



La Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia

Tiene el honor de invitarle a la toma de posesión como
Académico Correspondiente del

Dr. D. Julián Castillo Sánchez

La conferencia de recepción versará sobre

Estudio de la relación estructura molecular-actividad de los flavonoides a través de la colaboración Universidad-Industria

El conferenciante será presentado por la
Ilma. Sra. D^a María Trinidad Herrero Ezquerro
Secretaría General de esta Institución

La Secretaria General,
María Trinidad Herrero Ezquerro

Lugar:
Salón de Actos de la Real Academia de Medicina y Cirugía.
Plaza Preciosa, s/n Edif. Museo Arqueológico

Día: Miércoles, 5 de febrero de 2014

Hora:
19:30 horas

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de la Región de Murcia,

Excma. e Ilma. Sra. Secretaria General

Excmos. e Ilmos. Sres. Académicos

Excmas. e Ilmas autoridades

Familiares y amigos, Sras y Sres,

Hoy es para mí un día muy especial, en el que una mezcla de profunda satisfacción, sentido agradecimiento y honda preocupación se engloban en mi pensamiento. Satisfacción y, sobre todo, respeto y gratitud, porque ser recibido en una corporación como ésta constituye un honor al que nunca me habría considerado ser merecedor. Por ello, quiero expresar mi más emotivo agradecimiento a quienes me juzgaron y decidieron otorgarme este reconocimiento, y permítanme que lo haga de forma particular a los Doctores D^a María Trinidad Herrero Ezquerro, D. Manuel Clavel Sainz-Nolla y D. Tomás Vicente Vera, quienes me propusieron, a mi juicio con una elevada dosis de aprecio personal y no se si con la suficiente objetividad académica. Y permítanme, por ello, que les traslade también mi preocupación por lo difícil que me va a resultar estar a la altura intelectual que atesoran los miembros de esta Muy Ilustre y bicentenaria Institución creada en plena Guerra de la Independencia.

A pesar de que mi madre me enseñó a jugar al ajedrez desde bien jovencito, no supe hasta un poco más tarde elaborar una correcta apertura al mundo exterior desde las faldas de la pequeña mesa camilla en la que estudiaba. Físico de vocación, posible intento de estudiante de derecho y jugador de baloncesto o químico, fueron las diversas opciones de movimiento que, en un muy escaso periodo de tiempo, hube de elegir. Fue mi madre quien lo hizo por simples razones familiares y a su decisión debo haber estudiado química y, tal vez por ello, estar aquí. Salí de Albacete tras un verano seco y severo y un invierno anterior con algo más de 20º bajo cero, según constaba en los escritos de las viejas cabañuelas de mi abuelo, y llegué a una tierra cálida y llena de vida, que me ha dado todo cuanto tengo y soy, y a la que quiero y siento como mía propia.

Han pasado ya treinta y dos años desde que terminé mis primeros estudios universitarios de química orgánica y desde que dejé de asaltar la ventana de la residencia de mi querida esposa con los alegres “tanneres e trovares” de mi vieja y “sin par” tuna del Colegio Mayor Cardenal Belluga. No pretendo hacer aquí una glosa diferenciadora de la antigua frente a la moderna concepción de la Universidad, pero sí que me gustaría considerar la trascendencia que tuvo para muchas generaciones de universitarios, entre ellas la mía, la vida en mi Colegio Mayor, algo que, dicho con un convencimiento nutrido de cierta tristeza, no contempla la realidad universitaria de hoy.



Siguiendo recientemente por televisión la reposición de la vida de nuestro Nóbel Severo Ochoa, recuerdo con atención un momento que tal vez paso inadvertido para muchos, pero que para mí marca sin duda la trayectoria de este insigne investigador. Don Severo continuó sus estudios de Medicina en Madrid en 1927, y recuerda con placer y satisfacción su enorme alegría al poder residir, hasta la conclusión de los mismos, en 1929, en la prestigiosa “Residencia de Estudiantes”, en la que fue compañero de grandes intelectuales y artistas de la época, como García Lorca y Salvador Dalí, entre otros muchos. En ese momento no pude por menos que recordar mis años colegiales (77-82), en los que compartí pasillo, comedor, biblioteca, y más de una cerveza con tapa en el bar de Manolo, con mis 150 compañeros y una amplia historia a hombros de aquellos muros.

Tuve el privilegio de poder conocer de cerca, gracias a mi responsabilidad en la dirección del Mayor, a los, para mí, dos mejores rectores de la Universidad de Murcia,

Don Francisco Sabater y Don José Antonio Lozano Teruel; he compartido mesa, mantel, café, petardos,... con grandes hombres de la ciencia, Grisolía, Mayor Zaragoza, Grande-Covián, Parrilla, etc., también de la política, en una época ciertamente activa en este ámbito y de muchas áreas de la cultura, el deporte, etc. De hecho, creo que mi primer contacto experimental con los electrones desapareados tuvo lugar en el Mayor, arreglando los fusibles de la habitación de Don Santiago Grisolía, hábilmente sabotada por algún pérfido malandrín.



Este “maremagnum” de experiencias, de diálogos y de vivencias constituirá, para siempre, una piedra angular en mi desarrollo personal. Hoy miro hacia atrás y también, como Don Severo, siento la satisfacción de haber podido escuchar, aprender y compartir experiencias que me hicieron cambiar como persona. Pasillos compartidos con compañeros cursando muy diferentes disciplinas académicas me ayudaron a configurar mi capacidad de colaboración y de ser capaz de relacionar datos y conocimientos.

Muchas gracias a todos aquellos amigos y colaboradores que han influido e influyen en mi vida y, en especial, a algunos que supieron trasmitirme la cultura de la disciplina y del esfuerzo, del trabajo bien hecho y del respeto al individuo y a la ciencia, en un estímulo constante de superación personal, manteniendo siempre viva la llama de la curiosidad. Gracias a muchos de ellos por acompañarme en este, para mi, solemne momento.

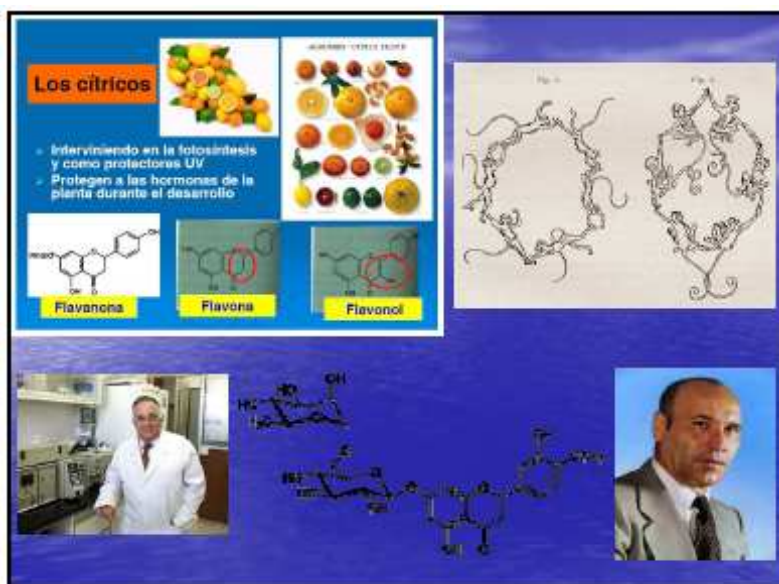
Cierro momentáneamente, este largo apartado de recuerdos y agradecimientos, y como bien dice mi hijo Álvaro, “papa tu nunca dices nada, por eso, hoy también lo repites”, y así debo expresar todo mi amor y gratitud a quienes comparten diariamente conmigo mis éxitos y mis fracasos, a quienes sostienen con su paciencia, comprensión e inmenso amor, mi propia ilusión y espíritu de trabajo, cualquier cosa buena que haya hecho en la vida ha sido gracias a la abnegación y al sacrificio de Flory y de mis hijos Juan Pedro y Álvaro.



Para una ocasión tan especial como la de hoy, no me ha parecido oportuno construir una conferencia estrictamente científica, es más, sentiría cierto sonrojo al hacerlo rodeado de tantos científicos de los que he aprendido con humildad. Mi discurso tratará de ser una pequeña narración cronológica de los principales logros conseguidos en la estudio de la relación estructura molecular-actividad fisiológica de los flavonoides, conjugada con la mención y agradecimiento a todos aquellos que la han hecho posible. Espero que esta dicotomía “estructura-actividad”, que para mí constituye una pequeña obsesión, no se convierta para Uds, a lo largo de este discurso, en una cansina cacofonía. Finalmente, intentaré exponer unas sencillas reflexiones sobre como creo que debería ser la relación Universidad-Industria, o ciencia y producción, como Uds prefieran, y sin la cual nunca podríamos haber realizado estos descubrimientos.

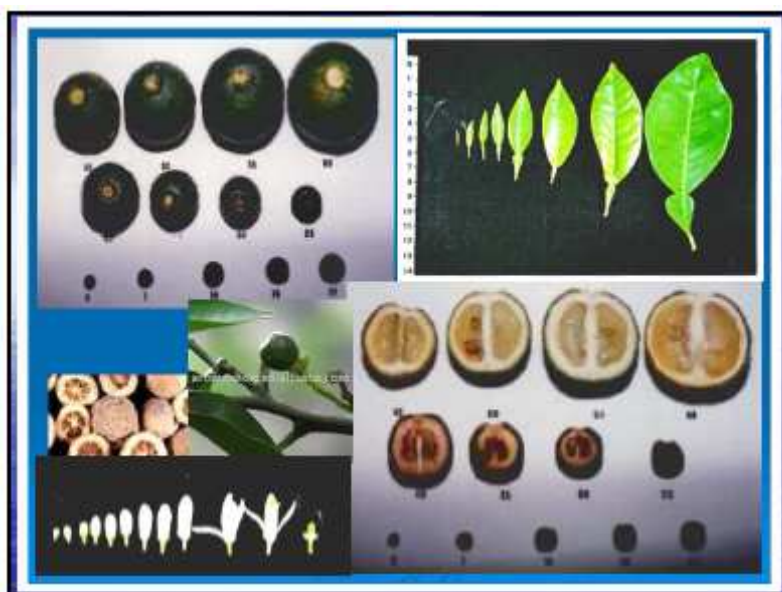
BIOSINTESIS DE FLAVONOIDES

Una de mis mayores sorpresas y satisfacciones, cuando en 1983 comencé a trabajar con flavonoides en el mundo industrial, fue la de saber que podría aprender y compartir de nuevo “mesa y mantel” con los Profesores y Rectores Sabater y Lozano Teruel. Si algo aprendí de ellos en aquel momento fue, del Rector Sabater, la lucha incansable para intentar conseguir todo aquello que teóricamente podría ser posible, y sobre todo la idea grabada a fuego de medir todo lo que hiciese, ¿has medido todo Julián, has medido?. Su persona representa para mí un recuerdo imborrable. Del Rector Lozano Teruel, aún no he acabado de aprender, es imposible, cada cosa que hace nos proporciona un nuevo ejemplo de docencia, de sentido común y de responsabilidad personal y científica.

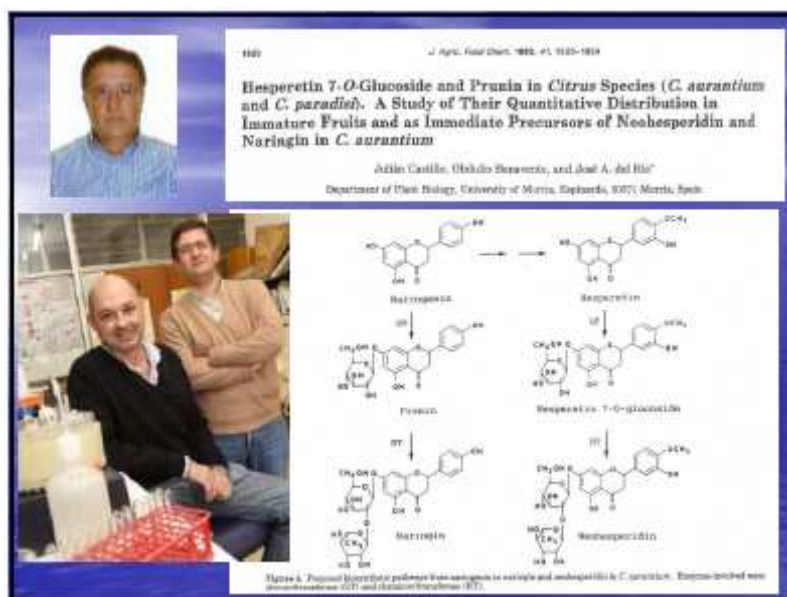


Nunca podré valorar lo suficiente la oportunidad de poder manejar casi a diario, micromoles y toneladas de una misma cosa, lo que me proporcionó los primeros mecanismos para poder tener una visión global y simultánea de lo que debería significar la colaboración y el trabajo conjunto Universidad-Industria. El año 1985 también fue afortunado para mí, pues en mi andadura profesional comenzó a funcionar un equipo de trabajo que aún hoy se mantiene y que espero que se prolongue hasta que las leyes naturales o las de los hombres nos jubilen. Casi 29 años trabajando codo con codo con el Dr. Obdulio Benavente-García, solo puedo decir, con sencillez y humildad, que mi trabajo es igualmente suyo.

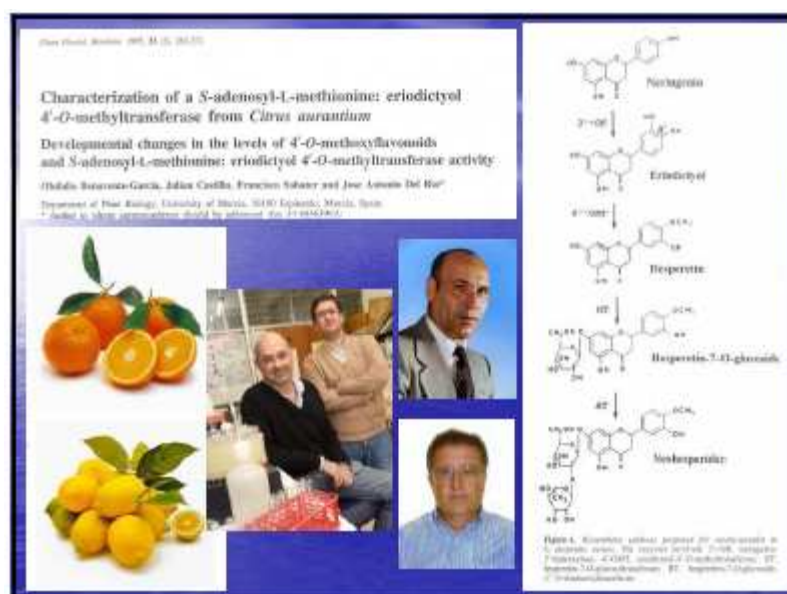
Permítanme, Señoras y Señores, que haga un pequeño recordatorio y pida una, no sé si sincera, disculpa. Vamos a entrar en el mundo de los conocidos “productos naturales” y del estudio de su potencial eficacia para la salud humana, pues bien, los productos naturales no son entes abstractos bondadosos y pluripotentes, son, sencillamente, combinaciones heterogéneas de moléculas potencialmente bioactivas, nada más, ni nada menos. Y quiero pedirles disculpas por el uso, y tal vez abuso, de fórmulas químicas en este discurso, a las que Flory llama “niditos de abeja”, lamento tan profundo defecto que los químicos nunca seremos capaces de corregir.



Al iniciarse la década de los 90, uno de los primeros retos en busca del conocimiento efectivo de la estructura molecular de los flavonoides no fue el de la relación de ésta con su actividad, sino con su biosíntesis. La ubicuidad de estos polifenoles en el reino vegetal generaba múltiples posibilidades de rutas biosintéticas características de cada familia de plantas superiores. Nuestro objetivo, tras haber aprendido a extraer de los cítricos cantidades ingentes de flavonoides, es decir toneladas, fue descender a los abismos microscópicos y moleculares e intentar averiguar como la madre naturaleza gestaba estos compuestos. Nuestro material vegetal de estudio no pudo ser otro que la naranja y, en concreto, nuestro querido y murciano naranjo “borde”, a la sazón, conocido botánicamente como *Citrus aurantium* “naranja de Sevilla”.



Los cítricos son, sin duda, el género vegetal que mayores cantidades de flavonoides acumula en su estructura y, generalmente, en forma de compuestos glicosilados, es decir, acompañados por moléculas de monosacáridos, sobre todo ramnosa y glucosa. Por aquel entonces, existían dudas de si estos glucósidos se formaban en primer lugar a partir de un esqueleto “madre”, la naringenina, mediante la acción de determinados enzimas glicosilantes y, después, se producían las diversas reacciones de hidroxilación, metilación, etc que generaban el resto de flavonoides, o si por el contrario éstas reacciones sucedían en primer lugar y, posteriormente, se producía la glicosilación.



La gran mayoría de autores consideraba que la biosíntesis sucedía de acuerdo con la primera hipótesis, sin embargo, nuestros estudios, con una cierta rebeldía consolidada, demostraron que los procesos de hidroxilación y/o metilación de naringenina se producían antes que la glicosilación. La identificación y cuantificación en tejidos vegetales inmaduros de los glucósidos de naringenina y hesperetina, así como el aislamiento y caracterización del enzima 4'-O-metiltransferasa, por primera vez en esta especie, constituyeron los pilares básicos de nuestro nuevo planteamiento, que ha sido confirmado, posteriormente, por múltiples investigadores.

PRIMEROS PASOS FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

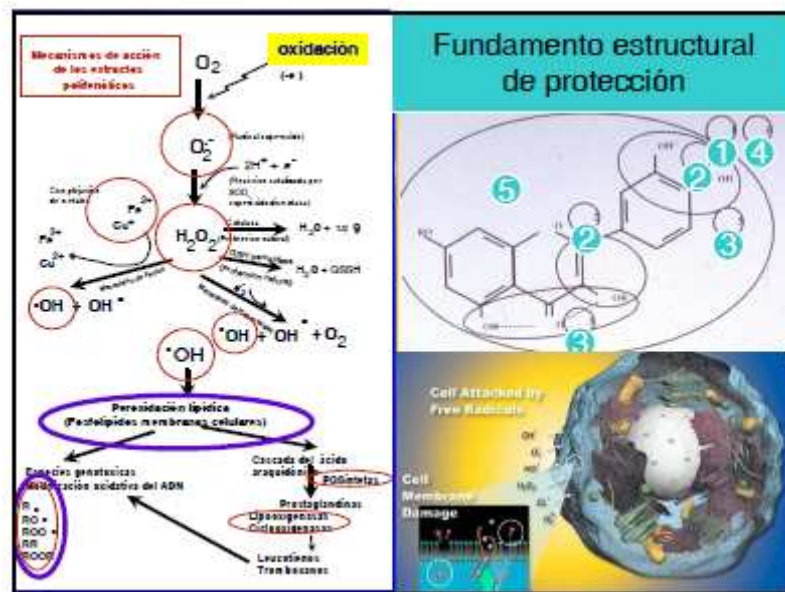
Con la llegada del nuevo siglo, ¡qué extraño me resulta decir esto!, inicié un nuevo e ilusionante proyecto industrial y con él, llego también la necesidad de comenzar a comprobar cómo podrían actuar esas moléculas cuya biosíntesis habíamos conseguido elucidar. La puerta que debíamos atravesar se llamaba “entender en que consiste realmente el estrés oxidativo”.



El estrés oxidativo está considerado como una de las llamadas “enfermedades” de nuestro tiempo, el desarrollo de la acelerada vida a la que estamos sometidos parece conducir a nuestro organismo a un cierto desequilibrio entre nuestras defensas y la denominada “oxidación”. Pero, este concepto no solo puede atribuirse al efecto provocado en el ser humano por el paso del tiempo en unas determinadas condiciones ambientales, empieza a resultar evidente que se trata también de un factor potencialmente determinante del origen y evolución de más de un centenar de patologías, que abarcan desde los trastornos cardiovasculares hasta las enfermedades neurodegenerativas.

Las reacciones de oxidación-reducción tienen una amplia distribución en la naturaleza y, obviamente, en las células de nuestro organismo, en cuyas mitocondrias radica el foco principal de estas reacciones y de la generación de especies radicales libres oxigenadas. No obstante, no olvidemos que también se generan por la acción de factores medioambientales que nos rodean de forma habitual o esporádica, contaminación, radiación, e incluso, la propia alimentación.

Rebeca Gerschman describió en 1962 una teoría general de los potenciales efectos tóxicos de ciertas especies oxigenadas que, posteriormente, amplió hasta construir una teoría general del envejecimiento. Teoría que, no como tal, pero si como un elemento importante de ella, aparece confirmada este mismo año en la última gran revisión sobre el tema, publicada en la prestigiosa revista Cell, “The Hallmarks of Aging”, cuyo autor principal es el científico español más prestigioso en la actualidad, el profesor Carlos López Otín.



A través de diversos estudios en el campo del envejecimiento, se ha podido ampliar el conocimiento de los procesos de oxidación celular y, por ende, de la potencialidad fisiológica de diversos agentes, que pueden ir desde la propia dieta hasta la suplementación preventiva y/o terapéutica de ciertos compuestos específicos de origen natural. A lo largo de la historia de la humanidad y en múltiples civilizaciones, el envejecimiento y la muerte se han asociado a lo sobrenatural, los papeles de médico, mago y sacerdote se encontraban muy próximos y la creencia en la inmortalidad o en la eterna juventud se ha repetido a lo largo de los tiempos. Algunas de esas civilizaciones han intentado lograr un perfecto equilibrio entre cuerpo y espíritu, otras en cambio han buscado alguna “sustancia milagrosa”. Aún hoy parece que buscamos ambas vías, lo que sí puedo garantizar es que los mal llamados antioxidantes, cuya actividad fisiológica puede llegar a ser realmente importante en diversos aspectos relacionados con la salud, no son esa “sustancia milagrosa” ni, por supuesto, tampoco creo que sean el “diablo vestido de molécula”.



De cualquier modo, aunque en función de los resultados de un buen número de estudios epidemiológicos, pueda resultar evidente la aparente potencialidad de dichos compuestos, es necesario trabajar con profundidad en este campo, en el que se mezclan actividades muy diferentes, que van desde la captación o bloqueo de ciertos radicales libres, hasta la regulación de la actividad proteica, ya sea por vía directa o epigenética.

El estudio sobre el origen, obtención, propiedades físico-químicas, metabolismo, biodisponibilidad, etc, de estos compuestos juega un papel necesario y fundamental para comprender esta potencialidad y poder aplicarla con eficacia. Son muchos los compuestos que parecen mostrar dicha potencialidad *in vitro* y, sin embargo, muy pocos demuestran una realidad contrastada cuando se aplican en ensayos específicos o en estudios epidemiológicos.

El análisis y búsqueda de la relación entre la estructura molecular y la actividad de estos compuestos en cada aplicación específica es, pues, absolutamente necesario, no solo para comprobar el verdadero mecanismo a través del cual podrían ejercer su acción “protectora”, sino también como base molecular útil en el diseño de compuestos cada vez más eficaces. Lo que inicialmente es un debate entre física y química, se convierte en una compleja tertulia que incluye a la Biología, disciplina científica en sí misma, tal y como describe el Profesor emérito de la Universidad de Harvard, Ernst Mayr. Estos mecanismos de actuación son relativa o significativamente diferentes entre sí, tanto en los diferentes procesos que acompañan al envejecimiento fisiológico, como en cada una de las patologías en las que pudieran intervenir.

Flavonoides: física, química, biología, todas...???????

¿Química?

¿Física?

$B > D > C > A$

$A \gg B > D > C$

[illegible]

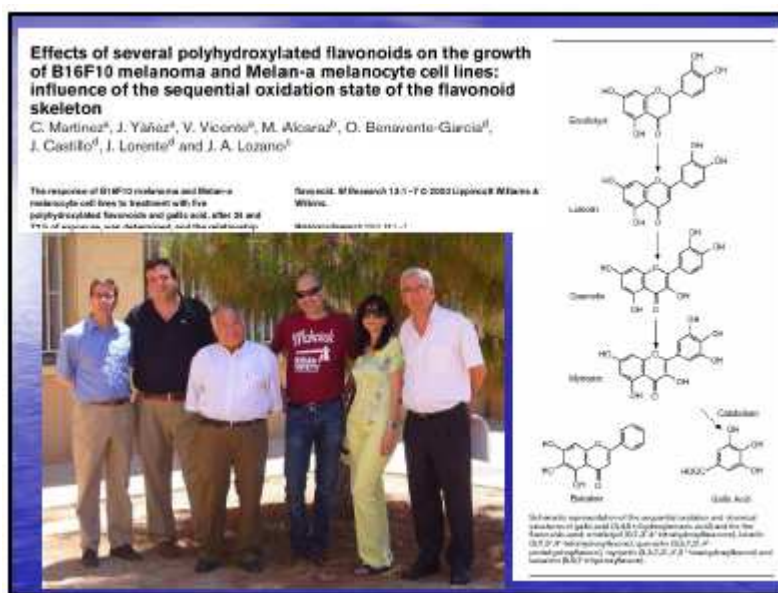
Entre los diversos flavonoides presentes en la naturaleza, los contenidos en la semilla de uva, las procianidinas, también mal llamadas “taninos conjugados”, mostraban una asombrosa capacidad para captar estos radicales en modelos in vitro, sin embargo, la heterogeneidad y complejidad de sus estructuras incrementaba la dificultad en la interpretación de sus mecanismos de actuación.

Tras un importante esfuerzo para separar y aislar los distintos grupos de moléculas presentes, y en función de los ensayos llevados a cabo, in vitro e in vivo, pudimos concluir que la capacidad radioprotectora de estos compuestos se encontraba íntimamente ligada y era cuantitativamente consistente con su grado de polimerización, es decir, con el número de moléculas “madre” de catequina y epicatequina enlazadas entre si. La clave principal para interpretar estos resultados no solo radicaba en el incremento de la capacidad de captación de radicales, sino, y tal vez sobre todo, en la generación, después del proceso, de radicales flavonoides mucho más estables, capaces de detener, por si mismos, la cadena radical oxidativa.

Adicionalmente, estas investigaciones sirvieron también para demostrar que la actividad anticlastogénica de este tipo de moléculas, con ciertos grupos hidroxilo estratégicamente situados en su estructura, era muy superior a la de los compuestos azufrados, con grupos funcionales tiol, ya empleados en ciertas terapéuticas clínicas de radioprotección. Esta línea de estudio no había hecho más que comenzar.

PROPIEDADES ANTICARCINOGÉNICAS

Los flavonoides también han suscitado interés en su aplicación como potenciales agentes anticarcinogénicos. Este tema, que para mí tiene un especial interés personal, debía ser tratado con la mayor seriedad y escurpulosidad científicas. El trabajo iniciado en 1999 con el equipo del Profesor Vicente Vicente Ortega sobre diferentes líneas celulares de melanoma, cáncer de próstata y colon, es un claro ejemplo de ello.



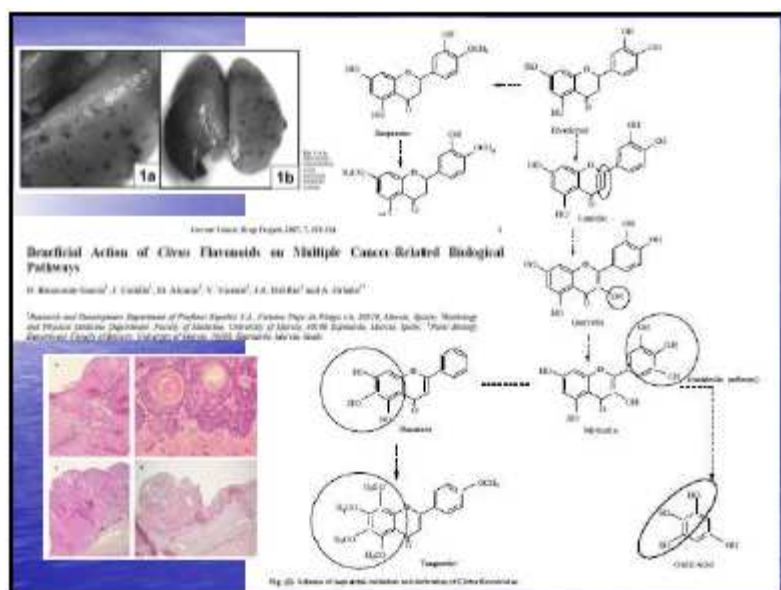
Señoras y señores, desde un punto de vista estrictamente estructural, objeto de este discurso, pudimos llegar a las siguientes conclusiones:

Existe una correlación directa entre el estado secuencial de oxidación molecular de los flavonoides y sus efectos antiproliferativos.

La presencia en el esqueleto flavonoide de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, que confiere al compuesto una estructura más planar, incrementa de forma significativa la capacidad de inhibir la proliferación celular.

La presencia en el esqueleto flavonoide de, al menos, tres grupos hidroxilo adyacentes, confiere a éste una capacidad antiproliferativa superior.

Si los tres grupos hidroxilo adyacentes están esterificados con grupos metilo la capacidad de inhibición es aún mayor.



Estas conclusiones estructurales, publicadas por primera vez hace ya más de diez años, han sido confirmadas recientemente, en otros flavonoides similares, por otros investigadores de nuestra región, lo cual constituye, ante todo, una clara satisfacción científica, a pesar de que, estoy seguro de que por un desafortunado olvido, no se hayan mencionado nuestros trabajos precedentes, como así aconsejan las buenas prácticas en el manejo de la bibliografía.

Adicionalmente, después de doce años de investigaciones acerca de la actividad de ciertos flavonoides y polifenoles sobre diversas líneas cancerosas, hemos podido extraer dos grandes conclusiones:

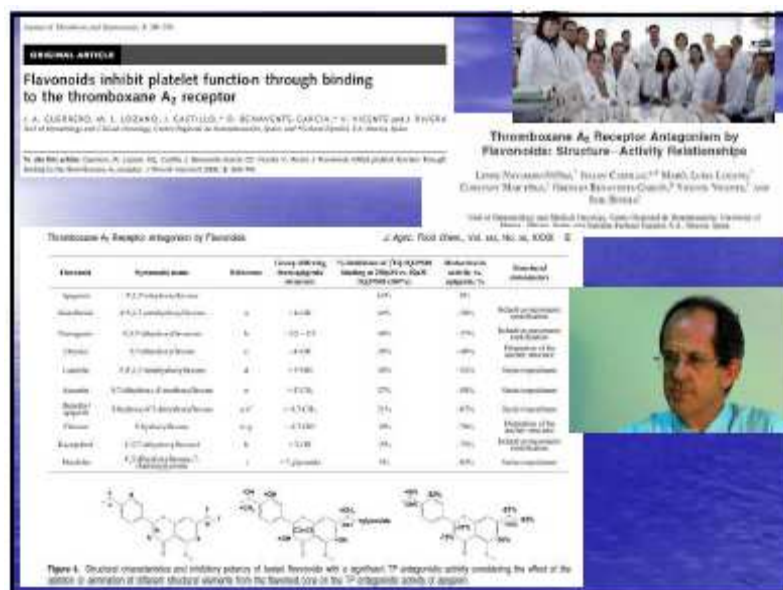
Que este tipo de compuestos naturales, solo son capaces de actuar con efectividad, a nivel fisiológico, como captadores de radicales libres lipoperoxi, resultado del efecto global y concatenado de oxidación; radicales que no son, en absoluto, cáncer-protectores, sino pro-cancerosos y su “bloqueo” podría evitar, precisamente, la cascada oxidativa que termine por dañar al ADN.

Y que los estudios sobre activos aislados a partir de productos naturales y cáncer, han mostrado cierta eficacia y buenos resultados iniciales, in vitro e in vivo, con moléculas que no son compuestos antioxidantes, sino que actúan a través de su capacidad citotóxica, antiproliferativa y antimetastásica. Cuando se han ensayado in vivo han mostrado eficacia como agentes activadores de la fase II y como citotóxicos específicos, a través de mecanismos aún por determinar, y sin interferir con los mecanismos anticancerosos de naturaleza radical que emplea el propio organismo.

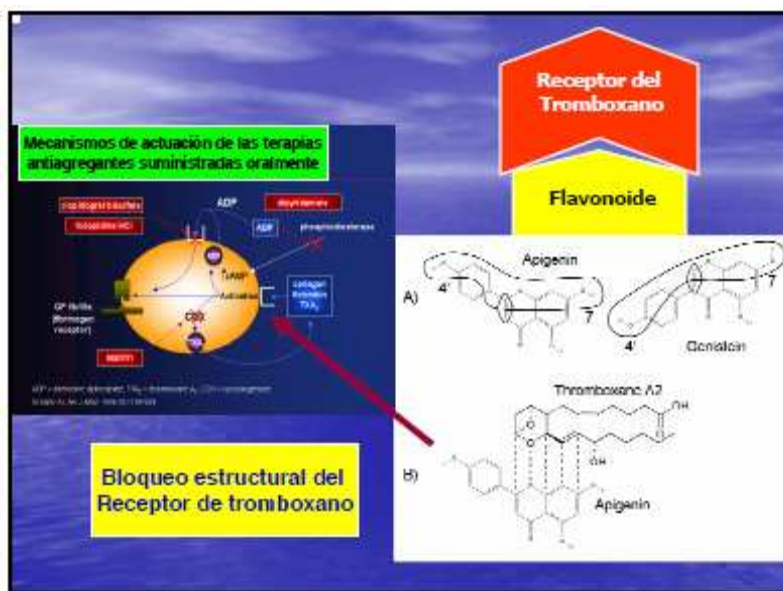
AGREGACION PLAQUETARIA Y TROMBOXANO

No hay duda de que uno de los campos de aplicación en el que los flavonoides han mostrado una mayor eficacia es el de la salud cardiovascular; sobre todo como vasoprotectores periféricos y reguladores de la función endotelial. Como tampoco hay duda de que las plaquetas están directamente implicadas en la homeostasis del sistema circulatorio, cumpliendo una misión fundamental, pero también pudiendo ocasionar trombosis y procesos inflamatorios diversos. Hoy en día existen intensos esfuerzos para el desarrollo de nuevos agentes antitrombóticos más eficaces y seguros.

En el año 2003 y a través de un gran amigo, el Dr. Javier López Sabater, tuve la inmensa fortuna de entrar en contacto con el equipo científico del Centro de Hemodonación, dirigido por el profesor Vicente Vicente García. Gracias a los trabajos desarrollados conjuntamente empezamos a entender que la potencialidad de algunos flavonoides era mucho más compleja y específica que lo que engloba la expresión general de “protectores cardiovasculares”.

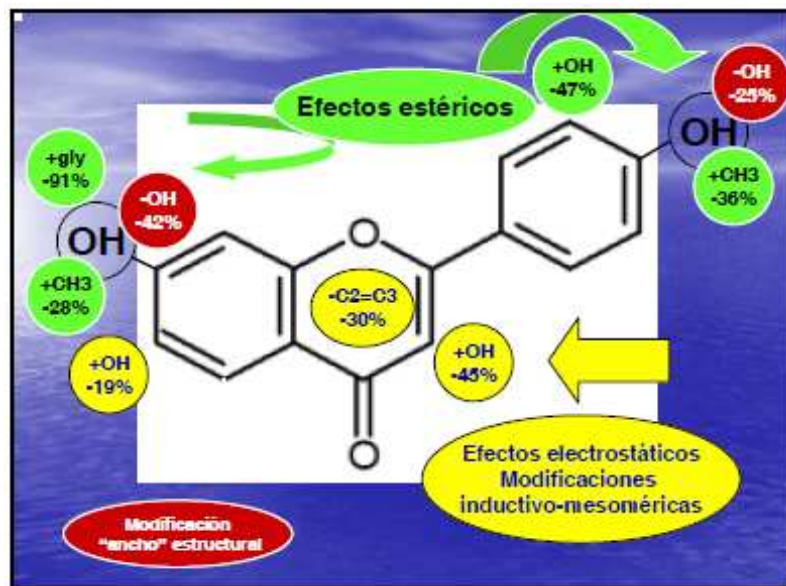


Nuestros estudios comparados, empleando un gran número de compuestos, demostraron la capacidad de algunos de ellos para competir con el Tromboxano A2 por el enlace con su receptor específico. Al mismo tiempo, nos permitió establecer cuáles eran las características estructurales que otorgaban a los flavonoides esa capacidad como antagonistas.



La flavona apigenina y la isoflavona genisteina, debido a la confluencia de todos los factores estructurales adecuados, mostraron la mayor capacidad como antagonistas. Si comparamos esa conformación molecular con ciertos elementos del Tromboxano A2, se nos revela una estrecha relación estructural próxima a una imagen especular, que podría justificar los efectos antagonistas sobre el receptor de membrana del Tromboxano A2 expresados por ambos flavonoides.

La presencia y/o ausencia de sustituyentes adicionales en el esqueleto flavonoide reducen de forma muy significativa, y diversa, la afinidad por el receptor. Impedimentos estéricos que provocan un incremento indeseable del volumen molecular, sobre todo en el caso de la glicosilación. Disrupciones del ancho estructural del flavonoide por eliminación de constituyentes esenciales. Modificaciones inductivas o mesoméricas que se producen por la eliminación o inclusión de ciertos elementos que alteran la disposición electrónica o la conformación espacial de la molécula en su interacción con el receptor.

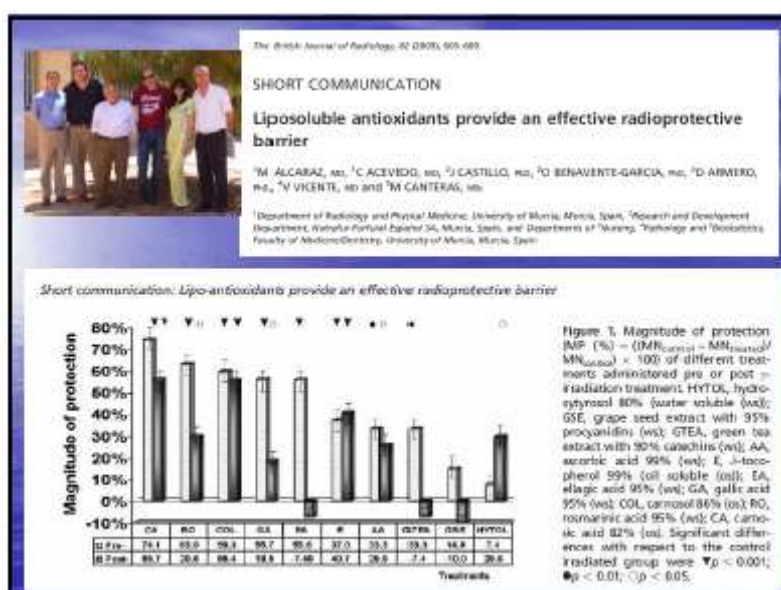


Todos estos datos, no solo proporcionan evidencias adicionales sobre la correlación entre las propiedades biológicas de los flavonoides y su estructura, sino sobre todo podrían ser útiles en el diseño de nuevos agentes antagonistas con efectos antitrombóticos.

¿UN CAMBIO DE PARADIGMA EN RADIOPROTECCIÓN?

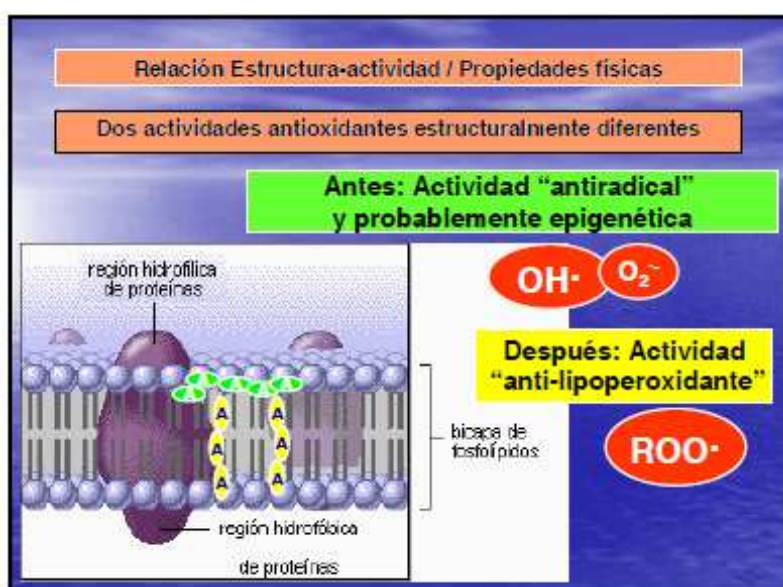
A mediados del año 2007, a raíz de los trabajos publicados por un buen amigo, el profesor Vicente Micol, sobre las interacciones entre algunos compuestos fenólicos y diversos modelos de membranas celulares, intentamos profundizar de nuevo en el comportamiento de diversos polifenoles en su actuación como genoprotectores celulares. Ya he mencionado que las radiaciones ionizantes causan una masiva generación de especies reactivas de oxígeno, induciendo procesos peroxidativos, lipoperoxi-radicales y daño al ADN celular. Esta citotoxicidad se incrementa al interactuar con los fosfolípidos de las membranas celulares y, bajo esas condiciones de desequilibrio oxidativo el uso de determinados agentes exógenos podría ser beneficioso.

Nuestra intención fue la de determinar con un ensayo celular específico y comparado, que características deben poseer determinados compuestos para ser considerados antioxidantes realmente efectivos frente a un estrés oxidativo muy intenso. Como agente “agresor” usamos de nuevo radiación ionizante gamma y como técnica de evaluación del daño genotóxico el test de micronúcleos, evaluando la reducción de la frecuencia de generación de micronúcleos en linfocitos humanos bloqueados citocinéticamente. Los compuestos estudiados pretendían representar a todas las grandes familias de los denominados “antioxidantes”, y todos ellos se adicionaron a la sangre a una misma concentración, fisiológicamente lógica y cinco minutos antes y después de la irradiación, que se realizó durante 40 segundos mediante una fuente Cs 137 a 2 Gy de intensidad.



Los resultados obtenidos sugerían mecanismos de protección diferentes en cada situación. Cuando los compuestos fueron añadidos antes de la irradiación, su capacidad radioprotectora-antimutagénica parecía estar basada en su eficacia a la hora de bloquear los radicales oxigenados primarios, con independencia de sus propiedades físico-químicas, sobre todo respecto a su polaridad molecular.

En cambio, después de la irradiación, en el medio celular solamente se encontrarían presentes lipoperoxi-radicales y se habría ya producido un incremento de secreción de enzimas lisosomales, liberación de ácido araquidónico y, en general, un incremento de la respuesta inflamatoria. Ante este panorama, los más potentes y populares antioxidantes solubles en agua, carecían de eficacia alguna y solo los compuestos de naturaleza lipídica o poco polar demostraron tener capacidad radioprotectora-antimutagénica.



De nuestro trabajo pudieron extraerse dos conclusiones que consideramos de interés general y que, en ciertos aspectos, podrían suponer un cambio de paradigma en la protección radiológica:

a) Solamente los antioxidantes liposolubles son capaces de proporcionar una protección efectiva en las condiciones más comunes de estrés oxidativo, cuando los radicales presentes mayoritariamente en estado estacionario son radicales peroxilo y no radicales oxigenados de tipo primario.

b) En la práctica médica habitual se asume que, para ejercer su acción protectora, las sustancias radioprotectoras deben estar presentes en el organismo previamente a la irradiación. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que algunas de las sustancias ensayadas también presentan una muy alta actividad radioprotectora aun administradas después de la irradiación, siendo más efectivas cuanto mayor es su lipo-solubilidad.

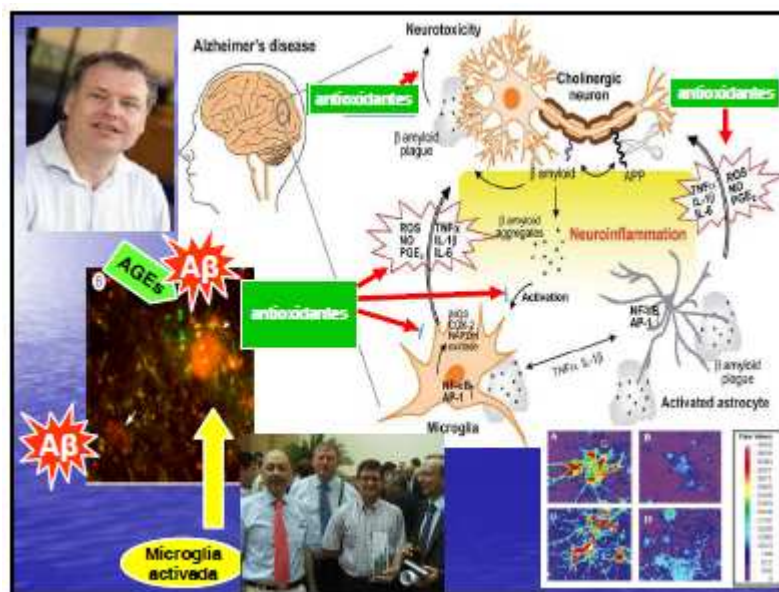
Este estudio fue enviado en primera instancia a la revista Lancet, siendo valorado muy positivamente, pero, amablemente rechazado por no tratarse de un ensayo clínico.

¿SUPERVIVENCIA NEURONAL?

El cerebro es uno de los órganos más sensibles a los efectos del estrés oxidativo y la consecuente peroxidación lipídica de las membranas, sobre todo por tres causas principales: contiene gran cantidad de ácidos grasos, consume un 20% de la fracción total de oxígeno del organismo cuando su peso es solo el 2% del cuerpo, a diferencia de otros órganos, dispone de una muy reducida actividad enzimática antioxidante que pueda neutralizar los radicales libres. Asimismo, el cerebro posee altos niveles de hierro en ciertas áreas que las hacen más susceptibles a procesos degenerativos.

De este modo, la combinación de estrés oxidativo y de procesos inflamatorios es deletérea para el tejido cerebral y se ha relacionado con la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. Todo agente exógeno que quiera ejercer alguna capacidad neuroprotectora deberá actuar directamente frente al estrés oxidativo, o bien, indirectamente, por supresión de la inflamación mediada por las células gliales.

Los trabajos desarrollados desde el año 2007 con los equipos de investigación de las Universidades James Cook y, actualmente, Western Sidney, dirigidos por un prestigioso especialista en Biología Molecular de la neurodegeneración, el profesor Gerald Muench, nos han permitido obtener una visión global de la potencial eficacia preventiva de algunos compuestos.

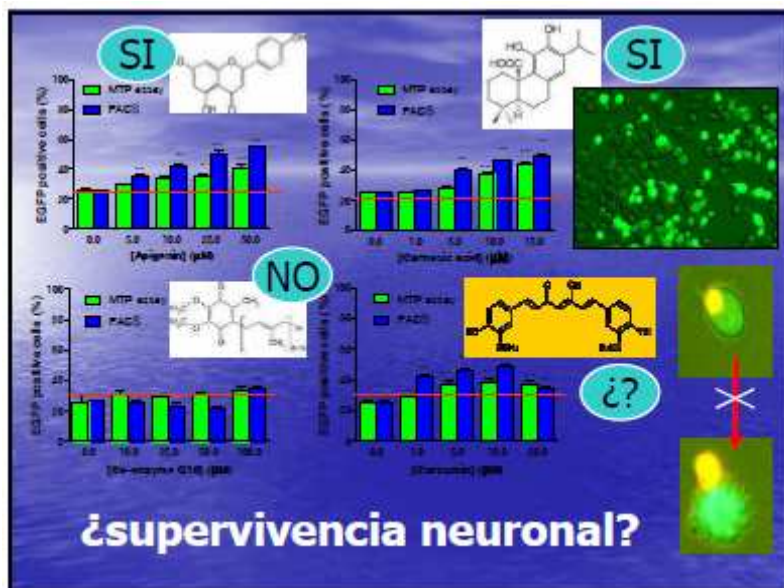


Hemos sido capaces de establecer una relación dosis-dependiente y de controlar los efectos nocivos de diversas sustancias sobre células del sistema nervioso central, para poder

tener una “regla de medida” y así evaluar correctamente la eficacia de los compuestos estudiados.

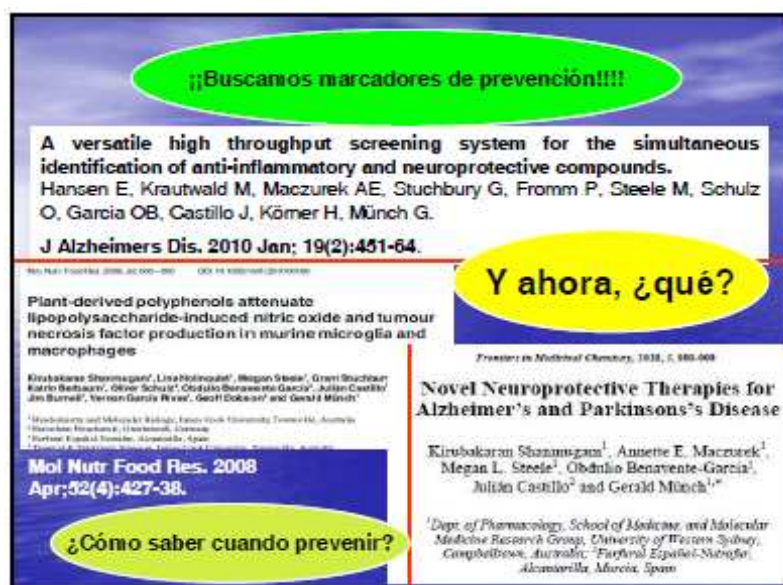
Hemos comprobado que algunos polifenoles y flavonoides son capaces de regular, también de forma dosis-dependiente, la generación del radical peroxinitrito, clave en el inicio de las agresiones oxidativas a las células del sistema nervioso central, así como detener la cascada inflamatoria que se desencadena en las primeras etapas de la agresión.

Hemos demostrado que el grado de protección de estos compuestos está directamente relacionado con su capacidad para regular y/ inhibir la producción de óxido nítrico, bloqueando, o aún más, regulando epigenéticamente la expresión del enzima óxido nítrico sintasa inducida.



Hemos podido establecer que ciertos flavonoides y polifenoles son capaces de mantener, de forma dosis-dependiente, la viabilidad, entendida como supervivencia, de neuronas N2A previamente tratadas con altas concentraciones de proteína β -amiloide y su cascada de agentes agresivos, protegiendo a las neuronas del ataque de células de microglía activadas.

Estas medidas de la viabilidad celular en cultivos conjuntos de neuronas y microglía empleando técnicas de marcaje florescente combinadas con citometría de flujo, han permitido la publicación y presentación por primera vez a nivel mundial de un nuevo modelo de test rápido y eficaz para identificar compuestos con potencial actividad neuroprotectora.



El potencial uso de productos naturales antioxidantes y/o antiinflamatorios como terapia preventiva o terapéutica en patologías neurodegenerativas podría ser, si va acompañado de la suficiente prudencia y responsabilidad científicas, de gran relevancia social y económica en futuros tratamientos de prevención o incluso de neurorescate, concepto que reúne las ideas de “mayor supervivencia” y “recuperación de actividad” del tejido neuronal remanente.

No olvidemos, que a pesar de los muchos avances realizados, la prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento está en continuo aumento. La mayor parte de ellas son multifactoriales, heterogéneas, genéticamente complejas y difíciles de diagnosticar, además, y éste es uno de los grandes objetivos de futuro, no disponemos en la actualidad de suficientes marcadores biológicos ni de diagnóstico precoz, ni de pronóstico.

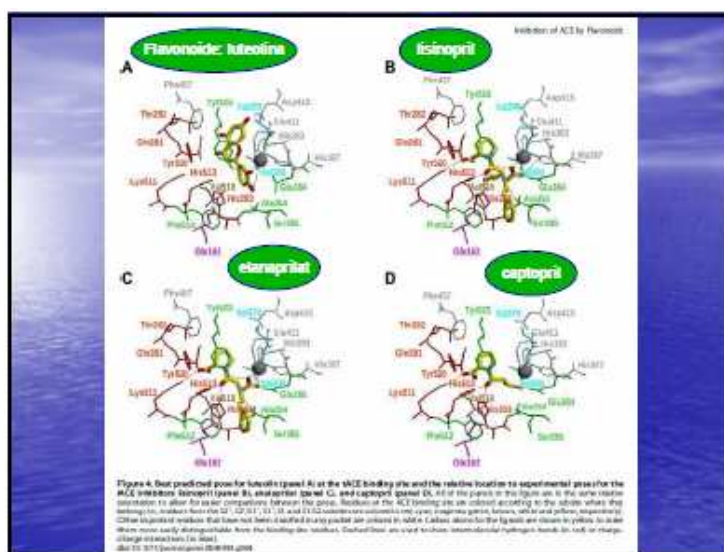
Ya saben Uds que las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de muerte en las sociedades industrializadas y que la hipertensión es uno de los mayores factores de riesgo. Diversos tratamientos farmacológicos pero, sobre todo, modificaciones en los hábitos de vida, incluida la nutrición, tienen efectos positivos en éste y otros factores de riesgo.

Figure 3. Structural diagram which quantitatively assesses the effect of the addition or elimination of different structural elements from the flavonoid core on the ACE1 activity of luteolin at 100 nM. According to these data, the significance index may be double (best C2=C3 linkage = 81% activity by comparing (cinnarutin) vs. apigenin) or >94% (methoxylation) (apigenin) or >94% by comparing dihydroxy vs. luteolin) or >94% (hydroxylation) (luteolin) or >94% by comparing apigenin vs. luteolin) or >94% (hydroxylation) (luteolin) or >94% by comparing quercetin vs. luteolin) or >94% (hydroxylation) (luteolin) or >94% by comparing rutin vs. luteolin.

26

un átomo de zinc. Sin embargo, estos estudios eran aislados y la relación estructura-actividad no había sido todavía caracterizada y establecida.

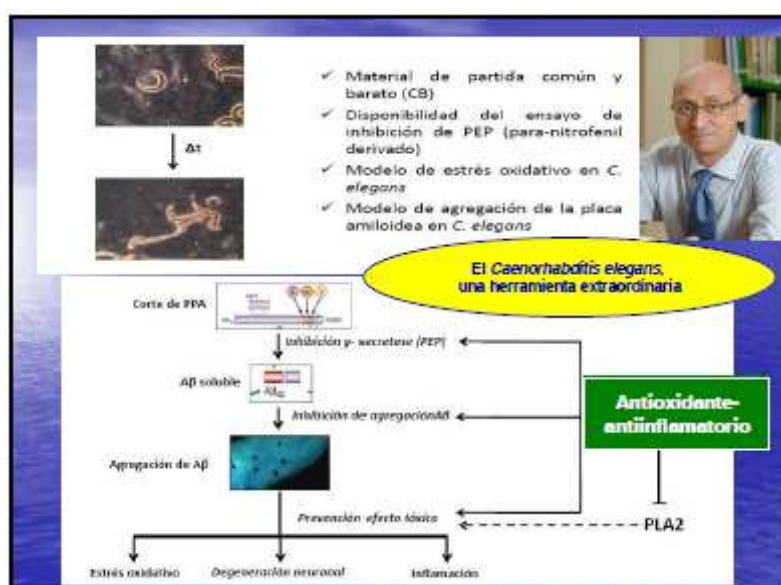
El estudio mostró una vez más, como no podía ser de otra forma, lo erróneo de emplear en la investigación científica criterios excesivamente generalistas. Hasta ahora se había sugerido “los flavonoides pueden actuar como IECAs”, pues bien, aunque varios resultados han sido prometedores, solo uno de los múltiples flavonoides estudiados, la luteolina, presentó un valor de IC₅₀ inferior a 25 μ M, límite fisiológico de concentración para considerar que una sustancia puede ser realmente útil en el organismo humano, más allá de una positiva y publicable entelequia in vitro. El correspondiente estudio estructura-actividad, mostró claramente cuál debía ser la combinación de características básicas del esqueleto molecular de un flavonoide para poder optar a ser un IECA: el grupo catecol en el anillo B; el doble enlace entre los carbonos C2 y C3 y el grupo cetónico conjugado en el carbono C4.



Para proporcionar una base molecular a estos resultados se realizaron estudios denominados de “docking molecular” proteína-ligando, mediante los cuales es posible pronosticar una conformación tridimensional de cómo actúa el compuesto en el interior del centro activo del enzima para lograr su inhibición. A través de este modelo es también posible establecer la influencia de los diferentes sustituyentes de la estructura del compuesto a nivel estérico e inductivo-mesomérico. De este modo, puede obtenerse la necesaria información molecular para el posterior diseño de fármacos más eficaces.

NUEVOS MODELOS DE EVALUACIÓN: PÉPTIDO β -AMILOIDE

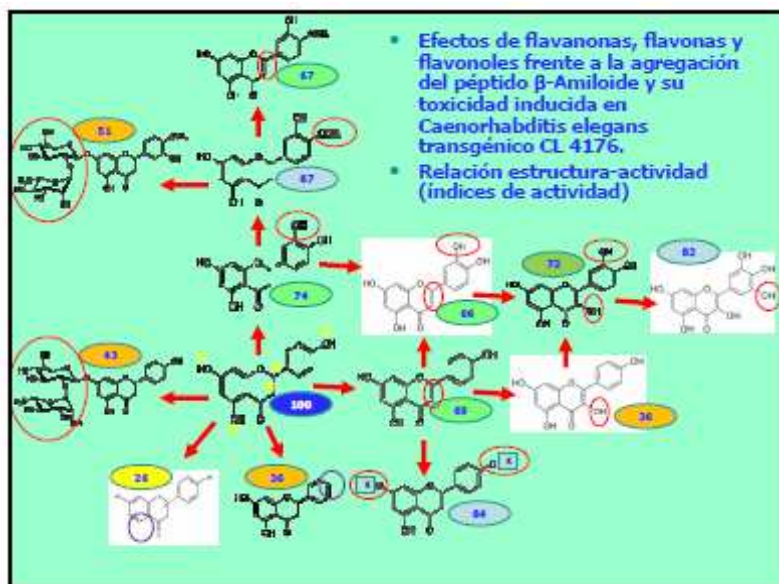
Desde la identificación del péptido β -amiloide como el principal agente citotóxico responsable de la progresión del Alzheimer, se han realizado numerosos intentos para reducir su producción, acumulación y, sobre todo, su agregación, considerada el verdadero evento patológico. Los primeros estudios realizados con flavonoides y que muestran una cierta capacidad real para inhibir esta agregación datan solo de hace menos de cinco años y, aunque sugieren algún tipo de mecanismo, no existe hasta ahora ni un solo estudio de estructura-actividad.



En el año 2008 tuve la fortuna de conocer al Dr. Daniel Ramón, con toda seguridad uno de los mayores expertos españoles en biotecnología y genómica. Tras trabajar conjuntamente en proyectos relacionados con el estudio y diseño de dietas e ingredientes para una correcta alimentación de las personas mayores, tarde pocos minutos en convencerle de que podríamos acometer un estudio estructura-actividad centrado específicamente en la inhibición de la agregación de la proteína-beta-amiloide, y así lo hemos hecho durante el pasado 2013.

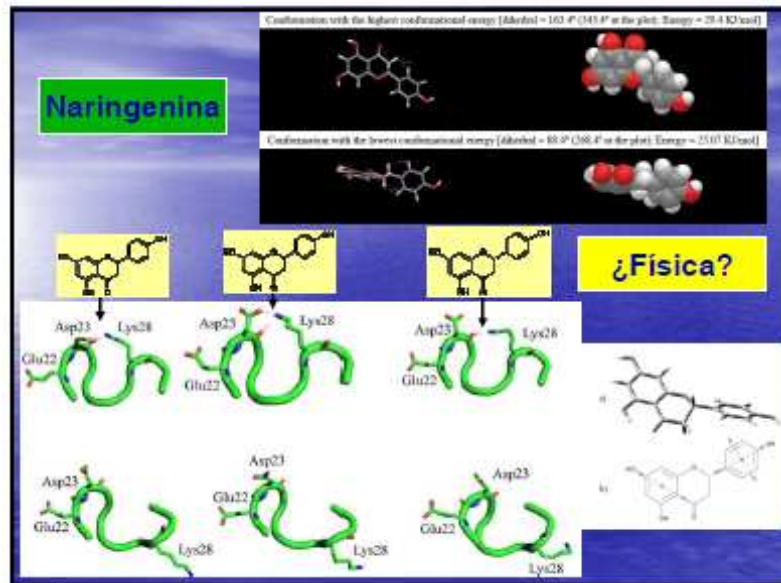
Hasta ahora se han empleado diversos modelos in vivo para estudiar el mecanismo de toxicidad del péptido amiloide y poder determinar estrategias terapéuticas efectivas. El modelo empleado en nuestro estudio ha sido el del nematodo, gusano, *Caenorhabditis elegans*, en concreto la línea transgénica CL4176 que, adecuadamente estimulada, genera de forma rápida una intensa acumulación del péptido A β 42, idéntico al del ser humano, en el interior de sus células musculares, provocando

una progresiva parálisis del animal. Los flavonoides empleados en el estudio se ensayaron a una concentración de 12,5 μM , absolutamente posible de ser alcanzada fisiológicamente en un ser humano.



Los resultados obtenidos en el estudio muestran una significativa e interesante capacidad protectora de algunos flavonoides. En concreto, la naringenina, fue capaz de inhibir en un 92% la expresión y/o agregación del péptido amiloide en el interior del nemátodo. Aunque aún no hemos podido determinar con la necesaria precisión cual de ambas acciones es la predominante, no es descabellado pensar pues que el “anclaje” y “bloqueo” de la agregación del péptido necesitaría específicamente la estructura y los puntos de anclaje que posee la naringenina. La adición de nuevos sustituyentes al esqueleto molecular disminuye de forma muy significativa la eficacia antiagregante: hidroxilaciones, metilaciones y, sobre todo, la glicosilación. Es muy destacable la negativa influencia de la desaparición de los hidroxilos en posiciones 5 y 7 y, en consecuencia, de los anclajes que éstos representan.

Desde el punto de vista de la “estructura espacial”, los resultados obtenidos por la naringenina y otros compuestos nos sugieren que existe una mayor eficacia de las flavanonas, con una estructura potencialmente no planar, digamos que se trata de un flavonoide “versátil y adaptable” a varios puntos de anclaje para bloquear mejor la agregación del péptido.



Solo a partir de 2010, algunos autores sugieren detalles atomistas del proceso. Las moléculas como los flavonoides desestabilizarían los oligómeros ordenados de péptido amiloide, debilitando los enlaces de hidrógeno entre las cadenas peptídicas, desagregando su capa exterior. Otros autores consideran que el mecanismo estaría más relacionado con la interacción con las fibrillas del péptido. Los flavonoides se unirían a los extremos de las fibrillas para bloquear la unión con un nuevo péptido entrante, e incluso para penetrar en el núcleo hidrofóbico y bloquear los enlaces entre los restos aminoácidos aspartato23-lisina28 a través de puentes de hidrogeno que impidiesen la agregación final de las fibrillas.

Señoras y señores, tal y como han podido comprobar, pacientemente, a lo largo de mi discurso, cada uno de los estudios de estructura-actividad que he expuesto nos conducen a conclusiones específicas y diferentes en cada patología, e incluso en los distintos factores que pueden intervenir en cada una de ellas. Se confirma la absoluta necesidad de evitar una incorrecta e inadecuada generalización científica en aspectos estructurales relacionados con la biología molecular en la fisiología humana.

LA RELACIÓN UNIVERSIDAD-INDUSTRIA

Sr. Presidente, Señoras y Señores, voy terminando y ahora es el momento de hacer una breve y humilde reflexión sobre lo reflejado en el título de esta conferencia, la colaboración Universidad-Industria y fíjense que no he empleado el término empresa, sino el de Industria, en un afán por manifestar y resaltar la mayor precisión del mismo, incluido el respeto que el propio término debe merecer.

De ningún modo puedo olvidar que ha sido gracias a la Dirección de mi actual empresa por lo que he podido desarrollar simultáneamente, desde el año 1998, una actividad industrial, investigadora y docente. Sin la comprensión y visión del Dr. Juan Lorente, y sin la colaboración de todo un equipo humano que ha ido creciendo año tras año, no hubiera sido posible. Éste es, sin duda, el primer y simple escollo que la colaboración entre estos dos mundos necesita y debe aún superar, entender que ambos se necesitan mutuamente, y que la dicotomía micromoles-toneladas, que aprendí hace ahora treinta años, no solo es un juego de palabras que despierta la sonrisa, sino un objetivo tangible e imprescindible, si es que queremos que nuestra sociedad siga progresando.



La secretaria de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación, la Dra. Carmen Vela, ha señalado hace pocas fechas que España todavía está "lejos" de tener un sistema de I+D+i "sano", por el escaso peso que tienen las empresas en la inversión en investigación, desarrollo e innovación total que se hace en el país. No hay duda de que en términos de inversión no le falta razón, pero, aparte de establecer lo que es una

obviedad numérica, ¿se ha preguntado el porqué, para intentar resolverlo? ¿Es que es posible que solo estemos viviendo un panorama español lleno de industrias irresponsables incapaces de darse cuenta de la necesidad de invertir en investigación? ¿No se desarrolla el tejido industrial español porque los empresarios constituyen una casta social ciega y aislada que es la única que no contempla la necesidad de la investigación? ¿Estamos asistiendo a una apoptosis de nuestro tejido industrial por falta de conocimientos, criterio y sentido común? No debería ser así y creo que no lo es, pero también es cierto que la industria española y la empresa en general debe enfocar de forma muy distinta su relación con la investigación y con los estamentos que la desarrollan en su mayoría.

Consideremos inicialmente algunos aspectos sin el ánimo de establecer una guerra de cifras. Hagamos una comparación entre España y dos de los motores de la investigación y la economía mundial, Alemania y Estados Unidos. Porcentaje de población universitaria: 4%, España; 2,2%, Alemania; 5,4%, USA; Número de investigadores por cada 10.000 trabajadores: 37, España; 60, Alemania; 81, USA. Porcentaje de profesores universitarios entre dichos investigadores: 54%, España; 27%, Alemania; 13%, USA. Porcentaje aproximado del PIB destinado a la investigación: 1,2%, España; 2,6%, Alemania; 2,9%, USA.

Sin demasiada perspicacia se extraen dos conclusiones: menor número de científicos, que en su mayoría pertenecen al sector público y muy escasa inversión global. Es evidente la absoluta necesidad de un mayor esfuerzo por parte del sector privado, tanto a nivel de la incorporación y presencia de más investigadores y técnicos en las industrias, como a la hora de afrontar con realismo y valentía los elevados costos de la investigación y el desarrollo.

Ahora bien, no es menos cierto que la industria necesita que la Universidad y los centros públicos de investigación sean interlocutores eficazmente válidos, en definitiva, hablen el mismo idioma en la I+D y, más todavía, en la situación actual. Como bien dice el Dr. Daniel Ramón, no hay dos ciencias, ciencia básica y ciencia aplicada, hay solo buena o mala ciencia y ese es un concepto primordial que todo investigador debe considerar. Nuestro país está repleto de grandes investigadores que deben evitar que la investigación científica se pueda convertir en una actividad solo de supervivencia endogámica a través de fondos públicos.

España cuenta con 1,6 millones de estudiantes universitarios distribuidos en 74 Universidades, unos 124.000 profesores universitarios y algo más de 11.000 investigadores y técnicos del CSIC. No olvidemos tampoco que, en ocasiones, no solo se trata de una cuestión de cantidad, sino también de criterio.



El mundo de la investigación debe descender con la humildad y sensatez propias de su condición a la necesidad de comprender cuales son las necesidades reales del mundo industrial, cual es la realidad productiva en un mundo globalizado y sumamente competitivo y realizar el necesario esfuerzo de comprender cuál debe ser, en cada momento, la velocidad en la innovación y solo, a partir ahí, se podrá construir conjuntamente un edificio de desarrollo sólido y con posibilidades de crecimiento. Como bien dice el Paleontólogo Prof. Ignacio Martínez, la ciencia es una empresa colectiva y no es el fruto del albur de hallazgos afortunados. A lo que yo añadiría, fruto del trabajo, la responsabilidad, la humildad y la curiosidad.

No soy quien, ni este es el momento y lugar para exigir al estamento político una mayor implicación en la consolidación de esta dicotomía Universidad-Industria. Estamos ya muy lejos de lo que la célebre frase de don Pío Baroja decía en 1904 sobre los políticos de la época: “españoles que viven gracias a que los demás no saben”, pero si que me gustaría que se diese forma real a la consabida frase mil veces repetida en los discursos políticos “hay que apostar por la I+D”.

“Las ideas son el motor de nuestra economía. Lo que nos hace diferentes. Cuando invertimos en las ideas antes que nadie, conseguimos que nuestras empresas y trabajadores tengan los mejores productos. No solamente atraemos a los mejores científicos del mundo, sino que continuamente invertimos en su éxito. Ayudamos a sus laboratorios y universidades para que aprendan y exploren. Financiamos sus proyectos de investigación para que puedan convertir sus sueños en realidades. Las inversiones en ciencia no siempre tienen retornos, pero cuando lo hacen cambian nuestras vidas de forma que no podíamos imaginar. No sabemos cómo será la vida dentro de 20 ó 100 años, pero lo que sí sabemos es que si seguimos invirtiendo en las soluciones más prometedoras para nuestros problemas más difíciles, las cosas mejorarán”.

Estas frases, pronunciadas recientemente por el Presidente Obama, son un claro ejemplo de lo que debe ser la participación y criterio político en la coordinación de las necesarias actividades que conduzcan al progreso social.

Lástima que en España no se escuchase con la suficiente atención y en el momento preciso a quién escribió lo que sigue hace ahora veinte años en plena euforia económica: “Realmente la situación española al respecto es inquietante. La actual bonanza del sistema económico español será solo una tapadera y un espejismo coyuntural si no se aborda ya, de una vez para siempre, el tema de la ciencia y la tecnología en España. A medio y largo plazo pueden ser nefastas las consecuencias si no se corrige la ceguera que viene dominando hasta ahora....estamos viviendo el sueño de que la economía se va a resolver con el turismo y el ladrillo...es un sueño a corto y medio plazo, lo único que importa es el esfuerzo productivo de verdad” (José Antonio Lozano Teruel, La Verdad, 1994).

Es más que evidente, pues, que la Universidad como ciencia y la industria como capacidad productiva, tienen la absoluta responsabilidad del entendimiento y el trabajo conjunto.

Señoras y Señores, termino ya. Aprovechando unas frases del Profesor Vicente Vicente García, Ilustre miembro de esta Institución, sobre la Medicina Académica, quisiera con su permiso adaptarlas y extrapolarlas a la trascendencia del papel que también deben jugar las Academias en el panorama expuesto.

Las Academias son centros con una trayectoria de años que está muy lejos de la improvisación, con unas reglas de funcionamiento claras y muy bien definidas. En la

sociedad actual, estas estructuras pueden y deben jugar un papel muy relevante, como “mentores”, en definitiva “maestros”, responsables de generaciones de profesionales en las cuales descansará la responsabilidad de llevar esta nave a buen puerto.

Según mis maestros, el éxito científico solo es fruto de la continuidad y del trabajo constante de años y la ciencia debe ejercerse con absoluta curiosidad, no exenta nunca de sentido y prudencia.

Muchas Gracias

REFERENCIAS

Alcaraz, M; De la Fuente, I; Castillo, J; Benavente-García, O; Lorente, J; Fonseca, G; Vicente, V. Efecto protector de procianidinas frente al daño genotóxico inducido in vivo por rayos X. Revista: Revista de Oncología, 3, suplemento 1, p 211. 2001.

Alcaraz, M; Acevedo, C; Castillo, J; Benavente-García, O; Armero D; Vicente, V; Canteras, M. Título: Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. The British Journal of Radiology. 82(979): 605-609. 2009.

Benavente-García, O.; Castillo, J; Sabater, F.; Del Rio, J.A. Characterization Of S-Adenosyl-L-Methionine: Eriodictiol 4'-O-Methyltransferase From *Citrus aurantium*. Plant Physiology And Biochemistry, 33:263-271. 1995.

Benavente-García, O.; Castillo, J; Marín, F.; Ortuño, A.; Del Rio, J.A. Uses And Properties Of Citrus Flavonoids. J. Agricultural And Food Chemistry, 45:4505-4515. 1997.

Benavente-García, O.; Castillo, J; Sabater,F.; Del Rio, J.A. 4'-O-Methyl Transferase From Citrus. A Comparative Study In *Citrus aurantium*, *C. paradisi* And Tangelo Nova. Plant Physiology And Biochemistry, 35 : 785-794. 1997.

Benavente-García, O; Castillo, J; Alcaraz, M; Vicente, V; Del Rio, JA; Ortuño, A. Beneficial action of citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. Current Cancer Drugs Targets. 7, 325-334. 2007.

Benavente-García, O; Castillo, J. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids. New Findings in Anticancer, Cardiovascular and Anti-inflammatory Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56, 6185-6205. 2008.

Berhanu, WM; Masunov, AE. Natural polyphenols as inhibitors of amyloid aggregation. Molecular dynamics study of GNNQQNY heptapeptidedecamer. Biophys Chem. 2010 Jun; 149 (1-2):12-21.

Bondy ML, Wang LE, El-Zein R, de Andrade M, Selvan MS, Bruner JM, Levin VA, Alfred Yung WK, Adatto P, Wei Q. Gamma-radiation sensitivity and risk of glioma. J Natl Cancer Inst 2001, 93: 1553-7.

Brownson, D.M.; Azios, N.G.; Fuqua, B.K.; Dharmawardhane, S.F.; Mabry T.J. Flavonoids effects relevant to cancer. Journal of Nutrition 2002, 132, 3482S-3489S.

Castillo, J; Benavente-García, O; Del Rio, JA. Naringin And Neohesperidin Levels During Development Of Leaves, Flower Buds And Fruits Of *Citrus aurantium*. Plant Physiology, 99: 67-73. 1992.

Castillo, J; Benavente-García, O; Del Rio, JA. Hesperetin 7-O-Glucoside And Prunin In Citrus Species *C. aurantium* And *C. paradisi*. A Study Of Their Quantitative Distribution In Immature Fruits And As Immediate Precursors Of Neohesperidin And Naringin In *C. aurantium*. J. Agricultural And Food Chemistry, 41:1920-1924. 1993

Castillo, J; Benavente-García, O.; Lorente, J.; Alcaraz, M.; Redondo, A.; Ortuño, A.; Del Rio, J. Antioxidant Activity And Radioprotective Effects Against To Chromosomal Damage Induced In Vivo By X-Rays Of Flavan-3-Ols (Procyanidins) From Grape Seeds (*Vitis vinifera*). Comparative Study Versus Other Phenolic And Organic Compounds. J. Agricultural And Food Chemistry, 48: 1738-1745. 2000.

Castillo J, Benavente-Garcia O, Del Bano MJ, Lorente J, Alcaraz M, Dato MJ. Radioprotective effects against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays as a function of polymerization grade of Grape Seed Extracts. J. Med. Food, 4: 117-123. 2001.

Dai, Q., Borenstein, A. R., Wu, Y., Jackson, J. C., Larson, E. B., Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. Am. J. Med. 2006, 119, 751–759.

Del Baño, MJ; Castillo, J; Benavente-García, O; Lorente, J; Martín-Gil, R; Acevedo, C; Alcaraz, M. Radioprotective-Antimutagenic Effects of Rosemary Phenolics against Chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma rays. J. of Agricultural and Food Chemistry, 54 (6): 2064-2068. 2006.

Del Rio, J.A.; Castillo, J; Benavente-García, O; Fuster, M.D.; Sabater, F.; Ortuño, A. Flavanones Biosynthesis And Its Modulation In Citrus. *Recent. Res. Devel. In Plant Physiol.*, 1: 55-66. 1997.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans M, Roberfroid M, Stahl W, Vin a-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British J Nutrition* 1998, 81: 79-98.

Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res* 1985; 147:29–36.

FitzGerald, G. A. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol* 1991, 68, 11B-15B

Fotsis, T.; Pepper, M.S.; Aktas, E.; Breit, S.; Rasku, S.; Adlercreutz, H.; Wahala, K.; Montesano, R.; Schweigerer, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Research* 1997, 57, 2916-2921.

Gilbert DL. Rebeca Gerschman: a personal remembrance. *Free Radic Biol Med.* 1996. 21(1):1-4.

Guerrero, JA; Rivera, J; Lozano, ML; Castillo, J; Benavente-García, O; Vicente, V. Caracterización de las bases terapéuticas del efecto cardioprotector de flavonoides: antagonismo del receptor de Tromboxano A2 plaquetario. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis.* 16, Suplemento 2, 26-27. 2004.

Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garcia O, Martínez, C; Vicente V, Rivera J. Antagonism of thromboxane A2 receptor plays a major role in the inhibitory effect of flavonoids in platelet function. *J. of Thrombosis and Haemostasis* 3, supplement 1, P0354. 2005.

Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garcia O, Martínez C; Vicente V; Rivera, J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J. of Thrombosis and Haemostasis*. 3(2): 369-76. 2005.

Guerrero, L, Castillo, J; Quiñones, M; García-Vallve, S; Arola, L; Pujadas, G; Muguerza, B. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE-I) activity by flavonoids. Structure-activity relationship. *Plos-One* Nov 2012 | Volume 7 | Issue 11 | e49493.

Hansen, E; Stuchbury, G; Fromm, Ph; Schulz, O; Benavente-Garcia, O; Castillo, J; Korner, H; Munch, G. Título: Development of a high throughput system for the simultaneous identification of anti-inflammatory and neuroprotective compounds. *Journal of Alzheimer's Disease*. 19(2): 451-464. 2010.

International Atomic Energy Agency. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. Technical Reports Series no. 405. Vienna, Austria. IAEA, 2001.

Jagota, S; Rajadas, J. Effect of Phenolic Compounds Against Ab Aggregation and Ab-Induced Toxicity in Transgenic *C. elegans*. *Neurochem Res* (2012) 37:40–48.

Kandaswami, C.; Lee, L.T.; Lee, P.P.; Hwang, J.J.; Ke, F.C.; Huang, Y.T.; Lee, M.T. The antitumor activities of flavonoids. *In vivo* 2005, 19, 895-909.

Kuo, S.M. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letter* 1996, 110, 41-48.

Kuntz, S.; Wenzel, U.; Daniel, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, Cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* 1999, 38, 133-142.

Larson, RL. Flavonoid-3'-O-methylation by *Zea mays* L. preparation. *Biochim. Physiol. Pflanzen*. 1989. 184, 453-460.

Lemkul JA, Bevan DR. Destabilizing Alzheimer's A β (42) protofibrils with morin: mechanistic insights from molecular dynamics simulations. *Biochemistry*. 2010 May 11;49(18):3935-46.

Lewinsohn, E; Berman, E; Mazur, Y; Gressel, J. (7)-Glucosylation and (1-6) rhamnosylation of exogenous flavanones by undifferentiated citrus cell cultures. *Plant Science*. 1989a, 61, 23-28.

Lewinsohn, E; Britsch, L; Mazur, Y; Gressel, J. Flavanone glucoside biosynthesis in Citrus. *Plant Physiology*. 1989b, 91, 1323-28.

Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y. et al., Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999, 20, 1945–1952.

López Otín, C; Blasco, MA; Partridge, L; Serrano, M; Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 153, 1194-1219. 2013.

Lozano Teruel, JA. *Ciencia contra la crisis*. 2001. ISBN 978-84-935839-8-9.

Luth, H. J., Ogunlade, V., Kuhla, B., Kientsch-Engel, R. et al.. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb. Cortex* 2005, 15, 211–220.

Macheix, JJ; Ibrahim, RK. The O-methyltransferase system of apple fruit cell suspension culture. *Biochim. Physiol. Pflanzen*. 1984. 179, 659-664.

Manthey, J.A.; Guthrie, N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 5837-5843

Martínez, C; Yáñez, J; Vicente, V; Alcaraz, M; Benavente-García, O; Castillo, J; Lorente, J; Lozano JA. Effects of several polyhydroxylated flavonoids on the growth of

B16F10 melanoma and melan-a melanocyte cell lines. Influence of the sequential oxidation state of the flavonoid skeleton. *Melanoma Research*, 13 (1): 3-9. 2003

Martinez, C; Vicente, V; Yáñez, MJ; Alcaraz, M; Castells MT; Canteras, M; Benavente-García, O; Castillo, J. The effects of the flavonoid diosmin, grape seed extract and red wine on the pulmonary metastatic B16F10 melanoma. *Histology and Histopathology* 20(4): 1121-9. 2005.

Martinez, C; Vicente, V; Yáñez, MJ; Alcaraz, M; Canteras, M; Benavente-García, O; Castillo, J. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin and diosmin. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17): 6791-97. 2005.

Martorell, P; Bataller, E; Llopis, S; Gonzalez, N; Álvarez, B; Montón, F; Ortiz, J; Ramón, D; Genovés, S. A Cocoa Peptide Protects *Caenorhabditis elegans* from Oxidative Stress and b-Amyloid Peptide Toxicity. May 2013 | Volume 8 | Issue 5 | e63283

Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., Yoshikawa, M., Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 1995–2000.

Mayr, E. Porqué es única la Biología. Consideraciones sobre la autonomía de una disciplina científica. Katz Editores. 2006. ISBN: 84-609-8356-0.

McIntosh, CA; Mansell, RL. Biosíntesis of naringin in citrus paradisi: UDP-glucosyltransferase activity in grapefruit seedlings. *Phytochemistry*, 1990, 29, 1533-38.

Menon, L.G.; Kuttan, R.; Kuttan, G. Inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells by polyphenolic compounds. *Cancer Letter* 1995, 95, 221-225.

Munch, G; Chandler, D; Benavente-García, O; Schultz, O and Castillo, J. Effects of plant-derived polyphenols on TNF release and nitric oxide production induced by advanced glycation end products. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, 141-150. 2010.

Navarro-Nuñez, L; Lozano, ML; Palomo, M; Martínez, C; Vicente, V; Castillo, J; Benavente-García, O; Diaz-Ricat, M; Escobar, G.; Rivera, J. Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation, and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 2970-2976. 2008.

Navarro-Núñez L, Castillo J, Lozano ML, Martínez C, Benavente-García O, Vicente V, Rivera J. Thromboxane A(2) Receptor Antagonism by Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *J Agric Food Chem*. 57(4): 1589-1594. 2009.

Pincemail J, Deby C, Lion Y, Braguet P, Hans P, Drien K, et al. Role of flavonoids in lipoperoxidation and radical reactions. "In: *Flavonoids and Bioflavonoids*" (Farkas L, Gabor M, Kallay F, eds.) *Proceedings of the 7th Hungarian Bioflavonoid Symposium*, Szeged, Hungary Elsevier Science Publishers, New York, 1986:423–36.

Prasad KN. Rationale for using multiple antioxidants in protecting humans against low doses of ionizing radiation. *Br J Radiol* 2005;78:485–92.

Popovic, M; Caballero-Bleda, M; Benavente-García, O; Castilo, J. Effect of the flavonoid apigenin on retention and extinction of passive avoidance response in rats. *Journal of Psychopharmacology*. 2013 Nov 27. PMID: 24284476.

Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D. et al., Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 2009, 8, 229–235.

Raymond, WR; Maier, VP. Chalcone cyclase and flavonoid biosynthesis in grapefruit. *Phytochemistry*. 1977, 16, 1535-39.

Rodriguez J, Yanez J, Vicente V, Alcaraz M, Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Lozano JA. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SKMEL-1 melanoma cell lines. Structure-activity relationship. *Melanoma Research*, 12: 99-107. 2002.

Scalbert, A.; Johnson, I. T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 2005, 81, 215S-2217.

Shanmugam, K; Holmquist, L; Steele, M; Stuchbury, G; Berbaum , K; Schulz, O; BenaventeGarcía, O; Castillo, J; Burnell, J; Garcia Rivas, V; Dobson; G; Münch, G. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 427-438. 2008.

Shanmugam, K; Maczurek, K; Steele, M; Benavente-García, O; Castillo, J and Munch, G. Neuroprotective mechanisms-Oxidative stress as a target for neuroprotective therapies in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Frontiers in Medicinal Chemistry.(BOOK)*. Bentham Science Publishers Ltd. 2010. ISBN: 978-1-60805-208-0; ISSN: 1567-2042.

Turek, J. W.; Halmos, T.; Sullivan, N. L.; Antonakis, K.; Le Breton, G. C. Mapping of a ligand-binding site for the human thromboxane A2 receptor protein. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 16791-16797.

Vicente García, V. La columna de la Academia. La Verdad de Murcia. Octubre 2013.

Wong, A., Dukic-Stefanovic, S., Gasic-Milenkovic, J., Schinzel, R. et al., Anti-inflammatory antioxidants attenuate the expression of inducible nitric oxide synthase mediated by advanced glycation end products in murine microglia. *Eur. J. Neurosci.* 2001, 14, 1961–1967.

Yañez J, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-Garcia O, Canteras M, Lozano JA. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutrition and Cancer*, 49(2): 191-199. 2004.