

# ANALES

## DE LA

# REAL ACADEMIA NACIONAL DE

# FARMACIA



**75**  
ANIVERSARIO  
1932 - 2007

**2007**

VOLUMEN LXXIII

Núm. 1

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

• 28004 MADRID



## ***In vitro* investigation of drug metabolism and toxicity in man**

Recibido el 1 de febrero de 2007

MARÍA JOSÉ GÓMEZ-LECHÓN<sup>A\*</sup> and  
MARÍA TERESA DONATO<sup>A, B</sup>

A) *Unidad de Hepatología Experimental, Centro de Investigación, Hospital La Fe, Avda. Campanar, 21, 46009-Valencia, Spain.*

B) *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Avda. Blasco Ibáñez 15, 46010-Valencia, Spain*

### **ABSTRACT**

The pharmaceutical industry is committed to marketing safer drugs with fewer side effects, predictable pharmacokinetic properties and quantifiable drug-drug interactions. Drug metabolism is a major determinant of drug clearance and interindividual pharmacokinetic differences, and an indirect determinant of the clinical efficacy and toxicity of drugs. From a commercial perspective, it is desirable that poorly behaved compounds are removed early in the discovery phase rather than during the more costly drug development phases. As a consequence, over the past decade, *in vitro*-based strategies in lead optimization screening in conjunction with ADMET screening studies have been incorporated earlier in the drug discovery

---

\* **Corresponding author:** María José Gómez-Lechón.

Unidad de Hepatología Experimental, Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe, Avda. Campanar, 21, E-46009-Valencia, Spain.

e-mail: gomez\_mjo@gva.es; Telf.: +34 96 197 30 48; Fax: +34 96 197 30 18.

**Abbreviations:**

ADMET: Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Toxicity.

EMA: European Agency for the Evaluation of Medicinal products.

FDA: Food and Drug Administration.

P450: Cytochrome P450 system.

phase. At present, the use of human *in vitro* hepatic models at early preclinical stages means that the process of selecting drug candidates is becoming much more rational. Several *in vitro* tools are available to address key issues at the earliest stages of drug development for a better candidate selection and hepatotoxicity risk assessment.

**Key words:** Cytochrome P450.—Drug metabolism.—Drug-drug interaction.—Hepatotoxicity.—Human hepatocytes.—Microsomes.

## RESUMEN

### Investigación *in vitro* del metabolismo y la toxicidad de fármacos en el hombre

El interés de la industria farmacéutica es incrementar la seguridad de los nuevos fármacos, disminuir sus efectos secundarios, conocer sus propiedades farmacocinéticas e identificar las posibles interacciones fármaco-fármaco. El metabolismo de los fármacos es un factor determinante en su aclaramiento, es responsable de la variabilidad interindividual de la farmacocinética y en consecuencia, de la variación en el efecto farmacológico y la toxicidad. Desde la óptica comercial, lo deseable es que los fármacos con propiedades no adecuadas sean descartados en las fases más tempranas del desarrollo, y no en las fases posteriores con mayor coste económico. Como consecuencia de esto, en las últimas décadas se han incorporado estrategias basadas en modelos *in vitro* en combinación con estudios de ADMET, para la selección de nuevos fármacos cabeza de serie durante fases muy tempranas del desarrollo. Actualmente, la utilización de modelos hepáticos humanos *in vitro* en las fases preclínicas supone un proceso de selección de nuevas moléculas candidatas a fármacos mucho más racional. Existen varios modelos *in vitro* para abordar estas cuestiones en las etapas tempranas del desarrollo de fármacos para optimizar la selección de moléculas candidatas y la evaluación del riesgo de hepatotoxicidad.

**Palabras clave:** Citocromo P450.—Metabolismo de fármacos.—Interacción fármaco-fármaco.—Hepatotoxicidad.—Hepatocitos humanos.—Microsomas.

## INTRODUCTION

Drugs and other xenobiotics usually have a low solubility in aqueous systems and require biotransformation to metabolites that are more hydrophilic and more readily eliminated. Typically, liver drug metabolism occurs in two phases: Phase I and Phase II. Phase I of biotransformation is the oxidative pathway in which the

compound undergoes oxidation to a more polar substance. Cytochrome P-450 (P450)-depending monooxygenases and flavin monooxygenases, are major role players in the oxidative metabolism of xenobiotics and endogenous compounds. This process is followed by the Phase II reactions in which metabolites are further conjugated by hepatocytes with endogenous molecules by glucoronidation, sulfation, methylation, acetylation and mercapture formation, rendering derivatives that are much more soluble, thus facilitating their elimination (1-3). Biotransformation reactions generally follow a detoxification process rendering metabolites inactive. Nevertheless, many drug intermediary products generated during metabolism are highly reactive and toxic, causing hepatotoxicity (4-6). Metabolism is the major determinant of drug clearance and interindividual pharmacokinetic differences, and the indirectly determinant of the clinical efficacy and toxicity of drugs. Many potential drug candidates are rejected in drug discovery given the undesirable pharmacokinetics that can result in an inadequate concentration of the drug at the site of action and/or great variations in clinical response and adverse effects.

Drug regulatory agencies, such as the Food and Drug Administration (FDA) and the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (7), have issued different guidelines to enhance the importance of ADME studies in the drug development process. The pharmaceutical industry is required to market safer drugs with fewer side effects, predictable pharmacokinetic properties and quantifiable drug-drug interactions. Therefore, companies are increasingly interested in optimizing these properties during early drug development phases (Figure 1). Rapid biotransformation, resulting in a short exposure to the pharmacologically active parent compound and the formation of active or toxic metabolites, is not usually welcomed. Alternatively, an extremely stable drug may pose a potential problem of drug-drug interactions and toxicity. Medicinal chemists are primarily concerned in designing molecules that will not only offer the desired activity, but suitable potency and duration of action which are influenced by pharmacokinetic properties. Consequently over the past decade, *in vitro*-based strategies in lead optimization screening in conjunction with ADMET screening studies have been incorporated earlier in the drug discovery phase (8, 9).

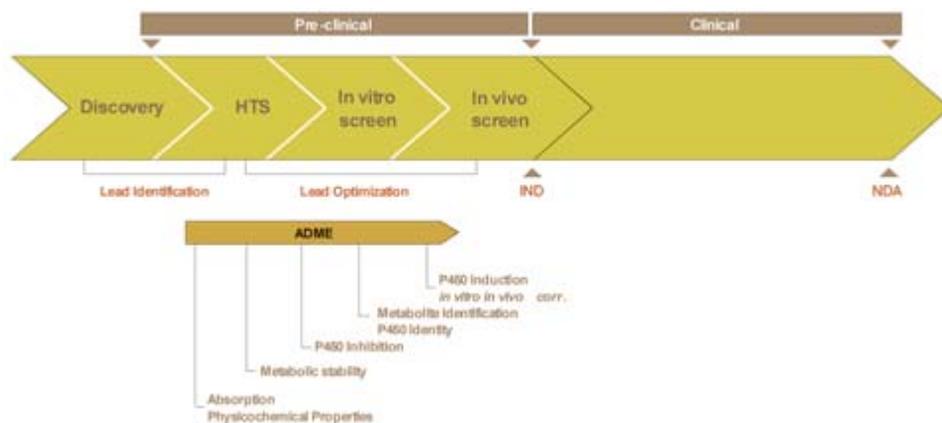


FIGURE 1. *Drug development process depicting the different types of ADME studies that could be performed at the various stages. Investigational New Drug (IND). New Drug Application (NDA).*

## KEY ISSUES TO BE ADDRESSED AT EARLY STAGES OF DRUG DEVELOPMENT

After intake, drugs are absorbed and distributed among the tissues and body fluids and then eliminated or cleared, mainly by the liver and kidneys. Therefore, the development of a new drug requires an exhaustive characterization of not only its pharmacological activity, but also knowledge of major enzymes involved in the metabolite formation, and the potential enzyme-inhibiting or enzyme-inducing properties of the drug. Therefore, over the last decade, *in vitro*-based strategies in lead optimization screening combined with ADMET screening studies have consequently been incorporated earlier in the drug discovery phase (10).

Several metabolic key issues should be addressed at very early stages of drug development for a better selection of the safest and most effective drug candidates (Figure 2):

- a) Drug metabolic stability and metabolic profile.
- b) Metabolite identification and structure clarification.

- c) Prediction of *in vivo* pharmacokinetic parameters from *in vitro* data.
- d) Identification of the P450 enzymes involved in drug metabolism.
- e) Interspecies comparison of the metabolic profile of a drug to select the animal species closest to man for preclinical studies.
- f) Drug-drug interactions due to enzyme induction/inhibition.
- g) Drug toxicity associated with drug metabolism.

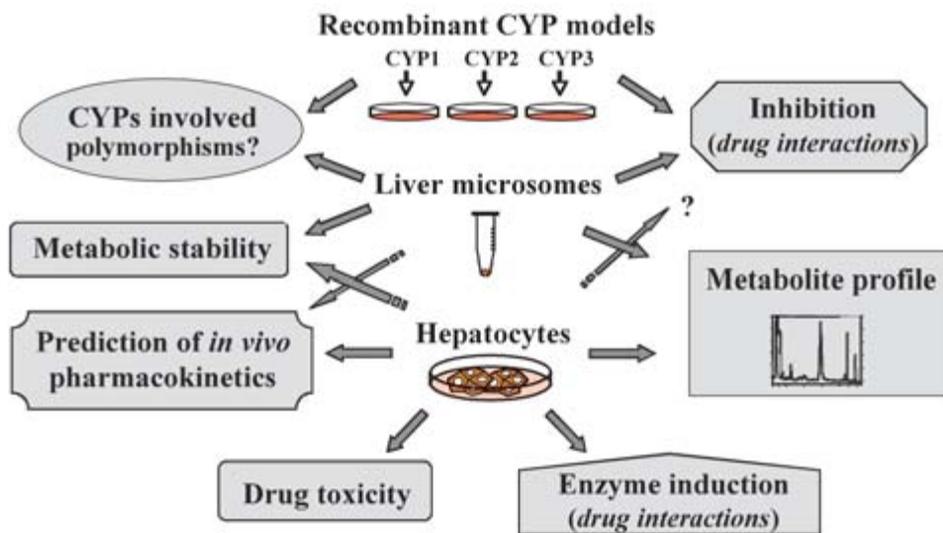


FIGURE 2. *Major applications of in vitro hepatic models during the development of new drugs.*

## DRUG METABOLIC STABILITY AND METABOLITE PROFILE AND METABOLITE IDENTIFICATION

Using *in vitro* methods enables us to determine and predict the metabolic stability of NCEs, which can be an important contributor

for a good pharmacokinetic profile as well as a risk for drug-drug interactions. Metabolic stability is defined as the susceptibility of a chemical compound to biotransformation, and is expressed as *in vitro* half-life ( $t(1/2)$ ) and intrinsic clearance (CL(int)). Based on these values, *in vivo* pharmacokinetic parameters, such as bioavailability and *in vivo* half-life, can be calculated when other data concerning the volume of distribution and fraction absorbed are available (11). Metabolic stability assays can be easily investigated by incubating new chemicals with fully competent metabolic models and performing sensitive chromatographic analysis (e.g. HPLC-MS/MS) of the incubation mixtures (12). In the early phases of chemical screening, metabolic rates are estimated by measurement of the disappearance of the test compound as metabolites are usually unknown. At advanced stages, formation of metabolites is also analyzed. Human liver microsomes, hepatocytes, and cDNA-expressed P450 enzymes are commonly used (Figure 2). A major disadvantage of using recombinant models expressing a single enzyme for the study of metabolic stability of a drug is the lack of other phase I and phase II enzymes. Human liver microsomes contain high levels of P450s and other drug-metabolizing enzymes (flavin monooxygenase, UDP-glucuronyltransferases, epoxide hydrolase). The metabolites identified after a short incubation with microsomes coincide with those reported as the major metabolites in human *in vivo* studies (13). The major limitation of microsomes is that they lack phase II cytosolic enzymes (glutathione S-transferases, sulfotransferases, soluble epoxide hydrolases, alcohol dehydrogenase, xanthine oxidase, etc.). Human hepatocytes represent a more complete system with physiological levels of cofactors, natural orientation for linked enzymes and intact membranes to allow for the modeling of intracellular drug concentrations (14, 15) (Figure 2). Moreover, the restricted accessibility of suitable human liver samples has greatly hindered the widespread use of human hepatocytes for drug metabolism studies. Recently, this scarcity has been countered by the increasing availability of metabolically competent cryopreserved human hepatocytes and by the use of optimized metabolic assays in hepatocytes cultured in multiwell plate formats (16, 17). Later in non clinical development, the ADME flow chart focuses on metabolite profiling in different species and metabolite identification. Significant metabolic interspecies

differences between animals and man exist, not only because of the different P450 enzymes expressed in man and other species, but also because of their relative abundance (18-20). Therefore, metabolite profiles in different animal models (i.e. microsomes or hepatocytes from several species) are analyzed and compared with the human profile toward a more astute selection of animal species for subsequent pharmacokinetic or toxicological studies. As metabolites may be inert, pharmacologically active or reactive, drug metabolite profile evaluation and metabolite identification are essential to design new safer drug candidates with improved ADME capabilities. Incubating the drug candidate with recombinant P450s individually expressed in various host systems can generate large amounts of metabolites for chemical structure identification (Figure 2). Analytically speaking, liquid chromatography tandem mass spectrometry is the most widely used tool to identify metabolites and determine both structure and metabolite profiles (21).

### **PREDICTION OF *IN VIVO* PHARMACOKINETIC PARAMETERS FROM *IN VITRO* DATA**

Human liver-derived models are invaluable tools in elucidating the pharmacokinetic parameters of a drug candidate and the selection of lead compounds with favorable properties during the drug discovery and development process (22, 23). Clearance of a drug from the body depends on the intrinsic ability of the organs, such as liver and kidney, to metabolize and excrete. Systemic clearance of a drug that is eliminated by hepatic metabolism is a function of the hepatic blood flow and the intrinsic clearance of the liver ( $CL_{int}$ , *in vivo*), which is defined as the ability of the liver to remove xenobiotics from the blood in the absence of other confounding factors. Disease conditions of the liver or administration of drugs that are inducers or inhibitors of P450 can therefore influence systemic clearance.  $CL_{int}$ , *in vitro* is a measure of enzyme activity towards a drug which is not influenced by other physiological determinants of liver clearance, such as hepatic blood flow or drug binding to blood proteins (24). As with all clearance terms, it has units of volume rate and acts as a proportionality constant to describe the relationship between the metabolism rate of a drug and

its concentration at the enzyme site. Two strategies underlying the prediction of *in vivo* hepatic drug metabolism from *in vitro* data have been defined (24, 25): the metabolite formation method, the most widely used, and the more recently adopted substrate depletion approach, where the intake of the parent drug is monitored over time (25). From a biochemical point of view  $CL_{int}$ , *in vitro* can be considered in terms of the enzyme parameters of the Michaelis-Menten equation (24, 26). Enzyme kinetics data must be obtained under linear conditions with regard to the enzyme concentration and incubation time, that is, the period when  $V_0$  is maintained. Once  $CL_{int}$ , *in vitro* is obtained from Michaelis-Menten constants ( $K_m$  and  $V_{max}$ ), reasonable estimates of *in vivo* hepatic clearance ( $CL_{int}$ , *in vivo*) can be obtained by using appropriate scaling factors and modeling (24, 26, 27). Mathematical physiological models (well-stirred, parallel tube, distributed and dispersion models) of hepatic drug clearances, which use both anatomical and physiological data, have been appraised in relation to their utility in predicting drug removal by the liver (28-30).

## **IDENTIFICATION OF P450 ENZYMES INVOLVED IN DRUG METABOLISM**

Early identification of P450s responsible for the metabolism of new molecules is important in drug discovery in order to minimize the role of polymorphic enzymes leading to inter-individual variation and potential drug-drug interactions. Pooled human liver microsomes are the most frequently model used for this purpose (31, 32). A major advantage of these *in vitro* systems is that P450 enzymes are present in their physiological relative proportions and can interact with other essential proteins required for P450-catalyzed oxidations (i.e. NADPH cytochrome P450 reductase, cytochrome b5). By the use of selective chemical inhibitors for individual P450s, the major metabolic pathways for a new drug can be either readily demonstrated or ruled out. The incubations in which the metabolism of the test drug is reduced suggest the involvement of the P450 enzyme, whose activity is affected by the inhibitor. One drawback that these assays present, even when using potent inhibitors, is that it is not possible to completely and selectively inhibit a single P450 activity.

In recent years, recombinant human P450 systems have been increasingly used for this purpose (Figure 2). Major limitations inherent to recombinant models are that concentrations of P450 enzymes are far in excess of their relative amount in the human liver, and that the secondary metabolism cannot be identified. However, such disadvantages have not appeared to hinder the utility of cDNA expressed enzymes to P450 reaction phenotyping. Incubating the compound with each separate recombinant P450 provides information about the role of individual P450s in metabolite formation (32, 33-37). However, the degree of involvement of a P450 in a particular reaction *in vivo* can neither be estimated nor can the metabolic profile of a drug in man be anticipated. Different strategies based on the combined use of *in vitro* models showing a full contingent of P450 enzymes (i.e. human liver microsomes, primary human hepatocytes) and P450 recombinant models have been proposed to mathematically reconstruct the relative contribution of each P450 enzyme in the metabolism of a given compound (35-39).

### **DRUG-DRUG INTERACTIONS DUE TO ENZYME INDUCTION/INHIBITION**

Pharmacokinetic interactions occur when the disposition (i.e. absorption, distribution, metabolism and excretion) of a drug is altered by another (40). One of the most important pharmacokinetic factors that control drug action is the rate of metabolic transformation. Hence, interactions that result in changes in the rate of drug metabolism can be of great clinical significance. Many drugs can inhibit, induce and alter relative amounts of different P450 enzymes. A strong inhibition/induction of P450 activities by a molecule is expected to seriously interfere with the metabolism of other drugs administered simultaneously or subsequently. These changes in *in vivo* metabolism rates can lead drug concentrations to fall outside their therapeutic window, implication a serious risk of drug-drug interactions. The high cost associated with drug development programs has focused attention on predicting, identifying and avoiding inhibitory potential early in the discovery process. *In vitro* studies, which are generally inexpensive and readily carried out, must serve as preliminary screenings to rule out the need

of *in vivo* testing. The objective of *in vitro* screening of P450 inhibition properties of drug candidates is to exclude potent inhibitors from further development. P450 enzymes play a crucial role in the metabolism of drugs and, therefore, P450 inhibition is the most important mechanism for metabolic drug-drug interactions (41, 42).

Microsomes and cDNA-expressed enzymes are the preferred test systems as they are more readily available than human hepatocytes (Figure 2). Assays are based on the analysis of potential reductions in the metabolism of an appropriate P450 probe substrate in the presence of various concentrations of the tested compound (11, 13). For the purpose of high throughput P450 inhibition screening, a variety of strategies based on fluorescence, LC-MS and radiometry approaches have been developed (43-45). Since several enzymes may be involved in the metabolism of a compound, the use of recombinant models expressing a single P450 may lead to an overestimation of the inhibitory effect of a given drug (46). A major limitation in making conclusive statements from assays in microsomes or recombinant enzymes is that ultimately *in vivo* metabolism is complicated by the role of processes missing in subcellular models. Drug transport across membranes, further metabolism by cytosolic enzymes, or binding to intracellular proteins can be determinant in the actual concentration of the substrate and inhibitor available to the enzyme (41, 47). Assays performed in intact cells could be more predictive (47).

Drug-drug interactions can also occur as a consequence of P450 induction. Metabolic interactions due to enzyme induction are far less frequent than those caused by inhibition; however, their consequences can be clinically relevant. A drug with inductive properties can accelerate its own metabolism or those of other co-administered drugs, resulting in either therapeutic inefficacy or in an exaggerated response. Screening of inducers cannot be done in microsomes or recombinant models as it requires a cellular system that is fully capable of expressing genes (Figure 2). Currently, primary hepatocytes are still the unique *in vitro* model for global examination of the inductive potential of drugs (14, 48, 49). After 24-72 h incubation with the test compound, P450 induction is monitored as its increases in enzyme activity (using specific substrates) or mRNA levels (by quantitative RT-PCR). Results are

compared to those of untreated cells (Figure 3). Different concentrations of the drug, covering a large range of concentrations, are recommended to assess the inductive potential of a new chemical.

Generally, if a negative results from *in vitro* inhibition/induction assays is obtained (no identified interaction), the study of potential clinical interactions is not needed. *In vitro* experiments should be conducted at similar concentrations to the relevant *in vivo* concentration for the optimization of the clinical assays.

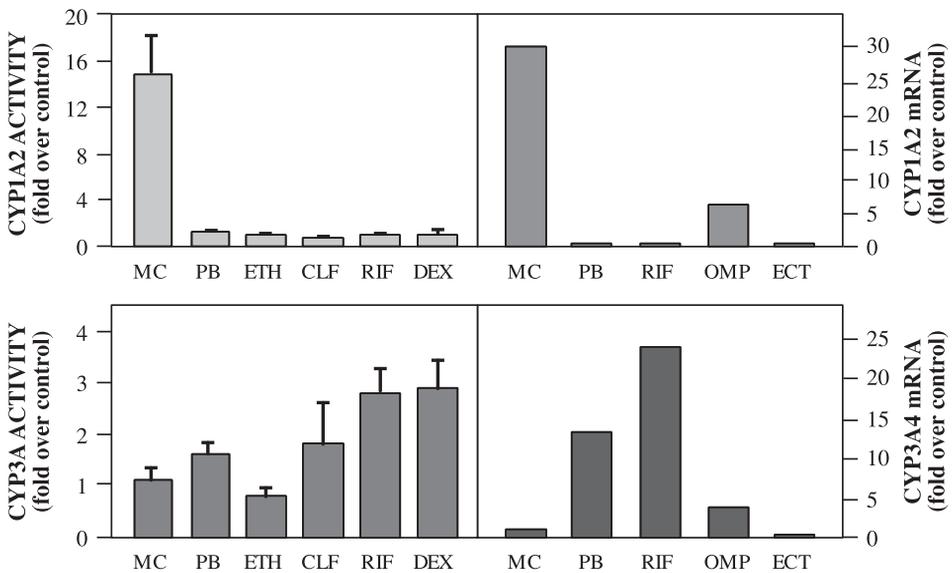


FIGURE 3. **Effects of model inducers on P450 enzymes in cultured human hepatocytes.** After 24 h in culture, human hepatocytes were exposed to 2  $\mu$ M 3-methylcholanthrene (MC), 1 mM phenobarbital (PB), 100 mM ethanol (ETH), 1 mM clofibric acid (CLF), 50  $\mu$ M rifampicin (RIF), 1  $\mu$ M dexamethasone (DEX), 50  $\mu$ M omeprazole (OMP), or 1 nM ecteinascidin (ECT), and P450 activities and mRNA levels were measured 48 h later. Activities were determined in three different hepatocyte preparations by the use of selective substrates: 7-methoxyresorufin (CYP1A2) and testosterone (CYP3A4). Specific CYP mRNA levels were quantified by quantitative RT-PCR in two different cultures. Results are expressed as fold increases over corresponding activity or mRNA values in controls (untreated cells).

## DRUG-INDUCED HEPATIC INJURY

Substances capable of producing liver damage and, more specifically, hepatocyte damage are known as hepatotoxins. *Intrinsic hepatotoxins* are substances that exert their effects in all individuals, in a dose-dependent and hence predictable manner. These toxins can interfere directly with cell metabolism (*active hepatotoxins*) (50) or become toxic once they have been biotransformed (*latent hepatotoxins*). *Idiosyncratic hepatotoxicity*, on the other hand, may be the consequence of an abnormal metabolism of the drug by susceptible individuals (*metabolic idiosyncrasy*) or be elicited by an immune-mediated hepatocyte injury (*allergic hepatitis*). The former has a geno- or phenotypic basis that results in the over/under expression of drug metabolizing enzymes, a different drug metabolism pattern and eventually the abnormal production of a toxic metabolite. This type of idiosyncratic toxicity is dose-dependent in susceptible individuals. Idiosyncratic drug toxicity is a rare human-specific event and therefore not detectable in experimental animals and impossible to be studied in clinical trials (51). Some xenobiotics are electrophilic in nature, and others are bioactivated by the liver to highly reactive metabolites generally more toxic than the parent compound, which is the key to many toxic phenomena (50, 52, 53). To minimize these effects, hepatocytes have effective defence mechanisms, and ultimately it is the balance between bioactivation, detoxification and defence/repair mechanisms that determines whether a compound will or will not elicit a toxic effect.

Figure 4 summarizes the molecular events that can be involved in hepatocyte toxicity: 1) The impairment of the biochemical functions of hepatocytes by the drug or by any of its stable metabolites is the first possible mechanism of hepatotoxicity (52-54). 2) The mitochondrion is a frequent target of hepatotoxic drugs and the alteration of its function has immediate effects on the energetic balance of cells (54). Depletion of ATP is, in fact, an early event in the course of drug-induced toxicity that precedes the irreversible stages of cell injury (56). 3) Lipid peroxidation. It is a free radical process leading to the oxidative degradation of lipids that finally may disrupt the structure and functionality of the cell membranes (56). 4) Alteration of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Intracellular

calcium participates in many cellular functions and its levels should be perfectly regulated to obtain a proper cell function. Many substances can interfere in intracellular calcium homeostasis control, thus leading to cell malfunction and death (50, 57). 5) Oxidative stress is produced by compounds able to undergo repeated oxidation and reduction cycles within the cell (58). This redox cycling causes the continuous production of reactive oxygen species (e.g. superoxide anion) and depletion of GSH and nicotinamide nucleotide pools, with a concomitant increase in lipid peroxidation and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation. Finally, biotransformation of xenobiotics can also result in the formation of intermediates capable of covalently binding to cell macromolecules (proteins, DNA and RNA) to form stable drug adducts (58).

Cytotoxicity end-points (cell viability assays: MTT, neutral red uptake tests, etc; cell membrane permeability alteration: enzyme leakage; etc.) represent a first approach to assess hepatotoxicity, but evaluation of these parameters alone may leave out of consideration xenobiotics that impair cell function without causing cell death. This may not be critical for the hepatocyte itself, but can be of toxicological significance for the whole organism (59). By examining the effects on hepatocyte-specific metabolism, it is possible to find out whether relevant hepatic specific functions become altered by the presence of a xenobiotic. Currently, several metabolic parameters, representative of the liver's most characteristic functions, should be evaluated, namely, gluconeogenesis, glycogen metabolism, ureogenesis, plasma protein synthesis, synthesis of VLDL, etc. In general, metabolic parameters are more sensitive to the toxic effect of hepatotoxins than cytotoxicity indicators (60). Concentrations to which cells are exposed for cell metabolism studies should not cause perceptible cell death (they should be up to the MNTC).

The ultimate goal of *in vitro* experiments is to generate the type of scientific information needed to identify compounds that are potentially toxic to man for which purpose not only the design of experiments but also the interpretation of results are essential. Even simple parameters for assessing cell toxicity have yielded promising results when comparing *in vitro* effects with human toxicity as false negatives are infrequent in compounds that are toxic without biotransformation.

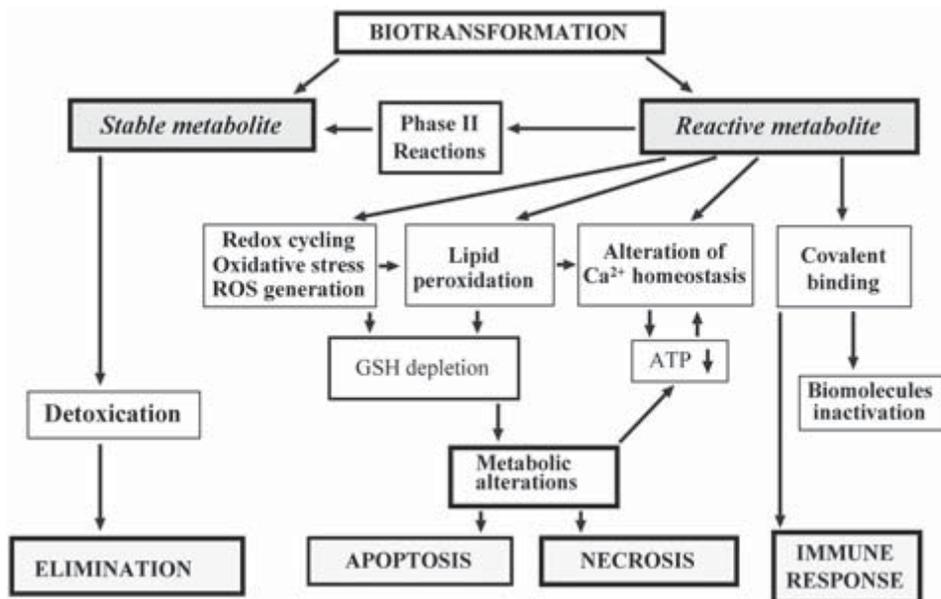


FIGURE 4. **Mechanisms of drug hepatotoxicity.** Different mechanisms can be involved in hepatocyte toxicity: Mitochondrion is a frequent target of hepatotoxic drugs and the alteration of its function has immediate effects on the energetic balance of cells (depletion of ATP). Lipid peroxidation, oxidative stress, alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and covalent binding to cell macromolecules are the molecular mechanisms more frequently involved in the toxicity of xenobiotics.

The monitoring of gene expression of cells exposed to toxic xenobiotics (toxicogenomics), has gained great popularity among researchers (61-63). The ease with which thousands of genes can be measured has led most of the scientists to register changes of as many genes as possible with the hope that an in-depth biostatistical analysis would reveal which of that gene were clearly linked to toxic events. It is hoped that through a better understanding of cellular mechanisms of toxicity, combined with mechanistically directed toxicogenomic analysis, the accuracy and predictivity of *in vitro* screening for toxicants could be greatly improved.

## **VARIABILITY OF DRUG METABOLIC CAPABILITY IN HUMANS**

Variability of drug metabolism rates is a consistent observation in human populations. Considerable differences can be observed among «extreme» individuals. Progressive advances in the knowledge of metabolic routes and enzymes responsible for drug biotransformation have contributed to understanding the great metabolic variations existing in human beings. Phenotypic and genotypic differences in the expression of the enzymes involved in drug metabolism are the main causes of this variability. It is well documented that P450 enzymes are polymorphically expressed (59, 64, 65). Mutations of P450 genes result in allelic variants causing defective, qualitatively altered, diminished or enhanced rates of drug metabolism. As a consequence, polymorphisms can lead to qualitative and/or quantitative alterations in the metabolism of drugs and could be responsible for the development of a number of unexpected adverse drug reactions and host-specific susceptibility to drugs or other chemicals. An association between polymorphisms and increased toxicity risk or cancer has been reported (66). Among P450 polymorphisms, those affecting CYP2C9, CYP2C19 and, particularly CYP2D6, have the highest impact on drug metabolism (67, 68). At present, a high number of CYP2D6 allelic variants (ca. 50) have been identified, some resulting in appreciable changes in enzyme function. In contrast, CYP1A1, CYP2E1 and CYP3A4 genes are relatively well conserved and only a few, if any, rare variants yielding changes in catalytic enzyme activity have been found (65).

Interindividual differences in catalytic activities cannot be exclusively attributed to genetic polymorphisms, and non-genetic factors should be considered as a leading cause of the great variability existing in drug metabolism rates. Age, gender, hormonal status, liver pathologies and drug intake can influence the P450 function. CYP3A4, the most abundant P450 in the human liver, constitutes a good example of phenotypic variability. Variations in CYP3A4 activity cannot be explained by the genotype as only rare allelic variants with no major functional effects have been identified (69). CYP3A4 variability is probably a direct consequence of the modulation of gene expression by environmental factors. The enzyme

is highly induced by different groups of compounds, including therapeutic agents such as glucocorticoids, antibiotics, anticonvulsants, or anti-inflammatories (14, 70-72).

The use of *in vitro* models able to reflect interindividual variations in drug metabolism will notably increase the relevance of preclinical metabolic studies. The analysis of P450 enzymes in microsomes from a human liver bank revealed the existence of considerable variability (73). As an example, high variations (>50-fold) were found in CYP3A4 activity levels in microsome preparations from 30 different livers (Figure 5A). A similar picture is observed when CYP3A4 activity is measured in primary human hepatocyte cultures prepared from different donors (Figure 5B). Incubation of the compound of interest with human liver microsomes or hepatocytes expressing different levels of P450 enzymes will help to anticipate information on

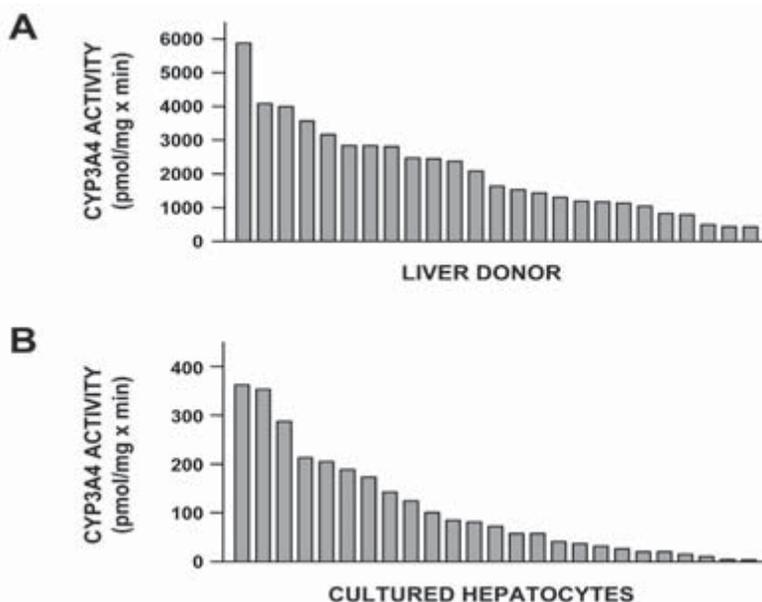


FIGURE 5. **Variability of CYP3A4 activity in human liver and human hepatocytes from different donors.** CYP3A4 activity (testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation) was determined (A) in microsomes from a human liver bank ( $n = 30$ ), and (B) in different preparations of human hepatocytes. The individual data for CYP3A4 activity are plotted and sorted in decreasing order to show inter-individual variability.

potential interindividual variations in metabolic rates or metabolite profile. The utility of cultured hepatocytes for this purpose was examined by investigating the metabolism of a model compound, aceclofenac, both *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* metabolism of the compound was studied in hepatocyte cultures obtained from human patients who, after clinical recovery, received a sub-clinical dose of the drug to examine the metabolism *in vivo* (presence of metabolites in urine) (74). A remarkable similarity between metabolic profile and the extent of aceclofenac *in vitro* and *in vivo* metabolism was found for each donor. These results support the idea that cultured human hepatocytes are a good approximation to anticipate *in vivo* metabolic profile of a drug, and back the validation process needed by this experimental model to be considered as a simplified tool to study drug metabolism and drug interactions. Moreover, the interindividual variations in drug metabolism also become evident in *in vitro* studies.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the financial support of the ALIVE Foundation, the Fondo de Investigaciones Sanitarias from Instituto de Salud Carlos III of Spain (03/0339), and the European Commission (LSHB-CT-2004-504761 and LSHB-CT-2004 512051).

### REFERENCES

- (1) GRAHAM, S. E. and PETERSON, J. A. (1999): How similar are P450s and what can their differences teach us. *Arch. Biochem. Biophys.* 369: 24-29.
- (2) WERCK-REICHHART, D. and FEYEREISEN, R. (2001): Cytochromes P450: a success story. *Gen. Biol.* 1: 1-8.
- (3) ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. and DE VOSS, J. J. (2002): Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. *Nat. Prod. Rep.* 19: 477-493.
- (4) WILLIAMS, D. P.; KITTERINGHAM, N. R.; NAISBITT, D. J.; PIRMOHAMED, M.; SMITH, D. A. and PARK, B. K. (2002): Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? *Curr. Drug Metab.* 3: 351-366.
- (5) PARK, K.; WILLIAMS, D. P.; NAISBITT, D. J.; KITTERINGHAM, N. R. and PIRMOHAMED, M. (2005): Investigation of toxic metabolites during drug development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207: 425-434.

- (6) NAVARRO, V. J. and SENIOR, J. R. (2006): Drug-related hepatotoxicity. *N. Engl. J. Med.* 354: 731-739.
- (7) FDA. Publications. Guidance for Industry, <http://www.fda.gov/cder/guidance/cln3.pdf> 1997 April. EMEA; <http://www.emea.eu.int/> 1997 December.
- (8) LIN, J.; SAHAKIAN, D. C.; DE MORAIS, S. M.; XU, J. J.; POLZER, R. J. and WINTER, S. M. (2003): The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 1125-1154.
- (9) DAMBACH, D. M.; ANDREWS, B. A. and MOULIN, F. (2005): New technologies and screening strategies for hepatotoxicity: use of *in vitro* models. *Toxicol. Pathol.* 33: 17-26.
- (10) THOMPSON, T. N. (2000): Early ADME in support of drug discovery: the role of metabolic stability studies. *Curr. Drug Metab.* 1: 215-241.
- (11) BARANCZEWSKI, P.; STANCZAK, A.; SUNDBERG, K.; SVENSSON, R.; WALLIN, A.; JANSSON, J. and GARBERG, P. (2006): Postlind. Introduction to *in vitro* estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol. Rep.* 58: 453-472.
- (12) MASIMIREMBWA, C. M.; BREDBERG, U. and ANDERSSON, T. B. (2003): Metabolic stability for drug discovery and development: pharmacokinetic and biochemical challenges. *Clin. Pharmacokinet.* 42: 515-528.
- (13) KANTHARAJ, E.; TUYTELAARS, A.; PROOST, P. E.; ONGEL, Z.; VAN ASSOEW, H. P. and GILISSEN, R. A. (2003): Simultaneous measurement of drug metabolic stability and identification of metabolites using ion-trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 2661-2668.
- (14) GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, M. T.; CASTELL, J. V. and JOVER, R. (2004): Human hepatocytes in primary cultures: The choice to investigate drug metabolism in man. *Curr. Drug Metab.* 5: 443-462.
- (15) LI, A. P. (2004): A comprehensive approach for drug safety assessment. *Chem. Biol. Interact.* 150: 27-33.
- (16) GEBHARDT, R.; HENGSTLER, J. G.; MULLER, D.; GLOCKNER, R.; BUENNING, P.; LAUBE, B.; SCHMELZER, E.; ULLRICH, M.; UTESCH, D.; HEWITT, N.; RINGEL, M.; HILZ, B. R.; BADER, A.; LANGSCH, A.; KOOSE, T.; BURGER, H. J.; MAAS, J. and OESCH, F. (2003): New hepatocyte *in vitro* systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab. Rev.* 35: 145-213.
- (17) REDDY, A.; HEIMBACH, T.; FREIWALD, S.; SMITH, D.; WINTERS, R.; MICHAEL, S.; SURENDRAN, N. and CAI, H. (2005): Validation of a semi-automated human hepatocyte assay for the determination and prediction of intrinsic clearance in discovery. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37: 319-326.
- (18) LEWIS, D. F.; IOANNIDES, C. and PARKE, D. V. (1998): Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Env. Health Persp.* 106: 633-641.
- (19) LIN, J. H. (1998): Applications and limitations of interspecies scaling and *in vitro* extrapolation in pharmacokinetics. *Drug. Metab. Dispos.* 26: 1202-1212.
- (20) BUN, H.; DISDIER, B., AUBERT, C. and CATALIN, J. (1999): Interspecies variability and drug interactions of clozapine metabolism by microsomes. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13: 577-581.

- (21) LAHOZ, A.; DONATO, M. T.; CASTELL, J. V. and GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (2006): *In Vitro* ADME high-throughput screening in drug preclinical development. *Mini Rev. Med. Chem.* 6: 1053-1062.
- (22) AITHAL, G. P.; RAMSAY, L.; DALY, A. K.; SONCHIT, N.; LEATHART, J. B.; ALEXANDER, G.; KENNA, J. G.; BACHMANN, K. A. and GHOSH, R. (2001): The use of *in vitro* methods to predict *in vivo* pharmacokinetics and drug interactions. *Curr. Drug. Metab.* 2: 299-314.
- (23) HUISINGA, W.; TELGMANN, R. and WULKOW, M. (2006): The virtual laboratory approach to pharmacokinetics: design principles and concepts. *Drug Discov. Today.* 11: 800-805.
- (24) HOUSTON, J. B. (1984): Utility of *in vitro* drug metabolism data in predicting *in vivo* metabolic clearance. *Biochem. Pharmacol.* 47: 1469-1479.
- (25) JONES, H. M. and HOUSTON, J. B. (2004): Substrate depletion approach for determining *in vitro* metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations. *Drug Metab. Dispos.* 32: 973-982.
- (26) NARITOMI, Y.; TERASHITA, S.; KAGAYAMA, A. and SUGIYAMA, Y. (2003): Utility of hepatocytes in predicting drug metabolism: comparison of hepatic intrinsic clearance in rats and humans *in vivo* and *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.* 31: 580-588.
- (27) RILEY, R. J.; MCGINNITY, D. F. and AUSTIN, R. P. (2005): An unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from *in vitro* intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 33: 1304-1311.
- (28) BACHMANN, K. A. and GHOSH, R. (2001): The use of *in vitro* methods to predict *in vivo* pharmacokinetics and drug interactions. *Curr. Drug Metab.* 2: 299-314.
- (29) YAMAMOTO, T.; ITOGA, H.; KOHNO, Y.; NAGATA, K. and YAMAZOE, Y. (2005): Prediction of oral clearance from *in vitro* metabolic data using recombinant CYPs: comparison among well-stirred, parallel-tube, distributed and dispersion models. *Xenobiotica.* 35: 627-646.
- (30) LIU, L. and PANG, K. S. (2006): An integrated approach to model hepatic drug clearance. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29: 215-230.
- (31) GUENGERICH, F. P. (1996): *In vitro* techniques for studying drug metabolism. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 24: 521-533.
- (32) GHOSAL, A.; CHOWDHURY, S. K.; TONG, W.; HAPANGAMA, N.; YUAN, Y.; SU, A. and ZBAIDA, S. (2006): Identification of human liver cytochrome P450 enzymes responsible for the metabolism of lonafarnib (Sarasar). *Drug Metab. Dispos.* 34: 628-635.
- (33) BOOBIS, A. R.; MCKILLOP, D.; ROBINSON, D. T.; ADAMS, D. A. and MCCORMICK, D. J. (1998): Interlaboratory comparison of the assessment of P450 activities in human hepatic microsomal samples. *Xenobiotica.* 28: 493-506.
- (34) TANG, W.; WANG, R. W. and LU, A. Y. (2005): Utility of recombinant cytochrome p450 enzymes: a drug metabolism perspective. *Curr. Drug Metab.* 6: 503-517.

- (35) BORT, R.; MACÉ, K.; BOOBIS, A.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; PFEIFER, A. and CASTELL, J. V. (1999): Hepatic metabolism of diclofenac. Role of human CYPs in the minor oxidative pathways. *Biochem. Pharmacol.* 58: 787-796.
- (36) EMOTO, C.; MURASE, K. and IWASAKI, K. (2006): Approach to the prediction of the contribution of major cytochrome P450 enzymes to drug metabolism in the early drug-discovery stage. *Xenobiotica.* 36: 671-683.
- (37) CHANG, Y.; MOODY, D. E. and MCCAMCE-KATZ, E. F. (2006): Novel metabolites of buprenorphine detected in human liver microsomes and human urine. *Drug Metab. Dispos.* 34: 440-448.
- (38) NARITOMI, Y.; TERASHITA, S. and KAGAYAMA, A. (2004): Identification and relative contributions of human cytochrome P450 isoforms involved in the metabolism of glibenclamide and lansoprazole: evaluation of an approach based on the *in vitro* substrate disappearance rate. *Xenobiotica.* 34: 415-427.
- (39) VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L. and GREENBLATT, D. J. (2001): Application of the relative activity factor approach in scaling from heterologously expressed cytochromes p450 to human liver microsomes: studies on amitriptyline as a model substrate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 326-37.
- (40) SINGH, S. S. (2006): Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs. *Curr. Drug Metab.* 7: 165-182.
- (41) LIN, J. H. and LU, A. Y. H. (1998): Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 35: 361-390.
- (42) DONATO, M. T. and GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (2006): Inhibition of P450 enzymes: An *in vitro* approach. *Curr. Enzyme Inhibition.* 2: 281-304.
- (43) CRESPI, C. L.; MILLER, V. P. and PENMAN, B. W. (1997): Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal. Biochem.* 248: 188-190.
- (44) MOODY, G. C.; GRIFFIN, S. J.; MATHER, A. N.; MCGINNITY, D. F. and RILEY, R. J. (1999): Fully automated analysis of activities catalysed by the major human liver cytochrome P450 (CYP) enzymes: assessment of human CYP inhibition potential. *Xenobiotica* 29: 53-75.
- (45) ATKINSON, A.; KENNY, J. R. and GRIME, K. (2005): Automated assessment of time-dependent inhibition of human cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Drug Metab. Dispos.* 33: 1637-1647.
- (46) NOEMIR, A. A.; RUEGG, C.; SHOEMAKER, M.; FAVREAU, L. V.; PALAMANDA, J. R., SILBER, P. and LIN, C. C. (2001): Inhibition of CYP3A4 in a rapid microtiter plate assay using recombinant enzyme and in human liver microsomes using conventional substrates. *Drug Metab. Dispos.* 29: 748-753.
- (47) ITO, K.; IWATSUBO, T.; KANAMITSU, S.; UEDA, K.; SUZUKI, H. and SUGIYAMA, H. (1998): Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol. Rev.* 50: 387-412.
- (48) PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; UUSITALO, J.; RAUTIO, A. and RAUNIO, H. (2005): Prediction of drug metabolism and interactions on the basis of *in vitro* investigations. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96: 167-175.

- (49) WIENKERS, L. C. and HEATH, T. G. (2005): Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4: 825-833.
- (50) CURI-PEDROSA, R.; DAUJAT, M.; PICHARD, L.; OURLIN, L. C.; CLAIR, P.; GERVOT, L.; LESCA, P.; DOMERGUE, J.; JOYEUX, H.; FOURTANIER, G. and MAUREL, P. (1994): Omeprazole and lansoprazole are mixed inducers of CYP1A and CYP3A in human hepatocytes in primary culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 384-392.
- (51) MASUBUCHI, N.; LI, A. P. and OKAZAKI, O. (1998): An evaluation of the cytochrome P450 induction potential of pantoprazole in primary human hepatocytes. *Chem-Biol Interact.* 114: 1-13.
- (52) PELKONEN, O.; HUKKANEN, J.; HONKAKOSKI, P.; HAKKOLA, J.; VIITALA, P. and RAUNIO, H. (2002): In Ernst Schering Res Found Workshop 37 (Pelkonen, O. and Baumann, A. Eds.) pp. 105-137.
- (53) WAXMAN, D. J. (1999): P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* 369: 11-23.
- (54) RONIS, M. J. J.; HUANG, J.; CROUCH, J.; MERCADO, C.; IRBY, D.; VALENTINE, C. R.; LUMPKIN, C. K.; INGELMAN-SUNDBERG, M. and BADGER, T. M. (1993): Cytochrome P450 CYP 2E1 induction during chronic alcohol exposure occurs by a two-step mechanism associated with blood alcohol concentrations in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 944-950.
- (55) Whitlock, J. P. (1999): Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 103-125.
- (56) McGEHEE, R. E.; RONIS, M. J. J.; COWHERD, R. M.; INGELMAN-SUNDBERG, M. and BADGER, T. M. (1994): Characterization of cytochrome P450 2E1 induction in a rat hepatoma FGC-4 cell model by ethanol. *Biochem Pharmacol.* 48: 1823-1833.
- (57) JONES, S. A.; MOORE, L. B.; SHENK, J. L.; WISELY, G. B.; HAMILTON, G. A.; MCKEE, D. D.; TOMKINSON, N. C.; LECLUYSE, E. L.; LAMBERT, M. H.; WILLSON, T. M.; KLIEWER, S. A. and MOORE, J. T. (2000): The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol. Endocrinol.* 14: 27-39.
- (58) LI, A. P. (2001): Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discov Today.* 6: 357-366.
- (59) MILLER, M. S.; MCCARVER, D. G.; BELL, D. A.; EATON, D. L. and GOLDSTEIN, J. A. (1997): Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 40: 1-14.
- (60) GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, M. T.; CASTELL, J. V. and JOVER, R. (2003): Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab.* 4: 292-312.
- (61) NIEMINEN, A. L.; SAYLOR, A. K.; TESFAI, S. A.; HERMAN, B. and LEMASTERS, J. J. (1995): Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem. J.* 307: 99-106.
- (62) ROSS, D. (1989) Mechanistic toxicology: a radical perspective. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 505-511.

- (63) CHAPMAN, D. E. (1995): Calcium signalling. *Cell* 80: 259-268.
- (64) Human P450 allele Nomenclature Web site: [www.imm.ki.se/P450alleles](http://www.imm.ki.se/P450alleles).
- (65) INGELMAN-SUNDBERG, M. (2005): The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207: S52-S56.
- (66) NEBERT, D. W.; MCKINNON, R. A. and PUGA, A. (1996): Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol.* 15: 273-280.
- (67) SMITH, D. A.; ABEL, S. M.; HYLAND, R. and JONES, B. C. (1998): Human cytochrome P450s: selectivity and measurement *in vivo*. *Xenobiotica.* 28: 1095-1128.
- (68) INGELMAN-SUNDBERG, M. (2004): Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 193-200.
- (69) DAI, D.; TANG, J.; ROSE, R.; HODGSON, E.; BIENSTOCK, R. J.; MOHRENWEISER, H. W. and GOLDSTEIN, J. A. (2001): Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolise testosterone and chlorpyrifos. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299: 825-831.
- (70) PICHARD, L.; FABRE, I.; FABRE, G.; DOMERGUE, J.; SAINT AUBERT, B.; MOURAD, G. and MAUREL, P. (1990): Cyclosporin A drug interactions. Screening for inducers and inhibitors of cytochrome P-450 (cyclosporin A oxidase) in primary cultures of human hepatocytes and in liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 18: 595-606.
- (71) PÉREZ, G.; TABARES, B.; JOVER, R.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. and CASTELL, J. V. (2003): Semi-automatic quantitative RT-PCR to measure CYP induction by drugs in human hepatocytes. *Toxicol. in Vitro.* 17: 643-649.
- (72) KOMOROSKI, B. J.; ZHANG, S.; CAI, H.; HUTZLER, J. M.; FRYE, R.; TRACY, T. S.; STROM, S. C.; LEHMANN, T.; ANG, C. Y.; CUI, Y. Y. and VENKATARAMANAN, R. (2004): Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. *Drug Metab. Dispos.* 32: 512-518.
- (73) GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, M. T.; CASTELL, J. V. and JOVER, R. (2004): Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab.* 5: 443-462.
- (74) PONSODA, X.; PAREJA, E.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; FABRA, R.; CARRASCO, E.; TRULLENQUE, R. and CASTELL, J. V. (2001): Drug biotransformation by human hepatocytes. *In vitro/in vivo* metabolism by cells from the same donor. *J. Hepatol.* 34: 19-25.

## **Los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química**

Mesa redonda celebrada en la Real Academia Nacional de Farmacia el día 11 de enero de 2007

Coordinador:

**EXCMO. SR. D. JUAN-RAMÓN LACADENA CALERO**

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia:*

*«La importancia del ARN en la Genética: un comentario a los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química»*

Ponentes:

**EXCMO. SR. D. MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ**

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia:*

*«ARN interferente, del descubrimiento a sus aplicaciones»*

**DR. D. RAFAEL GIRALDO SUÁREZ**

*Científico Titular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid: «Roger Kornberg y la RNA pol: los misterios de la maquinaria macromolecular que sintetiza el ácido ribonucleico desvelados al medio siglo de Severo Ochoa y su polinucleótido fosforilasa»*



## PRESENTACIÓN:

### **La importancia del ARN en la genética: Un comentario a los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química**

JUAN-RAMÓN LACADENA CALERO

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia*

Ha transcurrido algo más de un siglo desde que la palabra «Genética» fuera usada por primera vez por William Bateson en una carta que escribió el 18 de abril de 1905 a Adam Sedgwick y propuesta al año siguiente por el propio Bateson en la «Conference on Hybridization and Plant Breeding», que tuvo lugar en Londres en 1906, para denominar oficialmente a la nueva ciencia que explica la «herencia y la variación en los seres vivos». De hecho, las actas de aquella reunión pasaron a denominarse «Report of the Third International Conference on Genetics». Desde entonces, la Genética ha crecido vertiginosamente, llegando a ser uno de los pivotes fundamentales de la ciencia de la vida. Buena prueba de ello es que en 33 ocasiones se han concedido los premios Nobel a 69 científicos para premiar sus investigaciones relacionadas con la Genética (25 de Fisiología o Medicina, 7 de Química, 1 de la Paz).

En mi discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia en diciembre de 1995, que versó sobre la «Historia “nobelada” de la Genética», hacía referencia a la transición prebiótica al «mundo del ARN», situando la evolución del ARN en el contexto de la química que le precedió y de la biología que le siguió. Decía entonces que, en términos de evolución del aparato genético, habría que gritar —parafraseando la antigua fórmula de proclamación de los reyes en la monarquía francesa: «el Rey ha muerto, ¡viva el Rey!»— que «el ADN ha muerto, ¡viva el ARN!» (1).

Algo parecido me sucede hoy al hacer un breve comentario de presentación a esta sesión científica de la Real Academia Nacional de Farmacia sobre los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química, puesto que ambos galardones han premiado investigaciones en torno al ARN. En efecto, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska concedía el premio Nobel en Fisiología o Medicina 2006 a Andrew Z. Fire y Craig C. Mello, «por su descubrimiento de la interferencia por ARN: silenciamiento de genes por ARN de doble cadena» y, a su vez, la Real Academia Sueca de Ciencias otorgaba el Premio Nobel en Química 2006 a Roger D. Kornberg, «por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica».

### 1. REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL: INTERFERENCIA POR ARN (ARNi)

En 2006, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska otorgaba el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a Andrew Z. Fire y Craig C. Mello, «por su descubrimiento de la interferencia por ARN: el silenciamiento de los genes por el ARN de cadena doble». Como señalaba Daneholt, Presidente de la Asamblea Nobel, en su comentario científico institucional («RNA interference») al galardón concedido a Fire y Mello, antes del descubrimiento de la *interferencia por ARN* se había descrito en plantas un fenómeno llamado silenciamiento génico mediatizado por ARN. Antes de seguir adelante me gustaría hacer una precisión terminológica respecto a cómo traducir al español los términos «RNA interference» y el acrónimo «iRNA». El primero puede ser castellanizado como «interferencia por ARN» o «interferencia mediatizada por el ARN», y el segundo como «ARNi», «ARN de interferencia» o «ARN interferente». Todos son válidos.

En la década de los noventa se observó que al introducir un transgén en el genoma de un organismo transgénico, su efecto podía consistir en la estimulación de la actividad génica o, por el contrario, en la inhibición de la expresión de secuencias homólogas, denominándose a este fenómeno como *silenciamiento génico dependiente de homología*. La inhibición de la actividad génica podía producirse a nivel de transcripción (*silenciamiento génico transcripcional*, TGS) o post-transcripcional (*silenciamiento génico post-transcripcional*,

PTGS). Sin embargo, aunque era evidente que el ARN jugaba un papel fundamental en estos procesos, no se supo dar explicaciones convincentes del PTGS hasta que Fire, Mello y colaboradores descubrieron el fenómeno de la *interferencia por ARN* (2).

El trabajo fundamental de Fire y Mello consistió en inyectar moléculas aisladas de ARN con sentido (*sense RNA*) y de ARN antisentido (*antisense RNA*) en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, comprobando que el efecto fenotípico por el silenciamiento de un gen específico (el gen *unc-22*, que codifica para una proteína muscular) era escaso, si alguno. En cambio, la inyección del gusano con ARN bicatenario (*double-stranded RNA*, ARNds) formado por las hélices de ARN con sentido y ARN antisentido de dicho gen producía el efecto fenotípico esperado («*twitcher*») correspondiente a la falta de expresión del gen en cuestión. Aunque en su trabajo de 1998 Fire y Mello no pudieron determinar si el ARNds actuaba a nivel transcripcional o post-transcripcional, en un trabajo posterior de Fire publicado el mismo año (3) se demostraba que el ARNds actuaba a nivel post-transcripcional de manera que el ARNm diana era degradado, impidiendo así el proceso de traducción y la síntesis de la proteína correspondiente. Además, los autores presentaban un modelo de cómo el ARNds podía actuar de una forma *catalítica* para degradar el ARNm homólogo. Es decir, el mecanismo de acción propuesto era diferente al «modelo del ARN antisentido», descrito previamente por otros autores. El nombre de «*interferencia mediatizada por el ARN* (ARNi)» con que se ha bautizado al nuevo mecanismo de silenciamiento de los genes había sido propuesto el año anterior por Mello (4).

Las principales conclusiones del trabajo de Fire y Mello fueron las siguientes: 1) el efecto silenciador del ARNds no lo igualan ni el ARN monocatenario con sentido ni el ARN antisentido; 2) el silenciamiento es específico para un ARNm homólogo al ARNds, de forma que ningún otro ARNm se ve afectado por la presencia del ARNds; 3) para que se produzca el silenciamiento el ARNds tiene que mostrar homología con el ARNm maduro; es decir, no reconoce secuencias de intrones ni de promotores, de donde se deduce que el proceso de silenciamiento ocurre en el citoplasma; 4) el ARNm afectado por el silenciamiento es degradado, desapareciendo del citoplasma; 5) puesto que bastan unas pocas moléculas de ARNds para lograr el silenciamiento génico de la célula, se infiere que debe haber

una amplificación del ARNds o bien que éste tiene una acción catalítica y no estequiométrica; 6) el efecto del ARNds podría extenderse de unos tejidos a otros o incluso a la descendencia.

El mecanismo molecular del proceso de interferencia por ARN (ARNi) fue descrito por otros investigadores utilizando un sistema *in vitro* de extractos embrionarios de *Drosophila* (5), demostrando que el ARNds es procesado a fragmentos pequeños de 21 a 23 nucleótidos (6). Posteriormente, Fire y Mello analizaron el proceso *in vivo*, demostrando que el ARNds es fragmentado en trozos de unos 25 nucleótidos y que el ARN antisentido dispara el proceso de degradación del ARNm por emparejamiento base a base al propio ARNm (7). El procesamiento del ARNds a fragmentos pequeños se produce por la acción de una ribonucleasa denominada *Dicer* («picadora») (8), mientras que en la degradación del ARNm interviene un gran complejo ribonucleoproteico denominado *Risc* (por *RNA-induced silencing complex*) que contiene al menos una proteína de la familia *argonauta* que actúa como una endonucleasa cortando y degradando el ARNm (9). Revisiones de los mecanismos moleculares del proceso de silenciamiento por ARN (ARNi) han sido realizadas por varios autores (10-13), además de las propias «Nobel Lectures 2006» de los galardonados Fire y Mello.

Como señala Daneholt (14), el significado biológico y genético del descubrimiento del fenómeno de la interferencia por ARN (ARNi) se extiende a la protección contra infecciones virales, a la estabilidad de los genomas silenciando los elementos genéticos móviles, la regulación post-transcripcional de la expresión génica en los procesos de desarrollo, la regulación transcripcional de la expresión génica por el mantenimiento de la condensación de la cromatina que impide la expresión de sus genes, la utilización como herramienta experimental para silenciar genes específicos, así como la posible utilización en la terapia génica.

De todo esto nos hablará en profundidad nuestro Académico de Número, el Doctor Mariano Esteban Rodríguez.

## 2. MECANISMO MOLECULAR DE LA TRANSCRIPCIÓN EN EUKARIONTES

El proceso de *transcripción* es realizado por enzimas específicas: las ARN polimerasas-ADN dependientes o transcriptasas. Así como en las bacterias sólo existe un tipo de ARN polimerasa, en los eucariontes hay tres clases, denominadas ARN pol I, ARN pol II y ARN pol III que se encargan, respectivamente, de la transcripción del ARN ribosomal (ARNr), del ARN transcrito por genes que codifican para proteínas (ARNm) y de los ARN de tamaño pequeño (ARNt, ARN5S, etc.).

En 2006 se otorgó el premio Nobel en Química a Roger D. Kornberg (hijo del también premio Nobel en 1959, Arthur Kornberg), «por sus estudios de la base molecular de la transcripción eucariótica». Kornberg, que había iniciado su carrera científica como estudiante postdoctoral en el MRC de Cambridge, UK, trabajando con el laureado Nobel Aaron Klug en el estudio de la estructura de la cromatina, demostró en 1974 (15) que las histonas H3 y H4 forman un tetrámero del tipo  $(H3)_2(H4)_2$  y propuso, asimismo, que el nucleosoma es la unidad básica de la cromatina, estando formado por un octámero de histonas y 200 pb de ADN (16). En términos genéticos podríamos preguntarnos si «el sabio nace o se hace» y reflexionar cómo en este caso la «interacción genotipo-ambiente» ha dado como fenotipo a un Premio Nobel como lo fue su padre Arthur Kornberg.

Al regresar a Standford, USA, Kornberg decidió cambiar de línea de investigación adentrándose en el tema de transcripción en eucariontes. Aplicando a la perfección la regla de oro de la investigación—esto es, hacerse una pregunta importante, elegir el material biológico idóneo y aplicar la técnica experimental adecuada—, Kornberg eligió como organismo eucariótico modelo la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, siendo capaz de desarrollar un sistema de transcripción *in vitro* idóneo para llevar a cabo su propósito (17, 18). Mediante la técnica de análisis cristalográfico con rayos X, en el año 2001 Kornberg y colaboradores (19-20) estudiaron la estructura del complejo de transcripción (ARNpol II-ADN-ARN sintetizado) a un nivel de alta resolución (2,8 y 3,3 Å). Estudios posteriores de nuevas estructuras cristalizadas del complejo ARNpol II-ADN-ARN-nucleótidos-proteínas han permitido a Kornberg y colaboradores realizar una interpretación dinámica del proceso de transcripción.

De todo ello nos hablará el Doctor Rafael Giraldo Suárez, Científico Titular del Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) LACADENA, J. R. (1995): Historia «nobelada» de la Genética: Concepto y método. *Discurso de Ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España*. Madrid, 76 págs.
- (2) FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E. and MELLO, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806-811.
- (3) MONTGOMERY, M. K.; XU, S. Q. and FIRE, A. (1998): RNA as target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 15502-15507.
- (4) ROCHELEAU, C. E.; DOWNS, W. D.; LIN, R.; WITTMAN, C.; BEI, Y.; CHA, Y. H.; ALI, M.; PRIESS, J. R. and MELLO, C. C. (1997): Wnt signalling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell*. 90: 707-716.
- (5) TUSCHI, T.; ZAMORE, P. D.; LEHMAN, R.; BARTEL, D. P. and SHARP, P. A. (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Devel.* 13: 3191-3197.
- (6) ZAMORE, P. D.; TUSCHI, T.; SHARP, P. A. and BARTEL, D. P. (2000): RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101: 25-33.
- (7) PARRISH, S.; FLEENOR, J.; XU, S. Q.; MELLO, C. C. and FIRE, A. (2000): Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirements for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell*. 6: 1077-1087.
- (8) BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M. and HANNON, G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409: 363-366.
- (9) HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D. and HANNON, G. J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 404: 293-296.
- (10) HANNON, G. J. (2002): RNA interference. *Nature*, 418: 244-251.
- (11) MELLO, C. C. and CONTE, JR. D. (2004): Revealing the world of RNA interference. *Nature*. 431: 338-342.
- (12) MEISTER, G. and TUSCHI, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431: 343-349.
- (13) HAMMOND, S. M. (2005): Dicing and slicing. The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letter*. 579: 5822-5829.
- (14) DANEHOLT, B. (2006): RNA interference. *The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, Oficial website Nobel Foundation*.
- (15) KORNBERG, R. D. and THOMAS, J. O. (1974): Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*. 184: 865-868.

- (16) KORNBERG, R. D. (1974): Chromatin structure: a repeating unit of histone and DNA. *Science*. 184: 868-871.
- (17) LUE, N. F. and KORNBERG, R. D. (1987): Accurate initiation at RNA polymerase II promoters in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 8839-8843.
- (18) SAYRE, M. H.; TESCHNOCHNER, H. and KORNBERG, R. D. (1992): Reconstitution of transcription with five purified protein factors and RNA polymerase II from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 267: 23376-23382.
- (19) CRAMER, P.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2001): Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science*. 292: 1863-1876.
- (20) GNATT, A. L.; CRAMER, P.; FU, J.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2001): Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*. 292: 1876-1882.



## **RNA interferente: del descubrimiento a sus aplicaciones**

MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ \*

*Profesor de Investigación del CSIC, Centro Nacional  
de Biotecnología y Académico de Número de la Real  
Academia Nacional de Farmacia*

El día 2 de octubre de 2006, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Suecia anunciaba la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina, de forma conjunta, a los investigadores estadounidenses Profesores Andrew Z. Fire, de la Universidad de Stanford en California, y Craig C. Mello, de la Escuela de Medicina en la Universidad de Massachussets, por el descubrimiento del RNA de doble banda o bicatenario (dsRNA) que actúa como supresor específico de genes y que recibe el nombre de RNA interferente (RNAi) (Figura 1). El mecanismo de RNAi se pone en funcionamiento cuando se producen en la célula moléculas de dsRNA que activan la maquinaria bioquímica que degrada aquellas moléculas de RNA mensajero (mRNA) que llevan la misma información genética que el dsRNA. Cuando estas moléculas de mRNA desaparecen, el gen correspondiente es silenciado y la proteína no se produce. La Academia sueca resalta que este nuevo mecanismo de regulación genética y la enzimología del mismo juegan un papel fundamental en muchos de los procesos celulares, desde la función fisiológica de células y tejidos hasta el desarrollo de un organismo. Además el RNAi está presente en plantas, animales y humanos, protege contra las infecciones virales, y asegura la estabilidad genómica mediante el silenciamiento de los elementos móviles o transposones. Actualmente el RNAi de doble banda está siendo utilizado como herramienta para

---

\* Email: mesteban@cnb.uam.es; Teléfono: 91 585 45 53. Fax: 91 585 45 06; [www.cnb.uam.es](http://www.cnb.uam.es)

definir la función de cualquier gen celular, teniendo un gran impacto en la investigación biomédica, con posibilidades de aplicación clínica en un futuro.

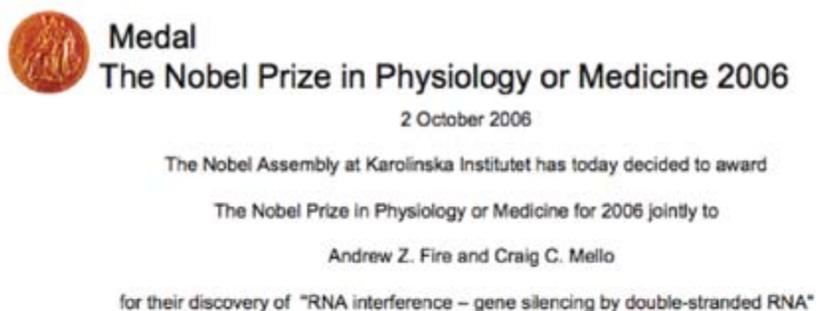


FIGURA 1. *Los descubridores del RNAi, Craig C. Mello (a la izquierda) y Andrew Z. Fire (derecha).*

Los investigadores americanos publicaron el descubrimiento del RNAi en la revista *Nature* en 1998 (1) (Figura 2), y en un tiempo récord este hallazgo ha trascendido a todos los campos de las ciencias de la salud. En palabras de Mello, al anunciarle la concesión del Nobel: «aunque hay muchas aplicaciones para el RNAi, aún desconocemos sus mecanismos...; el observar que el silenciamiento fuera transmitido de una generación a otra y se extendiera de un tejido a otro fueron momentos maravillosos...; un aspecto apasionante es su papel en los cambios evolutivos». Para Fire: «el beneficio más importante es que se harán muchos experimentos que nos dirán cosas importantes...; hay en marcha varios estudios estupendos de ensayos

en modelos animales y clínicos...; aunque es una investigación básica tiene la ventana abierta a su aplicación terapéutica». Es de resaltar que han transcurrido sólo ocho años desde el descubrimiento del RNAi a la concesión del Nobel a dos jóvenes investigadores en la plenitud de sus carreras científicas.

## **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans***

**Andrew Fire<sup>\*</sup>, SiQun Xu<sup>\*</sup>, Mary K. Montgomery<sup>\*</sup>, Steven A. Kostas<sup>††</sup>, Samuel E. Driver<sup>‡</sup> & Craig C. Mello<sup>‡</sup>**

<sup>\*</sup> *Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA*

<sup>†</sup> *Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA*

<sup>‡</sup> *Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech Suite 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA*

Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene<sup>1,2</sup>. Such effects have been proposed to result from a simple antisense mechanism that depends on hybridization between the injected RNA and endogenous messenger RNA transcripts. RNA interference has been used in the nematode *Caenorhabditis elegans* to manipulate gene expression<sup>3,4</sup>. Here we investigate the requirements for structure and delivery of the interfering RNA. To our surprise, we found that double-stranded RNA was substantially more effective at producing interference than was either strand individually. After injection into adult animals, purified single strands had at most a modest effect, whereas double-stranded mixtures caused potent and specific interference. The effects of this interference were evident in both the injected animals and their progeny. Only a few molecules of injected double-stranded RNA were required per affected cell, arguing against stoichiometric interference with endogenous mRNA and suggesting that there could be a catalytic or amplification component in the interference process.

NATURE | VOL 391 | 19 FEBRUARY 1998

FIGURA 2. Artículo en «Nature» (1998) donde se describe el descubrimiento del RNAi.

**Andrew Fire** nació en abril de 1959 en Palo Alto, California, creció en Sunnyvale, fue al Instituto Fremont, luego estudió en la Universidad de California donde se graduó en matemáticas en 1978 con diecinueve años. Posteriormente se trasladó al Massachusetts Institute of Technology (MIT) donde obtuvo el grado de Doctor en 1983. Su etapa postdoctoral la realizó en el laboratorio de Biología Molecular, Medical Research Council, dirigido por el Nobel Sydney Brenner, «padre» de *C. elegans*. Desde 1986-2003 fue Profesor del Departamento de Embriología de la Carnegie Institution de Washington en Baltimore y posteriormente Profesor de Patología en la Escuela de Medicina de la Universidad de Stanford. Los estudios de su laboratorio se centran en los mecanismos por los que las células y organismos responden a cambios genéticos, y especialmente en entender los mecanismos moleculares de la maquinaria de RNAi y su papel en la célula, usando el gusano *C. elegans* como modelo.

**Craig Mello** nació en 1960, estudió en la Universidad de Brown, obtuvo su doctorado en 1990 por la Universidad de Harvard y realizó su etapa postdoctoral en el Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle en el laboratorio de James Priess. Desde 1994 es miembro del Centro del Cáncer en la Escuela de Medicina de la Universidad de Massachusetts en Worcester, y el año 2000 fue nombrado Profesor del Instituto Médico Howard Hughes de la misma Universidad. El interés de su laboratorio se centra en la regulación de la expresión genética durante la embriogénesis del gusano *C. elegans*, con especial énfasis en los mecanismos de interferencia genética.

## ANTECEDENTES

Desde que se identificó al material genético como DNA en 1944 y su estructura en doble hélice por Watson-Crick en 1953 ha sido fundamental entender cómo se produce el flujo de la información genética del núcleo al citoplasma. Varios Premios Nobel han obtenido el galardón por sus contribuciones: al entendimiento de la síntesis de RNA por Ochoa-Konrberg (1959), regulación de la expresión génica por Jacob-Monod (1965), desciframiento del código genético por Nirenberg-Khorana (1968), actividad catalítica del RNA por Altman-Cech (1989) y el concepto de ribozima, y existencia de mRNA

con secuencias interrumpidas (exones e intrones) por Sharp-Roberts (1993). En los años ochenta se observó en bacterias que moléculas pequeñas (unos 100 nucleótidos) de RNA pueden aparearse con secuencias complementarias e inhibir la síntesis de proteínas. Este proceso de activación antisentido también ocurre en células eucariotas, como se demostró por primera vez en 1993 con el gusano *C. elegans*. Durante años se pensó que este modelo de regulación no era común, hasta que se demostró la existencia de un gran número de moléculas pequeñas de RNA. Aunque solamente un 2% del genoma contiene secuencias codificantes para aproximadamente 30.000 genes, se transcribe cerca del 50% del genoma en RNA. Muchos de estos transcritos no contienen una señal de lectura ORF (open reading frame) por lo que no son traducidos a proteínas. Más bien se trata de RNAs no codificantes (ncRNAs), que sin embargo dan origen a RNAs biológicamente activos, incluyendo variantes que pueden regular o silenciar a los genes codificantes.

El fenómeno de silenciamiento de genes fue descrito en plantas en 1990 por el grupo de Rich Jorgensen, intentando aumentar el color púrpura de petunias por introducción de un gen clonado que producía un pigmento (2). Se observó que cuando se introducía en la planta una copia extra del gen que codifica para la enzima que participa en la producción de pigmentos de antocianina, chalcona sintasa, las flores resultantes tenían colores variados, desde púrpura a blanquecino. Debido a que tanto el gen introducido como el homólogo endógeno eran suprimidos, se llamó a este proceso co-supresión génica o silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). Otros científicos trabajando en la Universidad de Roma con el hongo *Neurospora crassa* observaron que cuando introducían copias adicionales del gen que codifica para el pigmento naranja que sintetiza el hongo, los hongos transgénicos perdían su color naranja y se producían hongos blanquecinos. A este fenómeno lo llamaron «quelling» o supresión (3). En 1995 el estudiante Sue Guo del laboratorio de Kempthues en la Universidad de Cornell, estudiando la influencia de genes específicos en desarrollo, demostró que cuando introducía secuencias en forma de oligonucleótidos antisentido y sentido juntos en *C. elegans* la supresión del gen de interés era mayor que cuando introducía los oligos sentido o antisentido de forma individualizada (4). Ninguno de los grupos anteriores fue capaz de dar una expli-

cación al fenómeno de supresión que observaron en sus experimentos. Serían Fire-Mello los que demostrarían en 1998 la existencia del RNA interferente como explicación de este proceso de control selectivo de la expresión génica (1).

## DESCUBRIMIENTO DEL RNA INTERFERENTE

La publicación en *Nature* (1998) del artículo de Fire-Mello y colaboradores, titulado «Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*» supuso un salto espectacular para entender el fenómeno de silenciamiento de genes. Aunque existían evidencias previas, como se indicó anteriormente, de que tanto el RNA antisentido como el RNA sentido podían silenciar genes de forma específica, sin embargo estos experimentos eran inconsistentes y de bajo rendimiento. Fire-Mello demostraron el efecto fenotípico de RNA inyectando en las gónadas del gusano *C. elegans* el gen *unc-22* que codifica para la proteína del miofilamento, que es abundante pero no esencial. Existen varios miles de copias de *unc-22* mRNA presentes en el músculo estriado del gusano y ya se sabía que una disminución en los niveles de este gen producían un aumento en la curvatura del gusano mientras que la supresión completa del gen resultaba en mayores defectos estructurales y pérdida de motilidad.

Observaron que los cambios fenotípicos en el gusano solamente se producían cuando se inyectaba el RNA sentido y antisentido en forma de dsRNA, pero no cuando cada RNA era incorporado en forma de cadena sencilla. Además demostraron que la secuencia del RNA a inactivar y la contenida en el RNA bicatenario tenían que ser complementarias, lo que aportaba especificidad en el silenciamiento. Muy pocas moléculas eran necesarias para obtener silenciamiento. Para explicar el silenciamiento llevaron a cabo experimentos de hibridación *in situ* del gen abundante *mex-3* RNA inyectado en las gónadas de animales adultos, y observando que después de añadir RNA bicatenario complementario al gen *mex-3* desaparece el mensajero, lo que les llevó a proponer un efecto a nivel de transcripción o de estabilidad del gen. Finalmente la inyección de RNA bicatenario *unc-22*, y gfp-LacZ en la cabeza o cola de animales transgénicos para la proteína fluores-

cente GFP, demostró también producir interferencia pronunciada en la progenie y en todos los tejidos, indicando que el RNA bicatenario fue amplificado o que actuaba catalíticamente. En dicho artículo los autores indicaban que el RNAi explicaba el fenómeno estudiado previamente en plantas de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) y lo culminaban con la sentencia «la interferencia genética por dsRNA puede ser utilizado por el organismo como proceso fisiológico de silenciamiento génico». El fenómeno del RNAi se define en la Figura 3 con el anuncio del premio Nobel.

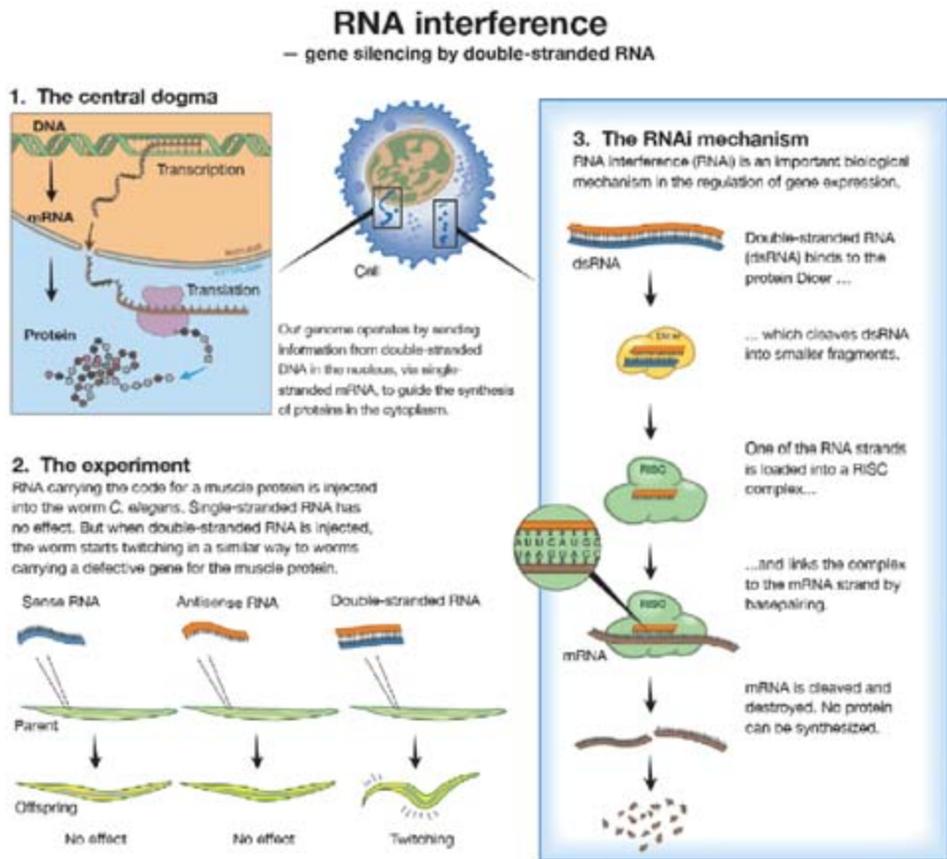


FIGURA 3. Esquema en el que la Academia sueca define el descubrimiento del silenciamiento génico por RNAi al anunciar la concesión del premio Nobel a Fire-Mello.

En un estudio posterior publicado en el PNAS del mismo año (5), Fire-Mello aportaron evidencia de que el mRNA es el sitio de acción del dsRNA por reconocimiento de las cadenas complementarias y que se degrada antes de su traducción en proteínas. También demostraron cómo el dsRNA actúa de forma catalítica sobre el mRNA homólogo mediante la interacción de una molécula lineal de RNA aportado por el dsRNA y el mRNA. Además indicaron que el RNAi puede servir como sistema táctico de defensa en organismos inferiores, de forma similar al sistema de defensa de los interferones en mamíferos.

En poco tiempo la presencia del RNAi fue rápidamente documentada en muchos otros organismos incluyendo la mosca del vinagre, tripanosomas, plantas, planaria, hidra y el pez cebra (6). Así pues, se considera al RNAi como un sistema que ha revolucionado la biología celular y se ha extendido a otras muchas áreas. La revista *Science*, en su edición de diciembre de 2002, consideró al RNAi como la molécula revelación del año (7), y la revista *Nature* dedicó en 2004 un número especial al RNAi (8).

### **MECANISMO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO POR dsRNA**

Poco después del descubrimiento del RNAi se demostró en plantas que el proceso de silenciamiento PTGS se correlacionaba con la presencia de moléculas pequeñas de RNA (de unos 25 nucleótidos) y que este RNA contiene secuencias sentido y antisentido, por lo que se propuso que este RNA pequeño es el responsable de PTGS (9). Varios grupos de investigación se lanzaron al estudio bioquímico del proceso de RNAi, demostrando con embriones de *Drosophila* que el dsRNA es procesado a un tamaño de 21-23 nucleótidos, semejante al descrito en plantas (10, 11). Se propuso que este dsRNA, llamado RNA pequeño de interferencia (small-interfering RNA, siRNA) actúa como guía para la rotura del mRNA. En estudios posteriores, Fire-Mello establecieron por ensayos *in vivo*, que el dsRNA de largo tamaño es cortado en fragmentos de unos 25 nucleótidos y que el RNA antisentido activa la degradación del mRNA por apareamiento de las bases (8, 12) (Figura 4). Posteriormente, por ensayos *in vitro* con cultivos celulares de *Drosophila*, se descubrió la maquinaria del RNAi. Se demostró la existencia de un complejo llamado RISC (RNA-

induced silencing complex) que interacciona con el mRNA a través del RNA antisentido de bajo tamaño donde el mRNA es fragmentado y posteriormente degradado (13). Este complejo contiene al menos un miembro de la familia de proteínas llamadas Argonauta, que actúan como endonucleasas, cortando el mRNA (se conoce como función Slicer). También se demostró que una enzima como la ribonucleasa III, llamada Dicer, es responsable del procesamiento del dsRNA largo a corto (14). En ciertos sistemas como las plantas, gusanos y hongos, la presencia de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) juega un papel importante en la generación y amplificación del siRNA (15). El avance importante de la formación de estas moléculas pequeñas de 21-23 nucleótidos es que evitan la activación del sistema de defensa de los interferones, que requiere mayores tamaños del dsRNA por encima de los 30 nucleótidos. Estudios recientes han demostrado que los dsRNAs entre 25-30 nucleótidos son 100 veces más potentes efectores del silenciamiento génico que los de 21 nucleótidos (16), parece ser por favorecer la eficiencia del papel secundario de Dicer al introducir más siRNAs en el complejo RISC. Los miembros de la familia Dicer contienen varios motivos en la secuencia, incluyendo el dominio de unión a dsRNA (dsRBMs), dominio de ribonucleasa III (RNasa III) y el motivo RNA helicasa con el consenso DExH. Dicer procesa moléculas largas de dsRNA y precursores de miRNAs en pequeñas moléculas de dsRNA con un extremo 5' fosfato y el extremo 3' con dos nucleótidos libres, cuyas cadenas se desaparean y la cadena antisentido se localiza preferentemente en complejos de silenciamiento que median funciones posteriores (14, 17). Es de interés que en muchos organismos, incluyendo *C. elegans*, un solo gen Dicer (DCR-1) es suficiente para mediar el procesamiento de dsRNA por distintas rutas (18). Mediante estudios proteómicos de análisis de proteínas que interaccionan con Dicer (19) llevados a cabo por el grupo de Mello, se ha demostrado que además de los factores necesarios para las rutas de procesamiento de RNAi y de miRNA, DCR-1 interacciona con una serie de proteínas necesarias para la segregación cromosómica de RNAi y la acumulación de varias especies de endo-siRNA. Tanto DCR-1 como el homólogo de la RNA-fosfatasa PIR-1 son necesarios para la acumulación de siRNA y para el procesamiento del sustrato de RdRP derivado de DCR-1. Hay al menos cuatro factores de interacción, incluyendo los conocidos como ERI-1 y RRF-3, necesarios para la

acumulación de especies endógenas de RNAs pequeños. Estos resultados sugieren un papel de ERI-1 y RRF-3 en la producción de sustratos endógenos para DCR-1 y apoyan el modelo por el que moléculas específicas de la actividad de DCR-1 compiten con rutas de silenciamiento de RNAs.

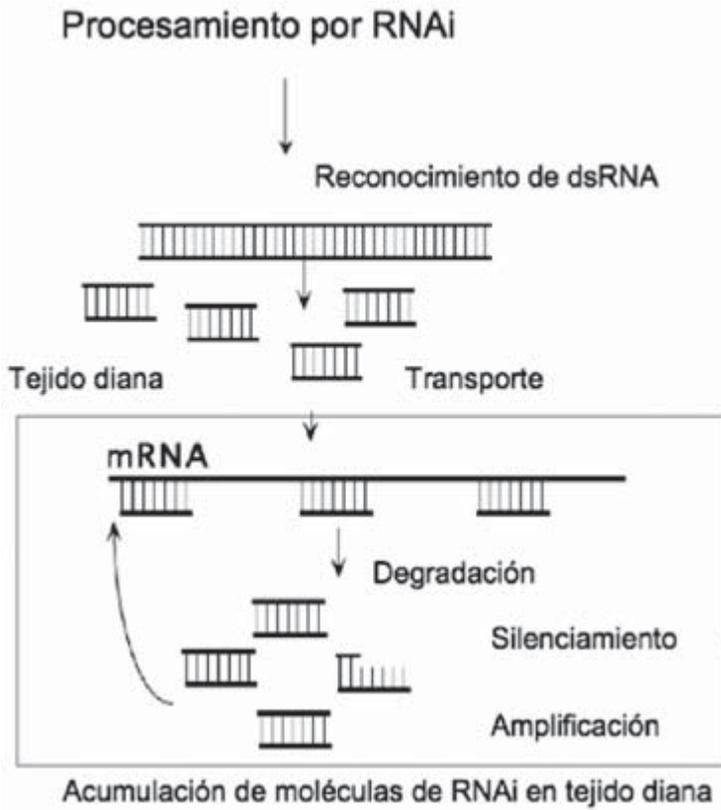


FIGURA 4. Esquema del procesamiento por RNAi.

### MICRO RNAs COMO REGULADORES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los micro RNAs (miRNAs) son una clase de RNAs no codificantes que funcionan como activadores endógenos de la ruta del RNAi (20,

21) (Figura 5). En palabras de Mello al conocer la concesión del Nobel: «pienso que el Comité Nobel, en un futuro próximo, debe de reconocer el descubrimiento de microRNAs, que son moléculas distintas a los siRNAs que descubrimos nosotros, para su consideración al Nobel de Química o Fisiología por su relevancia en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo». Aunque fueron descubiertos inicialmente en *C. elegans*, el primero de ellos fue *lin-4* (22) y luego *let-7* (23) como controladores del desarrollo larvario, estas moléculas pequeñas son de gran interés en biología por su aparente papel en la determinación y mantenimiento del linaje celular. Los miRNAs, con un tamaño medio de unos 22 nucleótidos, se originan como resultado de la transcripción por RNA polimerasa II de regiones del genoma que dan lugar a un transcrito primario (pri-miRNA) que varía en tamaño de unos cientos a miles de nucleótidos, que sufre procesamiento por «splicing», «capping» y «poliadenilación, semejándose al mRNA, aunque puede o no contener un ORF (open reading frame). El componente funcional es una estructura en forma de orquilla con las dos cadenas apareadas por complementariedad en su secuencia terminando en un bucle (stem-loop) y que puede localizarse en un exón o intrón. El precursor es procesado por enzimas nucleares como Droscha o Pasha (DGCR en humanos) para producir una estructura termodinámicamente estable de orquilla con bucle, denominada pre-miRNA de unos 70 pares de bases, con un extremo 5'-fosfato y con 2 nucleótidos terminales en el extremo 3', que es exportada del núcleo al citoplasma por la proteína Exportin-5. La estructura dúplex en forma de bucle es posteriormente procesada por las ribonucleasa III citoplásmica Dicer para producir el miRNA maduro de 22 nucleótidos que se asemeja al siRNA, con un extremo 5'-fosfato y 2 nucleótidos libres en el extremo 3'. Este RNA en forma de dúplex se traslada al complejo efector RISC donde se va a producir el silenciamiento de los mRNAs con secuencia complementaria (Figura 6). Se desconoce el mecanismo de separación de las dos cadenas por una helicasa. La cadena activa, llamada guía, se incorpora en el complejo efector RNAi-RISC que lo va a guiar hasta encontrar el homólogo mRNA y provocar la supresión en la traducción por degradación del mRNA. RISC corta el mRNA en el medio de la región complementaria, 10 nucleótidos más arriba del nucleótido apareado con el extremo 5' del siRNA guía. Esta reacción no requiere ATP (ver revisiones 17, 18). Considerando que la secuencia madura es corta y que no se necesita complementarie-



## Generación de miRNAs & siRNAs

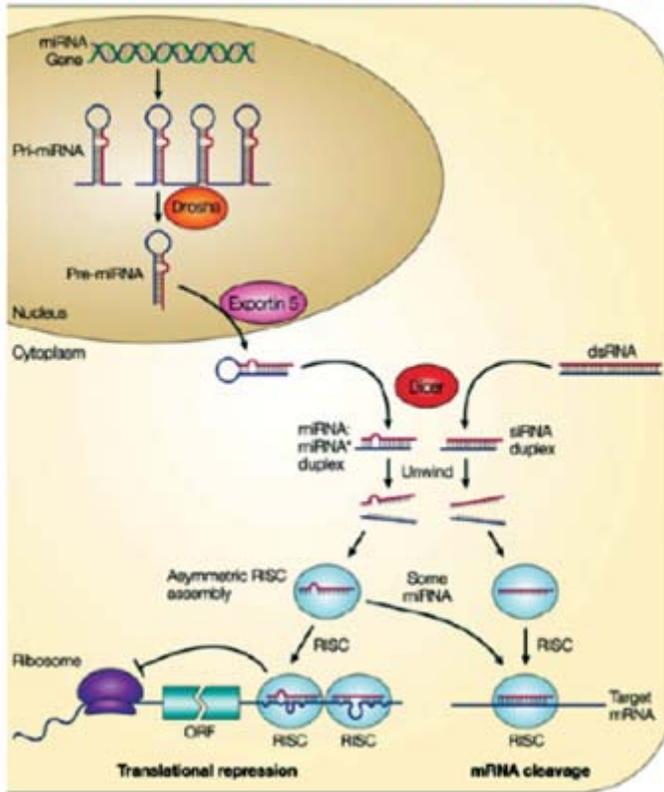
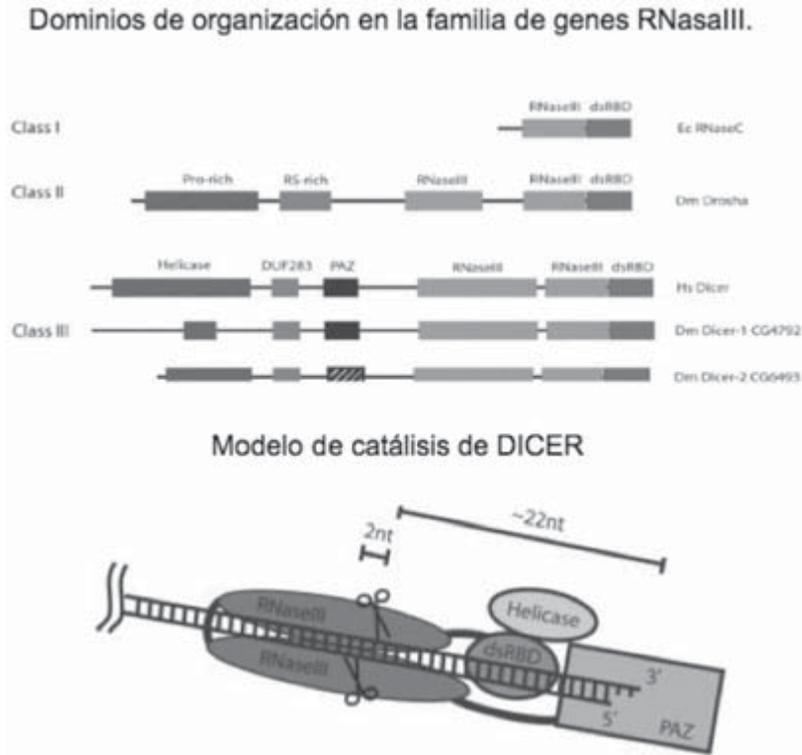


FIGURA 6. *Esquema sobre la generación de miRNA y siRNA y su acción en silenciamiento.* La transcripción por RNA pol II produce moléculas con secuencias que pueden formar bucles y que son procesadas por endorribonucleasas como Drosha. Los fragmentos generados son exportados por exportina del núcleo al citoplasma donde entran en la maquinaria de Dicer-RISC para culminar en el silenciamiento génico bien por degradación del mRNA (caso de siRNA) o por inhibición de la traducción (caso de miRNA).

## BIOQUÍMICA DEL RNA INTERFERENTE

En el mecanismo de silenciamiento de genes por RNAi intervienen una serie de factores cuyas funciones se han ido elucidando y otras son desconocidas (8, 17, 18). Analizaremos los factores más relevantes en el complejo Dicer y RISC. La maduración de los RNAs

pequeños es un proceso secuencial catalizado por endonucleasas del tipo RNasa III llamadas Drosha y Dicer que contienen dominios catalíticos de RNasa III y dominios de unión con dsRNA (dsRBD). Como hemos indicado anteriormente, Drosha es requerida para el procesamiento de los precursores de miRNA que luego son transportados del núcleo al citoplasma para luego interactuar con Dicer y procesarlos en fragmentos de 21 nucleótidos. Existen varios genes Dicer en función de los organismos. Por ejemplo, *Drosophila melanogaster* tiene dos genes semejantes: DICER-1, que procesa preferentemente miRNA, y DICER-2, que procesa dsRNA de largo tamaño. El procesamiento es dependiente de ATP y requiere el dominio funcional helicasa de DCR-2. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, se han identificado cuatro proteínas semejantes a Dicer que están involucradas en procesamiento (DCL-1 a DCL-4). En *C. elegans* sólo una proteína Dicer ha sido identificada, lo mismo que en humanos. El modelo catalítico más actual de Dicer propone que el dominio PAZ se une al extremo 3' del dsRNA con los dos nucleótidos libres. Los dos dominios de RNase III en DICER1 se asocian intramolecularmente formando un pseudodímero creando un lugar activo de forma semejante a la RNasa III de *E. coli*. Cada uno de los dominios hidroliza una de las cadenas del RNA bicatenario generando un nuevo extremo terminal con los dos nucleótidos libres en el extremo 3'. La longitud del producto final con 21 nucleótidos se mide por la distancia entre el dominio terminal de unión a PAZ y el lugar activo de corte (Figura 7). La importancia de Dicer en la funcionalidad de un organismo se ha demostrado con ratones a los que se les ha inactivado el gen correspondiente, lo que resulta en letalidad embrionaria (25). Mientras que tanto Dicer como Drosha contienen el dominio RNasa III, la interacción con dsRNA requiere cofactores. En *Drosophila* tanto DICER-1, DICER-2 y Drosha se asocian con los factores Loquacious, R2D2 y Pasha, que parece dirigen la incorporación específica de la cadena del siRNA al complejo multiproteico RISC que es el encargado de llevar a cabo la destrucción nucleolítica del mRNA target. Una vez que se han producido los siRNA y miRNA en forma de complejo ribonucleoproteico (RNP), estos son incorporados en otro complejo de silenciamiento RNA-inducido, RISC.



**FIGURA 7. Dominios de organización de Dicer y modelo de acción para la generación de fragmentos dsRNA.** Dicer pertenece a la familia de proteínas con acción RNasa III. Los dominios de RNasa III y de unión a dsRNA en esta familia de proteínas se indican para *E. coli* (*Ec*), *Drosophila* (*Dm*) y humano (*Hs*). En la parte inferior se indica el modelo de catálisis para Dicer que se describe en el texto (adaptación de la referencia 17).

Cada RISC contiene un miembro de la familia de proteínas Argonauta (Ago) que probablemente se une directamente con el RNA en el complejo (también recibe el nombre de Slicer). Por análisis de cromatografía de exclusión, se ha determinado que el tamaño de RISC varía entre 140 y 500 kDa (26-28). El número de proteínas Ago difiere entre las especies, variando entre una en *Schizosaccharomyces pombe* a más de 20 en *C. elegans*, comparado con 5 en *D. melanogaster* y 8 en humanos. Las diferentes variedades de Ago sugieren especificidad en la secuencia reconocida. El ensamblaje de RISC

es dependiente de ATP, lo que probablemente refleja la necesidad energética para el proceso de separación de las dos cadenas en el siRNA o miRNA. Las proteínas Ago tienen una masa molecular de unos 100 kDa y contienen dos dominios conservados, PAZ (piwi-argonaute-zwille) y PIWI. El dominio PIWI ha sido implicado en la interacción con Dicer. Los datos de cristalografía de la proteína Ago demuestran una gran semejanza entre el dominio PIWI y miembros de la familia de nucleasas RNasa H. Como RNasa H rompe el RNA en las cadenas dobles de RNA/DNA, se ha propuesto que Ago actúa cortando el RNA en los híbridos RNA/siRNA. El dominio PAZ específicamente reconoce el extremo terminal del apareamiento en el siRNA y miRNA con el característico dos nucleótidos libres en el extremo 3' (29-32) (Figura 8). Además de la proteína Ago, otras proteínas se han identificado en el complejo de RISC. En el caso de *D. melanogaster*, el producto Vasa del gen intrónico (VIG), la proteína relacionada con frágil-X (dFXR) y el dominio tudor de la nucleasa de estafilococo (Tudor-SN); en el caso de humanos, se han observado interacciones entre AGO2/eIF2C2 (factor de iniciación en la traducción) con FMRP (frágil X mental retardation protein) (17).

El siguiente paso es la rotura del mRNA y represión traduccional. La cadena sencilla del siRNA en RISC le guía de forma específica hacia la secuencia homóloga en el mRNA. RISC corta el mRNA en el medio de la región complementaria, 10 nucleótidos más arriba de los nucleótidos apareados con el extremo 5' del siRNA. Esta reacción no requiere ATP. El complejo RISC/miRNA cataliza la hidrólisis del mRNA produciendo extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. Esta reacción de hidrólisis difiere de la clásica rotura endonucleolítica mediada por la actividad de la enzima pancreática RNasa. Esta reacción requiere de la presencia de magnesio y se asemeja a la que Dicer produce durante la generación del siRNA a partir de largos precursores de dsRNA. Se ha propuesto un modelo para explicar la actividad endonucleolítica de RISC a partir de la actividad catalítica de Ago (Slicer). El extremo 5' del siRNA se une al dominio PIWI de la Ago. El extremo 5'-fosfato que es importante para tener alta afinidad en la unión está coordinado por cuatro residuos conservados y separados de la cadena de mRNA. El extremo 3' del siRNA se extiende más allá de la interacción con el dominio PAZ de Ago. La afinidad en la unión con el mRNA depende del grado de apareamiento de las

dos cadenas con la región 3'. La maquinaria catalítica es la actividad RNasa H localizada en el dominio PIWI, originando extremos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo (ver revisiones 8, 17, 18) (Figura 8).

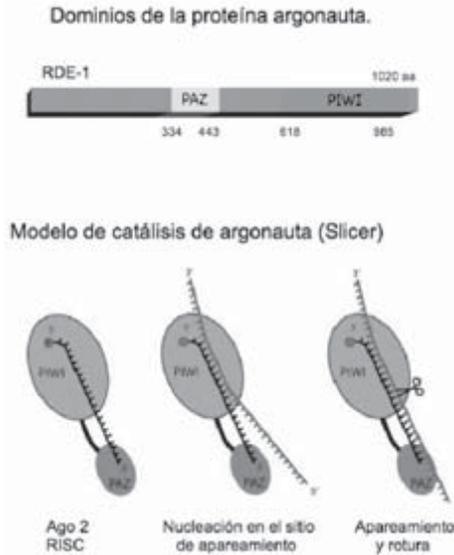


FIGURA 8. **Dominios de la proteína argonauta y modelo de acción de RISC para provocar la rotura del mRNA.** En la parte superior se indican los dominios PAZ y PIWI que caracterizan a la familia de proteínas que intervienen en la acción de RISC. Existe gran semejanza entre el dominio PIWI y miembros de la familia de nucleasas RNasa H. Una de las cadenas de RNA (de unos 22 nucleótidos) que ha entrado en el complejo RISC, se une por complementariedad al mRNA, con la zona PIWI favoreciendo el apareamiento en la zona central, mientras que el dominio PAZ une al extremo 3'. Como RNasa H rompe el RNA en las cadenas dobles de RNA/DNA, se ha propuesto que Ago actúa cortando el RNA en los híbridos RNA/siRNA (adaptación de la referencia 17).

## SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL RNAI Y APLICACIONES

Desde un principio, al RNAi se le han ido asignando funciones biológicas con repercusiones muy importantes en regulación de la expresión génica, en desarrollo, evolución, así como sus posibles aplicaciones farmacológicas (33).

## 1. Efecto antiviral

Las observaciones pioneras en plantas indicaban un efecto protector contra infecciones virales cuando se producía el fenómeno de PTGS, lo que sugería que el RNAi podría proteger contra agresiones víricas en otros organismos. Se ha establecido de hecho que RNAi es un mecanismo de defensa antiviral que funciona en plantas, gusano y mosca, aunque no se ha establecido que este mecanismo exista en mamíferos. No obstante, los estudios llevados a cabo en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con RNAi administrado de forma exógena, indican que formas sintéticas en dúplex apareado como siRNAs (34) o con estructura de horquilla (hairpin, shRNAs) introducidas en las células y dirigidas contra varios de los mRNAs que codifican por proteínas víricas estructurales (env-gag-pol) y no estructurales (rev-tat-vif-nef) y contra factores celulares como son los co-receptores CXCR4 y CCR5 para la entrada del VIH, pueden interferir eficazmente la infección por VIH en distintos cultivos celulares (33). Se han llevado a cabo aproximaciones semejantes contra los virus de la hepatitis B y C, mediante la introducción de siRNAs o shRNAs dirigidos frente a mRNAs que codifican por proteínas virales. También se están utilizando miRNAs humanos como herramienta contra la patogénesis del virus de la gripe. El potencial del siRNA para tratar infecciones virales se ha demostrado en ratones frente al virus de la gripe, parainfluenza y el virus respiratorio sincitial (35-37), así como en primates desafiados con el coronavirus del SARS (34). Estos experimentos en animales han estimulado el comienzo de un ensayo clínico en fase I frente al virus respiratorio sincitial, enfermedad que puede causar la muerte en niños recién nacidos. No obstante los virus pueden utilizar mecanismos de defensa para evadir el silenciamiento por RNAi (38). También los virus pueden codificar por miRNAs para regular su propia expresión génica (39). Se han descubierto microRNAs en retrovirus (VIH), papovavirus (SV40) y herpesvirus (herpes simplex, Epstein Barr, citomegalovirus, Kaposi-associated herpes) (40, 41). Esta novedosa línea de investigación nos va a permitir avanzar en el conocimiento de la capacidad evolutiva que han adquirido los virus para evadir el sistema de RNAi como mecanismo de defensa frente al hospedador. La dificultad en el uso de siRNAs o shRNAs en terapia radica en la limitación para llevar este

tipo de moléculas al lugar deseado, como puede ser el hígado, células linfoides, células madre, etc. Existe un gran esfuerzo investigador para desarrollar vehículos (como son vectores virales basados en lentivirus, adenovirus y adenoasociado, vectores de DNA con promotores de pol III, encapsulación en liposomas, conjugación con anticuerpos por receptores celulares, etc.) que transporten en el organismo estas moléculas a sus lugares de acción. Los mayores impedimentos son la dificultad para que el siRNA atraviese la membrana celular y su corta vida media, debido a la rapidez con la que se elimina por el riñón y su digestión por ribonucleasas endógenas. La incorporación intravenosa de siRNA modificado químicamente e incorporado en liposomas reduce la replicación del virus de la hepatitis B en modelo murino (42). Indudablemente es necesario hacer mucha más experimentación antes de decidir su aplicación terapéutica en humanos para resolver los problemas de estabilidad, especificidad, resistencia celular y de no interferencia con procesos celulares. A corto plazo es más factible la aplicación del RNAi en animales de granja para contrarrestar infecciones virales con incidencia en la industria alimenticia.

## **2. Cáncer y enfermedades genéticas**

Existe gran interés en utilizar la tecnología del RNAi en el tratamiento de tumores. La evidencia indica que muchos miRNAs están altamente expresados en tejidos diferenciados, pero su expresión está reducida en tumores. Se ha sugerido que si los miRNAs contribuyen al cáncer, la supresión de los mismos puede servir como terapia antitumoral (43). Esta aproximación puede funcionar, ya que estudios en ratón han demostrado inhibición de miRNAs con antagonistas llamados «antagonomics» (44).

También, la posibilidad de poder regular la expresión de genes de forma específica por RNAi en organismos, abrió las puertas a su posible uso como agente terapéutico para el control de enfermedades con deficiencia génica conocida (33). Así pues, se está aplicando la tecnología de RNAi como terapia de enfermedades neurodegenerativas como Huntington, Ataxia, Alzheimer, entre otras (45). Varios estudios han demostrado que la terapia del RNAi mejora el fenotipo

de enfermedades humanas en modelos animales. Recientemente, utilizando siRNAs introducidos por vía sistémica en forma de liposomas se ha demostrado que se puede silenciar (90%) en macacos el gen de la apolipoproteína B (APOB) en el hígado durante 48 horas después de su administración, con la consiguiente reducción en los niveles de colesterol (46). Hace falta realizar más experimentación para demostrar carencia en toxicidad del producto y que se obtiene silenciamiento completo y de larga duración en genes implicados en enfermedades neurodegenerativas (ejemplo, hungtintina, Sca I, ataxia, B-amiloide, tau y otros).

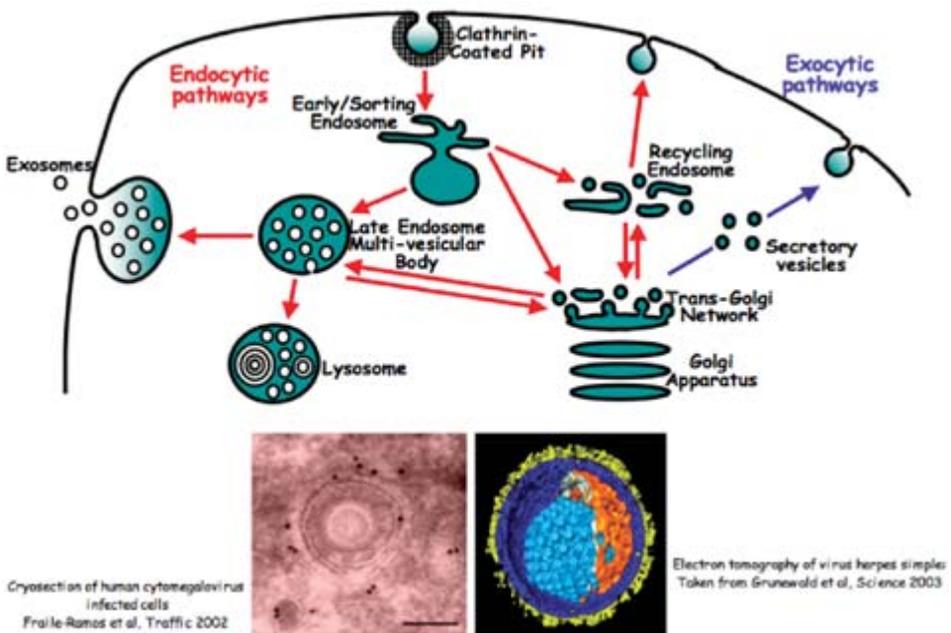
### **3. Represión específica de genes y regulación del desarrollo de organismos**

Una de las grandes aplicaciones del RNAi ha sido su utilización para reprimir de forma específica la funcionalidad de genes celulares y asignar funciones a los mismos, lo que ha supuesto un salto espectacular en genómica funcional y en biología del desarrollo. Básicamente, el producto es introducido en una célula en forma de siRNA o shRNA, actuando de vehículo un vector no viral o viral, y llevando en su secuencia promotores adecuados para su producción intracelular y silenciamiento del gen específico al activarse el sistema Dicer-RISC (47). De esta manera se ha conseguido silenciar multitud de genes en células en cultivo y esencialmente se podrá silenciar cualquier gen de interés en un organismo. Un ejemplo se indica en la Figura 9, donde el RNAi se puede utilizar para silenciar mRNAs que codifican para proteínas involucradas en la ruta endocítica de procesamiento de moléculas. Mediante RNAi se puede discriminar qué parte de la maquinaria endocítica es necesaria para la morfogénesis y salida de virus de la célula.

### **4. Control de la expresión de la cromatina por RNAi**

Después del descubrimiento del RNAi, se observó que el proceso de regulación transcripcional en plantas, PTGS, se debía a una supresión en la transcripción de la heterocromatina (48), fenómeno que luego se extendió a *S. Pombe*, *Drosophila* y vertebrados (47, 49).

Además, se observó que el RNAi regula la actividad de genes en la región próxima a la cromatina condensada. Este fenómeno no está aún caracterizado a nivel molecular, aunque está claro que modificaciones en la cromatina, como son los niveles de metilación y mediante la unión de proteínas específicas a la cromatina, juegan un papel importante en la regulación transcripcional. Se considera que estas funciones son relevantes para definir cómo funciona el genoma y el mantenimiento de su integridad, así como su evolución.



**FIGURA 9. Esquema del procesamiento endocítico y su bloqueo por RNAi.**  
 La entrada de moléculas o virus en una célula está controlada por el sistema endocítico que procesa complejos proteicos y los lleva a distintos compartimentos celulares. En estos complejos intervienen una serie de proteínas, por lo que la inhibición en la síntesis de alguna de estas proteínas por siRNA altera la formación de partículas virales. La incorporación intracelular de siRNA específico para proteínas que actúan en distintos compartimentos nos ayuda a conocer en qué medida estas rutas intervienen en la morfogénesis de virus complejos, como el citomegalovirus, que pertenece a la familia de los herpesvirus.  
 Esquema adaptado por Alberto Fraile en mi laboratorio del CNB.

## **5. El RNAi asegura la estabilidad genómica manteniendo el silenciamiento de los elementos móviles**

Durante el proceso de transcripción del genoma de una célula se expresa cerca de un 50% de su información genética en forma de elementos móviles (transposones) y en secuencias virales (retrotransposones). Estos elementos serían nocivos a la célula a no ser que existiera un sistema de regulación de los mismos. Se propuso inicialmente en plantas y *C. elegans* que se producía silenciamiento de estos elementos móviles, ya que cuando se introducen formas mutadas en la maquinaria de RNAi ocurren alteraciones en la función del genoma (50, 51). En este proceso, las regiones del genoma que codifican para transposones dan lugar a dsRNA debido a la transcripción de las dos cadenas complementarias del DNA. Un mecanismo que tiene la célula para mantener bajo control el dsRNA producido por los transposones es activar el sistema RNAi. Lo mismo ocurre con el dsRNA subproducto de la transcripción de secuencias virales no codificantes que dan lugar a dsRNA activando el RNAi y eliminando la acción de estas secuencias virales. Aún desconocemos a nivel molecular el sistema de regulación de los transposones y secuencias virales no codificantes y las consecuencias que pueden tener en la función celular, desarrollo y evolución de nuestro genoma.

## **6. El RNAi y el sistema de los interferones como reguladores de la síntesis de proteínas**

Se propuso inicialmente que el RNAi actuaba como un sistema de defensa del genoma contra elementos nocivos para el huésped, como son los virus. Con anterioridad se conocía otro sistema de defensa del organismo, los interferones (IFN), como primera línea de lucha contra los virus. Existe un denominador común entre RNAi y los IFN, cual es la activación de ambos sistemas por dsRNA. Sin embargo, mientras que RNAi es activado por moléculas de dsRNA con un tamaño medio de 22 nucleótidos, sin embargo el sistema de los interferones es activado por dsRNAs con un tamaño superior a 30 nucleótidos. En ambos casos se produce una inhibición en la síntesis de proteínas al suprimirse la traducción de los mRNA, aunque en el caso de RNAi esta inhibición es específica, mientras que

la activación de IFN da lugar a una inhibición no específica, es decir, el bloqueo en la traducción de mRNAs virales y celulares sin especificidad. La inhibición de la síntesis de proteínas por la activación del sistema de IFN se debe a la acción de enzimas inducidas: el sistema 2-5A sintetasa/RNasa L y la proteína quinasa PKR. En el primer caso, la enzima 2', 5'oligoadenilato sintetasa es activada por dsRNA, que sintetiza en presencia de ATP oligonucleótidos pequeños (pp)p5A2'(p5'A2')n, que se unen a la enzima endoribonucleasa L (RNasa L) dando lugar a la degradación de cualquier mRNA a su alrededor (52, 53). En el caso de la proteína quinasa PKR, ésta se activa por la unión de dsRNA, lo que provoca fosforilación de la pequeña subunidad del factor de iniciación eIF-2 $\alpha$  con la consiguiente inhibición en la síntesis de proteínas por ser este un factor esencial en la iniciación. La proteína PKR además activa el factor transcripcional NF-kB, jugando un papel muy relevante en el control de infecciones virales y en proliferación celular (54). Así pues existe complementariedad en la acción de los dos sistemas de defensa del organismo, RNAi e IFN, para actuar tan pronto como la célula encuentra en su citoplasma dsRNA (Figura 10). Hacen falta más investigaciones para demostrar la relevancia de la actuación conjunta de estos dos importantes mecanismos, RNAi e IFN, como mecanismos de defensa del organismo contra patógenos.

## CONCLUSIONES

El descubrimiento por Fire-Mello de que las células disponen de un mecanismo especial, RNAi, para suprimir la expresión de genes propios por mediación de dsRNA, fue algo totalmente inesperado y que ha supuesto un cambio radical en nuestro entendimiento del control de la expresión génica en los organismos. El RNAi no solamente protege contra las infecciones virales, sino que además asegura la estabilidad genómica silenciando los elementos móviles (transposones y retrotransposones), controla la síntesis de proteínas, regula el desarrollo de organismos, mantiene la cromatina condensada suprimiendo la transcripción, y controla procesos evolutivos. Así pues, el RNAi es una herramienta eficaz para suprimir la expresión de genes de forma específica, por lo que su aplicación en medicina ha despertado un gran interés. La demostración de siRNA/ shRNA

como vehículo para reprimir en modelos animales infecciones virales, cáncer y trastornos genéticos, augura un horizonte de esperanza para aplicar esta tecnología como arma terapéutica contra muchas enfermedades. Es predecible que el número de ensayos clínicos aumentará en los próximos años y que eventualmente se aplicará el RNAi como procedimiento clínico.

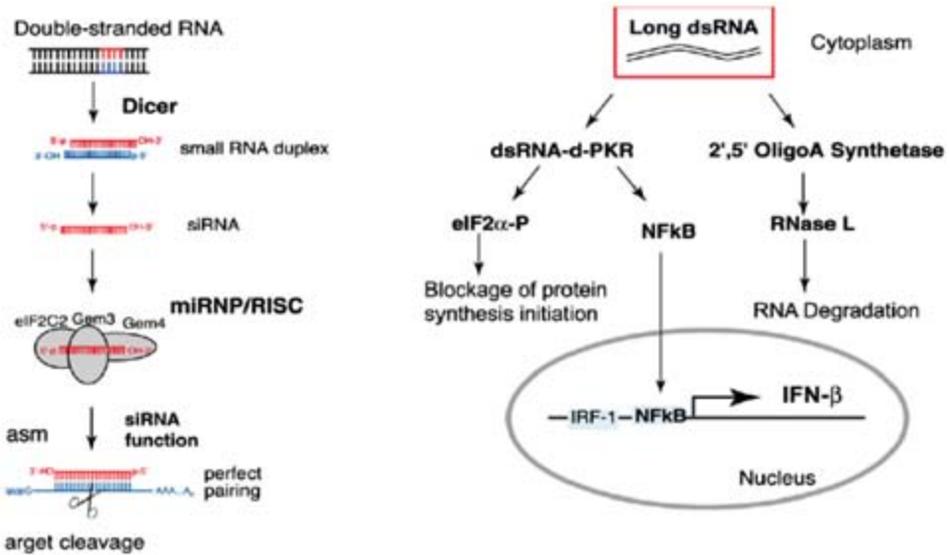


FIGURA 10. *Esquema comparativo de los dos mecanismos de defensa del organismo que utilizan dsRNA como activador. En la parte izquierda se indica la acción del sistema RNAi, mientras que en el lado derecho se presenta la activación de las dos rutas enzimáticas inducidas por los interferones. El resultado final es la inhibición de la síntesis de proteínas, bien por degradación del mRNA o por bloqueo de la iniciación.*

## REFERENCIAS

- (1) FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E. and MELLO, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806-811.
- (2) NAPOLI, C.; LEMIEUX, C. and JORGENSEN, R. (1990): Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 2: 279-289.

- (3) ROMANO, N. and MACINO, G. (1992): Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6: 3343-3353.
- (4) GUO, S. and KEMPHUES, K. J. (1995): par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* 81: 611-620.
- (5) MONTGOMERY, M. K.; XU, S. and FIRE, A. (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 15502-15507.
- (6) TUSCHL, T.; ZAMORE, P. D.; LEHMANN, R.; BARTEL, D. P. and SHARP, P. A. (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev.* 13: 3191-3197.
- (7) COUZIN, J. (2002): Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science.* 298: 2296-2297.
- (8) MELLO, C. C. and CONTE, D. JR. (2004): Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 431: 338-342.
- (9) HAMILTON, A. J. and BAULCOMBE, D. C. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 286: 950-952.
- (10) ELBASHIR, S. M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K. and TUSCHL, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411: 494-498.
- (11) ZAMORE, P. D.; TUSCHL, T.; SHARP, P. A. and BARTEL, D. P. (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 101: 25-33.
- (12) PARRISH, S.; FLEENOR, J.; XU, S.; MELLO, C. and FIRE, A. (2000): Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell.* 6: 1077-1087.
- (13) HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D. and HANNON, G. J. (2000): An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404: 293-296.
- (14) BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M. and HANNON, G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409: 363-366.
- (15) COGONI, C. and MACINO, G. (1999): Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature.* 399: 166-169.
- (16) KIM, D. H.; BEHLKE, M. A.; ROSE, S. D.; CHANG, M. S.; CHOI, S. and ROSSI, J. J. (2005): Synthetic dsRNADicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* 23: 222-226.
- (17) HAMMOND, S. M. (2005): Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579: 5822-5829.
- (18) MEISTER, G. and TUSCHL, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 431: 343-349.
- (19) DUCHAINE, T. F.; WOHLSCHEGEL, J. A.; KENNEDY, S.; BEI, Y., CONTE, D. JR.; PANG, K. *et al.* (2006): Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell.* 124: 343-354.

- (20) BARTEL, D. P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116: 281-297.
- (21) LEE, R. C. and AMBROS, V. (2001): An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294: 862-864.
- (22) LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L. and AMBROS, V. (1993): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75: 843-854.
- (23) REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUVIE, A. E. *et al.* (2000): The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403: 901-906.
- (24) LEWIS, B. P.; BURGE, C. B. and BARTEL, D. P. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120: 15-20.
- (25) BERNSTEIN, E.; KIM, S. Y.; CARMELL, M. A.; MURCHISON, E. P.; ALCORN, H., LI, M. Z. *et al.* (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35: 215-217.
- (26) NYKANEN, A.; HALEY, B. and ZAMORE, P. D. (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. 107: 309-321.
- (27) HAMMOND, S. M.; BOETTCHER, S.; CAUDY, A. A.; KOBAYASHI, R. and HANNON, G. J. (2001): Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 293: 1146-1150.
- (28) MARTÍNEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB, H.; LUHRMANN, R. and TUSCHL, T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 110: 563-574.
- (29) LINGEL, A.; SIMON, B.; IZAURRALDE, E. and SATTLER, M. (2004): Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 576-577.
- (30) MA, J. B. YE, K. and PATEL, D. J. (2004): Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*. 429: 318-322.
- (31) SONG, J. J.; LIU, J.; TOLIA, N. H.; SCHNEIDERMAN, J.; SMITH, S. K.; MARTIENSSEN, R. A. *et al.* (2003): The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10: 1026-1032.
- (32) YAN, K. S.; YAN, S.; FAROOQ, A.; HAN, A.; ZENG, L. and ZHOU, M. M. (2003): Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 426: 468-474.
- (33) HANNON, G. J. and ROSSI, J. J. (2004): Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*. 431: 371-378.
- (34) LI, B. J.; TANG, Q.; CHENG, D.; QIN, C.; XIE, F. Y.; WEI, Q. *et al.* (2005): Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in *Rhesus macaque*. *Nat. Med.* 11: 944-951.
- (35) GRIMM, D.; STREETZ, K. L.; JOPLING, C. L.; STORM, T. A.; PANDEY, K.; DAVIS, C. R. *et al.* (2006): Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 441: 537-541.

- (36) BITKO, V.; MUSIYENKO, A.; SHULYAYEVA, O. and BARIK, S. (2005): Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat. Med.* 11: 50-55.
- (37) Tompkins, S. M.; Lo, C. Y.; Tumpey, T. M. and Epstein, S. L. (2004): Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 8682-8686.
- (38) LAKATOS, L.; CSORBA, T.; PANTALEO, V.; CHAPMAN, E. J.; CARRINGTON, J. C.; LIU, Y. P. *et al.* (2006): Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25: 2768-2780.
- (39) SULLIVAN, C. S.; GRUNDHOFF, A. T.; TEVETHIA, S.; PIPAS, J. M. and GANEM, D. (2005): SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature.* 435: 682-686.
- (40) GRUNDHOFF, A.; SULLIVAN, C. S. and GANEM, D. (2006): A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpes viruses. *RNA.* 12: 733-750.
- (41) PFEFFER, S.; SEWER, A.; LAGOS-QUINTANA, M.; SHERIDAN, R.; SANDER, C.; GRASSER, F. A. *et al.* (2005): Identification of microRNAs of the herpes virus family. *Nat. Methods.* 2: 269-276.
- (42) MORRISSEY, D. V.; LOCKRIDGE, J. A.; SHAW, L.; BLANCHARD, K.; JENSEN, K.; BREEN, W. *et al.* (2005): Potent and persistent *in vivo* anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 23: 1002-1007.
- (43) HAMMOND, S. M. (2006): RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58: 63-68.
- (44) KRUTZFELDT, J.; RAJEWSKY, N.; BRAICH, R.; RAJEEV, K. G.; TUSCHL, T.; MANOHARAN, M. *et al.* (2005): Silencing of microRNAs *in vivo* with «antagomirs». *Nature.* 438: 685-689.
- (45) BOUDREAU, R. L. and DAVIDSON, B. L. (2006): RNAi therapy for neurodegenerative diseases. *Curr. Top. Dev. Biol.* 75: 73-92.
- (46) ZIMMERMANN, T. S.; LEE, A. C.; AKINC, A.; BRAMLAGE, B.; BUMCROT, D.; FEDORUK, M. N. *et al.* (2006): RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* 441: 111-114.
- (47) SIJEN, T.; VIJN, I.; REBOCHO, A.; VAN BLOKLAND, R.; ROELOFS, D.; MOL, J. N. *et al.* (2001): Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr. Biol.* 11: 436-440.
- (48) METTE, M. F.; AUFSATZ, W.; VAN DER WINDEN, J.; MATZKE, M. A. and MATZKE, A. J. (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19: 5194-5201.
- (49) HALL, I. M.; SHANKARANARAYANA, G. D.; NOMA, K.; AYOUB, N.; COHEN, A. and GREWAL, S. I. (2002): Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science.* 297: 2232-2237.
- (50) KETTING, R. F.; HAVERKAMP, T. H.; VAN LUENEN, H. G. and PLASTERK, R. H. (1999): Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell.* 99: 133-141.
- (51) TABARA, H.; SARKISSIAN, M.; KELLY, W. G.; FLEENOR, J.; GRISHOK, A.; TIMMONS, L. *et al.* (1999): The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell.* 99: 123-132.

- (52) PLAYER, M. R. and TORRENCE, P. F. (1998): The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol. Ther.* 78: 55-113.
- (53) SEN, G. C. and SARKAR, S. N. (2005): Hitching RIG to action. *Nat. Immunol.* 6: 1074-1076.
- (54) GARCÍA, M. A.; GIL, J.; VENTOSO, I.; GUERRA, S.; DOMINGO, E.; RIVAS, C. *et al.* (2006): Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to anti-proliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 1032-1060.

# **Roger Kornberg y la RNAPol II: El mecanismo de síntesis del ácido ribonucleico desvelado al medio siglo de Severo Ochoa y su polinucleótido fosforilasa**

RAFAEL GIRALDO SUÁREZ\*

*Científico Titular. Centro de Investigaciones Biológicas,  
CSIC, Madrid*

## **RESUMEN**

El premio Nobel de Química, en su edición de 2006, ha sido otorgado al Profesor Roger Kornberg, del Departamento de Biología Estructural de la californiana Universidad de Stanford. El Profesor Kornberg ha desarrollado durante años un exhaustivo y riguroso trabajo sobre el complejo de proteínas responsable de la síntesis del ARN mensajero en las células eucarióticas, la RNA polimerasa II. Aplicando metodologías biofísicas, en particular la cristalografía de rayos-X, su trabajo muestra cómo diez de las doce subunidades proteicas del enzima se coordinan para separar las dos hebras de la molécula de ADN, reconocer el primer ribonucleótido que debe incorporarse sobre el molde de la cadena que ha de ser transcrita y catalizar la polimerización de sucesivos nucleótidos con gran fidelidad y procesividad. Cerca de medio siglo después de que Severo Ochoa realizase la primera síntesis bioquímica del ARN en un tubo de ensayo, el trabajo del ahora galardonado desentraña, en sus detalles más íntimos, el funcionamiento de la maquinaria macromolecular esencial para la expresión de los genes.

**Palabras clave:** Premio Nobel Química 2006.—Roger Kornberg.—RNAPol II.—Síntesis ARNm.—Cristalografía rayos-X.

---

\* Centro de Investigaciones Biológicas - CSIC. C/ Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid. España. Teléfono: 91 837 31 12 (ext. 4348). Fax: 91 536 04 32. E-mail: [rgiraldo@cib.csic.es](mailto:rgiraldo@cib.csic.es)

**ABSTRACT**

**Roger Kornberg and RNAPol II: unveiling the mechanism of ribonucleic acid synthesis half a century after Severo Ochoa and his polynucleotide phosphorylase**

The Nobel Prize in Chemistry 2006 has been awarded to Prof. Roger Kornberg, Head of the Department of Structural Biology, Stanford CA, USA. Prof. Kornberg has been leading along years an exhaustive and rigorous research effort on RNAPol II, the protein complex responsible for the synthesis of messenger RNA in eukaryotic cells. By means of biophysical approaches, X-ray crystallography in particular, his work shows how ten of the twelve protein subunits of the whole enzyme are coordinated in order to melt the two DNA strands, recognize the first ribonucleotide to be incorporated on the template chain to be transcribed and catalyze polymerization of successive nucleotide building blocks with astonishing fidelity and processivity. Nearly half a century after the pioneering *in vitro* synthesis of RNA by Severo Ochoa, the work now awarded unveils, with a wealth of intimate details, the function of the macromolecular machinery essential for gene expression.

**Keywords:** Nobel Prize Chemistry 2006.—Roger Kornberg.—RNAPol II.—mRNA synthesis.—X-ray crystallography.

**INTRODUCCIÓN AL PROBLEMA BIOLÓGICO**

La transmisión de la información genética es, junto con el establecimiento de un metabolismo energético y la compartimentalización mediante membranas, uno de los principios definitorios de la vida (1). El llamado «dogma central» de la Biología Molecular, formulado por vez primera por Francis Crick para establecer el flujo de información entre biomoléculas (para una perspectiva histórica, véase ref. 2), asigna una posición central al ácido ribonucleico (ARN). En su formulación más simple:



Es decir, la información almacenada en las porciones codificantes (genes) del ácido desoxirribonucleico (ADN) es transferida a una macromolécula intermedia (el ARN mensajero, ARNm) que es finalmen-

te decodificada a proteínas, las protagonistas principales de los procesos celulares. Mientras que la perpetuación de la información contenida en el ADN (mediante el proceso de *replicación*) y su expresión en ARN (*transcripción*) están fundadas en la complementariedad inherente a los pares de bases A-T/U y G-C, en el último paso (*traducción*) el principio de complementariedad entre nucleótidos y aminoácidos no es satisfecho de una manera directa. Requiere pues de macromoléculas adaptadoras (los ARN de transferencia, ARNt) y de otras estructurales-catalíticas (ARN ribosómicos, ARNr), asociadas en sí mismas a proteínas (en ARNt sintetetasas y ribosomas). En la simplicidad del esquema conceptual arriba comentado subyace una extraordinaria complejidad en el nivel molecular, al participar en cada uno de dichos procesos decenas de proteínas y largas cadenas de ácidos nucleicos, ensamblados y coordinados de manera precisa para ejercer sus respectivas catálisis con gran eficiencia y fidelidad. Tres son las maquinarias macromoleculares responsables de los procesos de transmisión y expresión de la información genética: el replisoma, la ARN polimerasa (en lo sucesivo, RNAPol) y el ribosoma.

No es pues de extrañar que, dadas su esencialidad y complejidad, los procesos de replicación, transcripción y traducción, atraigan de manera continuada el interés de la comunidad científica y que muchos de los avances significativos en tales campos hayan recibido el reconocimiento de los principales galardones científicos, con los Premios Nobel a la cabeza.

### **LOS KORNBERG, UNA SAGA FAMILIAR FOR THE LOVE OF ENZYMES**

Las primeras síntesis de ácidos nucleicos en un tubo de ensayo fueron realizadas por los grupos de Severo Ochoa (ARN) y Arthur Kornberg (ADN), lo que les valió el compartir el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1959. Ambos investigadores publicaron en su día unas excelentes anotaciones autobiográficas (3, 4) en las que narran con trazos muy vivos la cadena de acontecimientos que les llevaron a aislar enzimas capaces de realizar dichos procesos. En lo que se refiere al ARN, nuestro Nobel describe cómo la por él bautizada polinucleótido fosforilasa, purificada de *Azotobacter vinelandii*,

era capaz de realizar la reacción reversible (5):  $n\text{NDP} \Leftrightarrow (\text{NMP})_n + n\text{Pi}$ , pudiendo pues polimerizar cualquier nucleósido difosfato (NDP) en ARN, con la liberación de fosfato inorgánico. Si bien dicho enzima fue la herramienta clave en la síntesis de copolímeros que condujeron al desciframiento del código genético (2), los hechos pronto mostraron que la biosíntesis celular del ARN era realizada por otro enzima mucho más complejo: la RNAPol (6). En los microorganismos procarióticos existe un único holoenzima RNAPol, mientras que en los eucariotas se ensamblan hasta tres versiones del mismo, evolutivamente relacionadas y especializadas en la transcripción de cada uno de los tipos de ARN: RNAPol I (ARNr), II (ARNm) y III (ARNt).

Para el propósito de este artículo, baste añadir que el interés de Ochoa y Kornberg por la enzimología de los procesos de transferencia de la información genética supuso la coronación del trabajo sobre el metabolismo energético (fosforilación oxidativa) de una larga genealogía de investigadores, todos ellos asimismo premiados con el Nobel: O. Meyerhof (1922), O. Warburg, (1931), C. y G. Cori (1947), F. Lipmann (1953), P. Boyer (1997) ... Esta saga se ha visto continuada en 2006 con el galardón recibido, en su modalidad de Química, por el estadounidense Roger Kornberg (nacido en 1947, hijo de Arthur), por su contribución, pionera y abrumadora, a la comprensión de los mecanismos moleculares de la transcripción en eucariotas. Más allá del hecho anecdótico de tratarse del sexto caso de pareja padre/madre-hijo/a galardonados con «el Premio entre los premios», es consecuencia de la profunda pasión por la Bioquímica que A. Kornberg transmitió a sus hijos desde una edad muy temprana (4) y de la determinación invencible de Roger de abordar aproximaciones biofísicas que su padre no había llegado a explorar. R. Kornberg se inició en ellas durante su formación posdoctoral en Cambridge, en el laboratorio de Aaron Klug (a su vez también premiado con el de Química en 1982).

## **ESTUDIOS ESTRUCTURALES SOBRE LA RNAPOL II: RESOLUCIÓN Y COMPLEJIDAD VAN DE LA MANO**

Fiel al segundo de «los diez mandamientos» del bioquímico formulados por su padre (7), un microorganismo, la levadura *Saccharomy-*

*ces cerevisiae* ha sido el sistema modelo que le ha permitido a R. Kornberg el obtener una perspectiva universalmente válida sobre un proceso esencial. Su primera aproximación al problema de la transcripción se deriva de aportaciones pioneras sobre la estructura de la cromatina eucariótica, más en concreto sobre el desplazamiento de los nucleosomas, las partículas nucleoproteicas que la constituyen (8, 9), al paso de la maquinaria transcripcional (10). El laboratorio de Kornberg impactó a la comunidad científica con una primera descripción de la estructura de la RNAPol II a baja resolución (16 Å) mediante técnicas de difracción de electrones (microscopía electrónica) (11). A una resolución tal, típica del rango accesible para dicha técnica (debido a limitaciones en el orden de los especímenes), se distinguen con claridad el volumen y la forma del holoenzima, en los que destaca la presencia de distintos lóbulos, pero sin que se puedan inferir ni la estructura fina ni la función de cada uno de ellos.

Los años siguientes fueron quizá los más arduos para el grupo de Stanford. El llevar la resolución de sus estudios estructurales a niveles en los que fuera posible una interpretación funcional implicaba recurrir a la cristalografía de rayos-X (12). Como el nombre de dicha técnica indica, se requería la obtención de cristales tridimensionales, es decir, la deposición de moléculas del enzima en las tres direcciones del espacio con un orden tal que difractasen los rayos-X de manera coherente. De las doce subunidades de la RNAPol II (Rpb1-12), la cristalización del holoenzima requirió la eliminación de dos de ellas (Rpb4 y 7, no esenciales). El tamaño de la celdilla unidad (aquel elemento mínimo cuya repetición espacial constituye el cristal), como era de esperar siendo la RNAPol II un complejo cuya masa molecular ronda el medio millón de Daltons (Da), era muy grande (dimensión mayor, 370 Å). Esto impuso el uso de radiación sincrotrón de gran intensidad y resolución espacial. Este tipo de fuente de rayos-X, accesible en grandes instalaciones gestionadas por consorcios internacionales (pronto también en España: el sincrotrón ALBA, en Barcelona), es uno de los avances que han impulsado de manera decisiva el desarrollo presente de la cristalografía de macromoléculas biológicas, haciendo factibles proyectos de tamaño y complejidad crecientes, como el que aquí nos ocupa.

Los cristales inicialmente obtenidos por Kornberg y sus colaboradores difractaban los rayos-X a una resolución máxima de 3.5 Å,

lo que habría sido suficiente para trazar un modelo de la estructura del holoenzima en el que se distinguiera el esqueleto polipeptídico de las diez subunidades. Sin embargo, la reconstrucción matemática, mediante transformadas de Fourier, de la densidad electrónica de los átomos que componen la RNAPol II requería no sólo las amplitudes de cada reflexión (obtenidas de manera directa de los datos del experimento de difracción) sino también sus fases, que podrían ser inferidas de la localización de átomos pesados en la red cristalina (12). Los primeros empleados con éxito fueron 18 átomos de wolframio, agrupados en un *clúster*, que se incorporaron a los cristales por difusión. Las fases obtenidas, hasta 5 Å de resolución, permitieron localizar diversos lóbulos en el enzima (13), que podían ser superpuestos sobre el volumen previamente obtenido mediante microscopía electrónica. La posición de uno de ellos difería entre ambas estructuras, lo que sugería que podría desplazarse para abrazar el ADN molde, como se discutirá más adelante.

No había pasado aún un año, cuando condiciones de cristalización mejoradas permitieron reducir ligeramente el tamaño de la celdilla e incluir otros grupos de átomos pesados en la red cristalina. Como resultado, se obtuvieron fases fiables hasta una resolución de 3.1 Å, a la que fue ya posible el trazar las cadenas polipeptídicas y así distinguir  $\alpha$ -hélices y láminas- $\beta$  (14). La sustitución de los iones de  $Mg^{2+}$ , presentes en los cristales, por  $Zn^{2+}$  condujo a determinar su posición y así postular la localización del centro activo en el holoenzima. Por último, la más nítida definición de lóbulos y dominios asociada al aumento en la resolución trajo consigo el modelado de una localización plausible tanto para el ADN molde como para el ARN naciente.

Una ulterior mejora en las condiciones de cristalización y la sustitución de las 94 metioninas presentes en la RNAPol II por su análogo Se-Met permitieron extender la resolución hasta 2.8 Å y con ello proceder al trazo de las cadenas laterales de los residuos aminoácidos sin ambigüedades notorias y con una buena estereoquímica (15). En dicho modelo se caracterizaron los residuos que participan en los contactos entre las diez subunidades presentes (Fig. 1A). Quedó así perfectamente definida la existencia de cuatro grandes módulos, potencialmente móviles en respuesta a la unión del holoenzima al ADN. Otro elemento entonces identificado de manera inequívoca

fue un ion  $Mg^{2+}$  (A) en el posible centro activo. La densidad de un posible segundo  $Mg^{2+}$  (B) no quedaba, sin embargo, tan claramente definida. En aquel momento era ya claro que la subunidad mayor, Rpb1 (1.733 residuos aminoácidos), contenía los residuos catalíticos y, junto con Rpb2, la mayoría de los que determinan la interacción de la RNAPol II con el ADN molde y canalizan al ARN naciente. Asimismo, se pudo modelar la RNAPol II humana sobre la de levadura, como la identidad de secuencia entre ambas (53%) permitía inferir. En cuanto a la similitud estructural con las cinco subunidades ( $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\sigma$ ) del holoenzima RNAPol bacteriano (16, 17), el dímero de  $\alpha$  está relacionado con el subcomplejo Rpb3-Rpb11,  $\beta$  con Rpb2 y  $\beta'$  lo está con Rpb1, mientras que los factores  $\sigma$  de selección de promotor encuentran su análogo funcional en el factor general de transcripción TFIID, cuya masa molecular y número de componentes superan los de la propia RNAPol II.

La estructura de la RNAPol II pudo ser finalmente extendida hasta 2.3 Å, tras difundir en los cristales diversos NTPs, lo que permitió elucidar el mecanismo catalítico, tal y como se discutirá más abajo. En paralelo, otra serie de estructuras iba a permitir al grupo de Kornberg el definir las interacciones del ADN molde y el ARN naciente con el holoenzima.

## INTERACCIONES DE LA RNAPOL II CON LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Aunque las sucesivas estructuras de la RNAPol II habían dado lugar a modelos de fiabilidad creciente sobre la situación de ADN molde y ARN en complejo con el holoenzima (11, 13-15), la comprensión de esta máquina macromolecular requería co-cristalizarla con ácidos nucleicos. El primer hito en dicha dirección fue publicado por Kornberg de manera simultánea a la estructura del holoenzima a 2.8 Å de resolución, sirviéndose de ésta para la obtención de fases, si bien a unos más modestos 3.3 Å impuestos en parte por la complejidad del sustrato (18): una doble hélice de ADN de 30 pb, con una prolongación de cadena sencilla en uno de sus extremos 5' para la carga de la RNAPol II, de los que catorce habían sido desplazados por el enzima al transcribir *in vitro* un ARN cuya síntesis se había

detenido ante la primera base de adenina del molde, al no haber sido incluido en la reacción el UTP complementario.

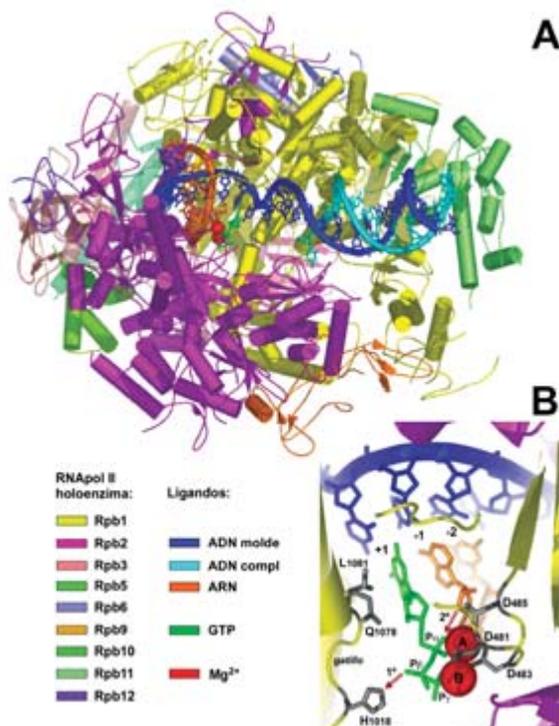


FIGURA 1. (A) **Estructura de la RNApol II en elongación** (asociada a un híbrido ADN-ARN). En diversos colores se indican las subunidades proteicas (Rpb) visibles en la orientación presentada. Las  $\alpha$ -hélices se esquematizan como cilindros y la hebras- $\beta$  como flechas. El nucleótido (GTP), sito en el centro activo, se muestra en forma de varillas, así como las bases en los ácidos nucleicos. Los dos iones Mg<sup>2+</sup> catalíticos se representan como esferas. (B) **Una sección ampliada del centro activo** (rotada unos 180° en torno al eje Y). Los residuos relevantes para la catálisis nucleófila (flechas granates) se representan en color gris. Modelo basado en el fichero PDB con código 2E2H (21) y representado por medio del programa PyMOL (<http://www.pymol.org>).

En cuanto a la estructura del holoenzima en el complejo (Fig. 1A), la mayor diferencia con la de su forma libre estriba en la posición del lóbulo móvil que, como ya se había propuesto (13-15), abraza el ADN molde tras rotar unos 30° y acomodar cambios estructurales en cinco

regiones distribuidas entre las subunidades Rpb1 y 2. Por lo que respecta al ADN que ha de ser aún transcrito, yace en un surco con potencial electrostático positivo (15) entre dicho módulo y Rpb2-Rpb5. En la región que lo precede, el ADN desapareado en la horquilla muestra una gran flexibilidad, mientras que los residuos en la hebra molde interaccionan con aminoácidos de la llamada « $\alpha$ -hélice puente», que forma parte también de Rpb1. El híbrido ADN-ARN permanece apareado a lo largo de 9 pb, presentando una conformación intermedia entre las canónicas de A y B-DNA. Los contactos observados entre subunidades Rpb y ADN/ARN se establecen con los esqueletos azúcar-fosfato de éstos y no con las bases, lo que explica la ausencia de especificidad de secuencia que caracteriza la interacción entre polimerasas y ácidos nucleicos. Es de destacar que se cumple otra de las predicciones hechas sobre los modelos previos (13-15): la porción de ADN ya transcrita y re-apareada se sitúa en ángulo recto con respecto a la que queda por transcribir, desviada por acción de una «pared» establecida por un dominio de Rpb2, mientras que el ARN sintetizado se separa del ADN y se posiciona en un canal de salida que atraviesa el holoenzima. El mecanismo de separación del ARN fue revelado en otra estructura cristalina adicional (a 3.6 Å de resolución), en la que éste no era formado por transcripción sino sintetizado químicamente, incluyendo un nucleótido 3'-desoxi terminador, e hibridado después al ADN: dos lazos provenientes de Rpb1 y uno de Rpb2 interaccionan entre sí para actuar como una cuña y guiar el ARN hacia aquél canal (19).

## EL MECANISMO CATALÍTICO DE LA RNAPOL II

La difusión de diversos NTPs en la red cristalina de la RNAPol II y la co-cristalización con un híbrido sintético ADN-ARN permitió apreciar con gran detalle el discurrir de los ácidos nucleicos en el centro activo (20) y proponer un mecanismo catalítico fiable (21), ya esbozado sobre las estructuras preexistentes (Fig. 1).

El centro activo del enzima se localiza alrededor del extremo 3' de la cadena naciente de ARN y es aportado, una vez más, por Rpb1. La presencia de un nucleótido terminador en dicho extremo del ARN permitió situar un NTP complementario al residuo  $i+1$  del ADN

molde sin que su fosfato- $\alpha$  experimentara la catálisis (Fig. 1B). De los dos iones metálicos  $Mg^{2+}$  identificados en la estructura del holoenzima libre (15), el mejor definido de ellos (A) es coordinado por el fosfato- $\alpha$  y por una triada de aspartatos (D481/483/485), mientras que el segundo (B) lo es por los fosfatos- $\beta$  y  $\gamma$  del ligando NTP. Dado que en ausencia de nucleótido la presencia del metal en B apenas se intuía, se infiere que éste debe acompañar al NTP entrante. ¿Cómo evita la RNAPol II la incorporación de un NTP desapareado? El estudio de los cristales de varios de tales complejos conllevó la sorpresa de que un nucleótido no complementario se encuentra rotado unos  $180^\circ$ , coordinados aún sus fosfatos- $\beta$  y  $\gamma$  por el metal B, pero estableciendo contactos adicionales, mientras que la base se proyecta hacia un poro bajo el centro activo del enzima. El sitio en el que se unen los nucleótidos no complementarios constituiría, en realidad, el punto primario de entrada (E) de cualquier nucleótido que, cuando es el correcto, rotaría en torno al metal B para formar el par de bases y disponerse en A para la catálisis. Las interacciones proteína-NTP durante la rotación contribuirían a evitar la incorporación de dNTPs, si bien esta selectividad parece tener una base más cinética que estructural.

Con una gran intuición, otro grupo había propuesto independientemente una configuración similar para los nucleótidos no apareados en la RNAPol bacteriana (22). Además, dichos investigadores utilizaron el modelo de Kornberg sobre los dos metales del centro activo de la RNAPol II para explicar dos reacciones colaterales que dicha enzima puede realizar *in vitro*: nucleolisis y pirofosforolisis, viniendo a cerrar así el círculo de la reversibilidad de las reacciones de síntesis y degradación del ARN, como ya fuera mostrado en sentido inverso por Severo Ochoa con la polinucleótido fosforilasa (5). Aunque las RNAPol virales, no homólogas con las RNAPol celulares, presentan un mecanismo catalítico que implica también dos metales, en aquéllas ambos iones entran con los NTPs (23-25). Además, la topología relativa de los centros activos y de los híbridos ADN-ARN es distinta, permitiendo en el caso de la RNAPol II el retroceso del enzima, relevante en caso de pausa transcripcional y que permite la edición del ARN (20).

En el más reciente de sus trabajos, cuya publicación coincidió con la ceremonia de entrega del Nobel de Química a Kornberg, el grupo

de Stanford ha llegado a definir, sobre complejos ternarios que incluyen RNAPol II, el híbrido ADN-ARN y NTPs, el conjunto de interacciones que acompañan a la formación del enlace fosfodiéster (21) (Fig. 1B). Dos son los elementos que participan directamente en la catálisis, denominados la  $\alpha$ -hélice «puente» y el lazo «gatillo». Están en contacto estrecho y sus movimientos acoplados contribuirían al movimiento de translocación de la RNAPol II. Cuando el sitio A se encuentra ocupado con el NTP complementario, el gatillo se dispone en múltiples conformaciones, predominando aquellas próximas al metal. A altas concentraciones de  $Mg^{2+}$ , el segundo metal (B) se localiza en una nueva posición (C), siendo desplazados en paralelo los NTPs desde el sitio A al E, inhibiendo la catálisis. El residuo Leu1081 en el gatillo establece contactos hidrofóbicos con la base del nucleótido, a la par que Gln1078 interacciona con el grupo 3'-OH del anillo de ribosa. A su vez, el residuo His1085 establece un puente, bien sea de hidrógeno o salino, con el fosfato- $\beta$  del NTP a través de su nitrógeno imidazólico protonado. Éste atraería hacia sí parte de la densidad electrónica del fosfato, facilitando el ataque nucleófilo ( $S_N2$ ) del grupo terminal 3'-OH del ARN, que resultaría en la formación del nuevo enlace fosfodiéster (Fig. 1B). Dado su papel central en la catálisis, no resulta extraño que el gatillo sea la diana de factores reguladores (en la RNAPol bacteriana, NusA y NusG) e inhibidores. Entre estos últimos, el grupo de Kornberg determinó la estructura cristalina de la  $\alpha$ -amanitina en complejo con la RNAPol II (26). Esta potente toxina se une junto a la hélice puente, bloqueando el movimiento del gatillo hacia el nucleótido unido en el sitio A. Un papel análogo sobre la RNAPol bacteriana lo ejerce la estreptolidigina (27).

### **HACIA LA ESTRUCTURA DE LA MAQUINARIA TRANSCRIPCIONAL AL COMPLETO**

Los esfuerzos del grupo de Kornberg por entender la transcripción en su conjunto no se han detenido en la RNAPol II. El ensamblaje macromolecular responsable de todo el proceso comprende unas 60 proteínas distintas, con una masa molecular que excede los 2,5 millones de Da, dimensiones que le acercan a las del ribosoma. El primero de los factores generales de transcripción en unirse al ADN es TFIID, compuesto por unas 15 proteínas distintas de las cuales TBP

desempeña una misión estratégica al reconocer las secuencias TATA que caracterizan a los promotores eucarióticos. Muy poco después de que otros dos grupos resolvieran la estructura de los dominios C-terminales de las TBPs de *Arabidopsis* y humana, Kornberg resolvió la homóloga de *S. cerevisiae* (28). TBP se reveló como un monómero plegado en torno a una extensa lámina- $\beta$  antiparalela curvada y con simetría binaria interna, asemejándose en su forma global a una silla de montar. TBP se une, a través de su superficie cóncava, al ADN disponiéndose a lo largo del surco menor de éste e introduciendo en él una curvatura próxima a los  $90^\circ$ . El ADN quedaría así plegado en torno a la RNAPol II, estableciendo un puente entre ésta y TBP, al que se une como una grapa de refuerzo aún otro factor transcripcional general: TFIIB. De este modo se determina la distancia característica que separa, en los promotores eucarióticos, la secuencia TATA promotora del sitio de entrada del primer NTP (+1).

Precisamente fue TFIIB el siguiente objetivo de los estudios del grupo de Stanford, al co-cristalizar un complejo entre la RNAPol II y TFIIB, resolviendo su estructura a una resolución de  $4.5 \text{ \AA}$ , suficiente para trazar el esqueleto polipeptídico de las proteínas (29). En su mitad N-terminal, compuesta por un dominio de unión a  $\text{Zn}^{2+}$  y un lóbulo a guisa de «dedo», TFIIB interacciona con el extremo C-terminal de Rpb1, situándose próximo al túnel de salida del ARN y «poniendo su dedo» en el propio centro activo del holoenzima, donde estabilizaría el híbrido ADN-ARN en los momentos iniciales de la síntesis de este último. Por su parte, la mitad C-terminal de TFIIB, de estructura fundamentalmente  $\alpha$ -helicoidal, pudo modelarse en interacción con TBP. Cuando el ARN sintetizado por el holoenzima sobrepasa el tamaño de unos diez nucleótidos desplazaría a TFIIB, quedando la RNAPol II libre de su anclaje a TBP-TATA para así recorrer el resto del ADN a transcribir.

El modelo actual de inicio de la transcripción, además de la RNAPol II, ADN/ARN, TBP y TFIIB, incluye otros factores generales cuyas estructuras han sido ya esbozadas mediante microscopía electrónica, tales como TFIIE-H, cuya actividad helicasa contribuye a la apertura de la doble hélice del ADN en el promotor, o TFIIF, que captura transitoriamente la hebra de ADN complementaria al molde (29). En los próximos años cabe esperar una eclosión de los estudios sobre el llamado *complejo mediador*, sobre cuya bioquímica

lleva años trabajando el grupo de Stanford. Recibe su nombre de su función de intermediario entre el holoenzima y la pléyade de factores transcripcionales que regulan específicamente la expresión de cada familia génica. Su primera descripción estructural a baja resolución simplemente muestra cómo envuelve, a modo de media luna, la RNAPol II (30). Vista la trayectoria científica de Roger Kornberg, podemos apostar que, para nuestro deleite, su curiosidad le llevará mucho más allá en el análisis de la estructura y función de este nuevo gigante macromolecular (20 subunidades, 1 millón de Da).

## EPÍLOGO

En su conjunto, el trabajo de R. Kornberg ilumina con gran detalle la transcripción eucariótica, desde el reconocimiento de las secuencias promotoras por la proteína TBP, su interacción con factores transcripcionales generales y de éstos, a su vez, con la RNAPol II y, sobre todo, cómo actúan las subunidades del holoenzima en la incorporación y edición de ribonucleótidos complementarios a la hebra de ADN a transcribir, sin olvidar su actividad en la separación de las cadenas del ADN o la elucidación del mecanismo inhibitorio de una toxina clásica ( $\alpha$ -amanitina).

Como es habitual ante el fallo de un premio del impacto social y con el prestigio científico del Nobel, no ha faltado en este caso la polémica. Por un lado, están quienes se han extrañado de que no hubiese un segundo galardonado, e incluso un tercero. A juicio de quien escribe estas líneas, aunque otros laboratorios han contribuido con estudios sobre la estructura de las RNAPol bacterianas (16, 17) y virales (23-25), una posible razón para su no inclusión habría sido que éstos no han alcanzado ni la profundidad ni la extensión del trabajo realizado por R. Kornberg, habiendo formulado hipótesis menos precisas sobre el mecanismo catalítico. Por otro lado, investigadores que han desbrozado con gran detalle la biología molecular de la activación transcripcional, sin embargo no llegaron a incluir la RNAPol como objeto principal de sus estudios (31, 32). En otro orden de cosas, desde alguna de las áreas más tradicionales de la Química se han escuchado voces reclamando la creación de una modalidad del Premio Nobel en Biología, reflejando el hecho de que

cuatro de los Nobel de Química de los últimos cinco años han reconocido hallazgos de naturaleza biológica. En palabras de nuestro común maestro, A. Klug, «*The whole way he (R. Kornberg) handled RNAPol material is beautiful Chemistry... The question is whether large molecules are part of Chemistry, and of course they are*» (33).

Aventurando una predicción, no sería de extrañar que los estudios sobre otro de los tres procesos esenciales en la transmisión de la información genética, la traducción del ARNm por los ribosomas, se vean reconocidos, en un futuro no muy distante, con el Premio Nobel. La estructura del ribosoma, una gigantesca maquinaria macromolecular que entronca directamente con el mundo prebiótico, ha sido desvelada (de nuevo mediante cristalografía de rayos-X, pero también con aportaciones de microscopía electrónica y bioquímicas) en los albores del nuevo siglo, incluyendo diversos estados funcionales y en interacción con ARNm, ARNt, cofactores proteicos y antibióticos de gran interés farmacológico (34-39). Sin embargo, en tal caso la decisión será aún más difícil para el comité Nobel de la Academia Sueca, pues los investigadores que han realizado una contribución relevante superan el número límite de tres fijado en los estatutos del galardón.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) GIRALDO, R. (2003): Common domains in the initiators of DNA replication in *Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*: Combined structural, functional and phylogenetic perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 533-554.
- (2) FREELAND JUDSON, H. (1995): *The eight day of Creation: Makers of the revolution in Biology*. Penguin books, Londres.
- (3) OCHOA, S. (1999): «La persecución de un hobby». En: *Escritos* (Gómez Santos, M., Ed), págs. 50-92. CSIC, Madrid.
- (4) KORNBERG, A. (1989): *For the love of enzymes: The Odissey of a biochemist*. Harvard U. Press, USA.
- (5) GRUNBERG-MANAGO, M. and OCHOA, S. (1955): Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides: Polynucleotide phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 3165-3166.
- (6) FURTH, J. J.; HURWITZ, J. and ANDERS, M. (1962): The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. I: The purification and properties of ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* 237: 2611-2619.
- (7) KORNBERG, A. (2000): Ten Commandments: Lessons from the enzymology of DNA replication. *J. Bacteriol.* 182: 3613-3618.

- (8) KORNBERG, R. D. (1974): Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*. 184: 868-871.
- (9) KORNBERG, R. D. and LORCH, Y. (1999): Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 98: 285-294.
- (10) LORCH, Y.; LAPOINTE, J. W. and KORNBERG, R. D. (1987): Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*. 49: 203-210.
- (11) DARST, S. A.; EDWARDS, A. M.; KUBALEK, E. W. and KORNBERG, R. D. (1991): Three-dimensional structure of yeast RNA polymerase II at 16Å resolution. *Cell* 66: 121-128.
- (12) BLOW, D. (2002) Outline of Crystallography for Biologists. Oxford U. Press. UK.
- (13) FU, J.; GNATT, A. L.; BUSHNELL, D. A., JENSEN, G. J.; THOMPSON, N. E.; BURGUESS, R. R.; DAVID, P. R. and KORNBERG, R. D. (1999): Yeast RNA polymerase II at 5 Å resolution. *Cell*. 98: 799-810.
- (14) CRAMER, P.; BUSHNELL, D. A.; FU, J.; GNATT, A. L.; MAIER-DAVIS, B.; THOMPSON, N. E.; BURGUESS, R. R.; EDWARDS, A. M.; DAVID, P. R. and KORNBERG, R. D. (2000): Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*. 288: 640-649.
- (15) CRAMER, P.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2001): Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Å resolution. *Science*. 292: 1863-1876.
- (16) ZHANG, G.; CAMPBELL, E. A.; MINAKHIN, L., RICHTER, C., SEVERINOV, K. and DARST, S. A. (1999): Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell*. 98, 811-824.
- (17) VASSYLYEV, D. G.; SEKINE, S.; LAPTENKO, O.; LEE, J.; VASSYLYEVA, M. N.; BORUKHOV, S. and YOKOHAMA, S. (2002): Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature*. 417: 712-719.
- (18) GNATT, A. L.; CRAMER, P.; FU, J.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2001): Structural basis of transcription: An RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science*. 292: 1876-1882.
- (19) WESTOVER, K. D.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2004): Structural basis of transcription: Separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science*. 303, 1014-1016.
- (20) WESTOVER, K. D.; BUSHNELL, D. A. and KORNBERG, R. D. (2004): Structural basis of transcription: Nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell*. 119: 481-489.
- (21) WANG, D.; BUSHNELL, D. A.; WESTOVER, K. D.; KAPLAN C. D. and KORNBERG, R. D. (2006): Structural basis of transcription: Role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*. 127: 941-954.
- (22) SOSUNOV, V.; SOSUNOVA, E.; MUSTAEV, A.; BASS, I.; NIKIFOROV, V. and GOLDFARB, A. (2003): Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *EMBO J*. 22: 2234-2244.
- (23) TAHIROV, T. H.; TEMIAKOV, D.; ANIKIN, M.; PATIAN, V.; McALLISTER, W. T.; VASSYLYEV, D. G. and YOKOHAMA, S. (2002): Structure of a T7 RNA polymerase elongation complex at 2.9 Å resolution. *Nature*. 420: 43-50.

- (24) TEMIAKOV, D.; PATIAN, V.; ANIKIN, M.; McALLISTER, W. T.; YOKOHAMA, S. and VASSYLYEV, D. G. (2004): Structural basis for substrate selection by T7 RNA polymerase. *Cell*. 116: 381-391.
- (25) YIN, Y. W. and STEITZ, T. A. (2004): The structural mechanism of translocation and helicase activity of T7 RNA polymerase. *Cell*. 116: 393-404.
- (26) BUSHNELL, D. A.; CRAMER, P. and KORNBERG, R. D. (2002): Structural basis of transcription: Alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 1218-1222.
- (27) TEMIAKOV, D.; ZENKIN, N.; VASSYLYEVA, M. N.; PEREDERINA, A.; TAHIROV, T. H.; KASHKINA, E.; SAVKINA, M.; ZOROV, S.; NIKIFOROV, V.; IGARASHI, N.; MATSUGAKI, N.; WAKATSUKI, S.; SEVERINOV, K. and VASSYLYEV, D. G. (2005): Structural basis of transcription inhibition by antibiotic streptolydigin. *Mol. Cell*. 19: 655-666.
- (28) CHASMAN, D. J.; FLAHERTY, K. M.; SHARP, P. A. and KORNBERG, R. D. (1993): Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 8174-8178.
- (29) BUSHNELL, D. A.; WESTOVER, K. D.; DAVIS, R. E. and KORNBERG, R. D. (2004): Structural basis of transcription: An RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Ångstroms. *Science*. 303: 983-988.
- (30) ASTURIAS, F. J.; JIANG, Y. W.; MYERS, L. C.; GUSTAFSSON, C. M. and KORNBERG, R. D. (1999): Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science*. 283: 985-987.
- (31) ROEDER, R. G. (2003): The eukaryotic transcriptional machinery: Complexities and mechanisms unforeseen. *Nat. Med*. 9: 1239-1244.
- (32) NAAR, A. M.; LEMON, B. D. and TJIAN, R. (2001): Transcriptional coactivator complexes. *Ann. Rev. Biochem*. 70: 475-501.
- (33) SANDERSON, K. (2006): Nobel Prize blurs boundaries. *Nature*. 443: 615.
- (34) WIMBERLY, B. T.; BRODERSEN, C. E.; CLEMONS, W. M.; MORGAN-WARREN, R. J.; CARTER, A. P.; VONRHEIN, C., HARTSCH, T. and RAMAKRISHNAN, V. (2000): Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407: 327-339.
- (35) BAN, N.; NISSEN, P.; HANSEN, J.; MOORE, P. B. and STEITZ, T. A. (2000): The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. 289: 905-920.
- (36) SCHLUENZEN, F.; TOCILJ, A.; ZARIVACH, R.; HARMS, J.; GLUEHMANN, M.; JANELL, D.; BASHAN, A.; BARTELS, H.; AGMON, I.; FRANCESCHI, F. and YONATH, A. (2000): Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Ångstroms resolution. *Cell*. 102: 615-623.
- (37) ALLEN, G. S.; ZAVIALOV, A.; GURSKY, R.; EHRENBERG, M. and FRANK, J. (2005): The cryo-EM structure of a translation initiation complex from *Escherichia coli*. *Cell*. 121: 703-712.
- (38) SELMER, M.; DUNHAM, C. M.; MURPHY, F. V.; WEIXLBAUMER, A.; PETRY, S.; KELLEY, A. C.; WEIR, J. R. and RAMAKRISHNAN, V. (2006): Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*. 313: 1935-1942.
- (39) KOROSTELEV, A.; TRAKHANOV, S.; LAURBERG, M. and NOLLER, H. F. (2006): Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. *Cell*. 126: 1065-1077.

————— *Artículo original* —————

## **El cambio conformacional en el TCR detecta la fortaleza del ligando en células T maduras y en timocitos**

Recibido el 2 de febrero de 2007

RUTH M. RISUEÑO \* Y BALBINO ALARCÓN  
*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC.  
Universidad Autónoma de Madrid.  
Cantoblanco, Madrid (España).*

### **RESUMEN**

El receptor para el antígeno de células T (TCR) es el encargado de reconocer los péptidos antigénicos enmarcados en una molécula del complejo principal de histocompatibilidad propio (MHC). Una característica única del TCR es su habilidad para explorar los ligandos de MHCp estructuralmente similares y transmitir diferencialmente las señales bioquímicas dependiendo de la fortaleza del reconocimiento del ligando. Durante el desarrollo tímico, los ligandos fuertes inducen la selección negativa provocando la muerte por apoptosis de los clones autorreactivos. Sin embargo, son los ligandos débiles los que inducen la selección positiva y permiten al timocito sobrevivir y seguir madurando. En periferia, las células T maduras únicamente son activadas por ligandos fuertes. El proceso más temprano descrito en la activación de las células T vía TCR es un cambio conformacional en CD3ε dependiente de ligando. En este trabajo se ha comparado la respuesta a li-

---

\* Ruth M. Risueño  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 - Cantoblanco. Madrid. España.  
Teléfono: +34 91 497 50 74.  
Fax: +34 91 497 47 99.  
e-mail: rmrисуeno@cbm.uam.es

**Abreviaturas:** TCR (receptor para el antígeno de células T), MHC (complejo principal de histocompatibilidad), PRS (secuencia de poliprolinas), GST (glutación-S-transferasa).

gandos con distinta afinidad por el TCR en células T maduras de periferia y timocitos inmaduros referidos a la inducción del cambio conformacional. Tanto la estimulación *in vitro* como *in vivo* de las células T maduras e inmaduras con ligandos de alta afinidad inducen el cambio conformacional en el TCR. Es decir, la respuesta de los timocitos y las células T maduras frente a agonistas fuertes es igual en sus primeras etapas de activación.

**Palabras clave:** TCR.—Cambio conformacional.—Desarrollo tímico.—Linfocito T.—Timocito.

### ABSTRACT

#### A conformational change in the TCR senses the strength of the ligand in mature T cell and thymocytes.

The T-cell receptor (TCR) provides the T cell the capacity to respond to antigen peptides bound to the major histocompatibility complex (MHC). A unique feature of the TCR is its ability to scan similar MHCp ligands and transmit distinct biochemical signals depending on the strength of the ligand recognized. In developing thymocytes, strong agonists induce negative selection provoking the death by apoptosis in auto-reactive clones. Nevertheless, weak TCR ligands induce positive selection and allow thymocytes to survive and to continue developing. In periphery, only strong ligands activate mature T cells. The first event described upon TCR triggering is a conformational change in CD3 $\epsilon$ . In this study, we have compared the activation induced by different affinity TCR ligands in mature T cells in periphery and in immature thymocytes referred to the ability to induce the conformational change in the TCR. Not only *in vitro*, but also *in vivo*, the stimulation with strong agonists induces a conformational change in mature and immature T cells.

**Key words:** TCR.—Conformational change.—Thymic development.—T lymphocyte.—Thymocyte.

## INTRODUCCIÓN

### I. Estructura del TCR

El receptor para el antígeno (TCR) es el marcador más característico de los linfocitos T maduros. La mayoría de los linfocitos T en humanos presentan el TCR $\alpha\beta$ . Éste está compuesto por las cadenas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  encargadas del reconocimiento de las moléculas del

complejo principal de histocompatibilidad (MHC) unidos a un péptido antigénico (1), asociadas a las cadenas invariables CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  y CD3 $\zeta$  (CD247) (Figura 1). Los tallos citoplásmicos de las cadenas CD3 contienen unos motivos llamados de «inmunorreceptores basados en tirosinas» o ITAMs que son los lugares de reclutamiento de la maquinaria de transducción de señales tras la activación por el TCR (2). Las cadenas CD3 $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  contienen un único motivo ITAM, mientras que CD3 $\zeta$  tiene tres. Además, la cadena CD3 $\epsilon$  presenta una secuencia de poliprolinas (PRS) situada por encima del ITAM (3).

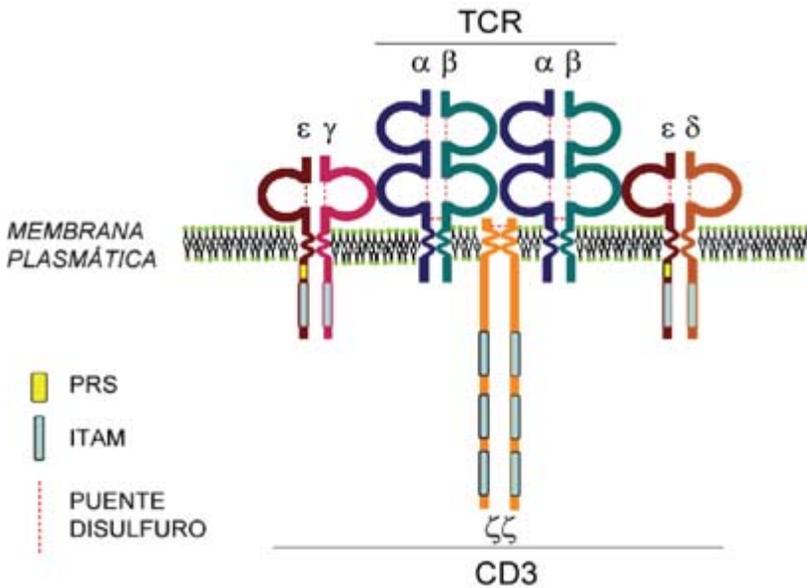


FIGURA 1. *Receptor para el antígeno de células T*. Representación esquemática de la estructura del TCR. Los ITAMs aparecen como rectángulos grises. El cuadrado gris representa la secuencia de poliprolinas (PRs) de CD3 $\epsilon$ .

## II. Señalización por el TCR

Tras el reconocimiento productivo de un MHC-péptido por parte del TCR, se produce la activación de la quinasa de la familia Src Lck que fosforila los motivos ITAM de las cadenas del CD3. La fosfori-

lación de los ITAMs los convierte en sitios de reclutamiento de proteínas efectoras, principalmente de ZAP70. ZAP70 es una PTK citosólica que se activa cuando Lck la fosforila una vez reclutada a los ITAMs. Entre las moléculas que son fosforiladas por ZAP70 se encuentran  $\alpha$ -tubulina, Vav-1, Gab2, LAT y SLP76. Cuando los adaptadores LAT y SLP76 se fosforilan también actúan como proteínas andamio que permiten el reclutamiento de una buena parte de la maquinaria necesaria para la activación de la célula T por el TCR. Se forma un macrocomplejo de señalización o señalosoma (4) (Figura 2) que producirá la activación completa de la célula T.

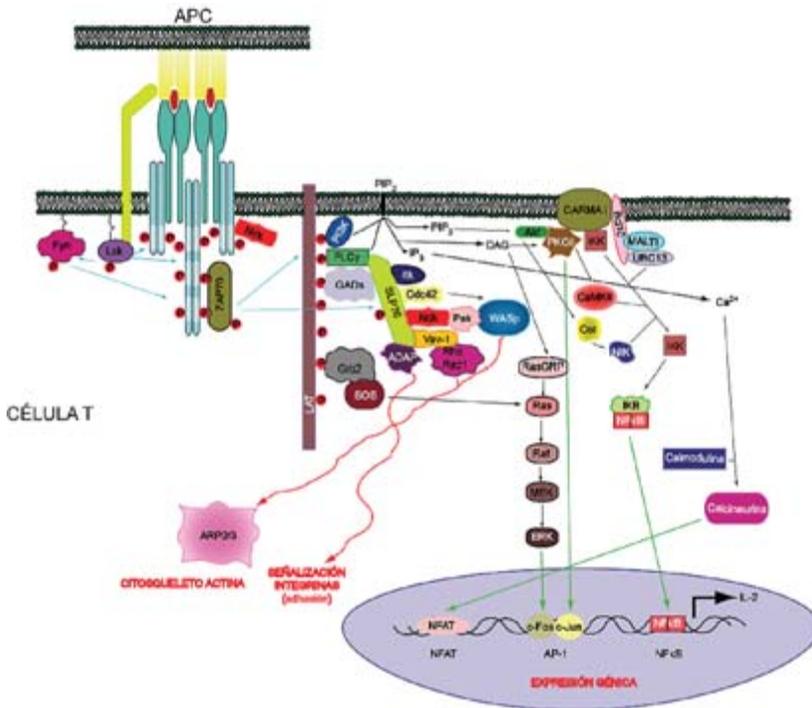


FIGURA 2. Esquema simplificado de la señalización a partir del TCR.

Aún cuando la fosforilación completa de los ITAMs se produce rápidamente tras el reconocimiento por parte del TCR del ligando, el primer hecho descrito tras la activación es un cambio conformacional en la cadena CD3ε que provoca la exposición de su secuencia

de poliprolinas (PRS) y permite la interacción con Nck. Dicha interacción se cree imprescindible para la activación completa de la célula (5).

### III. Desarrollo de células T

El timo es un órgano encapsulado cuya función principal es la generación de células T. Los precursores más precoces existentes en el timo son denominados dobles negativos (DN) ya que no expresan CD4 ni CD8. En DN2 se inicia el reordenamiento del gen TCR $\beta$ . El reordenamiento de la cadena TCR $\beta$  se termina en la etapa DN3. En esta etapa, las células que no expresan un pre-TCR (compuesto por la cadena TCR $\beta$  asociada a pT $\alpha$ ) se mueren. Este proceso se denomina selección  $\beta$  y permite la selección de células con una única cadena de TCR $\beta$  productiva. Una vez pasado el punto de control de la selección  $\beta$ , las células proliferan y comienzan a coexpresar los correceptores CD4 y CD8. A estos timocitos se les denomina DP. Los timocitos DP que expresen un receptor restringido para un MHC de clase I o II propio producen una señal que reprime los genes de la recombinasa (RAG), induce la supervivencia a largo plazo, e impulsa a la migración hacia la corteza y la diferenciación a células T madura (Figura 3). Todo este proceso se denomina selección positiva y se inicia en timocitos DP corticales (6). Los ligandos fuertes, que son estimuladores en células T maduras, provocan la delección clonal en el timo. Este proceso es el responsable de la eliminación de las células T autorreactivas y se denomina selección negativa. La selección negativa es imprescindible para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica central (7). El parámetro que controla el desarrollo de los timocitos es la afinidad del TCR por los ligandos MHC-péptidos, proponiéndose que el TCR interpreta la fuerza de la señal tras el contacto (8) (Figura 4).

Se ha propuesto que la distinción en la señalización entre selección negativa y positiva podría deberse a la distinta cinética de activación de ERK. Los ligandos que inducen selección positiva producen una activación suave y sostenida de ERK, mientras que los de selección negativa provocan una activación fuerte y transitoria de ERK (9). Sin embargo, la única ruta descrita específica de selección

negativa ha sido la de MINK (10). En condiciones de selección negativa, MINK es reclutada al TCR, probablemente vía Nck, y está implicada en la activación de JNK y BimEL, ambas moléculas necesarias en selección negativa. Recientemente, se ha descrito que el cambio conformacional, medido por la exposición del epítipo de APA1/1, únicamente ocurre en condiciones de selección negativa (11).

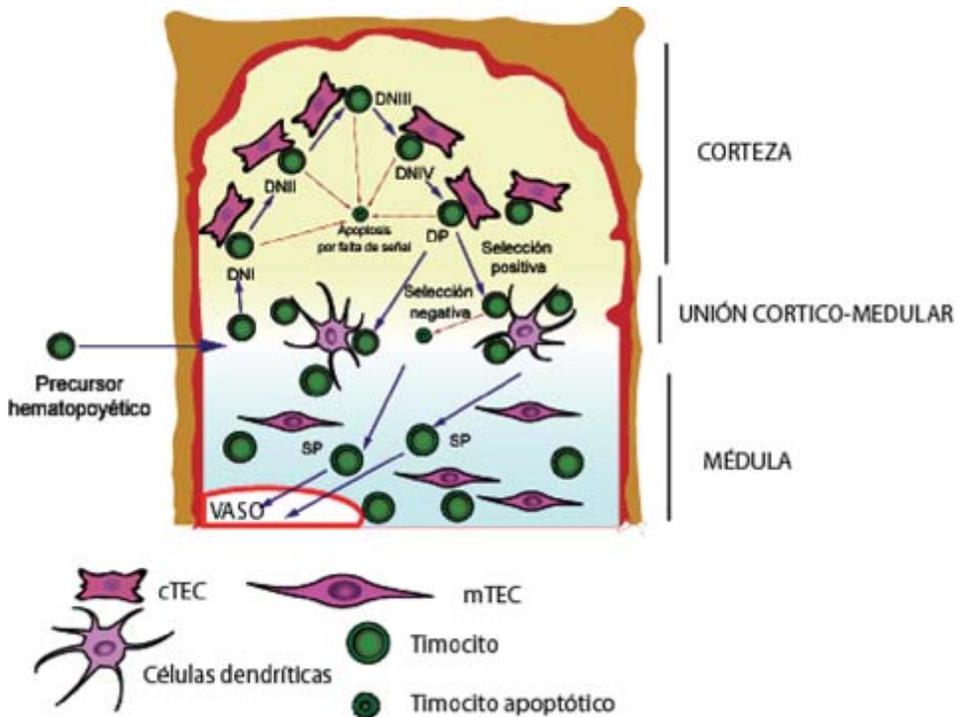


FIGURA 3. **Desarrollo tímico.** Los progenitores de médula ósea (DN1) entran en el timo adulto cerca de las uniones córtico-medulares. A medida que migran hacia la parte externa de la corteza, adquieren el fenotipo DN2 y DN3. En ese momento, se inicia el reordenamiento de la cadena TCR $\beta$ . Al producirse el reordenamiento productivo de TCR $\beta$ , se expresa el pre-TCR (DN4). Los timocitos DP inician el reordenamiento de TCR $\alpha$  y se expresa el TCR. Se inicia la migración hacia la médula y se producen los procesos que llevarán a la selección positiva y negativa. Las células que hayan sobrevivido a estos puntos de control, se dirigirán a la médula donde se terminará su maduración y saldrán a la periferia.

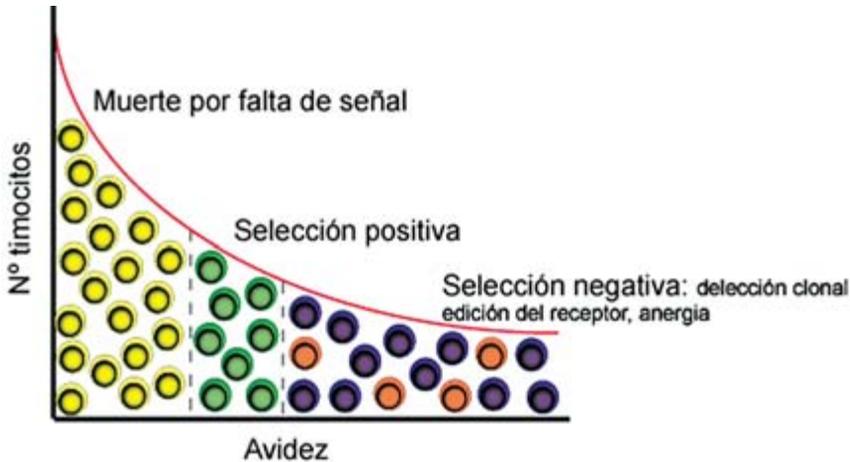


FIGURA 4. *Modelo de afinidad durante la selección positiva y negativa.*

La afinidad del TCR por los MHC-péptidos endógenos es un parámetro fundamental en la maduración de los timocitos. Aquellos timocitos que no reconozcan MHC-péptidos o lo hagan con muy baja afinidad mueren por falta de señal. Si el TCR presenta una afinidad baja por los complejos MHC-péptido endógeno, el timocito sobrevive y prolifera (selección positiva). Los timocitos con TCRs con alta afinidad por el MHC-péptido mueren por apoptosis durante la selección negativa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Ratones

La cepa de ratón utilizada como silvestre fue la C57BL/6. Los ratones transgénicos OT-I expresan el TCR transgénicos OT-I (V $\alpha$ 2.1 V $\beta$ 5.1) que reconoce el péptido SIINFEKL (derivado de OVA) enmarcado en una molécula de MHC de clase I H2-k<sup>b</sup> (12). Todas las cepas de ratón son mantenidas en el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM, Madrid) de acuerdo a la «Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio».

## 2. Reactivos

### 2a. Péptidos

Los péptidos OVAp (SIINFEKL), E1 (EIINFEKL) y HA<sub>307-319</sub> (péptido utilizado como irrelevante, PKYVKQNTLKLAT) fueron sintetizados por el método FMOC en los servicios de apoyo a la investigación del CBMSO (CSIC-UAM, Madrid).

### 2b. Anticuerpos

El anticuerpo anti-fosfotirosinas 4G10 fue adquirido a Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), mientras que el hibridoma productor del anticuerpo anti-CD3 $\epsilon$  $\delta$ / $\epsilon$  $\gamma$  145-2C11 es de ATCC (Rockville, MD). Los anticuerpos anti-CD4 biotinilado (L3T4), anti-CD69FITC (H1.2F3), anti-CD8 $\alpha$  biotinilado (53-6.7) y el anticuerpo anti-CD90.2 (53-2.1) proceden de BD-Pharmingen (San Diego, CA). Tanto el anticuerpo policlonal anti-CD3 $\zeta$  448 (13) como el monoclonal anti-CD3 $\epsilon$  APA1/1 (14) son de producción propia. Actualmente, el anticuerpo monoclonal APA1/1 está siendo comercializado por Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) y BD Pharmingen (San Diego, CA). El anticuerpo anti-H2-k<sup>b</sup>:OVAp 25D1.16 fue donado por la Doctora M. del Val (ISCIII, Madrid).

Los anticuerpos secundarios acoplados a la actividad peroxidasa son de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Los anticuerpos y estreptavidinas utilizadas acopladas a los fluoróforos FITC, PE y Cy5 proceden de Southern Biotech (Birmingham, AL), mientras que los acoplados a Alexa488, proceden de Molecular Probes (Eugene, OR).

### 2c. Purificación de las proteínas de fusión GST-SH3.1

El plásmido pGEX-4T1-GST-SH3.1 (cedidos por el Doctor R. Geha, Harvard Medical School, Boston) fue transformado en la cepa de *E. coli* XL1-blue. La purificación y acoplamiento a Glutation-sefarosa (Amersham, Piscataway, NJ) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 3. Tinción de células por citometría

Se incubaron  $2 \times 10^5$  células por tinción en presencia de 4  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo primario directamente marcado pertinente durante 20 min a  $0^\circ \text{C}$ . Se fijaron y permeabilizaron con el reactivo Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, San Diego, CA). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo APA1/1 biotinilado o con un anticuerpo biotinilado isotópico control. Posteriormente se incubó en presencia de una estreptavidina acoplada al fluoróforo correspondiente. Las células se lavaron y se resuspendieron en 300  $\mu\text{l}$  de PBS 1x degasificado y se analizaron en un citómetro FCSCalibur usando el programa CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

### 4. Experimentos funcionales

#### 4a. *Estimulación de timocitos de ratones OT-I con los dímeros de H2k<sup>b</sup>*

La estimulación de timocitos de ratones transgénicos OTI se realizó de acuerdo a lo ya publicado (15).

### 5. Ensayo de «pull-down»

Las fracciones postnucleares se sometieron al ensayo de pull-down siguiendo el protocolo ya publicado (5).

### 6. Inmunohistoquímica

Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajo el timo y los ganglios linfáticos inguinales. La fijación, corte y tinción de los órganos, se realizó según las indicaciones ya publicadas (11).

## RESULTADOS

### I. El epítipo de APA1/1 se expone tras la estimulación con un anticuerpo anti-CD3 en timocitos

Previamente se había descrito que la estimulación con un anticuerpo anti-CD3 induce la exposición del epítipo reconocido por APA1/1 en células T de ganglio de ratón C57BL/6 (silvestre) (15). Dicho epítipo es solapante con la región de poliprolinas de CD3 $\epsilon$  responsable del reclutamiento de la proteína adaptadora Nck. La exposición del epítipo de APA1/1 se produce por un cambio conformacional en la cadena CD3 $\epsilon$ . Para comprobar si dicho cambio conformacional, detectado por el anticuerpo APA1/1, también se producía en timocitos tras la estimulación, se extrajo el timo de un ratón C57BL/6. Los timocitos fueron estimulados durante diez minutos con un anticuerpo anti-CD3 y se detectó la fluorescencia del anticuerpo APA1/1 por citometría de flujo. Al igual que en las células T maduras (15), la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 provocaba un aumento de tinción con el anticuerpo APA1/1 (Figura 5B). Es decir, los timocitos DP exponían la secuencia de poliprolinas de CD3 $\epsilon$  (reconocida por APA1/1) al ser estimulados y, por lo tanto, se producía un cambio conformacional en el TCR. Para comprobar que dicho cambio conformacional también era detectado mediante el ensayo de *pull-down* con GST-Nck (método mediante el cual se describió el cambio conformacional que afecta a CD3 $\epsilon$  dependiente de ligando), se estimularon células T de ganglio y timocitos de los mismos ratones silvestres con el mismo anticuerpo anti-CD3 y se detectó el complejo TCR mediante *western blot* con un anticuerpo anti-CD3 $\zeta$  (CD3 $\zeta$  es la última cadena en ensamblarse al TCR maduro y, por lo tanto, sólo se detectan los TCR maduros unidos a GST-Nck). En ambos casos y en concordancia con las tinciones con APA1/1, la estimulación con el anticuerpo anti-CD3 inducía la unión a GST-Nck del TCR, es decir, se inducía el cambio conformacional (Figura 5A).

## II. En timocitos, la estimulación con un agonista fuerte induce el cambio conformacional en el TCR

En un contexto fisiológico, el ligando natural del TCR es un péptido enmarcado en una molécula de MHC propia. Por lo tanto, era importante confirmar que la inducción del cambio conformacional observado en células T maduras e inmaduras utilizando el anticuerpo APA1/1 también ocurría cuando se estimulaba con un MHC-péptido. Se utilizaron ratones transgénicos para el TCR OT-I (12). Este TCR está restringido para el MHC H2-k<sup>b</sup> y sus ligandos tanto agonista (OVAp) como agonista parcial/antagonista (E1) están ampliamente descritos (12). Para mimetizar la presentación antigénica, se utilizaron dímeros de H2-k<sup>b</sup>:Ig (Figura 6A).

Se aislaron células T de bazo de ratones OT-I y se estimularon durante 24 horas con los dímeros H2-k<sup>b</sup>:Ig cargados con el péptido agonista OVAp o con el agonista parcial/antagonista E1 y adsorbidos a plástico. Posteriormente, se detectó la expresión del marcador de activación CD69 por citometría de flujo comprobándose que la estimulación con los dímeros H2-k<sup>b</sup>:Ig cargados con OVAp inducían la expresión en superficie de CD69, mientras que la estimulación con los dímeros de H2-k<sup>b</sup> sin péptido o cargados con el péptido agonista parcial/antagonista E1 no inducen la expresión de dicho marcador de activación (15). Se confirmó que en este sistema y a esas concentraciones, el péptido OVAp actúa como agonista y el E1 no. Utilizando el mismo conjunto de H2-k<sup>b</sup>:Ig para estimular timocitos (Figura 6B) y células T de ganglio de ratones OT-I (15), se observó que la intensidad media de la fluorescencia para APA1/1 aumentaba tras la estimulación con los dímeros cargados con OVAp (Figura 6B, línea continua), comparado con los dímeros vacíos (Figura 6B, línea sombreada) o cargados con el péptido E1 (Figura 6B, línea discontinua). Estos resultados indican que el cambio conformacional detectado por la exposición del epítipo de APA1/1 en la cadena CD3ε se induce tras la estimulación con un agonista fuerte del TCR tanto en células T maduras como inmaduras.

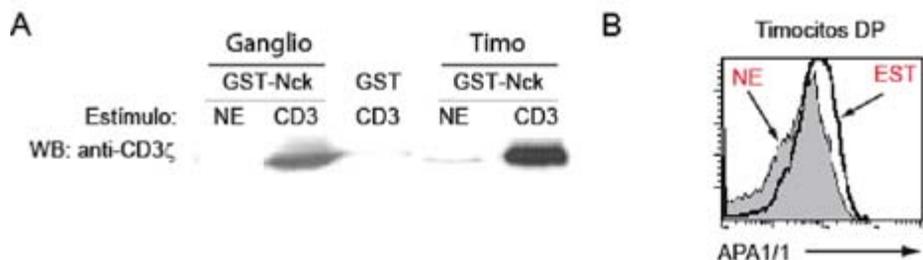
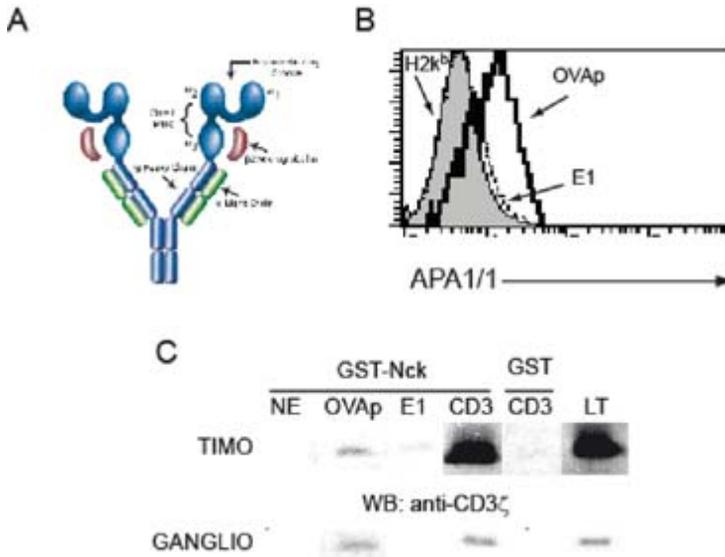


FIGURA 5. **La estimulación con un anticuerpo anti-CD3 induce la exposición del epítipo de APA1/1 en timocitos de ratón C57BL/6.** A. La estimulación con un anticuerpo anti-CD3 induce la unión del TCR a GST-Nck en células T de ganglio y timocitos de ratón. Los lisados de las células de ganglio y de timo de un ratón C57BL/6 estimuladas con el anticuerpo anti-CD3 145-2C11 (NE, no estimulado; CD3, estimulado) fueron sometidas a un ensayo de pull-down con GST-SH3.1. Se detectó el TCR precipitado por western blot con el anticuerpo anti-CD3 $\zeta$  448. Como control negativo, se realizó un preaclarado con GST.

B. La estimulación con un anticuerpo anti-CD3 en timocitos DP induce la exposición del epítipo reconocido por APA1/1. Se estimularon los timocitos de un ratón C57BL/6 de igual forma que en A. Se tiñeron con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y APA1/1 y se analizaron por citometría de flujo. El histograma corresponde a la tinción de APA1/1 dentro de la población positiva para CD4 y CD8 y superpuesta las muestras estimulada (línea continua), no estimulada (línea discontinua) y el control isotípico (línea sombreada).

Para correlacionar estos datos de citometría de flujo utilizando el anticuerpo APA1/1 con los ensayos de *pull-down*, las células T de ganglio y timocitos fueron estimuladas con este conjunto de dímeros de H2-k<sup>b</sup>:Ig cargados con OVA<sub>p</sub>, E1 o sin cargar. Posteriormente se realizó un ensayo de *pull-down* con la proteína de fusión GST-Nck. La unión del TCR a GST-Nck únicamente se inducía cuando el estímulo utilizado eran los dímeros de H2-k<sup>b</sup> cargados con el agonista fuerte OVA<sub>p</sub> tanto en timocitos como en células T maduras de ganglio de ratones OT-I (Figura 6C).

Para detectar la respuesta frente a agonistas fuertes (OVA<sub>p</sub>) y débiles (E1) *in vivo* en células T maduras e inmaduras, se inyectaron por vía endovenosa ratones OT-I con los péptidos OVA<sub>p</sub> y E1. Los ratones fueron sacrificados a las 3 horas y se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales y el timo. Las secciones tisulares de cada órgano fueron teñidas con el anticuerpo APA1/1 y con el anticuerpo 25D1.16 que reconoce el MHC H2-k<sup>b</sup> unido a los péptidos OVA<sub>p</sub> y



**FIGURA 6. Únicamente la estimulación con un agonista fuerte induce la exposición del epítipo de APA1/1 en timocitos.** **A.** Esquema del dímero H2-k<sup>b</sup>:Ig. **B.** La estimulación con H2-k<sup>b</sup>-OVAp induce la expresión del epítipo de APA1/1. Se estimularon durante 30 minutos timocitos de un ratón OT-I con los dímeros H2-k<sup>b</sup> (línea sombreada), H2-k<sup>b</sup>-E1 (E1, línea discontinua) y H2-k<sup>b</sup>-OVAp (OVAp, línea continua). Se tiñó el dímero con un anticuerpo anti-ratón FITC. Se permeabilizaron y tiñeron con APA1/1. Se analizaron por citometría de flujo. Aparecen superpuestos los histogramas de las tres muestras para la tinción de APA1/1. **C.** La estimulación con H2-k<sup>b</sup>:OVAp induce la unión del TCR a GST-SH3.1 tanto en células de ganglio como en timocitos. Las células de ganglio o timo de un ratón OT-I RAG2<sup>-/-</sup> fueron estimuladas con 0,5 µg/ml de dímero H2-k<sup>b</sup> unido al péptido OVAp, E1 o sólo durante cinco minutos. Se lisaron las células y se sometieron a un ensayo de pull-down con GST-SH3.1. La presencia del TCR se detectó por western blot con el anticuerpo anti-CD3 $\zeta$  448.

E1 (16). Se detectó un incremento en el número de células APA1/1 positivas en los ratones inyectados con OVAp y E1 comparado con el ratón inyectado con el péptido irrelevante (Figura 7). Sin embargo, en los ganglios las células T maduras sólo responden al péptido OVAp. Para obtener datos más cuantitativos, se estimó el número de células APA1/1 positivas en cada condición usando el programa ImageJ, se refirió al número total de células y se normalizó frente a la fluorescencia del anticuerpo 25D1.16 para equilibrar los niveles de expresión de ambos ligandos. El agonista fuerte OVAp fue

mejor inductor del cambio conformacional que el E1 tanto en timocitos (Figura 7) como en células T maduras. Por lo que para el TCR OT-I los ligandos que seleccionan positiva y negativamente en timo parecen inducir diferencialmente el cambio conformacional en los TCRs de los timocitos correlacionándose con lo observado en las células T maduras de periferia.

## DISCUSIÓN

Los datos mostrados en este trabajo sugieren que el cambio conformacional en el TCR es provocado por un agonista total y no por un agonista parcial/antagonista. A nivel del reconocimiento del TCR de los distintos péptidos enmarcados en el MHC, los péptidos antagonistas se unen con menor afinidad y mayor constante de disociación que los péptidos agonistas (17). El cambio conformacional en el TCR podría representar una interpretación directa de la cinética de unión de los distintos ligandos. Este modelo explicaría que los dímeros H2-k<sup>b</sup>-E1 se unan al TCR OT-I pero no se exponga el epítipo de APA1/1. A pesar de las diferencias encontradas en la inducción del cambio conformacional en el tallo intracelular de CD3ε entre agonistas y agonistas parciales/antagonistas, la estructura cristalográfica del TCR A6 unido al MHC cargado con el péptido agonista Tax y variantes de él que actúan como agonistas débiles/antagonistas (18) parecen ser similares.

Se ha publicado que tanto los ligandos débiles que inducen selección positiva como los ligandos con alta afinidad que inducen selección negativa provocan el cambio conformacional en el TCR de acuerdo con la precipitación con GST-Nck (19). La estimulación con MHC-péptidos nulos no inducía el cambio conformacional en el TCR. De acuerdo con esto, el cambio conformacional puede distinguir entre MHC-péptidos nulos y los señalizantes, pero no entre los péptidos que inducen selección positiva (baja afinidad) y selección negativa (alta afinidad). El cambio conformacional no sería un reflejo de la intensidad de señal sino que únicamente daría cuenta de la unión de un ligando. Las discrepancias observadas entre los resultados de los experimentos *in vitro* de cromatografía de afinidad con GST-Nck y las tinciones *in situ* de APA1/1 en secciones histológicas

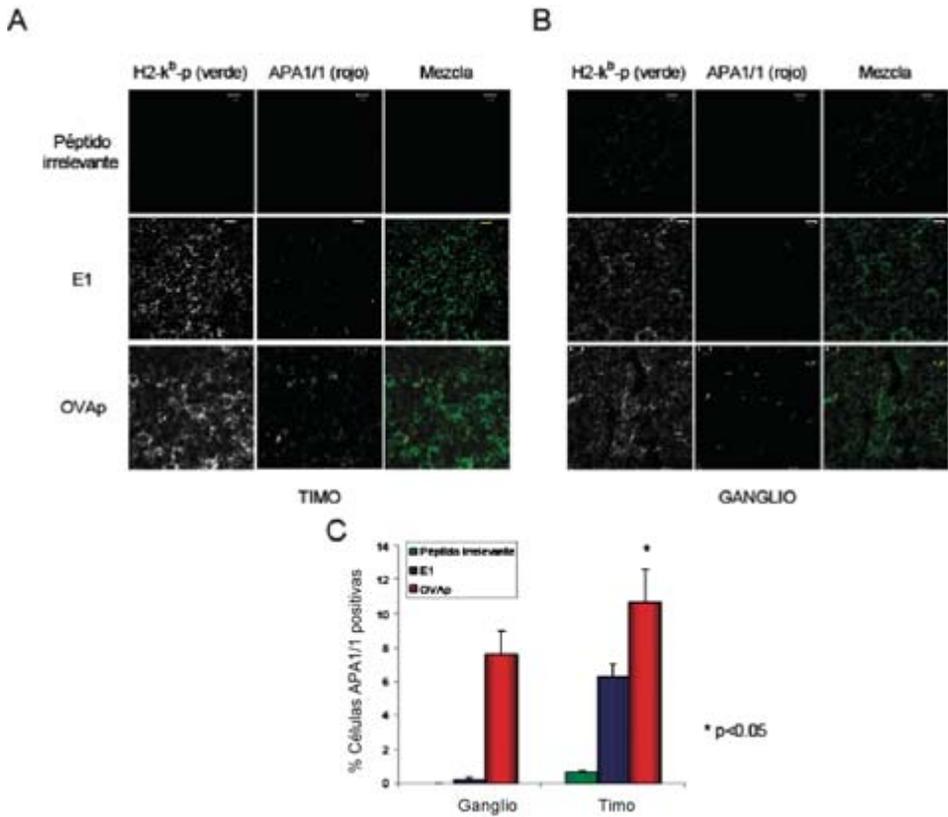


FIGURA 7. **La sensibilidad del TCR a agonistas totales es igual en timo que en ganglios linfáticos.** Se inyectó 0,4 mg del péptido OVAp, E1 o un péptido irrelevante por vía intravenosa en ratones transgénicos OT-I. A las tres horas se extrajeron los timos (A) y ganglios inguinales (B). Con las secciones de 10  $\mu$ m, se realizaron las tinciones con el anticuerpo 25D1.16 (verde) y APA1/1 (rojo). Las imágenes se analizaron en un microscopio confocal con un objetivo de 40x. La barra de escala corresponde a 20  $\mu$ m. Se representa el porcentaje de células APA1/1 positivas frente al número total de células (cuantificado por la tinción nuclear con ToPro) y normalizada a la fluorescencia del anticuerpo 25D1.16. La media y desviación estándar proceden del análisis de dos experimentos distintos y cuatro secciones de cada condición por experimento.

podrían explicarse por un escaso rango dinámico de la primera técnica o porque la precipitación con GST-Nck necesita de la previa ruptura de la célula, mientras que la tinción con APA1/1 se hace en células fijadas. De acuerdo con estos resultados, tanto en periferia como en el timo, las células T responden mejor al agonista total

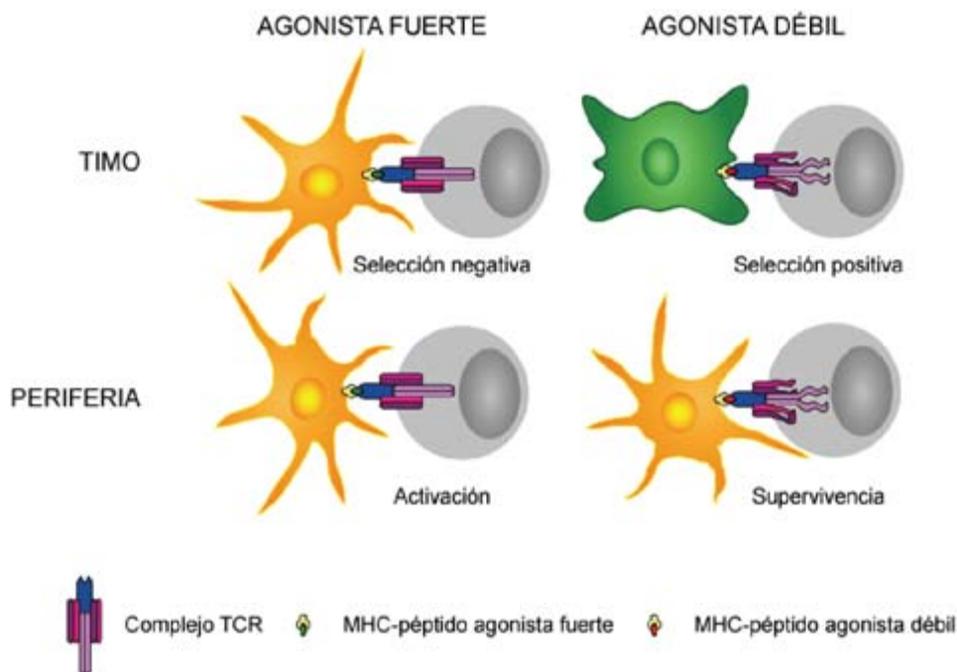


FIGURA 8. **Modelo de activación del TCR dependiente de la afinidad del ligando.** El reconocimiento de un MHC-peptido agonista fuerte, que produce selección negativa en el timo o la activación productiva de la célula T madura, induce un cambio conformacional en el TCR. Sin embargo, tanto en timocitos como en células T maduras de la periferia, la estimulación con un MHC-peptido agonista débil no induce el cambio conformacional en el TCR.

OVAp que induce selección negativa que al agonista parcial E1 (selección positiva) pero sólo en timo aparece respuesta frente a E1. De hecho, las diferencias en la respuesta de los timocitos y células T maduras a los agonistas débiles (que inducen selección positiva) se pueden explicar por una menor sensibilidad del TCR a los ligandos a medida que madura. Las células T maduras pierden la capacidad de responder a los ligandos de baja afinidad, aunque siguen respondiendo a los ligandos de alta afinidad.

¿Cómo puede discriminar el TCR entre los ligandos de MHC-peptido de distintas afinidades? Atendiendo a parámetros cinéticos y puesto que son los ligandos de alta afinidad los que provocan la selección negativa e inducen el reordenamiento del TCR, la unión sosteni-

da del ligando al TCR llevaría a una larga exposición del epítipo de APA1/1. De hecho, el cambio conformacional sostenido podría provocar la activación de una ruta específica de señalización que induciría la apoptosis del timocito. La razón por la cual las células T maduras utilizan una ruta de señalización distinta a los timocitos para regular la muerte celular no es conocida. Tampoco se han descrito las cascadas de señalización que pueden ser activadas como consecuencia directa de la exposición del epítipo. Sin embargo, el comportamiento de las células T ante estimulaciones débiles tanto en periferia como durante su desarrollo es parecido. En ninguno de los casos inducen el cambio conformacional (Figura 8). Los timocitos que se estimulan con los ligandos de baja afinidad son seleccionados positivamente, es decir, reciben señales de supervivencia (6). En células T, una estimulación de este tipo también aportaría señales de supervivencia que podrían ser importantes para el mantenimiento de la población de células T y células de memoria (20).

Se ha propuesto que la serín-treonín quinasa MINK conecta selectivamente el TCR con la ruta de señalización que media la selección negativa pero no positiva (10). Esta quinasa interacciona por su región de poliprolinas con uno de los dominios SH3 de Nck (21). Teniendo en cuenta que Nck es un ligando de la secuencia de poliprolinas de CD3 $\epsilon$  que se expone tras sufrir el cambio conformacional (5), Nck podría ser el enlace entre el TCR y MINK en la activación de la señalización que produce la eliminación de los timocitos autorreactivos. Además del reclutamiento de Nck al TCR, el cambio conformacional en el TCR podría tener consecuencias añadidas en la señalización. Por ejemplo, podría alterar el grado o el patrón de fosforilación de los ITAMs.

La selección negativa de timocitos provoca la muerte de aquellas células T que contengan un TCR autorreactivo y es un proceso clave en la adquisición de tolerancia inmunológica central que controla la salida a periferia de clones que puedan presentar reactividad frente a autoantígenos (6). Puesto que el cambio conformacional en el TCR, detectado por el anticuerpo APA1/1 y mediante ensayos de *pull-down*, ocurre tanto en la activación de células T maduras en periferia y en timocitos frente a ligandos fuertes permitiría el abordaje de posibles inhibidores de la transmisión de dicho cambio conformacional como posibles inmunomoduladores en respuestas autoinmunes.

## AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer el valioso trabajo del equipo técnico del grupo. La investigación ha sido financiada por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología SAF2005-00937 (B. A.), el programa de Formación de Profesorado Universitario (R. M. R.) y la Fundación Ramón Areces y el Banco Santander Central Hispano (CBMSO).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) KUHNS, M. S.; DAVIS, M. M. and GARCÍA, K. C. (2006): Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* 24: 133-139.
- (2) KANE, L. P.; LIN, J. and WEISS, A. (2000): Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 242-249.
- (3) GIL, D.; GUTIÉRREZ, D. and ALARCON, B. (2001): Intracellular redistribution of nucleolin upon interaction with the CD3epsilon chain of the T cell receptor complex. *J. Biol. Chem.* 276: 11174-11179.
- (4) WERLEN, G. and PALMER, E. (2002): The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 299-305.
- (5) GIL, D.; SCHAMEL, W. W.; MONTOYA, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F. and ALARCON, B. (2002): Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell.* 109: 901-912.
- (6) STARR, T. K.; JAMESON, S. C. and HOGQUIST, K. A. (2003): Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 139-176.
- (7) HOGQUIST, K. A.; BALDWIN, T. A. and JAMESON, S. C. (2005): Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 772-782.
- (8) SIGGS, O. M.; MAKAROFF, L. E. and LISTON, A. (2006): The why and how of thymocyte negative selection. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 175-183.
- (9) WERLEN, G.; HAUSMANN, B. and PALMER, E. (2000): A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature.* 406: 422-426.
- (10) McCARTY, N.; PAUST, S.; IKIZAWA, K.; DAN, I.; LI, X. and CANTOR, H. (2005): Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat. Immunol.* 6: 65-72.
- (11) RISUEÑO, R. M.; VAN SANTEN, H. M. and ALARCON, B. (2006): A conformational change senses the strength of T cell receptor-ligand interaction during thymic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 9625-9630.
- (12) HOGQUIST, K. A.; JAMESON, S. C.; HEATH, W. R.; HOWARD, J. L.; BEVAN, M. J. and CARBONE, F. R. (1994): T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell.* 76: 17-27.

————— *Artículo original* —————

## Regulación epigenética en la pancreatitis necrótica aguda

Recibido el 14 de febrero de 2007

JUAN SANDOVAL<sup>1</sup>, JAVIER PEREDA<sup>2</sup>, JOSÉ LUIS  
RODRIGUEZ<sup>1</sup>, JUAN SASTRE<sup>2</sup>, GERARDO LÓPEZ RODAS<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Universitat de Valencia  
46100 Burjassot (Valencia)

### RESUMEN

La pancreatitis necrótica aguda (PA) produce, en casos graves, una severa necrosis a nivel local, múltiples complicaciones sistémicas y elevada mortalidad. En este trabajo hemos analizado el complejo y ordenado perfil temporal de expresión de los genes más importantes relacionados con el inicio de la PA inducida por taurocolato en rata. Entre éstos se incluyen genes que codifican factores de transcripción (como *egr-1*), rutas de señalización intracelular, moléculas de adhesión (como *icam-1*), citoquinas (como *tnf $\alpha$* ) y genes de estrés oxidativo. El análisis de los mecanismos epigenéticos de regulación en tres genes modelo (*egr-1*, *icam-1* y *tnf $\alpha$* ) muestra la intervención de diferentes factores de transcripción pro-inflamatorios (EGR-1, ATF-2, NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  o SP1), la unión de los complejos HAT (CBP) y liberación de complejos HDAC (HDAC1/2-Sin3A-) y la modificación de residuos específicos de histonas (H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac y H3K4me<sub>3</sub>). Por otra parte, el estudio del mecanismo de acción del potencial fármaco terapéutico pentoxifilina mostró que su efecto beneficioso puede ser producido, en parte, por represión de diversos genes, en especial *egr-1*, *icam-1* y *tnf $\alpha$* , regulando la unión a sus promotores de factores transcripcionales pro-inflamatorios (NF- $\kappa$ B, SP1, C/EBP $\beta$  y EGR-1) y la inhibición de las rutas de señalización de ERK1/2 y JNK1/2 implicadas en la activación de estos genes. Estos resultados avalan el posible uso terapéutico

---

\* Autor para correspondencia: Gerardo López Rodas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. C/ Doctor Moliner, 50. 46100 Burjassot (Valencia). Teléfono: 96 354 48 67. Fax: 96 354 46 35; e-mail: gerardo.lopez@uv.es

de la pentoxifilina en las fases iniciales de la PA, o como tratamiento preventivo, al bloquear los estímulos pro-inflamatorios característicos de la PA.

**Palabras clave:** ChIP.—HAT/HDAC.—Cromatina.—Modificación de histonas.—Inflamación.

## ABSTRACT

### Epigenetic regulation during acute necrotic pancreatitis.

The acute necrotic pancreatitis (AP) produces, in serious clinical cases, a severe local necrosis, develops several systemic complications and elevate mortality. In the present work we analysed the complex and ordered temporal profile of gene expression of the most important genes related with the initiation of AP induced by taurocholate in rat. They include genes coding for transcriptional factors (f.i. *egr-1*), intracellular signalling network, adhesion molecules (f.i. *icam-1*), cytokines (f.i. *tnf $\alpha$* ) and oxidative stress genes. The analysis of regulation epigenetic mechanisms in three model genes (*egr-1*, *icam-1* y *tnf $\alpha$* ) showed the involvement of different pro-inflammatory transcriptional factors (EGR-1, ATF-2, NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  or SP1), binding of HAT complexes (CBP) and release of HDAC complexes (HDAC1/2-Sin3A-) and site-specific histone modification (H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac y H3K4me<sub>3</sub>). Furthermore, the study of the mechanism of action of the potentially pharmacological agent pentoxifylline showed that beneficial effect may be produced, at least partially, by repression of different genes, specially *egr-1*, *icam-1* and *tnf $\alpha$* , throughout regulation of pro-inflammatory transcriptional factors binding (NF- $\kappa$ B, SP1, C/EBP $\beta$  or EGR-1) and inhibition of signalling network ERK1/2 and JNK1/2 involved in the activation of those genes. The results support the potential therapeutic use of pentoxifylline in the initial phases of AP, or as preventive treatment, since it blocks the pro-inflammatory stimulus generated in AP.

**Key words:** ChIP.—HAT/HDAC.—Chromatin.—Histone modification.—Inflammation.

## INTRODUCCIÓN

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad cuya incidencia se ha incrementado notablemente durante las últimas décadas. Hoy en día implica alrededor del 3% de los pacientes ingresados en los grandes hospitales, presentando una importante tasa de complicaciones y, lo que es más importante, una mortalidad considerable (1). A pesar de que existen diferentes hipótesis acerca de los sucesos tempranos en la PA, hoy en día se acepta que el principal desencadenan-

te es el daño y la eventual muerte de las células pancreáticas. Esto implica la activación de mediadores de la inflamación que activan la respuesta inflamatoria local y en un porcentaje de los pacientes desencadena el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y, si éste persiste, el síndrome de disfunción multiorgánica (MODS).

Ensayos clínicos en humanos han permitido estudiar estos mediadores de la inflamación, clasificándose en: componentes celulares (macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, etc.), mediadores de origen celular (citoquinas, estrés oxidativo, etc.) y de origen humoral (complemento, etc.) (2). Los mediadores de la inflamación serían el nexo de unión entre la lesión local del páncreas y los efectos sistémicos descritos en la PA, igual que en otros procesos de inflamación sistémica como la sepsis, grandes quemados, etc. Entre los procesos que regulan los macrófagos, neutrófilos y células endoteliales se encuentran la activación de diferentes células inmunológicas, liberación de gran cantidad de mediadores proinflamatorios ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6) que extienden y amplifican la señal inflamatoria (3).

Gran parte de las investigaciones indican que la severidad de la pancreatitis y la afectación pulmonar resultan de un desequilibrio entre los mediadores pro-inflamatorios y los anti-inflamatorios (4). Entre los principales mediadores pro-inflamatorios destacan las citoquinas  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y el factor activador de plaquetas (PAF). Por otro lado, los mediadores anti-inflamatorios son esencialmente IL-10, IL-4. Desafortunadamente, a pesar de las evidencias que indican un papel principal de las citoquinas en el desarrollo de la PA, la inhibición de estas moléculas en diversos ensayos clínicos han proporcionado resultados desesperanzadores.

En la última década, el conocimiento de los mecanismos moleculares epigenéticos de la regulación génica se ha erigido como un campo de investigación cuyo desarrollo puede conducir a la aparición de nuevas estrategias terapéuticas para paliar ciertos procesos patológicos. La PA se caracteriza, en sus etapas iniciales, por el desarrollo de un poco conocido programa de regulación de la expresión génica que pone en marcha la respuesta inflamatoria local y sistémica. Sin embargo, un análisis detallado de los mecanismos epigenéticos que gobiernan estas etapas iniciales de la PA no ha sido llevado a cabo hasta la fecha.

Este trabajo ha consistido justamente en intentar conocer los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión génica durante la PA y el análisis del posible mecanismo de acción de un potencial agente terapéutico para la PA, la pentoxifilina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales de experimentación

Los animales de experimentación utilizados en este trabajo fueron ratas Wistar macho jóvenes de 250 a 350 g de peso corporal. El modelo de pancreatitis aguda necrótica utilizado ha sido el de infusión retrógrada de taurocolato sódico al 3,5% (Sigma) a un ritmo de 0,1 mL/100 g de peso del animal durante un minuto. Para el grupo de animales tratados con pentoxifilina, ésta se administra mediante perfusión intravenosa inmediatamente después de la inducción con taurocolato. Para el grupo SHAM se administra suero fisiológico (NaCl al 0,9%). La manipulación de los animales y los protocolos de experimentación han sido realizados de acuerdo con los criterios resaltados por la «Guía para el cuidado de animales de experimentación» (National Institutes of Health, publicación 86-23 revisada 1985).

### 2. Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (ChIP)

Este método fue adaptado a nuestro tejido a partir del protocolo descrito por Borrás *et al.* (5) y Sandoval *et al.* (6). De forma resumida, las muestras de tejido pancreático, aisladas de la región de la cabeza del páncreas, se entrecruzan en formaldehído al 1% durante 10 minutos. La reacción se detiene por adición de glicina a una concentración final de 0,125M. A continuación se aísla la cromatina y se fragmenta por sonicación hasta obtener un rango de distribución de tamaños de cromatina desde 400 pb a 600 pb. La muestra, con aproximadamente 50 µg de DNA para cada inmunoprecipitación, se incuba con 30 µL de proteína A+G-sefarosa prebloqueada, y posteriormente se incuban durante 16 horas con el anticuerpo correspondiente, excepto una muestra que es tratada de forma similar

a la que no se le añade anticuerpo (No Ab). A continuación, las muestras se incuban con 50  $\mu$ L de proteína A+G-sefarosa, se lava y se desentrecruza durante toda la noche. Por último se purifica el DNA con el *PCR purification Kit* (Quiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacena a  $-20^{\circ}$  C hasta su análisis por PCR. Los oligonucleótidos usados para las PCR fueron: *egr1* (promotor): 5'-GTAGAACCCCGGCCTGACTC-3' y 5'-AGGCTCCTGGAGTTCCCAGC-3'; *egr1* (zona codificable): 5'-CTTGCCCTGTTGAGTCCTGC-3' y 5'-CACAGGCAAAGGCTTCTCG-3'; *icam1* (promotor): 5'-GGGATGGCCGTCCTGACTA-3' y 5'-GCCACTTCCCAGAAACCT-3'; *icam1* (zona codificable): 5'-TGTCGGTGCTCAGGTATCCA-3' y 5'-TTCACCTGCACGGATCCA-3'; *tnf $\alpha$*  (promotor): 5'-GGTGAGGACGGAGAGGAGATT-3' y 5'-TGGGAGTTAGTACCAGGGTGTTC-3'; *tnf $\alpha$*  (zona codificable): 5'-CAGCCGATTTGCCATTTTCAT-3' y 5'-TCCTTAGGGCAAGGGCTCTT-3';  $\beta$ -actina (promotor): 5'-GCCGTTCCGAAATTGCCT-3' y 5'-ACGTCCTGCTTACCTGGTG-3';  $\beta$ -actina (zona codificable): 5'-AGAGCAAGAGAGGCATCCTG-3' y 5'-GGGTCATCTTTTCACGGTTGG-3';  $\alpha$ -actina (promotor): 5'-AGGGACTCTAGTGCCCAACACC-3' y 5'-CCCACCTCCACCCTACCTGC-3';  $\alpha$ -actina (zona codificable): 5'-AGGATTCCTACGTGGGCGAC-3' y 5'-AGAGAGACAGCACCGCCTG-3'; Región intergénica 5'-TGCCGGTTATCACTCTCTCATGC-3' 5'-GGTCTTGTTTCAGTCTTCACATGC-3'.

### 3. Aislamiento y análisis de RNA

La extracción de RNA total de tejido pancreático se realizó utilizando *RNA later* (Ambion) cuya función es estabilizar el RNA. La extracción total de RNA se lleva a cabo mediante el Kit *mini RNA total extraction* (Quiagen) según las indicaciones del fabricante. El cDNA de las muestras se amplifica por PCR utilizando los oligonucleótidos de la región codificable de los genes de interés. Las reacciones de PCR cuantitativo en *tiempo real* de las muestras de cDNA se realizaron en termociclador *ABI GeneAmp 7000 Sequence Detection System* (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) usando como agente fluorescente *Syber Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems)*. Cada reacción se llevó a cabo por triplicado y las curvas de fusión se construyeron mediante el programa *Dissociation Curves software* (Applied Biosystems), para asegurar que sólo se amplifica

un único producto de PCR. Como control de carga se analiza el gen *rRNA 18S*.

## RESULTADOS

### 1. Rastreo de genes diana

El estudio de los mecanismos de regulación génica durante la PA se ha iniciado con un rastreo y la selección de los genes potencialmente implicados en este proceso patológico. Estudios previos con microarrays procedentes de dos grupos independientes (7-8), y un estudio detallado en nuestro laboratorio de la cinética de expresión de gran cantidad genes (datos no mostrados), evidenciaron la existencia de diferentes patrones de expresión temporales para los genes estudiados. En base a su implicación en la PA demostrada por estudios con ratones *knock out* (8-9), a su perfil temporal y grado de expresión hemos seleccionado, para estudiar los mecanismos epigenéticos de regulación, los genes *egr-1* (*early growth response gene*) (8) como ejemplo de genes inmediato-tempranos, *icam-1* (*intercelular adhesion molecule 1*) (10) como ejemplo de genes tempranos, y *tnf- $\alpha$*  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (9) como ejemplo de genes tardíos.

### 2. Estudio de las modificaciones de histonas

Entre los mecanismos epigenéticos de regulación de la actividad de la cromatina destaca el de las modificaciones postraduccionales de las histonas. Así pues, se caracterizó el patrón de modificaciones de las histonas en los promotores de los genes seleccionados y se correlacionó con la activación transcripcional durante la PA. Se seleccionaron para este estudio anticuerpos asociados a activación transcripcional, y en algún caso a represión en mamíferos. Fundamentalmente se ha analizado las acetilaciones de las histonas (anticuerpos  $\alpha$ -H3K9ac,  $\alpha$ -H3K14ac,  $\alpha$ -H3K18ac,  $\alpha$ -H3K23ac,  $\alpha$ -H3K27ac,  $\alpha$ -H4K5ac,  $\alpha$ -H4K8ac y  $\alpha$ -H4K16ac), algunas metilaciones ( $\alpha$ -H3K4me<sub>2</sub>,  $\alpha$ -H3K4me<sub>3</sub>,  $\alpha$ -H3K9me<sub>2</sub> y  $\alpha$ -H3R17me<sub>2</sub>) y la fosforilación de la ser10 de H3 ( $\alpha$ -H3S10ph-K14ac) implicadas todas ellas en la regulación transcripcional.

En la Figura 1 se evalúan mediante ChIP las variaciones en las modificaciones de histonas en los promotores de *egr-1*, *icam-1* y *tnf- $\alpha$*  y del gen de la  $\alpha$ -actina como control negativo. Adicionalmente, se analizó el patrón de modificación de histonas en una región intergénica que no mostraría alteración durante la inducción de la PA.

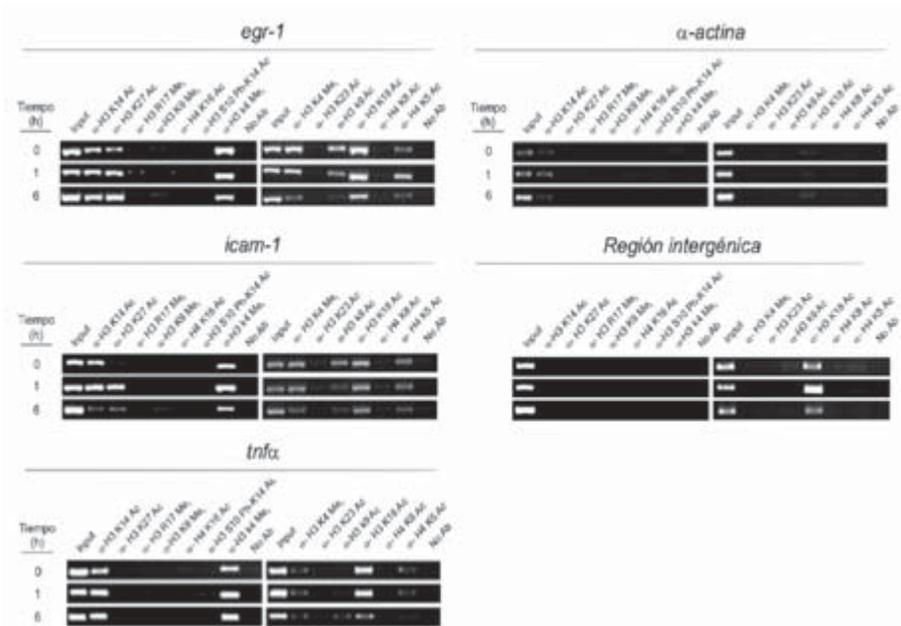


FIGURA 1. **Modificaciones postraduccionales de las histonas en los promotores de *egr-1*, *icam-1* y *tnf- $\alpha$* .** Las muestras de cromatina entrecruzada a los tiempos indicados de inducción de PA fueron procesadas e inmunoprecipitadas con los anticuerpos:  $\alpha$ -H3K14ac,  $\alpha$ -H3K27ac,  $\alpha$ -H3R17me,  $\alpha$ -H3K9me,  $\alpha$ -H4K16ac,  $\alpha$ -H3S10Ph -K14ac,  $\alpha$ -H3K4me,  $\alpha$ -H3K4me,  $\alpha$ -H3K23ac,  $\alpha$ -H3K9ac,  $\alpha$ -H3K18ac,  $\alpha$ -H4K8ac,  $\alpha$ -H4K5ac,  $\alpha$ -H3K27ac y sus controles sin anticuerpo (NA) correspondientes. Las muestras Input e inmunoprecipitadas (IP) fueron analizadas por PCR utilizando oligonucleótidos de los promotores de los genes analizados. El gen de la  $\alpha$ -actina y una región intergénica se utilizan como controles negativos.

Una visión general de los datos de modificaciones de histonas indica que la totalidad de los genes seleccionados muestran la existencia e incremento de las marcas asociadas a activación transcripcional durante la PA. En concreto, se puede correlacionar la inducción génica con el enriquecimiento de las marcas específicas, como H3K4me<sub>3</sub>, H3K9ac H4K5ac o H4K8ac (12-14). Por otro lado, la marca asociada

a represión transcripcional y heterocromatina, la dimetilación de la lisina 9 en H3 (H3K9me<sub>2</sub>) (15) está ausente en los genes seleccionados. Estos datos implican que la cromatina de estos genes no se encuentra en una estructura de heterocromatina, sino en una estructura compatible con la de *genes potencialmente activos* capaces de responder rápidamente a un estímulo como la propia PA.

### 3. Unión de complejos modificadores de la cromatina

Los complejos HAT y HDAC son las enzimas encargadas de modular el nivel de acetilación en las histonas actuando en general como activadores (HAT) o inhibidores (HDAC) de la expresión génica. En este trabajo se ha analizado el coactivador transcripcional CBP que posee actividad HAT, y un complejo con actividad HDAC, denominado Sin3A que media en la represión de diferentes contextos transcripcionales (16).

Para conocer la posible implicación de CBP y Sin3A en la regulación transcripcional de los genes en nuestro modelo, se estudió la unión de estos complejos a los promotores de los genes estudiados a tiempos de 0, 1, 3 y 6 horas tras la inducción de la PA (Figura 2). Los perfiles de unión del coactivador CBP coinciden de modo notable con el correspondiente perfil temporal (*inmediato-temprano*, *temprano* o *tardío*) de expresión de cada gen. Por su parte, el complejo sin3A no se encuentra unido en ninguno de los promotores estudiados a excepción del gen *icam-1* en donde su patrón de unión es inverso al de CBP, aumentando así el nivel de acetilación en el promotor y activando el gen.

### 4. Unión de factores transcripcionales

Un análisis bioinformático TRANSFAC (datos no mostrados) permitió identificar los sitios de unión potenciales para factores transcripcionales en los promotores de los genes seleccionados. El promotor de *egr-1* de rata presenta elementos de respuesta al suero (SRE), cuya funcionalidad depende de los factores transcripcionales SRF y ELK-1, un sitio de respuesta a AMP cíclico (CRE) al que se

une el factor CREB, así como sitios para NF- $\kappa$ B y Sp1. Es de destacar la presencia de sitios de unión para el propio EGR-1 solapantes con los de SP1 (17). En cuanto al promotor del gen *icam-1*, la funcionalidad de algunos de los sitios de unión ha sido destacada en modelos biológicos diferentes al de rata. Así, se ha demostrado en humanos que los elementos de respuesta a las citoquinas pro-inflamatorias se encuentran en el promotor en una región próxima al inicio de transcripción (18). En el promotor de *tnf- $\alpha$*  existe una región que comprende desde -200 pb hasta el inicio de transcripción aparecen las secuencias de unión para SP1, AP-1, ETS/ELK-1, NF- $\kappa$ B, CREB, C/EBP $\beta$  y EGR-1/SP1 (19).

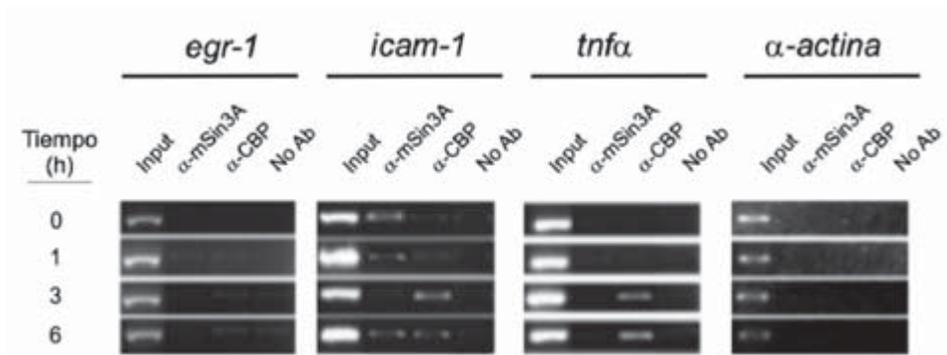


FIGURA 2. Unión de complejos histona acetiltransferasas (HAT) e histona desacetilasas (HDAC) en los promotores de *egr-1*, *icam-1* y *tnf- $\alpha$* .

Las muestras de cromatina entrecruzada a los tiempos indicados de inducción de PA fueron procesadas e inmunoprecipitadas con los anticuerpos:  $\alpha$ -SIN3A,  $\alpha$ -CBP y sus controles sin anticuerpo (NA). El gen de la  $\alpha$ -actina se utiliza como control negativo.

La unión de estos factores transcripcionales al promotor de los genes seleccionados fue estudiada mediante la técnica ChIP con anticuerpos frente a los diferentes factores transcripcionales (Figura 3).

En el promotor de *egr-1*, ELK1 se encuentra permanentemente unido al promotor (Figura 3) y su posible contribución a la regulación de *egr-1* podría ejercerse mediante fosforilación de dicho factor como sugieren p.e. (20-21). SP1 y EGR-1 manifiestan perfiles de unión opuestos (Figura 3), resultado que es consistente con la idea

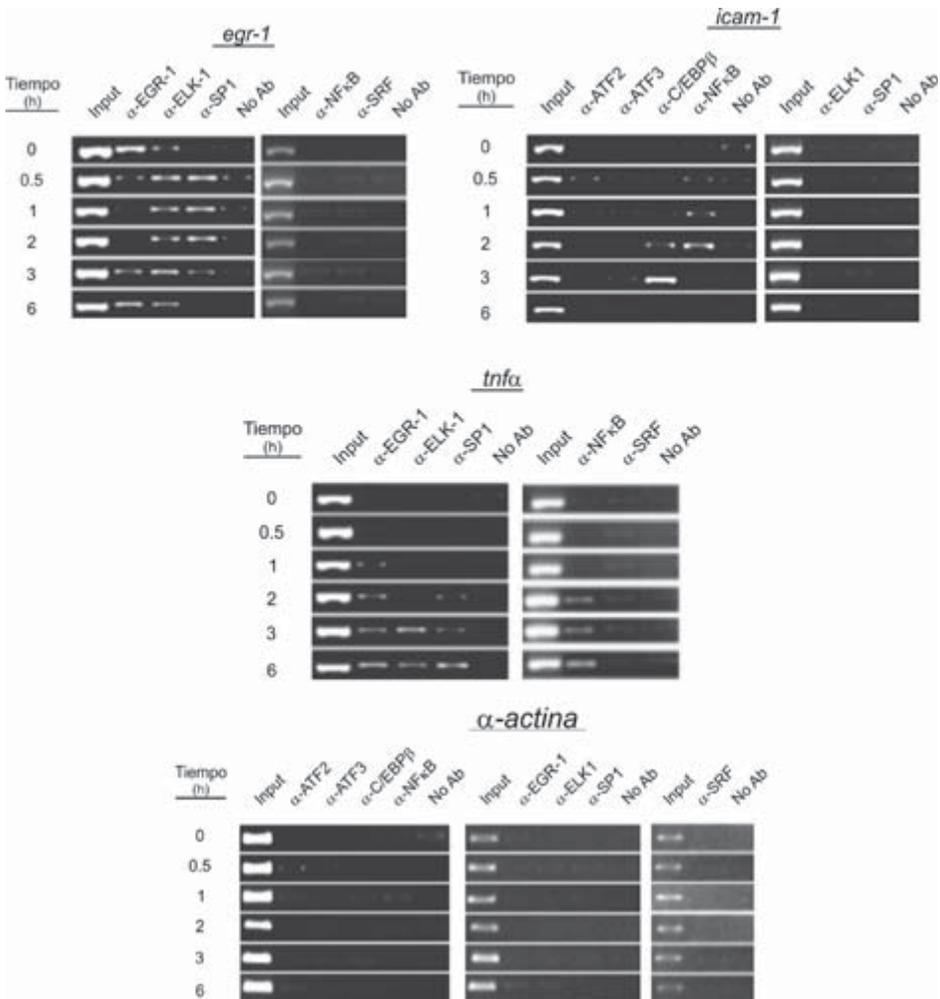


FIGURA 3. **Unión de factores transcripcionales al promotor de *egr-1*, *icam-1* y *tnf-α*.** Las muestras de cromatina entrecruzada a los tiempos indicados de inducción de PA fueron procesadas e inmunoprecipitadas con los diferentes anticuerpos. Las muestras Input e IP se analizan por PCR con los cebadores del promotor del gen.

de que EGR-1 competiría con SP1 (17, 22) desplazándolo de los sitios ricos en G+C como un mecanismo para inhibir la actividad de SP1. Por otro lado, NF-κB y C/EBPβ se unen al promotor de *icam-1* de modo secuencial y su unión es compatible con la inducción de la ex-

presión de este gen (Figura 3). Por último, en el promotor de *tnf- $\alpha$*  se unen los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B, EGR-1, SRF, ELK-1 y SP1 (Figura 3) consistente con la existencia de un enhanceosoma que regula la expresión de este gen y cuya composición depende del tipo celular, del estado de diferenciación y del estímulo que inicia la activación génica (23).

## 5. Mecanismo de acción del agente terapéutico pentoxifilina

La pentoxifilina, un derivado de la metilxantina, posee propiedades anti-inflamatorias (24) a través de la inhibición de la producción de citoquinas como TNF $\alpha$  e IL-2 y que se ha asociado a la reducción de la severidad de la PA (25). En base a estos resultados fue tentador conocer si la pentoxifilina es capaz de reducir la severidad de esta patología por medio de la inhibición de la expresión de los genes seleccionados en nuestro estudio implicados en las fases iniciales del desarrollo de la PA. Los resultados de la Figura 4, obtenidos a partir de ratas tratadas con pentoxifilina 30 minutos antes de la inducción de la PA, muestran que en general la expresión de los genes analizados se encuentra reducida en las muestras tratadas con pentoxifilina. El gen *inmediato-temprano*, *egr-1*, presenta una notable reducción a 1 hora, en *icam-1*, aunque su inducción es mínima a este tiempo, se observa también una reducción considerable y, en el gen *tardío* *tnf- $\alpha$*  la reducción de la expresión debida al inhibidor es especialmente drástica a las 6 horas de inducción.

Para ahondar en el conocimiento acerca del mecanismo molecular de acción de la pentoxifilina hemos estudiado su efecto sobre la unión de los factores de transcripción al promotor de los genes implicados en la PA. El análisis se efectuó por la técnica ChIP usando los anticuerpos contra los factores que regulan los genes pro-inflamatorios como EGR-1, C-JUN, SP1, NF- $\kappa$ B y C/EB $\beta$ . En el promotor del gen *egr-1* (Figura 5), a 1 hora de inducción en la muestra tratada con pentoxifilina (T+P 1 hora) la unión del factor SP1 es significativamente menor que el control no tratado (T 1 hora) a 0 y 6 horas de inducción de la PA. Estos datos indican que la reducción de la unión de SP1, asumiendo un papel activador de éste, podría ser un posible mecanismo por el cual la pentoxifilina reprime parcial-

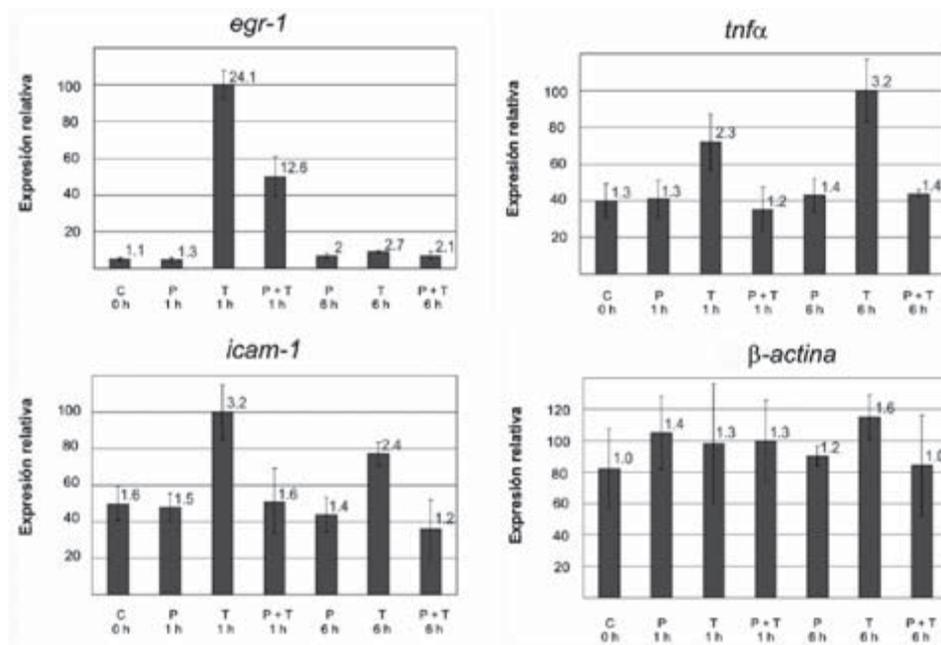


FIGURA 4. **Efecto de la pentoxifilina sobre la expresión de *egr-1*, *icam-1* y *tnf-α*.** Las muestras, analizadas por RT-PCR cuantitativa, se identifican como C: control no tratado; T: taurocolato 3,5%; P+T: pentoxifilina + taurocolato 3,5%. Los valores fueron normalizados respecto al gen rRNA 18S y referidos a la muestra con valor máximo y a la que se le asigna el valor arbitrario de 100%. Los valores sobre los histogramas representan el grado de inducción real respecto al control 0 horas. El gen de la β-actina se utiliza como control positivo por su expresión constitutiva.

mente a *egr-1*. El factor NF-κB en la muestra tratada con pentoxifilina no aparece unido al promotor de *icam-1* (T+P 1 hora), a diferencia del control no tratado (T 1 hora), por lo que el mecanismo de acción de la pentoxifilina en la represión de este gen durante la PA debe ser dependiente de NF-κB (Figura 5). En el promotor de *tnf-α* la represión del gen *tnf-α* dependiente de pentoxifilina parece estar mediada a tiempos iniciales por EGR-1 y, a tiempos tardíos, fundamentalmente por NF-κB y en menor medida por C/EBPβ (Figura 5). Como control negativo utilizamos el promotor del gen α-actina que no se expresa en el páncreas.

El análisis de los resultados de este estudio *in vivo* de la acción de la pentoxifilina en la disminución de la severidad de la PA permi-

te apuntar ciertas ideas. El efecto beneficioso del agente terapéutico en la PA puede ser producido, en parte, por la represión de los genes seleccionados en este estudio mediada por la regulación de la unión de factores transcripcionales pro-inflamatorios, principalmente NF- $\kappa$ B y SP1 y, en menor medida, C/EBP $\beta$  y EGR-1, así como la inhibición de las rutas MAP quinasas ERK y JNK (datos no mostrados). Estos resultados son compatibles con trabajos publicados que describen una acción anti-inflamatoria de este agente a través de la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias (26-27).

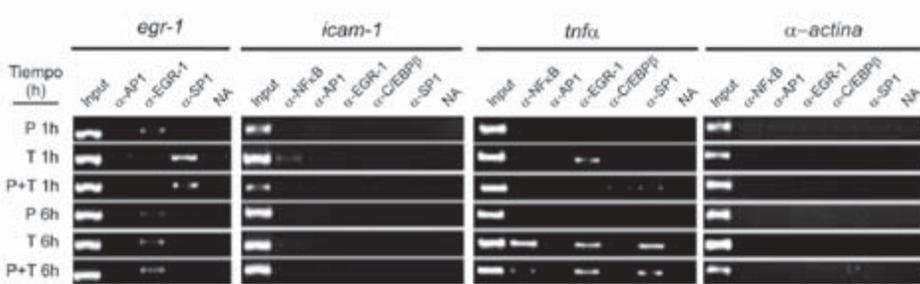


FIGURA 5. *Efecto de la pentoxifilina sobre la unión de factores en los promotores de egr-1, icam-1 y tnfa- $\alpha$ . Las muestras de cromatina entrecruzada a los tiempos indicados de inducción de PA, en presencia o no de pentoxifilina, fueron procesadas e inmunoprecipitadas con los anticuerpos:  $\alpha$ -NF $\kappa$ B,  $\alpha$ -API,  $\alpha$ -EGR-1,  $\alpha$ -C/EBP $\beta$ ,  $\alpha$ -SP1 y sus controles sin anticuerpo (NA) correspondientes. Las muestras se identifican como C: control no tratado; T: taurocolato 3,5%; P+T: pentoxifilina + taurocolato 3,5%. Como control negativo se utiliza el gen de la  $\alpha$ -actina.*

## DISCUSIÓN

Se han propuesto diferentes teorías para explicar la fisiopatología de la PA. En la actualidad se acepta que el origen de esta patología es el resultado de un proceso local de autodigestión del páncreas generado por la activación de sus propias enzimas, en especial del tripsinógeno (28). Mientras que los leucocitos, macrófagos y mediadores químicos de la inflamación son elementos clave que convierten las señales iniciadas por las lesiones locales del páncreas en un proceso sistémico sobre otros órganos (29).

En nuestro trabajo hemos mostrado que el daño inicial en células acinares activa un severo y estricto programa de señalización que regula la expresión de genes implicados en la PA. En este sentido hemos detallado el complejo y ordenado perfil temporal de los genes más importantes relacionados con el inicio de la PA y que han ampliado los estudios previos en humanos y en animales (30-31). Entre estos se incluyen factores de transcripción, rutas de señalización intracelular, citoquinas, moléculas de adhesión y genes de estrés oxidativo.

La inducción de la expresión génica requiere la activación de determinados factores transcripcionales, como NF- $\kappa$ B (32-33), AP-1 (34) o EGR-1 (8), en el páncreas durante el desarrollo de la PA. Sin embargo, hasta la fecha no se habían caracterizado *in vivo* los mecanismos por los cuales la estructura de la cromatina constituye un factor decisivo en la regulación de los promotores de los genes implicados en la PA. El análisis *in vivo* de los promotores de los genes *egr-1* (*inmediato-temprano*), *icam-1* (*temprano*) y *tnf- $\alpha$*  (*tardío*) han mostrado la participación de diferentes factores de transcripción (EGR1, ATF2, ELK1, NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  y SP1), la unión de la histona acetiltransferasas CBP y un aumento de las acetilaciones de histonas en la regulación de la cromatina en los diferentes promotores durante la activación génica correspondiente.

El análisis temporal de los mecanismos epigenéticos de regulación de la cromatina, en concreto las modificaciones de las histonas y la unión de complejos HAT, HDAC y remodeladores, permiten proponer modelos de activación transcripcional para estos genes. De modo general, la disociación de las HDAC es concomitante con la unión de HAT, lo cual genera un aumento de la acetilación de las histonas lo que facilita el acceso de factores de transcripción y de la maquinaria transcripcional. Diversos trabajos han aplicado estrategias similares para conocer los mecanismos de regulación de diferentes genes, como *nos-2* (35), *igf2r* (36) o *E-selectina* (37). Un aspecto a destacar es que nuestros resultados parecen compatibles con la idea del *código de histonas* en que se sugería que la sucesión y combinación de las modificaciones de las histonas en el promotor de un gen determinan su respuesta a un estímulo específico (11).

Se ha descrito recientemente que la administración *in vivo* de pentoxifilina en un modelo de PA leve inducida por ceruleína (38) y

en un modelo de PA grave inducida por taurocolato (24) se asocia con una disminución de los parámetros asociados a la PA. Sin embargo, el mecanismo de acción de este compuesto no estaba bien caracterizado a nivel molecular. En el presente trabajo hemos puesto de manifiesto que la administración de pentoxifilina en ratas con PA inducida por taurocolato es capaz de inhibir la activación de las rutas de quinasas (datos no mostrados). En base a estos datos, parecía de enorme interés analizar si el efecto beneficioso de este compuesto es producido, en parte, por la represión de los genes implicados en el desarrollo de la PA. Los estudios de expresión realizados mostraron que, en efecto, la pentoxifilina inhibía parcialmente la activación de muchos de los genes diana seleccionados. Por tanto, para profundizar en dichos estudios analizamos su acción sobre la unión de factores de transcripción en los promotores de los genes, mostrándose una reducción notable de dicha unión, en especial en el caso de los factores NF $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  y SP1. Estos resultados son compatibles con trabajos publicados que describen una acción anti-inflamatoria de este agente a través de la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias (26-27).

Los resultados sugieren por tanto que la pentoxifilina debe ejercer su acción inhibitoria en una etapa inicial de la ruta de transducción de señal activadora del taurocolato. Por tanto, nuestros resultados apoyan el uso de la pentoxifilina como agente terapéutico en fases iniciales de la PA, al reducir la expresión de los genes pro-inflamatorios estudiados, o su uso preventivo en pacientes con riesgo de padecerla por ejemplo al someterse a una colangiopancreatografía, prueba de diagnóstico que presenta como efecto secundario el desarrollo de una posible PA.

### **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido financiado por las ayudas a la investigación concedidas a G. López-Rodas por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-03616) y por la Consellería de Empresa, Universitat i Ciencia de la Generalitat Valenciana (ACOMP 06/132).

**BIBLIOGRAFÍA**

- (1) BANKS, P. A. (2002): Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointest. Endosc.* 56: S226-230.
- (2) WILSON, P. G.; MANJI, M. and NEOPTOLEMOS, J. P. (1998): Acute pancreatitis as a model of sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 41 Suppl A, 51-63.
- (3) NORMAN, J. G.; FINK, G. W. and FRANZ, M. G. (1995a): Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch. Surg.* 130: 966-970.
- (4) BHATIA, M. and MOOCHHALA, S. (2004): Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* 202: 145-156.
- (5) BORRAS, E.; ZARAGOZA, R.; MORANTE, M.; GARCÍA, C., GIMENO, A., LÓPEZ-RODAS, G.; BARBER, T.; MIRALLES, V. J.; VINA, J. R. and TORRES, L. (2003): *In vivo* studies of altered expression patterns of p53 and proliferative control genes in chronic vitamin A deficiency and hypervitaminosis. *Eur. J. Biochem.* 270: 1493-1501.
- (6) SANDOVAL, J.; RODRÍGUEZ, J. L.; TUR, G.; SERVIDDIO, G.; PEREDA, J.; BOUKABA, A.; SASTRE, J.; TORRES, L.; FRANCO, L. and LOPEZ-RODAS, G. (2004): RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 32: e88.
- (7) DUSETTI, N. J.; TOMASINI, R.; AZIZI, A.; BARTHET, M.; VACCARO, M. I.; FIEDLER, F.; DAGORN, J. C. and IOVANNA, J. L. (2000): Expression profiling in pancreas during the acute phase of pancreatitis using cDNA microarrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277: 660-667.
- (8) JI, B.; CHEN, X. Q.; MISEK, D. E.; KUICK, R.; HANASH, S.; ERNST, S.; NAJARIAN, R. and LOGSDON, C. D. (2003): Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. *Physiol. Genomics.* 14: 59-72.
- (9) TRACEY, K. J. and CERAMI, A. (1994): Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* 45: 491-503.
- (10) BHATIA, M.; WONG, F. L.; CAO, Y.; LAU, H. Y.; HUANG, J.; PUNEET, P. and CHEVALI, L. (2005): Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 5: 132-144.
- (11) STRAHL, B. D. and ALLIS, C. D. (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature.* 403: 41-45.
- (12) SANTOS-ROSA, H.; SCHNEIDER, R.; BANNISTER, A. J.; SHERRIFF, J.; BERNSTEIN, B. E.; EMRE, N. C.; SCHREIBER, S. L.; MELLOR, J. and KOUZARIDES, T. (2002): Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* 419: 407-411.
- (13) SCHNEIDER, R.; BANNISTER, A. J.; MYERS, F. A.; THORNE, A. W., CRANE-ROBINSON, C. and KOUZARIDES, T. (2004): Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell. Biol.* 6: 73-77.
- (14) GRANT, P. A.; EBERHARTER, A.; JOHN, S.; COOK, R. G.; TURNER, B. M. and WORKMAN, J. L. (1999): Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.* 274: 5895-5900.

- (15) STEWART, M. D.; LI, J. and WONG, J. (2005): Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol. Cell. Biol.* 25: 2525-2538.
- (16) SILVERSTEIN, R. A. and EKWALL, K. (2005): Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr. Genet.* 47: 1-17.
- (17) CAO, X.; MAHENDRAN, R.; GUY, G. R. and TAN, Y. H. (1993): Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J. Biol. Chem.* 268: 16949-16957.
- (18) KACHIGIAN, L. M.; WILLIAMS, A. J. and COLLINS, T. (1995): Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 27679-27686.
- (19) LI, D. H.; HAVELL, E. A.; BROWN, C. L. and CULLEN, J. M. (2000): Woodchuck lymphotoxin-alpha, -beta and tumor necrosis factor genes: structure, characterization and biological activity. *Gene.* 242: 295-305.
- (20) CHEN, C. C.; LEE, W. R. and SAFE, S. (2004b): Egr-1 is activated by 17beta-estradiol in MCF-7 cells by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of ELK-1. *J. Cell. Biochem.* 93: 1063-1074.
- (21) THOTTASSERY, J. V.; SUN, D.; ZAMBETTI, G. P.; TROUTMAN, A.; SUKHATME, V. P.; SCHUETZ, E. G. and SCHUETZ, J. D. (1999): Sp1 and egr-1 have opposing effects on the regulation of the rat Pgp2/mdr1b gene. *J. Biol. Chem.* 274: 3199-3206.
- (22) KACHIGIAN, L. M.; WILLIAMS, A. J. and COLLINS, T. (1995): Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 27679-27686.
- (23) VASSALLI, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411-452.
- (24) WARD, A. and CLISSOLD, S. P. (1987): Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 34: 50-97.
- (25) PEREDA, J.; SABATER, L.; CASSINELLO, N., GÓMEZ-CAMBRONERO, L.; CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E.; APARISI, L.; CALVETE, J., CERDA, M.; LLEDO, S.; VINA, J. and SASTRE, J. (2004): Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases. *Ann. Surg.* 240: 108-116.
- (26) EDWARDS, M. J.; ABNEY, D. L. and MILLER, F. N. (1991): Pentoxifylline inhibits interleukin-2-induced leukocyte-endothelial adherence and reduces systemic toxicity. *Surgery.* 110: 199-204.
- (27) SCHANDENE, L.; VANDENBUSSCHE, P.; CRUSIAUX, A.; ALEGRE, M. L.; ABRAMOWICZ, D.; DUPONT, E., CONTENT, J. and GOLDMAN, M. (1992): Differential effects of pentoxifylline on the production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. *Immunology.* 76: 30-34.
- (28) BHATIA, M.; WONG, F. L.; CAO, Y.; LAU, H. Y.; HUANG, J.; PUNEET, P. and CHEVALI, L. (2005): Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 5: 132-144.
- (29) KUSSKE, A. M.; RONGIONE, A. J. and REBER, H. A. (1996): Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 110: 639-642.
- (30) KINGSNORTH, A. (1997): Role of cytokines and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut.* 40: 1-4.

- (31) NORMAN, J. (1998): The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am. J. Surg.* 175: 76-83.
- (32) VAQUERO, E.; GUKOVSKY, I.; ZANINOVIC, V.; GUKOVSKAYA, A. S. and PANDOL, S. J. (2001): Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 280: G1197-G1208.
- (33) STEINLE, A. U.; WEIDENBACH, H.; WAGNER, M.; ADLER, G. and SCHMID, R. M. (1999): NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology.* 116: 420-430.
- (34) WULCZYN, F. G.; KRAPPMANN, D. and SCHEIDEREIT, C. (1996): The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J. Mol. Med.* 74: 749-769.
- (35) FISH, J. E.; MATOUK, C. C.; RACHLIS, A.; LIN, S.; TAI, S. C.; D'ABREO, C. and MARSDEN, P. A. (2005): The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J. Biol. Chem.* 280: 24824-24838.
- (36) YANG, Y.; LI, T.; VU, T. H.; ULANER, G. A.; HU, J. F. and HOFFMAN, A. R. (2003): The histone code regulating expression of the imprinted mouse *Igf2r* gene. *Endocrinology.* 144: 5658-5670.
- (37) EDELSTEIN, L. C.; PAN, A. and COLLINS, T. (2005): Chromatin modification and the endothelial-specific activation of the E-selectin gene. *J. Biol. Chem.* 280: 11192-11202.
- (38) GÓMEZ-CAMBRONERO, L. G.; SABATER, L.; PEREDA, J.; CASSINELLO, N.; CAMPS, B.; VINA, J. and SASTRE, J. (2002): Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 1: 393-403.

————— *Artículo original* —————

**Modelo general y cuatro ecuaciones para el  
ajuste de curvas de calibración en RIA.  
Comparación de resultados**

Recibido el 9 de diciembre de 2006

DÍEZ MONTORO, R.<sup>1</sup>; SALABERT SALVADOR, M. T.<sup>1</sup>,  
J. L. MORENO FRIGOLS<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Valencia.*

<sup>2</sup>*Servicio de Radioisótopos. Hospital Clínico Universitario  
de Valencia.*

**RESUMEN**

Se presenta un modelo teórico para la justificación de las ecuaciones de los cuatro parámetros y logarítmico-logística, utilizadas empíricamente en el ajuste de las curvas de calibración en RIA. De dicho modelo se deducen otras dos ecuaciones. Se analiza el ajuste de 192 curvas de RIA para las cuatro ecuaciones y se interpretan los resultados en términos de las posibles características de enlace en la unión antígeno-anticuerpo.

**Palabras clave:** Ecuación cuatro parámetros.—Inmunoanálisis.—Reacción antígeno-anticuerpo.

---

\* Doctor José Luis Moreno Frigols.  
Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.  
Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot (Valencia).  
e.mail: Jose.L.Moreno@uv.es

## ABSTRACT

### **General model and four equations for the fit of calibration curves in RIA. Comparison of results**

A theoretical model for the justification of the equations of the four parameters and logarithmic-logistic, used empirically in the fit of the calibration curves in RIA, is presented. From this model other two equations are deduced. The fit of 192 curves of RIA is analyzed for the four equations and the results are interpreted in terms of the possible characteristics of binding in the union antigen-antibody.

**Key words:** Equation four parameters.—Immunoanalysis.—Antigen-antibody reaction.

## INTRODUCCIÓN

En el terreno bioquímico-fisiológico es frecuente la existencia de sustancias cuyas concentraciones en los fluidos biológicos son demasiado pequeñas para ser detectadas por las técnicas espectrofotométricas. Por otra parte, muchas de ellas se encuentran mezcladas con otras de estructura muy semejante (1). La determinación analítica de tales sustancias suponía un doble reto, ya que se necesitaba una técnica de gran sensibilidad y especificidad. Yallow y Berson resolvieron el problema poniendo a punto, para la valoración de la insulina, un método que combina la capacidad de la radioquímica para la detección de cantidades muy pequeñas, con la cualidad de distinguir selectivamente entre compuestos muy parecidos, característica de las reacciones antígeno-anticuerpo.

El fundamento de la técnica consiste en añadir a la muestra una cantidad fija de la sustancia objeto de estudio marcada y un anticuerpo específico frente a ella. Puesto que la presencia del átomo marcador no altera (teóricamente) las propiedades químicas de la sustancia, el anticuerpo reacciona indiscriminadamente con la no marcada (presente en la muestra) y con la marcada (añadida). Si se aísla el complejo antígeno-anticuerpo del resto y se mide su radiactividad, el valor de esta será una función decreciente de la concentración de la muestra.

La determinación de la concentración de las muestras problemas se realiza mediante su lectura en la correspondiente curva de cali-

brado, la cual es siempre decreciente, puesto que una cantidad grande de sustancia en la muestra tenderá a saturar el anticuerpo, por lo que la actividad unida a éste será baja. Si la cantidad es pequeña, ocurrirá lo contrario.

Casi todos los análisis con grandes cantidades de muestras en química clínica usan los cálculos de resultados automatizados, que aumentan el rendimiento eliminando el proceso manual de la interpolación, el error del observador y disminuyendo la presencia de errores de la transcripción. Dicha curva, basada en los puntos obtenidos al medir muestras patrones, necesita de un ajuste de cuya bondad depende la exactitud del valor de la concentración problema.

El modelo no lineal más usado en inmunoanálisis es el modelo logístico de los Cuatro Parámetros (4). Puede ser escrito de varias formas; siendo una forma común la que se muestra en la Ecuación 1.

$$y = \frac{D - A}{1 + (x/C)^b} + A \quad \text{Ec. 1}$$

En esta ecuación  $x$  es la concentración de una muestra,  $y$  y la respuesta analítica (actividad cpm para el caso del RIA) correspondiente a dicha concentración. Cuando  $x = 0$  y se hace igual a  $D$ , y cuando  $x$  tiende a infinito y se acerca asintóticamente a  $A$  según se muestra en la Figura 1. La sustitución de  $x = C$  en la ecuación produce  $y = (D+A)/2$ , que es intermedio entre la ordenada en el origen y la asíntota.

Este modelo ha tenido éxito porque simula las características físicas reales de sistemas de radioinmunoanálisis. No obstante, hasta que el uso de ordenadores no estuvo ampliamente extendido, la Ecuación 1 no se usó directamente. Su utilización pasaba por realizar una linealización mediante el uso de una nueva variable  $Y$  definida por:

$$Y = \frac{y - A}{D - A} \quad \text{a partir de la cual se obtenía:}$$

$$\text{logit}(Y) = \ln\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = \ln\left(\frac{x}{C}\right)^b = \ln C^b - b \cdot \ln x \quad \text{Ec. 2}$$

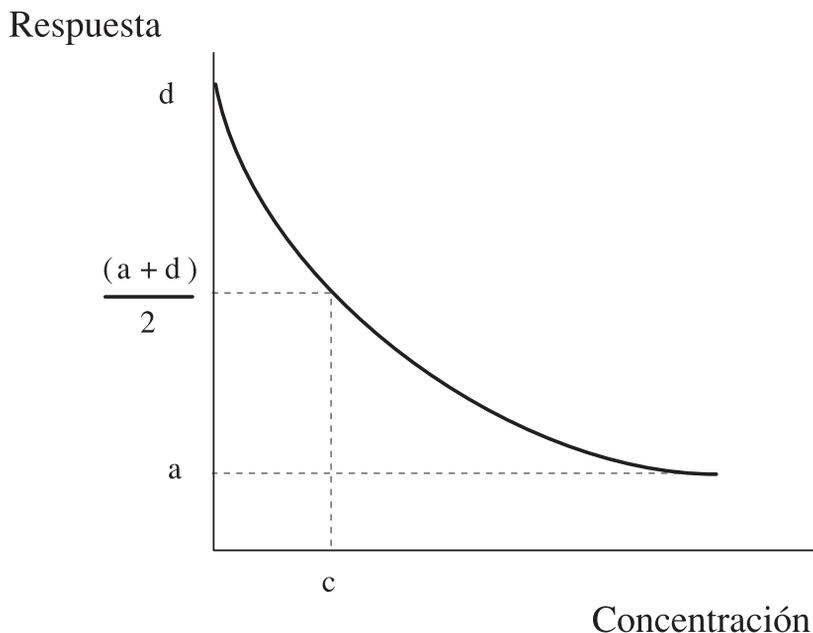


FIGURA 1. *Representación gráfica del modelo de los cuatro parámetros.*

Lógicamente antes de poder utilizar esta ecuación, se debe estimar el valor de los parámetros A y D. En el radioinmunoanálisis el valor de A coincide con las cuentas no específicas (NSB) y se puede estimar incluyendo un tubo sin el anticuerpo pero con el ligando marcado agregado. D se define como la respuesta medida para una concentración igual a 0. Con los radioinmunoanálisis comerciales, el reactivo no siempre está disponible para poder determinar fácilmente A. Si se hace una mala estimación de A y D, la Ecuación 2 no será una transformación lineal y los puntos del estándar, transformados al logit, no se ajustarán a una línea recta al representarse frente a la concentración.

## OBJETIVO

Puesto que la ecuación de cuatro parámetros, utilizada ampliamente, se justifica únicamente en función de su capacidad para ajus-

tarse a los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas, es nuestro propósito elaborar un modelo general que deduzca teóricamente dicha ecuación y analizar la calidad de los ajustes obtenidos para los distintos casos particulares a que da lugar.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado los resultados obtenidos en el Servicio de Isótopos del Hospital Clínico de Valencia para un total de 192 curvas de calibración correspondientes a ocho técnicas radioinmunoanalíticas: Aldosterona, Androstendiona, Gastrina, Glucagón, Insulina, Osteocalcina, Péptido C y TSI. Dichos resultados se analizaron mediante el programa informático Statistica, verificando el ajuste de las cuentas por minuto (cpm) frente a la concentración de los patrones para las ecuaciones mencionadas a continuación. Como criterios para la calidad del ajuste se utilizaron el coeficiente de correlación ( $r$ ) y la suma de los cuadrados de los residuales ( $\sigma$ )

**Ecuación de los tres parámetros (E3P):** 
$$y = E + \frac{F}{1 + \frac{x}{G}}$$

**Ecuación de los cinco parámetros (E5P):** 
$$y = E + \frac{H}{1 + \frac{x}{K}} + \frac{J}{1 + \frac{x}{L}} + M$$

**Ecuación de los cuatro parámetros (E4P):** 
$$y = A \frac{D - A}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^b}$$

**Ecuación logarítmico-logística (logit-log) (ELL):**

$$\text{Logit}\left(\frac{B}{B_0}\right) = b * \text{Ln}C - b * \text{Ln}x$$

## RESULTADOS

En el Anexo presentamos un grupo de tablas en los que se dan los resultados experimentales en cpm (y) obtenidos en las medidas de cada muestra y su variación con la concentración (x) junto con la desviación estándar y del coeficiente de regresión para cada una de las curvas.

## DISCUSIÓN

Como se indicó anteriormente, es nuestro propósito elaborar un modelo general que deduzca teóricamente la ecuación de los cuatro parámetros y analizar la calidad de los ajustes obtenidos para los distintos casos particulares a que da lugar.

Supóngase que una macromolécula P, que tiene n sitios de unión, reacciona con una sustancia de bajo peso molecular, A. La unión a uno de los sitios puede expresarse como:



Cuya constante de equilibrio es:

$$K_M = \frac{(PA)}{(P)(A)}$$

La mayoría de los métodos experimentales proporcionan solamente el número de moles de A enlazados a la macromolécula. Como la población es heterogénea, se obtiene un promedio:

$$\nu = \frac{(A)_{LIGADA}}{(P)_{TOTAL}}$$

donde  $(P)_{TOTAL}$  es el número de moles de macromoléculas en cualquier forma (P,PA,PA<sub>2</sub>,...).

Sabiendo que:

$$\begin{aligned} (A)_{LIGADA} &= (PA) + 2(PA_2) + 3(PA_3)+... \\ (P)_{TOTAL} &= (P) + (PA) + (PA_2)+... \end{aligned}$$

$$(PA) = K_1 (P)(A)$$

$$(PA_2) = K_1 K_2 (P)(A)^2$$

Se obtiene la expresión general para  $\nu$

$$\nu = \frac{K_1(A) + 2K_1K_2(A)^2 + \dots + n(K_1K_2\dots K_n)(A)^n}{1 + K_1(A) + K_1K_2(A)^2 + \dots + (K_1K_2\dots K_n)(A)^n}$$

Suponiendo que la unión de un ligando a uno de los sitios de una macromolécula «activa» tan fuertemente a los otros sitios que éstos se llenan inmediatamente, la ecuación anterior se reduce a una forma muy sencilla (12), ya que las concentraciones de todas las especies, excepto P y  $PA_n$ , serán despreciables. Por tanto, resulta:

$$\nu = \frac{nK(A)^n}{1 + K(A)^n}$$

$$\sigma = \frac{\nu}{n} = \frac{K(A)^n}{1 + K(A)^n} \quad (\text{Ecuación de Hill})$$

Si la ecuación de Hill se aplica a un sistema que contiene los ligandos M y Q, siendo  $n = 2$ , se supone que no quedan sitios sin ocupar y que no existen especies mixtas, resulta:

$$\sigma_M = \frac{K_M(M)^2}{K_M(M)^2 + K_Q(Q)^2}$$

$\sigma_M$  representa la fracción de sitios ocupados por moléculas marcadas, y por tanto puede hacerse igual a  $B/B_0$ , siendo B la actividad unida específicamente al anticuerpo, y  $B_0$  el valor de B correspondiente a una concentración nula de antígeno no marcado.

$$\frac{B}{B_0} = \frac{K_M(M)^2}{K_M(M)^2 + K_Q(Q)^2} = \frac{1}{1 + \frac{K_Q(Q)^2}{K_M(M)^2}} = \frac{1}{1 + \frac{(Q)^2}{\frac{K_M(M)^2}{K_Q}}} \quad \text{Ec. 3}$$

Llamando  $x$  a la concentración de analito, resulta:

$$x = (Q) + (PQ) + (PQM) + 2(PQ_2) \approx (Q) + 2(PQ_2) = (Q) + 2K_0(P)(Q)^2 = (Q)(1 + 2KQ(P)(Q)) \quad \text{Ec. 4}$$

Introduciendo en Ecuación 3 el valor de  $(Q)$  obtenido de Ecuación 4 y agrupando las constantes se obtiene:

$$\frac{B}{B_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^2}$$

$B$  representa la actividad unida específicamente al anticuerpo, y por tanto, puede escribirse:

$$B = y - A$$

$$B_0 = D - A$$

Siendo:

$y$  = Actividad medida en cpm

$A$  = Actividad inespecífica medida en cpm

$D$  = Actividad en cpm correspondiente a una muestra con  $x = 0$

Se obtiene:

$$y = A + \frac{D - A}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^2}$$

El exponente 2 se ha obtenido suponiendo una cooperatividad positiva total. Como un caso más general puede tomar valores distintos de 2, resultando finalmente:

$$y = A + \frac{D - A}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^b} \quad \text{Ecuación de los cuatro parámetros (E4P)}$$

Suponiendo que los sitios de unión son idénticos e independientes, el exponente  $b$  se hace igual a 1, con lo que la E4P se transforma en:

$$y = E + \frac{F}{1 + \frac{x}{G}} \quad \text{Ecuación de los tres parámetros (E3P)}$$

Suponiendo que los sitios de unión de anticuerpo son distintos (más de una clase de sitios) e independientes, podrá hacerse un planteamiento análogo al anterior para cada uno de ellos, obteniéndose finalmente:

$$y = \frac{H}{1 + \frac{x}{K}} + \frac{J}{1 + \frac{x}{L}} + M \quad \text{Ecuación de los cinco parámetros (E5P)}$$

Si se introduce una nueva variable Y definida por  $Y = \frac{y - A}{D - A}$ , la E4P queda en la forma:

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{1}{\left(\frac{x}{C}\right)^b} \quad \text{Ec. 3}$$

tomando logaritmos en ambos lados de la Ecuación 3, se obtiene la Ecuación 4:

$$\text{logit}(Y) = \ln\left(\frac{Y}{1 - Y}\right) = -\ln\left(\frac{x}{C}\right)^b = \ln C^b - b * \ln x \quad \text{Ec. 4}$$

$$\text{logit}\left(\frac{B}{B_0}\right) = -b * \ln x \quad \text{Ecuación logarítmico-logística (ELL)}$$

Este Modelo General teórico se ha elaborado en conexión con anteriores publicaciones (5-11), y como resumen podemos decir que a partir de él se obtienen cuatro ecuaciones:

- Ecuación de los cuatro parámetros (E4P): Aplicable a reacciones en las que los sitios de unión del anticuerpo son idénticos e interaccionantes.
- Ecuación de los tres parámetros (E3P): Aplicable a reacciones en las que los sitios de unión del anticuerpo son idénticos e

independientes. Se obtiene como un caso particular de la E4P haciendo  $b = 1$ .

- Ecuación de los cinco parámetros (E5P): Aplicable a reacciones en las que los sitios de unión del anticuerpo son distintos e independientes. Se obtiene a partir de la E3P suponiendo que hay más de una clase de sitios independientes.
- Ecuación logit-log (ELL): Es una modificación de la E4P utilizable para linealizar las gráficas.

### CONCLUSIONES

La capacidad de las ecuaciones para ajustarse a los resultados analíticos se ha comparado entre sí utilizando 192 curvas estándar de RIA correspondientes a ocho sustancias diferentes. En la tabla siguiente se muestra el número de veces que una determinada ecuación ha producido el mejor ajuste (atendiendo al parámetro  $r$ ) para cada sustancia:

Sustancia	E3P	E4P	E5P	ELL
Aldosterona	0	13	5	0
Androstendiona	0	6	31	0
Gastrina	0	15	2	0
Glucagón	0	5	12	0
Insulina	0	0	22	0
Osteocalcina	0	5	12	0
Péptido C	0	14	5	0
TSI	0	34	3	0

Llama la atención el hecho de que las ecuaciones de tres parámetros y logit-log no producen el mejor ajuste en ningún caso. Ello puede justificarse por motivos diferentes:

- La ecuación de tres parámetros puede considerarse como un caso particular de la de cuatro parámetros en la que  $b = 1$ , lo

cual exige que los sitios de unión del anticuerpo sean idénticos e independientes. Los resultados obtenidos parecen indicar que estas condiciones no se cumplen en ninguno de los casos estudiados.

- La ecuación logit-log es una transformación de la de cuatro parámetros, por lo que teóricamente cabe esperar que los ajustes por ambas sean concordantes. No ocurre así en la práctica, lo cual puede deberse a que, para su aplicación, es necesario conocer los valores exactos de  $B_0$  y  $D$ , y los resultados obtenidos sólo permiten disponer de valores puntuales de tales parámetros afectados de su correspondiente error.
- La ecuación de cinco parámetros resulta preferible en los casos de Androstendiona, Insulina, Glucagón y Osteocalcina, sustancias para las que cabe esperar que sus anticuerpos presenten dos sitios de unión distintos e independientes.
- La ecuación de cuatro parámetros resulta preferible en los casos de TSI (Anticuerpo anti receptor de la TSH), Gastrina, Péptido C y Aldosterona, sustancias para las que cabe esperar que sus anticuerpos presenten dos sitios de unión idénticos y dependientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) MORENO FRIGOLS, J. L. (2001): Inmunoanálisis, Cinética y Difusión. En el Libro Homenaje al Profesor Joaquín Moreno Clavel. Universidad Politécnica de Cartagena.
- (2) YALOW, R. S. and BERSON, S. A. (1970): General aspects of radioimmunoassay procedures. En: *In vitro* procedures with radioisotopes in medicine. 455-482. Viena.
- (3) MILES, L. E. M. and HALES, C. N. (1970): Immunoradiometric assay procedures: New developments. En: *In vitro* procedures with radioisotopes in medicine. 483-490. Viena.
- (4) CHAN, D. W. (1987): Immunoassay: A Practical Guide. Academic Press, Inc., 129-147.
- (5) OLIVAS ARROYO, C. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2001): Influence of viscosity and ionic strength on the reaction kinetics of aldosterone and androstendione and their specific antibodies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26: 547-562.

- (6) GARCÍA GÓMEZ, J.; PORCAR PONS, M. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Some kinetic aspects in the immunoradiometric assay of insulin-like growth factor binding protein-3. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 307-315.
- (7) GARCÍA GÓMEZ, J. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Kinetics and equilibrium in the immunoradiometric assay (IRMA) of Thyroglobuline, *J. Immunoassay & Immunochemistry.* 23(3): 347-367.
- (8) OLIVAS ARROYO, C.; DUART DUART, M. J. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Kinetics and equilibrium in insulin radioimmunoassay, *J. Immunoassay & Immunochemistry.* 23(4): 407-428.
- (9) GARCÍA GÓMEZ, J.; PORCAR PONS, M. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2004): Kinetics aspects in the immunoradiometric assay (IRMA) of human Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). *Chemistry: An Indian Journal.* 1(6): 451-457.
- (10) DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2005): Kinetics of androstendione - radioactive immunocomplex substitution reaction. *J. Immunoassay & Immunochemistry.* 26(2): 97-107.
- (11) DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2006): The influence of reactant concentration and reaction médium ionic strength, viscosity, and temperature in the immunocomplex substitution reaction in the radioimmunoassay of aldosterone. *Labmedicine.* Aceptado.
- (12) VAN HOLDE, K. (1979): *Bioquímica Física.* Ed. Alambra.

## ANEXO

- x: Concentración de las muestras patrones.
- y: Actividad en cpm correspondiente a cada muestra para diferentes curvas. A cada una de ellas corresponde el número que acompaña a y.

TABLA I: *Aldosterona*

x								E3P		E4P		E5P		ELL
	0	25	50	100	200	600	1200	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y1	3754	3446	3342	2811	2408	1597	953	33543	0,9974	25850	0,9979	33543	0,9974	0,9927
y2	4344	3811	3359	2821	2596	1789	1155	130917	0,9912	61997	0,9958	27346	0,9982	0,9906
y3	3774	3431	3078	2482	2325	1509	1135	66291	0,9942	58732	0,9948	49522	0,9956	0,9923
y4	2127	2036	1856	1531	1376	1137	955	17616	0,9927	13997	0,9942	17616	0,9927	0,963
y5	2445	2428	2220	1716	1666	1216	846	76846	0,9829	76841	0,9828	66992	0,9851	0,9264
y6	2617	2484	2190	1525	1257	1066	846	112535	0,9814	33049	0,9945	112535	0,9814	0,9448
y7	4399	4200	3850	3529	3119	2025	1279	25064	0,9984	13391	0,999	25064	0,9844	0,9944
y8	3501	3460	3268	2600	2365	1455	1056	78789	0,9931	71415	0,9937	78789	0,9931	0,9713
y9	2775	2613	2365	1930	1770	1212	841	36203	0,9941	33841	0,9945	36203	0,9941	0,9889
y10	2602	2154	2154	1606	1551	1141	646	115425	0,9782	70480	0,9867	54036	0,9899	0,9669
y11	2526	1885	1808	1581	1198	1026	631	82708	0,9824	32514	0,9931	36333	0,9923	0,9929
y12	4261	3841	3633	3044	2636	1683	1151	25599	0,9984	16871	0,9989	14414	0,9991	0,9973
y13	2230	1954	1912	1469	1299	927	654	26827	0,9932	25728	0,9935	26827	0,9932	0,9877
y14	1824	1649	1567	1522	1254	915	567	13180	0,9945	5720	0,9976	13180	0,9945	0,9814
y15	5239	5104	4471	4184	3374	1959	1436	72376	0,9973	62582	0,9976	72376	0,9973	0,9835
y16	4237	4106	3805	3553	2723	1620	1113	46337	0,9975	18374	0,999	46337	0,9975	0,9968
y17	2718	2539	2241	2070	1848	1038	775	29972	0,9953	26982	0,9958	29972	0,9954	0,9918
y18	2968	2849	2825	2639	2249	1334	943	24025	0,9969	3114	0,9996	24025	0,9969	0,9919

TABLA II: *Gastrina*

x								E3P		E4P		E5P		ELL
	0	32,6	65,2	131	261	523	1045	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y1	2934	2750	2426	2031	1334	864	471	28737	0,9974	6773	0,9993	28737	0,9974	0,9986
y2	2671	2598	2447	1884	1212	742	415	92006	0,991	8268	0,9992	92006	0,991	0,9968
y3	2545	2290	1804	1662	1200	627	311	43635	0,9947	41535	0,9949	43635	0,9947	0,9854
y4	7437	6402	6021	4552	2902	1645	1175	319301	0,9956	132104	0,9982	319301	0,9956	0,994
y5	7068	6579	6174	4440	2802	1399	813	621441	0,992	63069	0,9992	621441	0,992	0,9975
y6	7182	6632	6213	4579	2772	1291	863	713081	0,9912	54131	0,9993	713081	0,9912	0,9961
y7	6532	5756	5487	3935	2541	1470	881	325186	0,9945	104866	0,9982	325186	0,9945	0,9942
y8	7162	7039	6298	4716	3194	2261	1206	569963	0,9917	186481	0,9973	569963	0,9917	0,9825
y9	7674	6570	5896	4339	3092	1903	1298	104075	0,9985	45032	0,9994	104075	0,9985	0,9987
y10	5614	5114	4753	3705	2675	1608	907	70191	0,9982	18518	0,9995	70191	0,9982	0,9976
y11	5194	4369	4205	3164	2076	1342	735	107821	0,9968	88406	0,9974	107821	0,9968	0,9902
y12	3715	3359	2920	2033	1524	1116	512	94296	0,9945	77958	0,9955	94296	0,9945	0,9917
y13	6248	6135	5446	4386	3125	1674	1563	563871	0,9881	117824	0,9975	563871	0,9881	0,9753
y14	6142	4991	4568	3709	2418	1954	763	213268	0,995	161349	0,9962	143618	0,9966	0,9757
y15	5072	4441	3846	2932	1759	1057	424	55018	0,9985	14538	0,9996	55018	0,9985	0,9938
y16	4485	3751	3262	2705	1962	1253	783	10866	0,9995	4138	0,9998	2978	0,9999	0,9964
y17	4061	3479	2992	2115	1382	926	551	49357	0,9977	9577	0,9996	49357	0,9977	0,999

TABLA III: *Androstendiona*

x							E3P		E4P		E5P		ELL
	0	0,15	0,4	1,5	4	10	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y1	12793	11260	9990	7170	5319	3709	201267	0,9984	24860	0,9998	24402	0,9998	0,9996
y2	15787	13510	11625	8811	6345	3730	1484103	0,9927	87788	0,9995	1118	0,9999	0,933
y3	11524	9937	8217	5856	4327	2508	589436	0,995	174196	0,9985	10513	0,9999	0,9949
y4	9265	8167	6889	5261	3785	2415	343173	0,995	67263	0,999	20815	0,9997	0,9965
y5	11716	9762	9120	6188	4662	2698	785405	0,9932	272022	0,9976	253749	0,9978	0,9883
y6	11217	9425	8868	5556	4250	2880	495259	0,9954	433679	0,9959	186589	0,9983	0,9914
y7	12082	9979	8771	6268	4461	2734	732338	0,9941	13847	0,9999	33140	0,9997	0,9948
y8	11422	10525	9415	7044	4595	3081	52014	0,9995	26753	0,9998	19687	0,9998	0,9995
y9	21229	18310	16482	11129	8666	6045	824840	0,9977	494588	0,9998	434102	0,9988	0,9976
y10	12212	10289	9538	7547	5556	3288	1199678	0,9888	16278	0,9998	22765	0,9998	0,9825
y11	13285	11362	10439	7411	6434	4495	818044	0,9926	442018	0,996	334454	0,997	0,9934
y12	12586	11221	9858	7375	4856	3229	240264	0,9982	36865	0,9997	21968	0,9998	0,9987
y13	17143	14237	13556	8679	6434	4400	1283009	0,9948	1004213	0,9959	195987	0,9992	0,9913
y14	15780	12759	11282	7910	6135	3778	1590849	0,992	197369	0,999	232563	0,9988	0,9934
y15	15220	11805	10857	6810	5251	3555	1383702	0,9929	635691	0,9967	241041	0,9988	0,9927
y16	12541	10549	9161	6727	5079	3167	822210	0,9933	59232	0,9995	19003	0,9998	0,9954
y17	12313	11869	9419	7206	4777	2824	837597	0,9943	744889	0,9949	620778	0,9958	0,98
y18	17080	13801	12011	9386	6692	4526	2403310	0,9888	45368	0,9998	10955	0,9999	0,994
y19	11524	9937	8217	5856	4327	2508	589436	0,995	174196	0,9985	10513	0,9999	0,9949

TABLA III: *Androstendiona (continuación)*

							E3P		E4P		E5P		ELL
y20	16003	13804	12262	8923	6393	4214	648004	0,9968	11456	0,9999	29513	0,9999	0,9981
y21	15847	12901	11492	7995	5566	4179	757943	0,9963	136769	0,9993	0	0,9999	0,9982
y22	24103	21934	17499	13319	9606	6318	2554240	0,9947	1710236	0,9964	1036554	0,9979	0,9912
y23	17638	15664	12869	9993	7025	4773	1255667	0,9949	481198	0,9981	290574	0,9988	0,9957
y24	10474	9637	8771	6272	4886	3187	172583	0,9979	129286	0,9984	62735	0,9992	0,9982
y25	18421	15601	14139	10361	7443	4274	1806439	0,9936	76178	0,9997	144815	0,9995	0,9902
y26	12696	10673	9933	7816	5719	3853	1008951	0,9906	54986	0,9995	5417	0,9999	0,9989
y27	11146	9205	8949	6984	4774	3437	903637	0,9893	349145	0,9959	17577	0,9998	0,9811
y28	11396	9414	8040	6608	4205	2904	1283947	0,9873	264823	0,9974	192554	0,9981	0,9903
y29	14966	13715	11246	8917	6662	3336	2153802	0,9888	862640	0,9955	319896	0,9983	0,9843
y30	14649	13282	11975	10144	7646	5395	755736	0,9938	83465	0,9993	48351	0,9996	0,9956
y31	17793	15619	14767	10761	7588	5123	596398	0,9976	297542	0,9988	29398	0,9999	0,9935
y32	18038	15548	13941	10504	7431	5507	744740	0,9968	65963	0,9997	6727	0,9999	0,9989
y33	16550	14771	13092	8627	6832	4763	388678	0,9982	379690	0,9983	289711	0,9987	0,9968
y34	16427	14912	13320	9465	7074	4788	213167	0,999	112587	0,9995	36138	0,9998	0,9993
y35	15554	14282	12834	9483	6471	4000	133889	0,9994	2948	0,9999	393	0,9999	0,9988
y36	12965	11927	10445	7612	5156	3415	68934	0,9996	20247	0,9998	11851	0,9999	0,9995
y37	16025	13454	12057	9220	6492	4362	1326048	0,9931	29489	0,9998	24	0,9999	0,9951

TABLA IV: *Glucagón*

							E3P		E4P		E5P		ELL
x	0	31,25	62,5	125	500	1000	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y1	4726	3451	3024	2273	952,3	697	38564	0,998	24877	0,999	4176	1,000	0,997
y2	6895	5264	4617	2878	1702	1017	245936	0,995	224250	0,996	245936	0,995	0,992
y3	3047	2401	1728	1013	575,9	428,5	94320	0,991	5842	0,999	94320	0,991	0,984
y4	2125	1737	1402	1051	477,5	424	7915	0,998	1820	1,000	7915	0,998	0,993
y5	2055	1602	1187	739,5	441	237	28201	0,994	12084	0,998	28201	0,994	0,988
y6	2235	1835	1581	1009	538,4	527,5	40902	0,992	11370	0,998	40902	0,992	0,978
y7	2823	2350	2087	1334	716,4	530,5	52412	0,994	24301	0,997	52412	0,994	0,993
y8	1221	852,6	804,8	504,9	283,8	244,5	10207	0,993	10206	0,993	10207	0,993	0,985
y9	2235	1835	1581	1009	538,4	527,5	40858	0,992	11418	0,998	40858	0,992	0,978
y10	3815	2774	2411	1544	588,5	348,6	30789	0,998	30544	0,998	30789	0,998	0,997
y11	7436	6382	5806	4057	1543	1011	222867	0,997	82709	0,999	222867	0,997	0,998
y12	4271	3299	3032	2488	1628	1120	65700	0,995	9409	0,999	11080	0,999	0,994
y13	3181	2559	2037	1770	733,5	399,1	31283	0,997	20698	0,998	31283	0,997	0,993

TABLA V: *Insulina*

x								E3P		E4P		E5P		ELL
	0	5	15	50	100	200	400	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y1	4627	3721	2712	1724	1286	1066	565	76974	0,997	51012	0,998	13828	1	0,991
y2	5506	4228	3158	1873	1482	1125	692	69514	0,998	28484	0,999	8002	1	0,996
y3	6799	5065	3818	2543	1948	1554	880	275237	0,995	51758	0,999	10232	1	0,991
y4	8203	6205	4858	2999	2357	1791	1021	326930	0,996	65464	0,999	47900	0,999	0,992
y5	9136	7159	5297	3389	2484	2034	1185	240478	0,997	100895	0,999	20270	1	0,994
y6	7978	6022	4541	3108	2484	1801	1062	465225	0,994	71573	0,999	586	1	0,99
y7	7894	6229	4449	3115	2532	1636	1010	483111	0,994	192522	0,997	61613	0,999	0,991
y8	6943	5545	4152	2586	2079	1674	935	180467	0,997	109892	0,998	23173	1	0,991
y9	10291	7954	5939	3752	3064	1976	1274	470296	0,996	121144	0,999	40620	1	0,995
y10	9028	7238	5612	3488	2658	2124	1406	125728	0,999	48595	1	18574	1	0,998
y11	5629	4339	3181	2160	1478	1200	623	174610	0,996	53553	0,999	23767	0,999	0,989
y12	7993	6559	4531	3309	2813	2000	1058	772060	0,99	482347	0,994	162191	0,998	0,98
y13	7603	5587	4310	3088	2079	1585	983	491020	0,993	40234	0,999	32654	1	0,992
y14	4801	3808	2907	1784	1447	1077	544	115394	0,996	50610	0,998	9452	1	0,988
y15	6364	4741	3484	2485	1887	1370	668	439395	0,991	78384	0,998	5606	1	0,979
y16	12259	9667	7124	4829	3699	2697	1668	670806	0,996	186707	0,999	16217	1	0,995
y17	5803	4609	3339	2051	1646	1162	692	100003	0,998	55972	0,999	9252	1	0,995
y18	11947	8845	6665	4445	3290	2542	1593	692751	0,996	59526	1	25824	1	0,996
y19	8827	7360	4842	3389	2714	1914	1219	549025	0,994	500222	0,995	288797	0,997	0,989
y20	11065	9055	6833	4386	3479	2367	1555	335006	0,998	127053	0,999	27833	1	0,997
y21	11617	9130	6958	4419	3562	2518	1723	385179	0,998	87827	0,999	24455	1	0,998
y22	11248	8743	6770	4317	3335	2525	1675	355089	0,998	44655	1	27354	1	0,998

TABLA VI: *Osteocalcina*

x							E3P		E4P		E5P		ELL
	0	1	4,5	14	30	60	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y1	5037	4257	3019	1721	1009	730	9715	0,9996	12301	0,9997	4434	0,9998	0,999
y2	5542	4300	2842	1699	1315	981	5570	0,9993	22486	0,9998	4927	0,9999	0,999
y3	4752	3615	2381	1257	887	679	14567	0,999	27602	0,9994	3724	0,9999	0,999
y4	4576	3821	2585	1389	946	727	7105	0,9997	7576	0,9997	7576	0,9997	0,999
y5	4863	4148	2875	1935	1293	853	13288	0,9986	35650	0,9995	3713	0,9998	0,998
y6	7093	5504	3790	2436	1885	1203	24276	0,9971	151735	0,9995	17302	0,9997	0,996
y7	6057	4629	3100	2016	1360	799	10830	0,9963	150682	0,9997	159	0,9999	0,992
y8	4722	3658	2851	1687	1238	835	35715	0,9947	121313	0,9984	6195	0,9997	0,993
y9	5779	5137	3680	2586	1799	1087	43715	0,9976	83234	0,9987	11096	0,9997	0,996
y10	7200	5803	4737	2917	2321	1315	123995	0,9928	360317	0,9974	100328	0,998	0,983
y11	5683	4099	3386	1982	1537	1060	114563	0,9873	390962	0,9963	16304	0,9995	0,985
y12	5577	4226	3354	2047	1502	1058	52438	0,9926	222998	0,9983	4919	0,9998	0,992
y13	7380	6016	4215	2501	1938	1278	31054	0,9988	68533	0,9995	32373	0,9994	0,998
y14	6989	5789	4208	2297	1710	1158	56236	0,9988	66085	0,9999	15843	0,9997	0,998
y15	5124	4284	3064	1641	1329	984	41697	0,9985	41918	0,9986	41918	0,9985	0,996
y16	3568	3011	2226	1134	941	661	16219	0,9973	38391	0,9974	38391	0,9973	0,995
y17	2752	2494	1760	1430	1146	849	28880	0,9938	34830	0,9946	15162	0,9973	0,988

TABLA VII: Péptido C

							E3P		E4P		E5P		ELL
x	0	0.5	1	3	10	30	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y1	8847	7340	5827	3988	1499	856	242483	0,9976	165440	0,9984	110683	0,9989	0,995
y2	11592	8375	7234	3907	1722	929,5	1276979	0,9925	825106	0,9952	60916	0,9996	0,99
y3	10020	8136	5882	3454	1288	593,5	46454	0,9997	23232	0,9998	17487	0,9999	0,998
y4	10008	8083	6252	3255	1335	626,5	134770	0,9991	134591	0,9991	134770	0,9991	0,998
y5	6874	6488	5302	2725	1213	566,5	351808	0,9953	38366	0,9995	351808	0,9953	0,998
y6	5995	5272	4010	2609	1015	469,1	22423	0,9996	21890	0,9996	21083	0,9996	0,999
y7	4912	4366	3679	1982	802	403,9	95298	0,9974	36551	0,999	95298	0,9974	0,998
y8	12037	9764	7921	3700	1562	748	651214	0,9969	599973	0,9972	651214	0,9969	0,996
y9	11068	9741	7975	4092	1623	936,5	539737	0,9971	186008	0,999	539737	0,9971	0,997
y10	8764	8293	6031	3167	1375	613,2	438318	0,9964	73714	0,9994	438318	0,9964	0,995
y11	8620	8017	6787	3861	1791	918,7	309613	0,9971	51000	0,9995	309613	0,9971	0,999
y12	8356	6863	5971	2881	1340	574	500104	0,995	471205	0,9953	500104	0,995	0,991
y13	9609	8030	6524	3243	1633	737,5	322794	0,9975	289217	0,9978	322794	0,9975	0,997
y14	8302	6709	4235	2712	1485	556	224344	0,9975	209020	0,9977	103283	0,9989	0,992
y15	9316	8402	5808	3435	1713	1021	211426	0,9982	91270	0,9992	211426	0,9982	0,994
y16	7050	6797	5593	3160	1724	764,5	301116	0,9958	120354	0,9983	301116	0,9958	0,994
y17	8395	7193	6488	3368	1877	1141	610152	0,9933	467295	0,9948	610152	0,9933	0,99
y18	8832	8057	6640	3541	1460	599,5	301258	0,9975	60465	0,9995	301258	0,9975	0,999
y19	12427	11824	7312	4099	2601	1286	2013036	0,991	1014732	0,9955	2013036	0,991	0,971

TABLA VIII: TSI (Anticuerpo anti receptor de TSH)

x							E3P		E4P		E5P		ELL
	0	5	15	45	135	405	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y1	3052	2743	2160	1226	1114	753,9	80909	0,9909	47919	0,9946	80909	0,9909	0,97
y2	5707	4720	4285	3138	1605	760,8	154687	0,9957	88228	0,9976	8685	0,9998	0,985
y3	3067	3469	2811	1926	1053	774,5	260472	0,9786	118341	0,9903	260472	0,9786	0,987
y4	4066	3694	3319	2345	1193	726,5	29244	0,9984	17681	0,9991	29244	0,9984	0,997
y5	7504	6766	5479	3660	1612	1090	110069	0,9969	20657	0,999	110069	0,9984	0,996
y6	5311	4723	3778	2524	1451	1269	49275	0,9983	20657	0,9993	49275	0,9983	0,985
y7	6073	5654	4369	2867	2417	1801	196713	0,9937	97906	0,9969	196713	0,9937	0,964
y8	6244	5329	4426	2685	1818	1279	54787	0,9986	46247	0,9988	54787	0,9986	0,995
y9	6130	5290	4287	3092	1612	1327	77294	0,998	77067	0,998	73047	0,9981	0,992
y10	4819	4546	3709	2309	1392	1103	106063	0,9959	581	0,9999	106063	0,9959	0,982
y11	4769	4342	3422	2121	1396	1128	66068	0,9972	535	0,9999	66068	0,9972	0,982
y12	5431	4798	4033	2491	1348	1159	100254	0,9969	39569	0,9988	100254	0,9969	0,986
y13	6381	5917	4344	2744	1409	1210	215340	0,9957	65321	0,9987	215340	0,9957	0,977
y14	6316	5701	4515	2817	1502	1248	110400	0,9976	17339	0,9996	110400	0,9976	0,987
y15	6025	5548	4815	2880	1574	1173	192952	0,9955	21820	0,9995	192952	0,9955	0,991
y16	4516	4327	3943	2487	1334	946,2	165985	0,9932	6905	0,9998	165985	0,9932	0,991
y17	4816	4252	3339	2134	1337	1210	51006	0,9978	8008	0,9996	51006	0,998	0,978
y18	3991	3547	3035	1896	1186	1029	54810	0,9965	18727	0,9988	54810	0,9965	0,984
y19	4471	3925	3518	1886	1114	747,1	156553	0,9936	80501	0,9967	156553	0,9936	0,99
y20	3988	3193	2946	1889	1509	1375	98480	0,991	98134	0,9911	98480	0,991	0,968
y21	3604	3310	2854	1797	1032	877,5	61792	0,9955	8840	0,9993	61792	0,9955	0,985
y22	5932	5275	4152	2586	1739	1255	46492	0,9987	9679	0,9997	46492	0,9987	0,99

TABLA VIII: TSI (Anticuerpo anti receptor de TSH) (continuación)

x							E3P		E4P		E5P		ELL
	0	5	15	45	135	405	$\sigma$	r	$\sigma$	r	$\sigma$	r	r
y23	3529	3370	2715	1628	935,9	760,8	87506	0,994	1351	0,9999	87506	0,9941	0,977
y24	5113	4885	3811	2259	1190	808,9	149595	0,9957	13430	0,9996	149595	0,9957	0,985
y25	3784	3472	2874	1520	1125	887,8	148057	0,9906	24155	0,9985	148057	0,9906	0,973
y26	6259	5033	3880	2841	1640	1156	93437	0,9976	27723	0,9993	21888	0,9994	0,998
y27	3572	3390	2234	1392	957,9	642,6	141374	0,9908	67690	0,9956	141374	0,9908	0,959
y28	2858	2735	1595	919,6	541,1	323,7	159121	0,9867	69170	0,9942	159121	0,9867	0,959
y29	2010	1897	1617	1100	559,6	374,5	10019	0,9979	1037	0,9998	10019	0,9979	0,996
y30	3394	3384	2664	1769	908,1	617,7	80099	0,9945	27374	0,9981	80099	0,9945	0,934
y31	2770	2484	2444	1649	860,9	723	86094	0,9889	34010	0,9956	86094	0,9889	0,97
y32	2422	1969	1776	1191	643,1	563,3	32646	0,9942	32206	0,9943	32646	0,9942	0,982
y33	7833	6791	5015	3675	2429	2073	81950	0,9985	72239	0,9987	81950	0,9985	0,981
y34	4899	4696	4011	2364	1718	1311	218223	0,991	32023	0,9987	218223	0,991	0,974
y35	6059	5673	4080	3607	2897	2629	271301	0,9865	230919	0,9885	271301	0,9865	0,92
y36	4847	4538	3264	2885	2318	2103	173748	0,9865	147860	0,9885	173748	0,9865	0,92
y37	3892	3533	2899	1942	1449	1137	21350	0,9983	6192	0,9995	21350	0,9983	0,984

## Crónica de la Sesión Inaugural del Curso Académico 2007



*Mesa de la Presidencia (de izda. a dcha.): Don Carlos Berzosa, Don Alberto Galindo Tixaire, Don Salustiano del Campo Urbano, Doña María Teresa Miras Portugal (Presidenta Entrante), Don Fernando Gurrea y Don Landelino Lavilla. Sentado entre los Académicos, primero por la izda., Don Juan Manuel Reol Tejada (Presidente Saliente).*

El día 18 de enero de 2007, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la inauguración de su Curso Académico en un acto que revistió gran solemnidad. Presidieron el acto el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente saliente de la Real Academia Nacional de Farmacia, y la Excm. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, Presidenta entrante de nuestra corporación. Junto a ellos, el Presidente del Instituto de España, el Excmo. Señor Don Salustiano del Campo; el Subsecretario del Ministerio de Educación

y Ciencia, el Excmo. Señor Don Fernando Gurrea; el Presidente de la Real Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, el Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire; el Presidente de la Real Academia Nacional de Jurisprudencia y Legislación, el Excmo. Señor Don Landelino Lavilla, y el Rector de la Universidad Complutense de Madrid, el Excmo. Señor Don Carlos Berzosa.

El acto comenzó con la Toma de Posesión de la Presidencia de la Real Academia Nacional de Farmacia por parte de la Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal. En el Acto de Toma de Posesión, el Presidente saliente, Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada le hizo entrega de los Estatutos de nuestra Real Academia a la Presidenta entrante, Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, quien aceptó solemnemente y se comprometió a guardar fidelidad a los mismos.

A continuación, el Académico Secretario, Excmo. Señor Don Antonio Doadrio Villarejo, leyó la Memoria de Actividades Académicas correspondientes al año 2006; posteriormente el Excmo. Señor Don Juan Tamargo leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso sobre: «El desarrollo de fármacos. A propósito de la insuficiencia cardíaca: Luces, sombras, reflexiones y perspectivas».

Seguidamente se entregaron los Premios de Investigación, respectivamente, Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia, Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Premio Alcalíber, Premio Cinfa, Premio Faes Pharma, Premio Mabo, Premio Normon, Premio Juan Abelló, Premio Carlos del Castillo Leiva y Premio Santos Ruiz, a los jóvenes investigadores que los jurados eligieron merecedores.

Por último, se hizo entrega a Doña Josefa Ortega Ortiz de Apodaca de un Diploma por sus veintisiete años de trabajo y lealtad a nuestra Real Academia.

El acto contó con una masiva asistencia y la presencia, entre otras personalidades, de los Presidentes de la Real Academia Nacional de Medicina; de las Reales Academias Territoriales de Farmacia de España: Cataluña, Galicia, Iberoamericana de Sevilla y Granada y Santa María de la Región de Murcia, así como numerosos Acadé-

micos de las Reales Academias Nacionales de Medicina, Ciencias, y otras personalidades académicas.

Clausuró el acto la Presidenta de esta Real Corporación, declarando inaugurado el Curso Académico 2007 en nombre de S. M. el Rey.



## **Intervención del Presidente saliente Don Juan Manuel Reol en el Acto de Toma de Posesión de Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras, como Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia**

Cuando intervengo por última vez como Presidente de esta Real Academia Nacional de Farmacia quiero, en primerísimo lugar, recordar a quienes nos han dejado en el año 2006. Entre ellos el Profesor Fernández-Galiano: su magisterio y su dedicación a la Academia serán inolvidables para nosotros.

Las Academias no viven dentro de una urna de cristal. Son parte de la vida de España y laten al unísono con las alegrías y las preocupaciones de nuestro país. Por eso, una vez más, debemos condenar con toda firmeza el criminal atentado terrorista del 30 de diciembre.

Las Academias, desde la libertad, la independencia y la sabiduría de sus miembros, quieren, al servicio de los poderes públicos y la sociedad civil, anticipar escenarios, descubrir horizontes, criticar desde la esperanza y estimular desde la exigencia de mayores logros. En definitiva, el comportamiento intelectual de las Academias viene definido por la responsabilidad y el obligado compromiso con la excelencia.

La Real Academia Nacional de Farmacia, desde el soporte de las ciencias básicas, cultiva las ciencias farmacéuticas para acercar los logros científicos al paciente. En el marco de las ciencias de la vida, nos comprometemos con la salud, a través del estudio, debate y difusión de los hallazgos relacionados con las ciencias farmacéuticas y el medicamento.

Se han cumplido mis dos períodos (2001-2003-2006) de mandato, a los que estatutariamente está limitado el ejercicio de los cargos. Pues bien, hemos restaurado gran parte del edificio (Biblioteca, Aulas y Salones, principalmente) e incorporado las nuevas tecnologías (digitalización de nuestros fondos bibliográficos y excelente página web con dos millones y medio de visitas anuales). Pero no querría ser recordado sólo por esto, por cuanto siendo ello importante, y aún necesario, no dejan de ser soportes materiales para fines más elevados.

Me gustaría ser recordado por haber movlizado voluntades y estimulado la materia gris, que hay a raudales en esta Academia. Todo ello dirigido a un objetivo: debatir la ciencia, como diría el maestro Laín, «repensar» sus conclusiones, difundir y socializar los conocimientos. Pero ese objetivo tiene un último, o primer, horizonte: desde el núcleo del pensamiento científico y el filtro de la bioética, transmitir esperanza al paciente.

Me gustaría ser recordado por promover el diálogo con la sociedad y el mundo de la cultura y de la historia. Entiendo que deberíamos esforzarnos por abrir las mentes a la idea que sólo hay una cultura: la que pretende desentrañar el misterio de la vida y el cosmos desde el pensamiento científico, propio de Occidente, la filosofía grecolatina y el humanismo y sentido de la igualdad de raíz cristiana.

En este aspecto nuestros esfuerzos se han vuelto hacia la historia para situar las tareas de nuestros antecesores en los difíciles escenarios en los que vivieron. Así se entienden nuestros homenajes a los Profesores Obdulio Fernández, Enrique Moles, José M.<sup>a</sup> Albareda, o más recientemente a nuestro Presidente de Honor, el Profesor Santos Ruiz, y a Don Santiago Ramón y Cajal. Así se entiende, también, nuestra colección de *Lecturas Singulares* para recrear nuestro espacio-tiempo espiritual que no puede ser otro que el de Cervantes y León Felipe, el gran poeta farmacéutico.

Como expresión de nuestro quehacer en el período 2001-2006 daré unas cifras: 16 publicaciones sobre ciencias farmacéuticas, de la salud y básicas; 10 sobre aspectos históricos y culturales; 18 que recogen mesas redondas relacionadas con las fronteras sanitarias, la investigación, la industria farmacéutica, la profesión y los pacientes.

También quiero subrayar la renovación de los Anales y la culminación del Diccionario Bilingüe de Términos Farmacéuticos, actualmente en imprenta, que se presentará muy pronto en la Academia. Por último, el Convenio alcanzado con la Universidad Complutense para el mutuo acceso, a través de la red, de nuestros respectivos fondos bibliográficos.

Me gustaría ser recordado por conseguir la designación de nuestra Academia para organizar el II Encuentro de Academias Ibero-

americanas, en junio de este año en Madrid. En esas fechas nos reuniremos las Academias Iberoamericanas y las españolas. Hoy nos acompañan los Presidentes de la Real Academia de Farmacia de Cataluña, de la Academia de Farmacia de Galicia, de la Academia Iberoamericana de Sevilla y Granada y de la de Santa María de la Región de Murcia, después de haber tenido una mañana de trabajo compartiendo ideas y objetivos con ellos.

Me parece de excepcional importancia que, en seguimiento de la Declaración de Valparaíso, las ciencias farmacéuticas, que se estudian y cultivan en nuestras Academias, se asomen al mundo hablando español para dejar constancia del valor de nuestro esfuerzo en pro de la ciencia y de la salud. A la vez, con las Academias Iberoamericanas, reflexionaremos sobre nuestro pasado histórico para proyectarnos hacia este mundo nuevo y difícil del siglo XXI.

Me voy orgulloso y tranquilo:

Orgulloso por los resultados obtenidos, pero, sobre todo, por el esfuerzo y el empeño puesto al servicio de la Academia.

Orgulloso por haber aprovechado la oportunidad única de presidir una de las ocho Reales Academias del Instituto de España, para contribuir a llevar a la Real Academia Nacional de Farmacia al lugar de privilegio que por su historia y la excelencia del trabajo de sus miembros se merece.

Orgulloso por el respaldo que siempre he tenido de las Juntas de Gobierno, desde la primera a la última celebrada, y por las muchas señales de afecto de mis compañeros.

Me voy tranquilo. Permítanme un rasgo de humor. A partir de cierta edad... y en las Academias, la tranquilidad, como la salud, es «un estado transitorio que nada bueno presagia». En todo caso estos versos describen muy bien mi estado de ánimo:

«Ahora mismo  
hay sosiego en el rumor del viento  
y los pájaros duermen en sus nidos».

Tranquilo, porque la Academia ha alcanzado su velocidad de crucero.

Tranquilo, porque estos años se han incorporado a la Real Academia Nacional de Farmacia figuras de primera fila de la ciencia española que residen en muy diversos lugares de España.

Tranquilo, porque el timón está en excelentes manos.

El pasado 14 de diciembre, la Academia eligió, con sabiduría y extrema cortesía, a la Profesora M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal como nueva Presidenta. Al hacerlo así se produjo un cambio generacional. Una persona joven, a la vez que madura y reflexiva, dirigirá el rumbo de la Academia. La Academia ha elegido a esta brillantísima universitaria con la naturalidad con la que sabe hacer estas cosas.

La Profesora Miras es Doctora en Farmacia, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad Complutense, Socia de Honor de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, Premio Nacional de Ciencias de la CEOE. Ella es una de las grandes personalidades europeas de las neurociencias. Su trabajo, conocido y reconocido en el ámbito internacional, parte de la investigación básica para acercarse, desde la Farmacología Molecular, a la clínica, en el horizonte del paciente.

En resumen:

Una universitaria. Doctora en Farmacia, de enorme prestigio, extraordinaria densidad científica, grandísima cultura y calidad humana, es desde ahora mismo nuestra Presidenta.

Sólo me queda el capítulo de agradecimientos:

A Su Majestad El Rey, cuyo Alto Patronazgo nos honra y enorgullece.

A la Ministra de Educación y el Secretario de Estado por la asistencia y ayuda que permanentemente nos prestan.

Al mundo académico: Instituto de España y Reales Academias, a quienes hemos querido siempre mostrar cercanía porque idéntico es nuestro objetivo, aunque diversos los caminos. Especial referencia quiero hacer a nuestra hermana mayor, la Real Academia Nacional de Medicina, la primera en nuestro afecto, y a la Real Academia de Ciencias.

A nuestras queridas Academias de Farmacia de los distintos territorios españoles, a las Academias Iberoamericanas, porque con ellas compartimos idioma, motivaciones y objetivos.

Al mundo de la Sanidad y sus instituciones —Dirección General de Farmacia, Agencia Española del Medicamento, Instituto de Salud Carlos III—, tan presente y tan querido.

A la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia y a las Instituciones, los Laboratorios Farmacéuticos, Profesión, Empresas... que nos ofrecen generosamente su patronazgo.

A las Instituciones Colegiales de la profesión farmacéutica, tan querida, que está en la raíz de nuestra existencia.

A los medios de comunicación sanitarios y farmacéuticos que nos siguen y alientan.

Especialmente a nuestro personal, y en su representación a Pepa Ortega, veintisiete años de trabajo y lealtad a esta Casa.

Permítanme, por último, un desahogo sentimental. Vaya ahora en mis palabras finales un recuerdo a Burgos y a mi tierra castellana y leonesa, a la que dediqué años excepcionales de mi vida. Su recuerdo emocionado me viene hecho viento con el viento, como diría León Felipe.

Y a mi mujer, M.<sup>a</sup> Ángeles, sin la cual no entiendo ni se entiende mi vida. Con ella quiero vivir y sentir el tiempo que la Providencia nos conceda.

Por último a todos ustedes, los Académicos de la Real Academia Nacional de Farmacia: los respeto, los admiro y los quiero. Gracias por estos seis años de felicidad.

JUAN MANUEL REOL TEJADA  
Madrid, 18 de enero de 2007



## **Intervención de la Presidenta Entrante, Doña María Teresa Miras Portugal**

Excelentísimo Señor Presidente saliente de la Real Academia Nacional de Farmacia. Excmas. Señoras y Excmos. Señores Académicos, señoras y señores.

Por tradición e historia, la Presidencia de esta Real Academia Nacional de Farmacia lleva emparejada un gran honor y una gran responsabilidad.

Honor, por ser sucesora en el cargo de Presidentes de gran trayectoria profesional y humana que dedicaron inteligencia y voluntad para adecuar nuestra Academia en cada momento a los tiempos en que ejercieron su mandato, lo que nos ha permitido entrar sin complejos en este nuevo siglo XXI. De todos ellos es deudora esta Academia, y a ellos nuestra admiración y respeto.

Responsabilidad, pues el hecho de haber sido elegida en votación por mis propios compañeros, las Excmas. Señoras y Excmos. Señores Académicos, me hace depositaria de su afecto y de su confianza. Sé que nunca me faltará el apoyo, el consejo y el esfuerzo solidario de todos ellos; espero no defraudar sus esperanzas y realizar dignamente las tareas que esta nueva singladura me depare.

En estos tiempos movedizos, con amplios horizontes y parámetros de valores en pleno cambio, ¿cuáles son las funciones de las Reales Academias y en concreto de la Real Academia Nacional de Farmacia? y ¿qué se espera de sus miembros? Estas fueron las dos preguntas clave que me planteé como punto de partida de una profunda reflexión.

En *La Zapatera Prodigiosa*, de García Lorca, le preguntan al marido disfrazado de cómico.

—¿Y en qué consiste el trabajo de usted?

Y responde:

—¡Ah! Es un trabajo de poca apariencia y de mucha ciencia. (Yo) Enseño la vida por dentro.

Todos los miembros de esta Academia hemos estudiado y enseñado la vida por dentro, en la más plena y exacta extensión de la palabra, nos hemos visto fascinados por las diversas y sorprendentes formas de vida, la aparente fragilidad de sus moléculas, siempre en un precario equilibrio, las citoarquitecturas casi inimaginables, pero posibles, sus estrategias para seguir viviendo y multiplicándose, la sutil utilización de los procesos fisicoquímicos en la obtención de energía, los retos para comprender la complejidad de nuestras funciones cerebrales y lo que es tal vez uno de nuestros temas más queridos: el conseguir mediante la utilización de fármacos revertir los procesos patológicos. Estas moléculas con utilidad farmacológica son de muy diversa naturaleza y origen, algunas imposibles, por el momento, de ser sintetizadas químicamente. Además, tienen vida propia, si son difíciles de descubrir, en igual modo lo son de «domar», pues han de ser estables y llegar a su destino en forma y modo eficaz y seguro. Parece simple, pero para muchos de nosotros es el ligero y valioso equipaje de toda una vida.

Nuestra Academia es y ha sido lugar de saber y de reflexión, donde gente generosa que no espera ni honores ni dádivas, ajenos a apariencias vanas, hacen un esfuerzo colectivo y honesto por conocer e interpretar las claves de la situación científica y profesional en el contexto de la realidad social de nuestro país.

Desde tiempos pretéritos la idea de que el avance en el conocimiento científico nos llevaría hacia seres humanos más bondadosos ha cristalizado en la mente humana. Hace aproximadamente ocho siglos Maimónides afirmaba que la ignorancia era la fuente de los males humanos: *«Esos grandes males que recaen sobre los hombres, por obra de unos y otros, motivados por sus tendencias, pasiones, sentires y creencias, son debidos a la ignorancia, es decir, la carencia de conocimiento. Si estuvieran en posesión de la ciencia, sentiríanse refrenados de dañarse a sí mismos y a los otros, por cuanto el conocimiento de la verdad retrae de la enemistad y del odio, y evita que los humanos se hagan daño mutuamente»*.

Posiblemente, un poco más escépticos que antaño, tenemos, no obstante, al menos en ciencias de la vida y la salud, que seguir convencidos de que esa idea sigue siendo absolutamente válida y hoy más que nunca necesaria. Nuestra Academia debe de contribuir a

ese anhelo y esperanza en el valor del conocimiento y se encuentra en la obligación de saber valorar, apreciar y difundir las ciencias farmacéuticas que redundaran en una mejor salud y calidad de vida. Pero, ¿cómo diferenciar lo duradero y valioso de los cantos de sirena transitorios y sin contenido? Ciertamente en el tiempo que nos ha tocado vivir estamos sumergidos en una gran abundancia de información, somos la sociedad de la información, y no estaría por demás hacer la misma reflexión que Antonio Machado a través de Juan de Mairena: *«Aprendió tantas cosas —escribía mi maestro a la muerte de su amigo erudito—, que no tuvo tiempo para pensar en ninguna de ellas»*.

Así pues, no sólo es necesario el conocimiento, la reflexión sosegada es una labor esencial, y las Academias son un buen lugar para ello. La posibilidad de análisis de problemas y realidades concretas será más fecunda al ser procesada por el pensamiento de un colectivo plural, rico en vivencias, que ha sido capaz de mantener su ilusión en el valor del estudio y de la ciencia frente a los avatares y desgastes cotidianos.

En un reciente discurso, nuestro Presidente saliente, el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol, precisaba lo que eran en general los objetivos actuales de las Reales Academias, que citaré con sus propias palabras:

*«He creído siempre —decía— en la unidad de objetivos y en la misión última de las Academias: debatir la ciencia o los movimientos artísticos y culturales, abrir cauces y transmitir el conocimiento, “re-pensar” teorías, emitir juicios anticipatorios, iluminar a los gobiernos y la sociedad civil, desde la independencia y el rigor. Cada uno en el ámbito de su disciplina humanística o científica, todas propiciando el diálogo entre las Ciencias y las Letras. En definitiva, buscando la verdad y construyendo la gran cultura»*.

Pero un nuevo reto se presenta, estamos en la actualidad en la encrucijada de la convergencia del espacio europeo de educación superior, por analogía se está tratando de estructurar el espacio iberoamericano de educación superior y nuestra Academia no puede permanecer al margen, deberá de ser ambiciosa y prudente. Como primer paso, el próximo mes de junio se celebrará en nuestra sede el II Encuentro de la Asociación Internacional de Academias de Far-

macia, evento al que dedicó esfuerzos y anhelos nuestro Presidente saliente. La Academia tendrá que hacer un nuevo esfuerzo y necesitará conocer y saber qué está pasando en las de su entorno.

El Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol, en su presentación, ha elogiado y resaltado mis méritos, sin duda todos ustedes se han dado cuenta de que los ha multiplicado por el factor de su afecto y de su gran amistad, que es recíproca, pero no crean va a influenciar mis palabras de gratitud a su persona, pues sólo diré la verdad contrastada por los hechos. Comenzaré diciendo que toda institución que prospera y es capaz de adaptarse con éxito a los requerimientos de la sociedad, necesita una cabeza lúcida y noblemente ambiciosa que posea al mismo tiempo la capacidad de imaginar y soñar cuáles son los nuevos retos, y con el carisma de aunar en torno a su persona gente capaz y convencida de que la empresa vale la pena. Don Juan Manuel ha tenido sin duda la personalidad y el carisma necesarios para renovar nuestra institución, lo que era casi previsible por su trayectoria profesional intachable al servicio del país, de la sanidad y del medicamento. Miembro de múltiples academias y reiteradamente condecorado, por citar algún hecho singular, permítanme referirme a su espléndida labor como Primer Director General de Farmacia en el Ministerio de Sanidad, promoviendo la Legislación que significó la Reforma Farmacéutica del año 1978, y como Primer Presidente del Consejo General de Castilla y León; Diputado en las Cortes Constituyentes y Primera Legislatura, y en la actualidad Vocal del Consejo Asesor de la Agencia Española del Medicamento. Pero sobre todo hombre de bien, culto y refinado, que no desdeñó la acción, pues como decía Baltasar Gracián: *«El saber y el valor contribuyen conjuntamente a la grandeza»*.

Tenga por seguro, Don Juan Manuel, que como castellano recio, noble y de Burgos, todos los académicos echaremos de menos su presidencia y por su buen hacer como luchador infatigable por esta su Academia, será nuestra Institución quien atesore su memoria y sea su deudora.

Permítanme, para finalizar, recordar las palabras de Su Majestad el Rey Don Juan Carlos en la Sesión Solemne de Apertura del curso 2002-2003 de las Reales Academias del Instituto de España, celebrado en esta sede: *«El Instituto de España y las Reales Academias son*

*huellas luminosas de un pasado ilustrado, pero están cada día más presentes en la vida cultural y científica española (...). Este es el secreto de su vigencia y la clave de su importancia: el de proclamar, mediante un trabajo riguroso y exigente, la realidad de una cultura global, y difundir su mensaje a todos los ámbitos de la sociedad».*

Ese ha sido su mensaje y su encomienda, y el cumplirlo es nuestra misión.

A todos muchas gracias.

M.<sup>a</sup> TERESA MIRAS PORTUGAL  
Madrid, 18 de enero de 2007



## **Memoria Anual de Secretaría correspondiente al año 2006**

EXCMO. SEÑOR DON ANTONIO DOADRIO VILLAREJO

La Real Academia Nacional de Farmacia inicia oficialmente las actividades correspondientes al Curso 2006 con la Solemne Sesión Inaugural del 19 de enero, bajo la Presidencia del Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada, Presidente de la misma, y contando con la presencia del Presidente del Instituto de España, Excmo. Señor Don Salustiano del Campo y del de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire. La lectura del discurso reglamentario, titulado: «Europa y la globalización en sanidad», correspondió al Excmo. Señor Doctor Don Bartolomé Ribas Ozonas.

La Academia distinguió con las Medallas Carracido en su categoría de Oro a Caja Madrid, en categoría de plata a Doña Rosa Basante Pol y de bronce a Don José Antonio Matjí, que les fueron entregadas en la Sesión Inaugural. Todas ellas concedidas por su gran labor en la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF, al mejor servicio de ésta.

Durante el año pasado ha tenido lugar la incorporación de nuevos miembros a nuestra Corporación. En la Sesión Inaugural, toman posesión de sus cargos de Académicos Correspondientes Nacionales, los Ilmos. Señores/Señoras Doctores Rafael Lozano Fernández, Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata, Javier León Serrano, Joaquín Pérez Pariente, Ana M.<sup>a</sup> Requejo Marcos, Carmen Peña López, Juan Esteva de Sagrera, José Enrique Hours Pérez, José Manuel Giménez Amaya y Vicente Larraga Rodríguez de Vera. Además, se produjeron otras siete tomas de posesión en Sesiones Públicas con las lecturas de sus correspondientes discursos reglamentarios, de los Doctores Eva Delpón Mosquera, Jesús Pintor Just, Icíar Astiasarán Anchía, Francisco Rojo Vázquez, Juana Benedí González, Francisco Sánchez Muniz y José M.<sup>a</sup> Sánchez Montero. En total 17 nuevos Académicos Nacionales. En cuanto a Académicos Correspondientes extranjeros, contamos con cuatro nuevas incorporaciones, de los Doctores Geor-

ge V. Hillyer, Catedrático de la Universidad de Puerto Rico, y de Alfio Piva, Director del Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica, con la lectura de sus discursos reglamentarios, y de los Doctores Charon Robin Ganellin, inventor del Tagamet, y de Lennart Lindberg en Sesiones Privadas.

Las Sesiones Públicas Solemnes de toma de posesión de Académicos de Número son las más importantes entre las que se celebran en nuestra Institución. En el curso 2006 se produjeron cinco nuevas incorporaciones. El día 12 de enero toma posesión de su plaza, medalla número 11, el Excmo. Señor Don Gonzalo Giménez Martín, con la lectura de su discurso reglamentario: «Omnis cellula e cellula». El 26 de enero, lo hace, en la medalla número 33, el Excmo. Señor Don Mariano Esteban Rodríguez, quien pronunció su discurso titulado: «Los interferones y vacunas como control de enfermedades prevalentes». El día 9 de marzo, el Excmo. Señor Don José Luis Vila Jato, medalla número 30, con la lectura de su discurso: «Nanotecnología Farmacéutica: Una galénica emergente». El 11 de mayo, medalla número 22, el Excmo. Señor Don Fidel Ortega Ortiz de Apodaca, con la lectura de su discurso: «Biosensores y biochips, herramientas para el diagnóstico y la terapéutica», y el 26 de octubre ingresa como Académico de Número el Excmo. Señor Don Joan Guinovart Cirera, quien leyó su discurso titulado: «De la investigación básica al descubrimiento de fármacos», al que el Presidente de la Corporación le hizo entrega de la Medalla número 40. Todas ellas en nombre del S. M. el Rey.

Hemos de hacer mención especial a la pérdida sufrida este año por la Corporación debida al fallecimiento del Académico de Número, Excmo. Señor Don Emilio Fernández Galiano y de los Académicos Correspondientes Nacionales, Doctores Ramón San Martín Casamada, José Cardús Aguilar y Salvador Brossa Rabasa, además de los Extranjeros, Doctores Hermann Schmidt Hebbel, Marin Mehandjiev, Herbert Oelschläger y Aranibar Urquidi. Nuestro recuerdo y gratitud por su contribución a esta Corporación.

En relación a la Actividad Científica, vuelve a ser de nuevo de un extraordinario dinamismo, resumida en 37 Sesiones Científicas semanales, distribuidas en catorce Tomas de Posesión, once conferencias, ocho Mesas Redondas, una Tertulia Científica y dos Presentaciones de Monografías, además de la Sesión Inaugural.

En estas Sesiones Públicas, cada vez más universales, ya que se retransmiten en directo por Internet a través de nuestra web, sin restricción alguna, esta Real Academia Nacional de Farmacia ha demostrado su compromiso con la sociedad a la que sirve, tratando temas de gran interés y actualidad sanitaria, como la Tertulia Científica dedicada a la Ley sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida, la Mesa Redonda sobre Gripe Aviar o la Mesa Redonda, ya habitual, sobre Innovación y Medicamentos, que este año ha girado en torno al Cáncer, por citar sólo tres ejemplos significativos.

Nuestra Institución está abierta a todas las personalidades científicas y destacados profesionales sanitarios o de la industria farmacéutica, que cada vez con más frecuencia muestran su interés en impartir conferencias en nuestra Corporación. Así, el Doctor Don Pedro Mario Fernández San Juan, Jefe de Componentes y Aditivos del Centro Nacional de Alimentación de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, impartió su conferencia titulada: «¿Son seguros e inocuos los aditivos alimentarios?», y el Doctor Jean-Pierre Chanoine, del Children's Hospital de Vancouver (Canadá), versó sobre «El estómago habla al cerebro: ghrelina y obestatina». Profesionales destacados de la Industria Farmacéutica aportaron su contribución a las Sesiones Públicas, con las intervenciones de los Doctores Emilio Díez de Glaxo SmithKline, Fernando Peláez de MSD, y José Prous, Vicepresidente de Prous Sciences, que presentó la Base de datos Integrity: «Un nuevo instrumento para el descubrimiento de medicamentos». Asimismo, destacamos la intervención de la Doctora Rosario Perona, Presidenta de la Asociación Española de Investigación sobre el Cáncer, ASEICA. Todas ellas resultaron de enorme interés, con una gran afluencia de público.

En el año del Centenario de la concesión del Premio Nobel a Ramón y Cajal, no podía faltar nuestro homenaje ante tan destacada figura de las ciencias españolas, por lo que organizamos una Mesa Redonda coordinada por la Profesora Miras Portugal, Académica de Número, el 23 de noviembre, con las intervenciones de los Doctores Jesús Ávila de Grado, Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, y M.<sup>a</sup> Ángela Nieto, Profesora de investigación del CSIC.

Después de dos sesiones de retransmisión en pruebas, el 26 de octubre, por primera vez se retransmite *on line*, una Sesión Pública

de nuestra Corporación, eligiendo para esta ocasión, que sin duda marca un hito histórico, la de toma de posesión como Académico de Número del Doctor Joan Guinovart, que de esta manera también entra en nuestra historia. Esta Sesión fue seguida por Internet en directo por cien personas, tanto españoles como extranjeros, especialmente de Hispanoamérica, saturando el Servidor Multimedia que tenemos contratado con dicho límite.

La Fundación Casares Gil de nuevo ha contribuido a este desarrollo con su patronazgo, no sólo económico, sino también organizativo, en tres importantes Sesiones Científicas; con las Mesas Redondas sobre Innovación y Medicamentos, coordinada por el Profesor Monge Vega y la de Regeneración Hepática, coordinada por la Doctora María Cascales Angosto, así como con la conferencia del Profesor Doctor Don Francisco González de Posada, titulada: «Ángel del Campo y Enrique Moles: pilares de la renovación de la Química española», que cierra el Homenaje a las Grandes Figuras Farmacéuticas celebrado en el curso 2005.

La actividad de la Academia se complementa con las reuniones de las Secciones y Comisiones. Las secciones se reunieron en dieciséis ocasiones y las Comisiones en quince. Además, la Junta de Gobierno tuvo trece sesiones y la Junta General se convocó en nueve ocasiones.

Como es habitual, también este año se ha impartido en la Corporación tres Cursos del Tercer Ciclo, patrocinado por el Ministerio de Educación y Ciencia y coordinado por el Instituto de España, sobre Bases Moleculares del estrés oxidativo, Contaminación Atmosférica, y Radicales libres y envejecimiento.

Entre otras Actividades Científicas efectuadas por nuestros Académicos en otros foros hay que destacar las realizadas por el Profesor Antonio Monge Vega, que dictó la conferencia inaugural del curso académico 2006/2007, de la Universidad de Navarra, titulada: «Investigación y medicamentos. Cooperación, reto y oportunidad para los países en desarrollo». Las del Profesor Cabezas Fernández del Campo y la Doctora Ana M.<sup>a</sup> Pascual Leone, con sendos ciclos de conferencias en el Instituto de España sobre la Gripe Aviar y «Procesos Epigenéticos: Postformación y factores externos», respectivamente. La presidencia del Doctor Alberto Giráldez Dávila en el

VII Congreso de Ciencias Farmacéuticas y XXVI Symposium de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, y la conferencia impartida por el Doctor Bartolomé Ribas Ozonas en la Academia Nacional de Medicina de Francia.

Este enorme esfuerzo científico tiene su continuación *in extenso*, en el Capítulo de Publicaciones, editando tres números de los Anales y otro extraordinario, dedicado al *Balneario Cervantes, de la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales*, y tres monografías: la número XIX, *Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: Avances y perspectivas*; la número XX, *Enfermedades metabólicas*, y la número XXI, *Influenza Aviar y Gripe humana de origen aviario*.

La Fundación Casares Gil, como es habitual, vuelve a estar presente en estas actividades de la RANF, con el patronazgo de las monografías 19 y 20 y con las publicaciones de los números 2 y 3 de la serie *Lecturas Singulares*, iniciadas en el curso 2005, tituladas: *Recuerdo y desagravio a León Felipe y La Farmacia en tiempos de Miguel de Cervantes Saavedra*. Además, publica el segundo libro homenaje a las grandes figuras farmacéuticas, dedicado a Obdulio Fernández y Enrique Moles, y la Mesa Redonda *Regeneración Hepática*, esta última dentro de las monografías de la Fundación dedicadas a las sesiones científicas que patrocina.

Destacamos en este capítulo de publicaciones, el libro dedicado al que fuera nuestro Presidente de Honor: «En memoria de un Maestro: Ángel Santos Ruiz», en el que esta Corporación, que rinde culto a su historia, quiere homenajear a uno de sus más destacados miembros, a la vez que a una de las grandes figuras farmacéuticas del siglo XX.

En la biblioteca se ha proseguido con la labor de catalogación en el sistema ARSYS de los fondos de libros, superando las 120.000 entradas.

Durante el presente año se han gestionado 600 consultas directas en la biblioteca.

Los fondos de ésta se han enriquecido con donaciones que se agradecen específicamente. Son especialmente mencionables las producidas por los Académicos Doctores Abelló Gallo, Domínguez Carmona, Cabezas Fernández del Campo y Fernández Braña.

Hay que destacar la adquisición de un sistema CITRIX que transforma nuestra biblioteca en una biblioteca virtual programada, con un servidor central y seis puestos de trabajo, situados en el salón de lectura, que permiten la consulta de nuestros fondos, la conexión a Internet y el trabajar con todos los programas del Servidor Central.

Se ha negociado un convenio entre la Universidad Complutense, Biblioteca General —Biblioteca de la Facultad de Farmacia y la RANF— Biblioteca, para que nuestra biblioteca tenga acceso a los fondos totales de la UCM.

Desde el sabor de los siglos pasados en sus estantes, nuestra biblioteca entra en este siglo XXI, siglo de la información al servicio de todos.

En el año 2006, nuestra página web ha alcanzado por primera vez los dos millones de visitas, contando actualmente con 661 artículos y libros para descarga directa en pdf, 76 sesiones íntegras multimedia en vídeo diferido con diapositivas interactivas, todo ello indizado por título, autor y materia, además de una actualizada y completa información de esta Corporación, la indización de los Anales desde 1932 y el catálogo de todos nuestros fondos bibliográficos.

Durante el año 2006 se han producido elecciones en los cargos de Presidente, Bibliotecario y Presidentes de las seis Secciones, siendo elegida para el cargo de Presidente de esta Corporación, la Excm. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, a la que hoy recibimos como nueva Presidenta, a la vez que despedimos al hasta ahora Presidente, el Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada. De verdad que ha sido un gran honor para este Académico Secretario, el haber hecho un equipo sin quiebra, con este honesto y eficaz burgalés.

Para el cargo de Presidente de la Sección 2.<sup>a</sup> fue elegido el Excmo. Señor Don Juan Ramón Lacadena Calero, y de la 3.<sup>a</sup>, el Excmo. Señor Don José Luis Vila Jato, mientras que renuevan en su cargo de Bibliotecario el Excmo. Señor Don Antonio Martínez Fernández, y los Excmos. Señores Don Antonio Monge Vega, Don Ángel Villar del Fresno, Don Bernabé Sanz Pérez y Don Román de Vicente Jordana, como Presidentes de las Secciones 1.<sup>a</sup>, 4.<sup>a</sup>, 5.<sup>a</sup> y 6.<sup>a</sup>, respectivamente.

Durante el año se produjo la elección de dos nuevos Académicos de Número, en las personas de los Excmos. Señores: Don Víctor Ji-

ménez Torres y Don César Nombela Cano, a los que felicitamos expresamente.

Organizaciones científicas y profesionales han enriquecido nuestras actividades, con su presencia en nuestra Institución, donde tienen abiertas nuestras puertas. Así, se ha celebrado una Sesión de la Asamblea Amistosa Literaria (fundada por Jorge Juan) y presidida por el Excmo. Señor Don Guillermo Perinat y Escrivá de Romaní, Conde de Casal; se entregaron los Premios AEFLA en su XXV Edición y se han impartido cursos de la AEFI. Es de destacar la presentación en nuestra Sede del proyecto Dioscórides de la Universidad de Salamanca, patrocinado por Caja Duero, con las intervenciones del Coordinador de la obra, Director del Centro Tecnológico Multimedia de la Universidad y Catedrático de Fisiología y Farmacología, Alejandro Esteller; del Director de la Real Academia Española, Excmo. Señor Don Víctor García de la Concha, del Presidente de Caja Duero, Don Julio Feroso y del Rector de la Universidad de Salamanca, Excmo. y Magfco. Señor Don Enrique Battaner Arias; contando con la presencia en el estrado del Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Excmo. Señor Don Alberto Galindo Tixaire.

A nivel personal, destaca la concesión de la Encomienda con placa de la Orden Civil de Alfonso X el Sabio al Excmo. Señor Don Salvador Rivas Martínez, la Medalla de Honor de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), a la Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, Cruz de las Palmas Académicas de la Academia Mundial de Ciencias, Tecnología, Educación y Humanidades de Valencia al Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas y Medallas de Honor de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense al Excmo. Señor Don Antonio Doadrio López, a la Excma. Señora Doña M.<sup>a</sup> Carmen Francés Causapé y a la Ilma. Señora Doña Carmen de la Rosa Jorge, y Medalla de Oro de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense a la Excma. Señora Doctora Doña Ana Pascual Leone-Pascual.

Nombramientos o ingresos en su caso, de Académico de Honor de la Academia de Farmacia de Galicia y de la Academia de Farmacia y Bioquímica de Argentina al Excmo. Señor Don Juan Manuel Reol Tejada; de Académico de Número de la Real Academia de Doctores, medalla número 50, al Excmo. Señor Don Albino García Sa-

cristán; de Académica Correspondiente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña a la Excma. Señora Doña Ana Pascual-Leone Pascual; de Académica Correspondiente de la Academia Nacional de Medicina de México, a la Excma. Señora Doña María Cascales Angosto; de Profesor Honorario de la Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú, al Excmo. Señor Don Juan Ramón Lacadena; de Académico de la Academia Rusa de Ciencias Ambientales (Rama Armenia), al Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas; de Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia y de Académico de Número de la Real Academia de Medicina de Salamanca al Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, y del Ilmo. Señor Don José Luis Lastres García como miembro correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia.

El Profesor Doctor Don Eugenio Sellés, Académico de Número, fue elegido Vicepresidente de la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino, y la Doctora Flora de Pablo Dávila, Académica Correspondiente, ha sido designada Coordinadora de Programas del Comité Científico asesor de la Fundación Alicia Koplowitz.

Vaya para todos ellos nuestra más calurosa felicitación por las distinciones que les han sido concedidas.

En el capítulo de obras hemos remodelado el Aula Santos Ruiz, ampliándola y actualizándola, inaugurándola en diciembre pasado, a falta del mobiliario. Con esta obra hemos querido poner a disposición del público un aula de coloquios moderna, con el último equipamiento informático, para dar respuesta a los retos actuales en presentaciones audiovisuales y con vistas al II Encuentro de la Asociación Internacional de Academias de Farmacia, que se celebrará en nuestra sede el próximo mes de junio, y cuyo comité organizador ya está constituido y trabajando para que esa reunión sea un éxito. Ya se ha elaborado un programa provisional, y se ha contactado con los Presidentes de las Academias de Farmacia de la Asociación para que realicen sus propuestas. Hoy mismo hemos tenido una reunión de trabajo con los Presidentes de las Academias de Farmacia Españolas de la Asociación, que hoy nos hacen el honor de acompañarnos en este acto.

Por último, no podemos dejar de hacer constar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación y Ciencia por las subvenciones

concedidas en el Curso 2006, que nos han permitido acometer las actividades programadas. También deseamos expresar nuestro agradecimiento a todos los patrocinadores del Concurso Científico, y a los Patronos y miembros de la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, que contribuyen a la actividad científica de nuestra Corporación, y a nuestro Académico de Número Excmo. Señor Don Juan Abelló Gallo, por su continuado patronazgo.

Una vez más, esta Real Academia Nacional de Farmacia ha comparecido para dar cuenta pública de sus actividades, de las que yo, el Secretario, doy fe.

Muchas gracias por su atención.

Madrid, 18 de enero de 2007.

*El Académico Secretario,*  
ANTONIO DOADRIO VILLAREJO



## **Concurso Científico. Relación de Premiados 2006**

### **PREMIO DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA**

Carmen Álvarez Escolá, María Ángeles Martín Arribas y Elisa Fernández Millán.

Por su trabajo titulado: *«Efecto de la subnutrición materna sobre el desarrollo, crecimiento y funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas en el feto: Implicación del sistema de IGFs».*

### **PREMIO DEL CONSEJO GENERAL DE COLEGIOS OFICIALES DE FARMACÉUTICOS**

Ruth M. Risueño y Balbino Alarcón.

Por su trabajo titulado: *«Los ligandos fuertes inducen un cambio conformacional en el TCR tanto en células T maduras como en timocitos».*

### **PREMIO DEL COLEGIO OFICIAL DE FARMACÉUTICOS DE MADRID**

Mario García García, S. Martín-Santamaría y B. de Pascual-Teresa.

Por su trabajo titulado: *«¿Son los moduladores positivos de adre-nomedulina nuevos inhibidores de metaloproteasas de la matriz?».*

### **PREMIO ALCALÍBER**

Gerardo López Rodas y Juan Sandoval del Amor.

Por su trabajo titulado: *«Mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica en la pancreatitis necrótica aguda. Papel del potencial agente terapéutico pentoxifilina».*

### **PREMIO CINFA**

Meritxell Nus, Francisco José Sánchez Muniz y José María Sánchez Montero.

Por su trabajo titulado: «*Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular*».

### **PREMIO FAES PHARMA**

Patricia García Hernández.

Por su trabajo titulado: «*Anisakis simplex: Actividad de los productos larvarios sobre el sistema del complemento*».

### **PREMIO MABO**

Doña María Auxiliadora Dea Ayuela.

Por su trabajo titulado: «*Contribución de la proteómica en la identificación de nuevas dianas para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la leishmaniosis visceral*».

### **PREMIO NORMON**

Mirandeli Bautista Ávila, María Ángeles Gómez del Río, Irene Iglesias Peinado, Juana Benedí González, María Isabel Sánchez-Reus.

Por su trabajo titulado: «*Efectos de fármacos encapsulados en liposomas sobre los macrófagos*».

### **PREMIO JUAN ABELLÓ**

Erceg Slaven.

Por su trabajo titulado: «*Papel de la vía glutamato-óxido nítrico-GMP cíclico en la modulación del aprendizaje. Aplicaciones terapéuti-*

*cas de los inhibidores de fosfodiesterasas: Sildenafil y Zaprinast en hiperamonemia y fallo hepático».*

### **PREMIO CARLOS DEL CASTILLO LEIVA**

Rafael Lozano Fernández, María del Carmen Lozano Estevan y Fernando de Jesús Franco.

Por su trabajo titulado: «*Nuevos métodos para el estudio cinético del polimorfismo de la Prednisolona mediante calorimetría diferencial de barrido*».

### **PREMIO SANTOS RUIZ**

Rodrigo Díaz Viciedo.

Por su trabajo titulado: «*Farmacología de Terpenoides de Helianthus annuus L.*».



## Sesiones Científicas

### 11 de enero

A las 19 horas, Mesa Redonda dedicada a los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química. Coordinador: Excmo. Señor Don Juan-Ramón Lacadena Calero, Académico de Número: «La importancia del ARN en la Genética: un comentario a los Premios Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química». Ponentes: Excmo. Señor Don Mariano Esteban Rodríguez, Académico de Número: «ARN interferente, del descubrimiento a sus aplicaciones», y Doctor Don Rafael Giraldo Suárez, Científico Titular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid: «Roger Kornberg y la RNA pol: los misterios de la maquinaria macromolecular que sintetiza el ácido ribonucleico desvelados al medio siglo de Severo Ochoa y su polinucleótido fosforilasa».

### 18 de enero

A las 19 horas se celebró en nuestra Sede la Sesión Solemne de Inauguración del Curso Académico 2007 de la Real Academia Nacional de Farmacia. El Acto comenzó con la toma de posesión de la Excm. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, como nueva Presidenta de la Corporación, después de que el Presidente saliente Excmo. Señor Juan Manuel Rol Tejada, le hiciese entrega de los Estatutos y se procediese a la cesión del cargo. En la Presidencia del Acto estuvieron presentes el Presidente del Instituto de España, los Presidentes de las Reales Academias de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y de la de Jurisprudencia y Legislación, el Subsecretario de Estado del Ministerio de Educación y Ciencia y el Rector Magnífico de la Universidad Complutense. El discurso inaugural estuvo a cargo del Excmo. Señor Don Juan Tamargo Menéndez, que versó sobre: «El desarrollo de fármacos. A propósito de la insuficiencia cardíaca: Luces, sombras, reflexiones y perspectivas».

**25 de enero**

A las 19 horas, conferencia del Doctor Jorge Alvar, Medical Officer (Leishmaniasis Control) Control of Neglected Tropical Diseases (WHO/CDS/NTD/IDM) Communicable Diseases Cluster World Health Organization, titulada: «Los Programas de la OMS para el Control de la Leishmaniosis en el Viejo Mundo».

**1 de febrero**

A las 19 horas, toma de Posesión como Académico Correspondiente del Profesor Don Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Director del Departamento de Toxicología y Farmacología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, quien pronunció su conferencia titulada: «Nuevos horizontes en la evaluación de la toxicidad de fármacos y otros agentes químicos». La presentación corrió a cargo del Académico de Número, Excmo. Señor Don Ángel María Villar del Fresno.

**8 de febrero**

A las 19 horas, conferencia de la Doctora Doña Margarita Lorenzo Balado, Académica Correspondiente, titulada: «Obesidad, inflamación y resistencia a la insulina».

**15 de febrero**

Sesión Necrológica en homenaje al Excmo. Señor Don Emilio Fernández-Galiano Fernández. Con la intervención de los Excmos. Señores: Don Jesús Izco Sevillano, Académico Correspondiente: «Emilio Fernández-Galiano, Botánico»; Don Gonzálo Giménez Martín, Académico de Número: «Emilio Fernández-Galiano, Investigador del CSIC»; Don Juan Ramón Lacadena Calero, Académico de Número: «Emilio Fernández-Galiano, Profesor Universitario», y Don Juan Manuel Reol Tejada, Académico de Número: «Emilio Fernández-Galiano, Académico».

**22 de febrero**

A las 19 horas, conferencia del Doctor Don Carlos Eduardo Calvo Monfil, Académico Correspondiente en Chile, titulada: «PPAR, una nueva diana terapéutica en el manejo del Síndrome Metabólico, Diabetes tipo 2 y Aterosclerosis».

**1 de marzo**

A las 19 horas tomó posesión de su plaza de Académico de Número, el Excmo. Señor Don N. Víctor Jiménez Torres, con la lectura de su discurso reglamentario: «Bases Posológicas en Oncología». Le contestó, en nombre de la Corporación, el Excmo. Señor Don José Luis Vila Jato.

**8 de marzo**

A las 19 horas, acto de la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. Mesa Redonda titulada: «Los aspectos nuevos en la ley de garantías y uso racional del medicamento». Intervienen: Doña M.<sup>a</sup> Teresa Pagés, Directora General de Farmacia, y Don Antoni Esteve, Presidente de Farmaindustria.

**15 de marzo**

A las 19 horas tomó posesión de su plaza de Académico Correspondiente el Doctor Herbert Zimmermann, quien disertó sobre: «Ectonucleotidasas, molecular properties and functional impact». Le presentó la Excmo. Señora Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal.

**22 de marzo**

A las 19 horas, Sesión Anual sobre novedades Farmacológico-Terapéuticas, organizada por la Sección 4.<sup>a</sup>, titulada: «Perspectivas de la Farmacología y Terapéutica de la ICC». Moderador: Profesor

Doctor Ángel M.<sup>a</sup> Villar del Fresno, Académico de Número. Ponentes: Profesor Doctor Juan Tamargo Menéndez, Académico de Número, y Profesor Doctor Esteban López de Sá y Areses, Jefe de la Unidad Coronaria en el Hospital Universitario «La Paz».

## **29 de marzo**

A las 19 horas, conferencia a cargo del Excmo. Señor Don Manuel Domínguez Carmona, Académico de Número: «La problemática de la celiaquía».

## Noticias

El 24 de enero se presentó en nuestra Real Academia el libro «Seguimiento Farmacoterapéutico: Casos Prácticos». Este libro ha sido impulsado por Correo Farmacéutico, coordinado por el grupo de investigación en atención farmacéutica de la Universidad de Granada y editado por Merck Sharp & Dohme de España. En la mesa redonda de presentación de dicho libro actuó como moderador Don José Martínez Olmos, Secretario General de Sanidad, Ministerio de Sanidad y Consumo, actuando como ponente Doña M.<sup>a</sup> José Faus Dader, responsable del Programa Dader de Atención Farmacéutica. También actuaron como participantes Doña Regina Revilla Pedreira, Directora de Relaciones Institucionales de MSD; Don Francisco J. Fernández Rodríguez, Director de Correo Farmacéutico; Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, y Doña Carmen Peña López, Secretaria General del Consejo General de Colegios Farmacéuticos.

\* \* \*

El Profesor Doctor Juan Tamargo, Académico de Número, ha sido galardonado con el Premio Lilly de Investigación.

\* \* \*

El 1 de marzo ha sido elegida nueva Vicepresidenta de nuestra Corporación, la Excm. Señora Doña Ana Pascual-Leone Pascual.

\* \* \*

El 8 de marzo, a las 17 horas, en nuestra Sede, le fue impuesta la Medalla del Trabajo en su categoría de plata, a la Doctora Consuelo Boticario Boticario, Académica Correspondiente, por la Subsecretaria del Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Aurora Domínguez, en un acto presidido por la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excm. Señora Doña M.<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal.

\* \* \*

El 21 de marzo, a las 19 horas, en nuestra Sede, ingresó como Académico de Número de la Real Academia de Doctores, el Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, con la lectura de su discurso de ingreso: «Biotecnología farmacéutica: desafíos para el siglo XXI». Fue contestado por el Excmo. Señor Don Julio Rodríguez Villanueva.

\* \* \*

El miércoles día 21 de marzo, a las 19 horas, en la Biblioteca Nacional dentro del ciclo: «Las mujeres también investigan», el anterior director de la FECYT, Joan Comella, Catedrático de Biología Celular en el Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de Lleida, entrevistó a María Teresa Miras, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

\* \* \*

El Doctor Mariano Esteban, Académico de Número, ha sido elegido Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia.

\* \* \*

La Real Academia Nacional de Farmacia va a promover un ciclo de tertulias sobre Cambio Climático a partir del 19 de abril.

## **El Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé recibe una importante distinción internacional**

La *Internacional Pharmaceutical Federation*, que conocemos como FIP, a propuesta del *Board of Pharmaceutical Sciences* (BPS) ha hecho pública la resolución de los premios (*Research Achievement Awards, 2007*) que reconocen la trayectoria investigadora y profesional de farmacéuticos en todo el mundo. Las convocatorias se realizan cada cuatro años, coincidiendo con la celebración del *Pharmaceutical Sciences World Congress*. En la presente convocatoria uno de los premiados es el Excmo. Señor Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y Catedrático de Farmacia y Tecnología Farmacéutica en la Universidad de Salamanca. La Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG) propuso al Doctor Domínguez-Gil como candidato el pasado mes de octubre. De acuerdo con las bases de la convocatoria, la documentación se debía acompañar de un apoyo explícito de dos sociedades científicas o profesionales. En el caso del Profesor Domínguez-Gil la solicitud fue acompañada de cartas de la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia y del Presidente de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Los premios serán entregados en Ámsterdam el próximo día 22 de abril durante la ceremonia inaugural del Congreso. La concesión de este premio está teniendo gran repercusión en los medios profesionales debido a que, por primera vez, se premia a un farmacéutico español. El premio reconoce especialmente el trabajo realizado por el equipo de trabajo que dirige el Doctor Domínguez-Gil en el campo de la Farmacocinética Clínica, que ha convertido al Hospital Universitario de Salamanca en centro de referencia en nuestro país.

## NORMAS PARA LA PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

### A. Política Editorial

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* es una revista trimestral que publica trabajos de investigación básica o aplicada relacionados con las ciencias farmacéuticas y afines.

2. Serán aceptados y considerados para publicación, aquellos manuscritos que no hayan sido publicados previamente (excepto resúmenes), que actualmente no estén siendo revisados en otras revistas, que su publicación haya sido aprobada por todos los autores y tácitamente o explícitamente por las autoridades responsables de los laboratorios donde se ha desarrollado el trabajo, y que si es aceptado, no será publicado en otra revista en la misma forma, en el mismo o diferente idioma, sin el consentimiento de los Editores.

3. El manuscrito original, una copia y la versión electrónica en CD, se enviará, con la correspondiente carta de presentación, a la siguiente dirección:

Doctora María Teresa Miras Portugal  
 Editora de los ANALES DE LA REAL  
 ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA  
 Real Academia Nacional de Farmacia  
 C/ Farmacia, 11  
 28004 Madrid  
 España  
 Fax: 91 531 03 06

Existe la posibilidad de enviar el manuscrito en formato electrónico como archivo adjunto a la siguiente dirección: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com). Tanto el texto como las figuras deberán ser enviadas en archivos separados. Los formatos aceptados son: .doc (Word) para el texto, y formato TIFF, JPG o PPT (Power Point) para las figuras.

4. Tipos de Manuscritos.

La revista considerará para publicar lo siguiente:

— REVISIONES: no deben tener una extensión superior a las 4.000 pala-

bras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas. Aunque la mayor parte de las revisiones serán invitaciones a petición de la Comisión Editorial, los autores interesados en contribuir con revisiones deben contactar previamente con el Editor.

- ARTÍCULOS ORIGINALES: no deben tener una extensión superior a 4.000 palabras (excluyendo resumen, bibliografía y página del título, pero incluyendo la leyenda de las figuras y las tablas) y la bibliografía no debe superar las 40 citas.
- COMUNICACIONES BREVES: artículos breves y definitivos. El manuscrito debe ser identificado como tal en la carta de presentación. La extensión no sobrepasará las 2.500 palabras incluyendo la bibliografía (no más de 10 citas) y con un máximo de tres figuras/tablas.
- CARTAS AL EDITOR: no deben superar las 1.000 palabras de extensión con un máximo de tres citas bibliográficas. Las cartas deben enfocarse en comentar artículos publicados previamente, o tratar diferentes aspectos de Política Educativa, Sanitaria y Ciencias Farmacéuticas.
- INFORMACIÓN ACADÉMICA: esta sección dará cuenta de las sesiones científicas, cursos, reseñas de libros, novedades editoriales y otros eventos que la revista considere de interés para los lectores.

### B. Organización de los manuscritos

Todos los elementos o partes del manuscrito deben ir a doble espacio, todas las páginas numeradas en la esquina superior derecha empezando en la página de la portada. Los manuscritos referentes a artículos originales deberán

contener, en este orden, los siguientes apartados:

## 1. PORTADA

### Título

Debe ir tanto en español como en inglés. Tendrá una extensión inferior a los 100 caracteres, excluyendo los espacios entre palabras.

### Nombre de los autores

El nombre completo de todos los autores y su afiliación institucional. En los trabajos que tengan más de un autor y más de una Institución, indicar la afiliación individual mediante números en superíndices.

### Palabras Clave

Cinco palabras clave (en español y en inglés) que no aparezcan en el título.

### Información de contacto

Nombre, dirección postal, número de teléfono, fax y dirección de correo electrónico del autor al que se enviarán las galeradas.

### Lista de Abreviaturas

Las abreviaturas y su significado deben incluirse en una lista en el mismo orden en el que se mencionan en el artículo.

## 2. PÁGINA DEL RESUMEN

Incluirá el resumen del artículo en español y en inglés. Deberá escribirse como texto continuo y se organizará del siguiente modo: una pequeña introducción donde se expliquen los antecedentes y los objetivos del trabajo, principales resultados y, finalmente, las conclusiones. Su extensión no debe superar las 250 palabras.

## 3. SECCIONES DEL MANUSCRITO

### • INTRODUCCIÓN

Exponer información principal y antecedentes del tema que puedan orientar al lector.

### • MATERIAL Y MÉTODOS (PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES)

En esta sección se explicarán los métodos experimentales empleados en el trabajo con un nivel de detalle suficiente que permita a otros investigadores repetir el trabajo; para aquellos métodos empleados sin modificaciones significativas respecto al método original, la citación del trabajo original será suficiente.

#### Experimentación en humanos

En aquellos trabajos de investigación que requieran de seres humanos, se deberá proporcionar: (a) consentimiento por escrito de cada paciente o sujeto sano; (b) el protocolo del estudio conforme con las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975, reflejado por la aprobación del comité apropiado de revisión de la institución. Se hará referencia a cada paciente mediante números, no mediante iniciales.

#### Experimentación animal

En los estudios en los que se emplee experimentación animal, se asegurará que todos los animales reciben cuidados humanos de acuerdo con los criterios resaltados en «Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio», preparada por la National Academy of Sciences y publicada por National Institutes of Health (NIH publicación 86-23, revisada en 1985).

#### Fabricantes y proveedores

Incluir los nombres y las localidades (ciudad y estado o país) de los fabricantes y proveedores cuando se mencionen fármacos, instrumentación, aparatos, software, etc.

### • RESULTADOS

Se presentarán los principales hallazgos del estudio en forma gráfica cuando sea posible. No ilustrar los pequeños detalles si su información puede ser descrita adecuadamente mediante texto.

## • DISCUSIÓN

En esta sección se presentarán de forma concisa las implicaciones de los nuevos hallazgos en el campo que corresponda, minimizando la reiteración de los resultados, evitando la repetición de información dada en la introducción, y ajustándose al enfoque y objetivo inicial del trabajo.

## • AGRADECIMIENTOS

Se incluirán los agradecimientos al personal de apoyo y a proveedores de reactivos especiales. Las becas y ayudas financieras se deberán incluir en esta sección.

## • BIBLIOGRAFÍA

Las citas bibliográficas tienen que numerarse entre paréntesis en la línea de texto, por ejemplo (7), o (11-13, 17), en el orden de citación en el texto. La bibliografía se incluirá al final del artículo. Sólo se podrán citar como artículos «en prensa» a aquellos de los que se incluye una copia de la carta de aceptación en el envío inicial. Las citas deben incluir el título completo del artículo y citarse en el siguiente formato:

Ejemplos de revistas (1) (2) y libros (3) (4):

- (1) MacKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62-65.
- (2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; McARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B.J. y SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
- (3) LANGER, T. y NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. en: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

- (4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

## • TABLAS

Cada tabla debe ir preparada en hoja individual, a doble espacio y numeradas consecutivamente con números arábigos en el orden en el que aparecen en el texto. No duplicar material que ya haya sido presentado en una figura.

## • LEYENDAS DE FIGURA

Las leyendas deben ir numeradas con números arábigos en el mismo orden en el que aparecen en el texto. El título de la leyenda de la figura no debe aparecer dentro de la propia figura, y debe proporcionarse suficiente información para que la figura sea inteligible sin hacer referencia al texto. Dentro de la leyenda deben ser explicados todas las abreviaturas y símbolos. Las leyendas de figura aparecerán todas de manera consecutiva en hoja aparte.

## • FIGURAS

La revista solicita un juego completo de figuras. En el reverso de cada figura debe ir marcado en lápiz el número de cada figura, su orientación y el nombre del primer autor.

### Blanco y negro

La revista alienta el envío de figuras en blanco y negro. Éstas deben ser impresiones láser de dibujos en blanco y negro y fotografías en brillo de alto contraste de todas las figuras de semitono, por ejemplo, microfotografías, geles, etc.

### Color

Proporcionar impresiones en papel brillante donde los símbolos y texto se aprecien claramente frente al fondo de la figura. El Editor y el Comité Editorial seleccionarán las figuras en color que serán publicadas.

Las figuras en color deben tener un alto contraste, sin fondo coloreado y con la posibilidad de aparecer en blanco y negro en la versión impresa de la revista.

Como se indicó previamente, si el envío del manuscrito se realiza vía e-mail, no es necesario mandar el juego completo de figuras impreso en papel.

### **PERMISOS**

Citaciones directas, tablas o ilustraciones tomadas de material protegido por copyright, deben ir acompañadas del permiso escrito del Editor y el autor original para poder ser utilizadas.

### **REVISIÓN Y PUBLICACIÓN**

Todos los manuscritos enviados para publicación serán revisados por dos evaluadores del área de referencia del trabajo. El Editor elegirá los evaluadores más apropiados para cada manuscrito. El manuscrito que requiera más de una revisión o que en el plazo superior a dos meses no sea remitido a la revista desde la decisión editorial inicial, se considerará como un nuevo envío.

La revista no realiza cargos por página. Una vez que el trabajo ha sido publicado, se envían 25 copias impresas del mismo al autor. También se proporcionará la versión en PDF del artículo.

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

### A. Editorial Policy

1. *ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA* is a quarterly journal that publishes basic and applied research on pharmaceutical sciences and related areas.

2. A manuscript is accepted for consideration for publication with the understanding that it has not been published elsewhere (except in abstract form), that it is not concurrently under review elsewhere, that its publication has been approved by all the authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and the Publisher.

Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright.

The journal publishes articles written in Spanish or English.

3. An original, a copy, and the electronic version on CD of the manuscript should be sent with a cover letter to:

María Teresa Miras Portugal PhD.  
Editor, ANALES DE LA REAL  
ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA  
Real Academia Nacional de Farmacia  
C/ Farmacia, 11  
28004 Madrid  
Spain  
Fax: 91 531 03 06

To submit the manuscript electronically as an attachment use the E-mail: [edicion@ranf.com](mailto:edicion@ranf.com). The text and the figures should be submitted in separate files. The accepted formats are: .doc (Word) for the text, and TIFF, JPG or PPT (Power Point) for figures.

### 4. Types of Manuscript.

The journal will consider and publish the following:

- **REVIEWS:** should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, references, title page but including legends to figures and tables) and the reference list need not be exhaustive (no more than 40). While most reviews are invited by the Editors, authors interested in contributing reviews are requested to first contact the Editor.
- **ORIGINAL ARTICLES:** should be no longer than 4,000 words (excluding abstract, title page, and references, but including legends to figures and tables), and include no more than 40 references.
- **RAPID COMMUNICATIONS:** brief, definitive reports. The manuscript should be identified as such in the cover letter. The length should no longer than 2,500 words including references (no more than 10) and with a maximum of three figures/tables.
- **LETTERS TO THE EDITOR:** should be no longer than 1,000 words and include no more than three bibliographic references. Letters should focus on commenting or enlarge previous published articles, or deal with some aspects of educational or sanitary policy and pharmaceutical sciences.
- **ACADEMIC INFORMATION:** this section will inform about different courses, scientific sessions and others events that the journal deem appropriate.

### B. Manuscript Organization

All elements of a manuscript should be double-spaced, and all pages must be numbered in the upper right corner, starting with the title page. Manuscripts describing original research should contain, in this order, the following elements:

## 1. TITLE PAGE

### Title

It must be in Spanish and in English. No more than 100 characters, not including spaces between words.

### Author Names

The full names of all authors and their institutional affiliation. In a multi-authored work involving more than a single institution, indicate individual affiliation by means of a superscript Arabic number.

### Keywords

Five keywords (in Spanish and in English) that do not appear in the title itself.

### Contact Information

Name, address, telephone number, fax number, and e-mail address for author to whom proofs should be sent.

### List of Abbreviations

Include the expansions and list in the order of their mention in the paper.

## 2. ABSTRACT PAGE

Should contain the summary in both Spanish and English. Write as continuous text organized as background and rationale for the study, main results, and conclusions. Do not exceed 250 words.

## 3. MANUSCRIPT SECTION

### • INTRODUCTION

Provide the minimum background information that will orient the general reader.

### • MATERIAL AND METHODS (EXPERIMENTAL PROCEDURES)

Provide a level of detail such that another investigator could repeat the work; for methods that are used without significant modification,

citation of the original work will suffice.

### Human Subjects

For reports of research using human subjects, provide assurance that (a) informed consent in writing was obtained from each patient and (b) the study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the appropriate institutional review committee. Refer to individual patients by number, not by initials.

### Animal Experimentation

In studies involving animal experimentation, provide assurance that all animals received humane care according to the criteria outlined in the «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985).

### Manufacturers

Include the names and locations (city and state or country) of manufacturers when mentioning proprietary drugs, tools, instruments, software, etc.

### • RESULTS

Present the major findings of the study in graphic form if practicable. Do not illustrate minor details if their message is conveyed adequately by simple descriptive text. Mention all tables and figures.

### • DISCUSSION

In the discussion, concisely present the implications of the new findings for the field as a whole, minimizing reiteration of the results, avoiding repetition of material in the introduction, and keeping a close focus on the specific topic of the paper.

• **ACKNOWLEDGMENT**

Acknowledge personal assistance and providers of special reagents. Grant and other financial support should be listed in this section.

• **REFERENCES**

These should be numbered in parentheses on the line, e.g. (7), or (11-13,17), in order of citation in the text. The list of references will be printed at the end of the paper. Articles may only be cited as «in press» if a copy of the acceptance notice is supplied at the time of submission. References should include the title of the article and be cited as follows:

Examples of journals (1) (2) and books (3) (4):

- (1) MacKINNON, R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62-65.
- (2) NIXON, J. E.; WANG, A.; MORRISON, H. G.; McARTHUR, A. G.; SOGIN, M. L.; LOFTUS, B. J. & SAMUELSON, J. (2002) A splicesomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 422-431.
- (3) LANGER, T. & NEUPERT, W. (1994) Chaperoning mitochondrial biogenesis. in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C., Eds.), pp. 53-83. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- (4) FELDMANN, H. (2004) Forty years of FEBS. Blackwell Publishing Ltd. Oxford.

• **TABLES**

Prepare tables on individual sheets of paper, double-spaced, and numbered consecutively with Arabic numerals in the order of their appearance in the text. Do not duplicate material presented in a figure.

• **FIGURE LEGENDS**

Number with Arabic numerals in the order mentioned in the text. Provide a title (this should not appear on the figure itself) and sufficient explanation to render the figure intelligible without reference to the text. Explain all abbreviations and symbols. Type figure legends consecutively on a separate sheet of paper.

• **FIGURES**

The Journal requires *one* set of figures. Mark the back of each figure in pencil with the figure number, its orientation, and the name of the first author.

**Black and White**

B/W figures are encouraged. Provide clean laser prints of black and white drawings and high-contrast glossy 18-cm-wide photographs of all halftone figures, e.g., photomicrographs, gels, etc.

**Colour**

Provide glossy prints in which lettering and symbols are clearly visible against the background. The Editor and the Editorial Committee will select the colour figures to be published.

As for the printed figures they should be contrasted, without colour background, and with possibility to appear in black and white in the printed version.

As indicated, if submission is carried out via e-mail, no printed figures are required.

**PERMISSIONS**

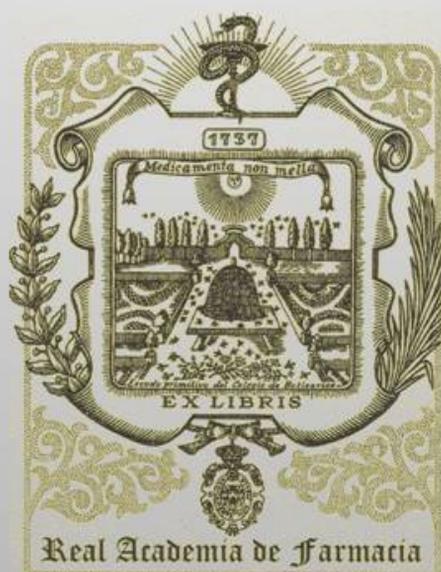
Direct quotations, tables, or illustrations taken from copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the publisher and the original author.

**PEER REVIEW AND PUBLISHING**

The Journal uses anonymous peer review in evaluating manuscripts for publication. The Editor will choose the appropriate reviewers for each manuscript. A manuscript requiring more than a single revision or returned

beyond 2 months of the date of the initial decision will be considered a new submission.

There are no page charges. Twenty-five offprints are provided free of charge to the corresponding author of each accepted article. The article in PDF version is also provided.



MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
POLÍTICA SOCIAL Y DEPORTE

[www.ranf.com](http://www.ranf.com)

ISSN 1697-4271