ANALES
DE LA
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA



75 ANIVERSARIO
1932 - 2007

2007

VOLUMEN LXXIII Núm. 4 Publicación trimestral

Domicilio de la Academia
FARMACIA, 11 • 28004 MADRID

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 813-832

Revisión

Nuevos aspectos biofarmacéuticos en nanotecnología farmacéutica

Recibido el 17 de septiembre de 2007

JOSÉ LUIS VILA JATO*
Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia
Presidente de la Sección de Tecnología Farmacéutica

RESUMEN

Para hacer frente al reto de la Nanomedicina, la Tecnología Farmacéutica ha desarrollado sistemas nanométricos que contienen el principio activo incluido en un vehículo que lo transporta. Como sistemas nanométricos permiten que el fármaco que llevan pueda atravesar las diferentes barreras biológicas del organismo lo cual no se podía realizar con los sistemas de liberación convencionales ya que en éstos son fundamentalmente las propiedades fisicoquímicas del principio activo las que condicionan su absorción y biodistribución.

La Nanotecnología Farmacéutica, término que paulatinamente se va introduciendo en prestigiosas publicaciones como el Journal of Pharmaceutical Sciences, como ciencia y tecnología de los sistemas farmacéuticos nanoparticulares presenta además de una fuerte base fisicoquímica, un mayor componente biológico ya que en ella intervienen nuevos aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos.

La internalización o paso de los nanosistemas al interior celular es un proceso cuyo conocimiento es cada vez mas imprescindible, resaltándose algunos de los aspectos mas novedosos como el papel de los llamados péptidos fusógenos. Igualmente tiene cada vez mas relevancia el conocimiento de los procesos que protejen al fármaco de su degradación en los endolisosomas (por ejemplo el efecto esponja de protones de las polietileniminas y los factores que controlan la rápida liberación del nanosistema de los endolisosomas (vectores lisosomotrópicos); con vistas a la utilización de fármacos cuya diana se encuentra en el interior del núcleo celular, interesa destacar el transporte activo por medio del complejo poro nuclear.

Finalmente se expone el papel de los llamados excipientes funcionales, los cuales han hecho cambiar el concepto clásico de un excipiente farmacéutico, ya que

* e-mail: vilajato@vilajato.e.telefonica.net

cada vez existen mayores evidencias de que polímeros como poloxamer, poloxaminas y polietielinglicoles pueden modificar señales de trasducción intracelular e incrementar la eficacia de ciertos principios activos.

Palabras clave: Nanotecnología Farmacéutica; Nanovehículos; Aspectos biofarmacéuticos.

ABSTRACT

New biopharmaceutical aspects in pharmaceutical nanotechnology.

The use of various pharmaceutical nanocarriers has become one of the most important areas of Nanomedicine. Ideally, such carriers should be specifically deliver the drug to the pathological area to provide the maximum therapeutic efficacy. The concept of «magic bullets» given by Ehrlich has now emerged in the form of targeted drug delivery systems and polymeric nanopartyicles, liposomes, micelles, dendrimers and polymer-drug conjugates are the vanguards of this ever-evolving field. The specific targeting ligands which guide the drug carriers to the molecular targets be it on cell surface or nulear membranes implies new biopharmaceutical aspects such us a better understanding of the physiological barriers, half-life of the nanosystems in the blood stream, the presence of receptors on cell membranes, the different mechanisms of internalization of nanostructures, intracelular trafficking and interactions.

It is conceivable, that dispite all the formidable challenges, interplay of different disciplines ranging from engineering to biology will make a new promissing field in Pharmaceutical Technology: the Pharmaceutical Nanotechnology.

Key words: Pharmaceutical Nanotechnology; Biopharmaceutics; Nanocarriers.

La Farmacia Galénica debe tener como objetivo la resolución de un problema farmacoterapéutico aplicando los conocimientos aportados por la Tecnologia Farmacéutica y la Biofarmacia. El creciente número de moléculas procedentes de la Biotecnología ha supuesto una profunda transformación en la Tecnología Farmacéutica ya que ello supone la necesidad de disponer de nuevas formas de dosificación para estas moléculas las cuales presentan un crecimiento importante ya que si en el año 2000 constituían el 25% de los medicamentos presentados ante la EMEA actualmente representan el 50%.

Las características que poseen los productos biotecnológicos limitan frecuentemente su utilización terapéutica ya que en muchos

casos se requiere una administración i.v.; por su naturaleza presentan una baja biodistribución y un elevado aclaramiento y, por otra parte, un gran número de estas nuevas moléculas necesitan una vectorización u orientación selectiva que les permita alcanzar sus dianas en compartimentos de difícil acceso como puede ser el interior de la célula. A pesar de ello, y dado que en muchos casos presentan una elevada actividad intrínseca, se considera suficiente la llegada al órgano diana de cantidades del orden del 10% de la dosis administrada.

El arsenal terapéutico disponible en la actualidad comprende fármacos de muy variada complejidad, desde las moléculas sencillas hasta las complejas macromoléculas como proteínas o derivados del ADN, para las que es necesaria una orientación selectiva hacia sus dianas terapéuticas en las que conseguir niveles terapéuticos relevantes. De forma esquemática, y tal como se recoge en la Figura 1, las formulaciones vectorizadas permitirían obviar las diferentes barreras con las que se encuentra un fármaco para alcanzar su diana terapéutica.

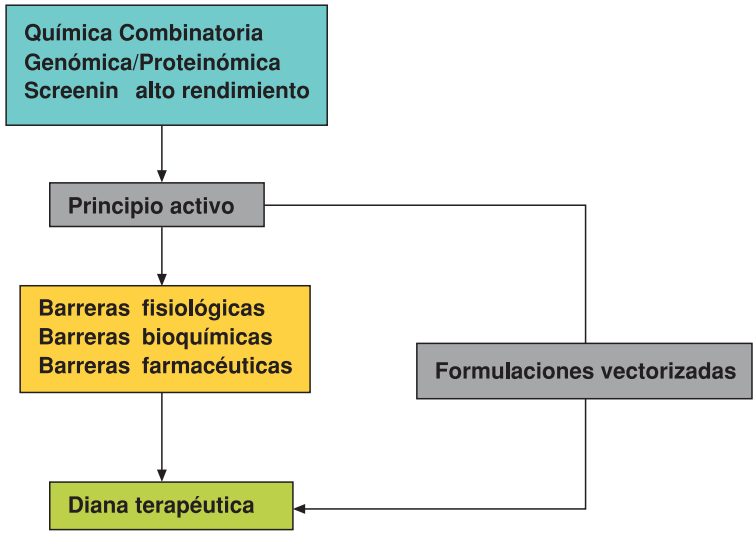


FIGURA 1. ***Esquema de la vectorización de fármacos y papel que representan los nanosistemas*** *para obviar las barreras fisiológicas (epitelios y membranas celular y nuclear), bioquímicas (inactivación enzimática) y farmacéuticas (inestabilidad física y química).*

En los últimos años ha tenido lugar un creciente interés, apoyado en un espectacular crecimiento, de las nanotecnologías y existe un gran optimismo, en mi opinión exagerado en ocasiones como el llegar a fijar el año 2015 como fecha para la curación del cáncer, pero lo que si es indudable es que la aplicación de la nanotecnología a las ciencias biomédicas supone unas mejores oportunidades de diagnóstico y unas terapéuticas más efectivas lo que ha llevado a acuñar el término de Nanomedicina cuya misión, según la Plataforma Española de Nanomedicina, seria el desarrollo de aquellas prácticas médicas, incluyendo la prevención, el diagnóstico y la terapia que requieren tecnologías basadas en interacciones entre el cuerpo humano y materiales, estructuras o dispositivos cuyas propiedades se definen a escala nanométrica.

El Instituto Nacional del Cáncer de EEUU comenzó en el año 2005 el Plan Nanotecnológico del Cáncer (Figura 2), cuya duración es de 10 años y con el que se pretende un cambio radical en los métodos de tratamiento, diagnóstico y prevención del cáncer. Para ello desarrolla programas con la finalidad de producir entidades multifuncionales, a escala nanométrica, que puedan diagnosticar, liberar agentes terapéuticos y permitir la monitorización en el progreso de los tratamientos oncológicos.

Igualmente la Plataforma Europea de Nanomedicina, dependiente de la Fundación Europea para la Ciencia, ha publicado en no-



Figura 2. ***Portada del Plan Nanotecnológico del Cáncer*** *(US National Cancer Institute 2005).*

viembre de 2006 la Agenda Estratégica de investigación en Nanomedicina en la que se incluyen las prioridades, para los próximos años, en diagnóstico, vectorización de fármacos y medicina regenerativa, señalando que, en la liberación de fármacos, las actividades deben iniciarse en los siguientes campos: trastornos cardiovasculares, cáncer, trastornos inflamatorios y musculoesqueléticos, trastornos neurodegenerativos, diabetes y enfermedades infecciosas.

El Instituto Nacional de la Salud de EEUU estima que para el año 2010 más del 50% de los avances en las ciencias biomédicas corresponderán al sector nanotecnológico basándose en las siguientes previsiones:

➤ Desde el punto de vista de la industria farmacéutica alcanzar una eficiente liberación del fármaco se considera como una característica esencial del producto y principalmente para las nuevas moléculas biotecnológicas en las que complejas barreras limitan su éxito clínico. Incluso, para los fármacos ya existentes, la industria farmacéutica busca nuevas formulaciones que aumenten el ciclo vital del fármaco mediante unas mejores características o nuevas indicaciones con respecto a las existentes. Esta estrategia de bajo riesgo/alta rentabilidad centra el problema en la liberación del fármaco ya que los riesgos inherentes a su utilización son conocidos.

➤ Estudios farmacoeconómicos realizados en ensayos clínicos oncológicos revelan que las nuevas formulaciones nanotecnológicas de antineoplásicos pueden resultar altamente competitivas frente a las clásicas formulaciones. Por ejemplo, con las formulaciones de doxorubicina en liposomas, el coste global del tratamiento es mas bajo al requerirse una menor frecuencia de administración y ser menores las intervenciones para disminuir los efecto secundarios. En general se espera que el uso de sistemas nanotecnológicos será favorable en aquellos casos en que la vectorización del fármaco es crucial para su eficacia y reducir sus efectos secundarios, aspectos especialmente importantes en la terapéutica oncológica y de las infecciones severas.

➤ Los éxitos alcanzados por las compañías Sequus Pharmaceutical, Liposome Company y Gilead en la aplicación de los liposomas a la clínica han supuesto en el plano tecnológico un profundo conocimiento de la preparación industrial de liposomas convencionales y

estéricamente estabilizados y de su comportamiento in vivo. Ello ha dado lugar a que en la actualidad se encuentren en fase clínica de desarrollo 29 formulaciones de liposomas conteniendo agentes citostáticos, antiinfecciosos y analgésicos. Estas buenas perspectivas se han trasladado también al campo de las nanopartículas poliméricas con la aprobación clínica de una formulación (Abraxane®) y otras que se encuentran en diversas fases de desarrollo clínico y considerar que éstos nanosistemas presentan ventajas frente a los liposomas ya que los polímeros son mas económicos que los lípidos y presentan una mayor versatilidad fundamentalmente en el aspecto multifuncional.

Si nos ceñimos más concretamente a los sistemas de liberación en los que la Nanomedicina ha adquirido o está adquiriendo una mayor relevancia tendríamos que señalar los que se recogen en la Figura 3. Dentro de estos sistemas son los liposomas, nanopartículas, vectores de ADN y dendrímeros los que se encuadran dentro del campo que constituye la nanotecnología farmacéutica y con los que se pretende conseguir las finalidades siguientes:

➤ Proteger al fármaco de su degradación, tanto física como química, aspecto esencial cuando se piensa en la utilización de los nuevos principios activos procedentes del área de la biotecnología.

➤ Incrementar la absorción de fármacos facilitando su difusión a través de los epitelios, aspecto de importancia relevante cuando se trata de buscar alternativas a la administración intravenosa de fármacos.

➤ Modificar las características farmacocinéticas de los fármacos y con ello su perfil de distribución a ciertos tejidos u órganos bien para incrementar su eficacia o disminuir efectos indeseables.

➤ Incrementar la penetración y distribución intracelular que son necesarios cuando la diana sobre la que va actuar el fármaco se encuentra en el interior de la célula.

➤ Mejorar las técnicas de imagen y diagnóstico in vivo.

Para hacer frente al reto de la Nanomedicina, la Tecnología Farmacéutica ha desarrollado sistemas nanométricos que contienen el principio activo, incluido en un vehículo o conjugado con un políme-



FIGURA 3. ***Nanosistemas que actualmente presentan mayor relevancia en el campo de la Nanomedicina.***

ro, que lo transporta a través de las diferentes barreras biológicas del organismo lo cual no se podría realizar con los convencionales sistemas de liberación ya que en éstos son fundamentalmente las propiedades fisicoquímicas del principio activo las que condicionan su absorción y biodistribución.

La Nanotecnología Farmacéutica, como ciencia y tecnología de los sistemas nanoparticulares, presenta cada vez, sin olvidar su fuerte base fisicoquímica, un mayor componente biológico ya que en ella intervienen nuevos aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos.

El comportamiento biofarmacéutico de los nanosistemas farmacéuticos presenta características específicas y diferentes de los principios activos que contienen. Tal como se recoge en la Figura 4 las macromoléculas, al ser inyectadas i.v. al organismo, pueden sufrir una degradación por la acción de enzimas específicos o bien, si van en vectores que las protegen, éstos pueden sufrir una agregación o adhesión a componentes plasmáticos. La biodistribución de las macromoléculas depende de la estructura de la pared de los capilares sanguíneos, condiciones fisiológicas o fisiopatológicas de los tejidos, aporte sanguíneo y linfático y propiedades fisicoquímicas del vector.

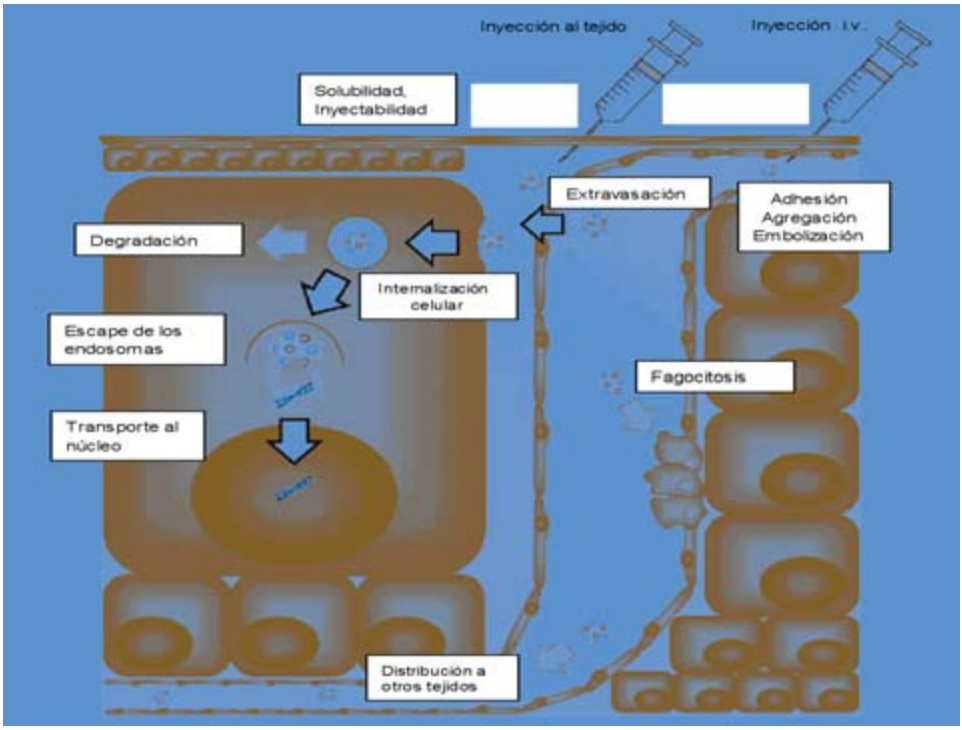


FIGURA 4. ***Problemas biofarmacéuticos asociados a la administración de nanosistemas farmacéuticos.***

Los nanosistemas farmacéuticos pueden pasar a través de las uniones de las células endoteliales y, en ciertas situaciones patológicas como en los tejidos tumorales, infartados o inflamados, pueden acumularse en el espacio intersticial adyacente; este efecto se conoce con el nombre de incremento de la permeabilidad y retención (EPR effect) y su efectividad puede atribuirse a dos factores: por una parte la extravasación de macromoléculas o nanosistemas coloidales tiene lugar por una mayor permeabilidad de los vasos (el tamaño de los poros de los capilares se sitúa entre 200 nm y 1,2 mm) y menor flujo sanguíneo y, por otra parte, la retención tisular está condicionada por un menor drenaje linfático intersiticial y el tamaño del nanosistema (Figura 5).

Utilizando diferentes modelos de tumor la importancia del efecto EPR depende del tamaño y tipo de tumor. Los tumores pequeños muestran una mayor permeabilidad y, en consecuencia, una mayor

acumulación lo cual resulta ventajoso para erradicar micrometástasis que son difíciles de tratar utilizando una terapia convencional. Por otra parte los tumores altamente vascularizados, como por ejemplo el sarcoma de Kaposi, presentan una elevada vascularización y un mayor efecto de retención. Para aquellos tumores poco vascularizados en el exterior y con un rápido crecimiento de la masa tumoral, la inyección intratumoral de los nanosistemas presentan ventajas frente a la administración i.v.

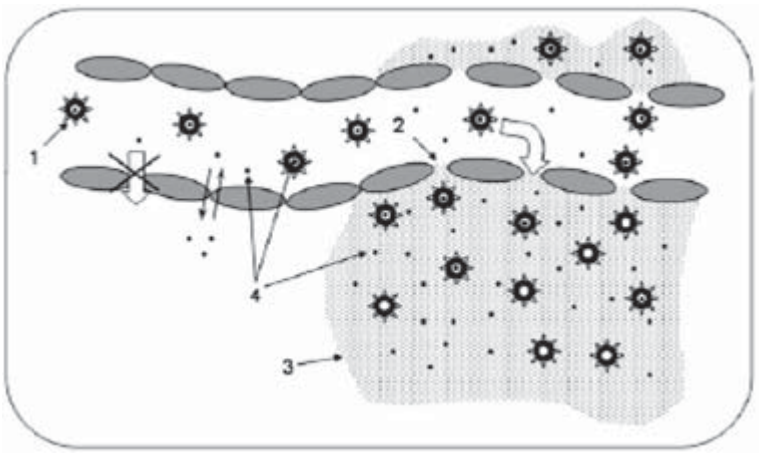


FIGURA 5. ***Esquema del efecto incremento de permeabilidad-retención (EPR effect).*** *Los nanovehículos que permanecen largo tiempo en la circulación (1) penetran a través de la pared endotelial (2) en el intersicio tumoral (3) y al degradarse, liberan el principio activo con lo que se alcanza elevadas concentraciones (4).*

Las interacciones con los biofluidos y el acceso al fluido intersticial constituyen las barreras extracelulares pero muchas macromoléculas tienen su diana en el interior de la célula como sucede con las terapéuticas basadas en el ADN.

La vectorización intracelular es deseable para aquellos casos en que la diana terapéutica se localiza en el interior de la célula bien en el citoplasma (oligonucleótidos antisentido, aptámeros, ribozimas, etc) o bien en el núcleo celular (plásmidos transgenes, siARN, oligonucleótidos). La internalización o paso de los nanosistemas a través

de la membrana celular es un complejo proceso de interacciones entre éstos y ciertos componentes de la membrana a través de los cuales se modifican señales celulares con lo que la internalización puede tener lugar por medio de una endocitosis o pinocitosis inespecífica en las que el sistema, fijado sobre la membrana celular, va liberando el fármaco o por endocitosis mediada por receptor la cual puede realizarse en los llamados hoyos recubiertos (coated pits), en los que se encuentra la proteína clatrina, proceso en el que se produce la invaginación de la membrana para formar endosomas que llevan en su superficie clatrina, o bien en los caveolos que son invaginaciones de la membrana tapizadas por una proteína especializada llamada caveolina. Utilizando sistemas poliméricos la endocitosisis puede potencializarse en función de la carga del sistema o la presencia de restos hidrofóbicos; la primera promueve una interacción electrostática entre el sistema y la membrana (con carga negativa) o bien una interacción con los lípidos que forman parte de ésta. Una especial atención se está prestando a la interacción entre las membranas celulares y ciertos lípidos, denominados facilitadores como DOPE (dioleilfofatidiletanolamina) y péptidos fusógenos como son los derivados del TAT (transactivator of transcription) del virus HIV, los conocidos como GALA o KALA, el péptido de 16 aminoácidos penetratina o la octaarginina. Aunque el mecanismo de penetración de éstos últimos no está bien aclarado es indudable que el conocimiento de estos procesos constituye un aspecto clave a la hora de diseñar un nanosistema que requiere su internalización celular.

Una vez que se ha formado el endosoma en el interior de la célula (Figura 6) éste puede dirigirse hacia el interior de la membrana biológica y salir posteriormente al exterior de la célula, por un mecanismo de exocitosis, o bien englobarse con lisosomas, vesículas englobadas por una membrana, que contienen un elevado número de enzimas capaces de inactivar muchas moléculas formándose un endolisosoma. Estos enzimas actúan a pH ácido para lo cual la membrana lisosomal contiene una bomba de protones que permite que el lisosoma tenga un pH inferior a 5 por lo que se debe asegurar la protección de proteínas/plásmidos de la acción de las nucleasas lisosomales. La rotura del endolisosoma permite que el nanosistema libere el principio, parte del cual puede degradarse y parte puede alcanzar sus dianas, bien a nivel del citosol o del núcleo.

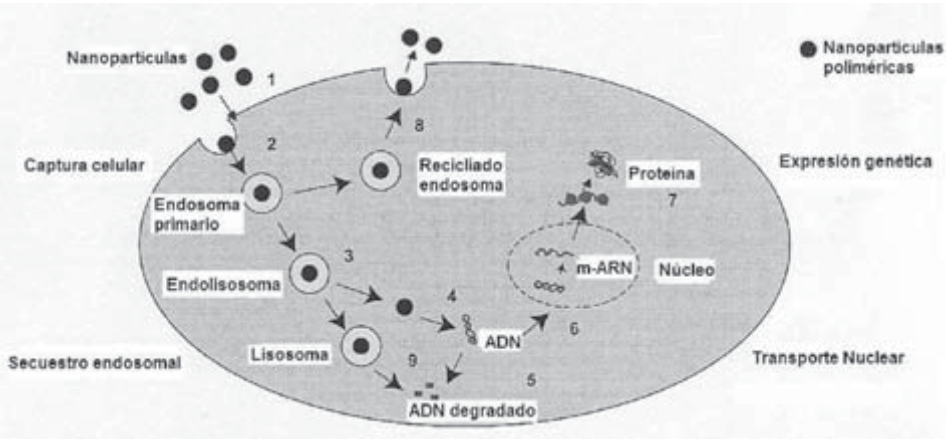


FIGURA 6. **Representación esquemática de las etapas que tienen lugar durante el tráfico intracelular de fármacos incluidos en nanosistemas.**

De todo lo expuesto se deduce que una condición importante para conseguir una efectiva liberación de un fármaco, que tenga su diana en el interior de la célula, es que el sistema que lo transporta lo proteja durante su permanencia en el endolisosoma y que rápidamente lo abandone. Un cierto número de vectores han sido explorados para una liberación específica intracelular y aunque su eficiencia de liberación sea alta son incapaces de mantener niveles terapéuticos por largo tiempo. Por ello el centro de atención actual es la obtención de sistemas que no solo protejan al fármaco de su degradación sino que, una vez que se encuentran en el citosol permitan una liberación controlada durante un largo tiempo.

Muchos de los recientes fármacos, fundamentalmente antineoplásicos, producen su acción sobre efectores genéticos de las células tumorales a través de una acción quelante o reticulación del ADN o bien interfiriendo su replicación, su transcripción o traslación por lo que la vectorización nuclear constituye el factor decisivo en este tipo de fármacos. El núcleo está rodeado de una doble membrana, constituida por fosfolípidos similares a los de la membrana celular, y presenta poros acuosos 10 veces mayores que los de la membrana plasmática los cuales permiten el paso de algunas macromoléculas (< 9 nm) solubles como ARN y algunas proteínas. Otras macromo-

léculas pueden pasar a través de la membrana nuclear por transporte activo por medio del complejo poro nuclear (CPN) constituido por proteínas denominadas porinas, que se caracterizan por la presencia de dominios constituidos por repeticiones múltiples de pequeñas secuencias de fenilalanina-glicina, que se disponen como una estructura anular en la membrana del núcleo, y cuya función está regulada por moléculas que se denominan señales de localización nuclear las cuales contienen aminoácidos catiónicos con restos que pueden ser fosforilados. Cuando éstas moléculas, conocidas como importinas, son activadas se asocian con CPN y por medio de la actividad GTPasa (GTP: guanosina trifosfato) el complejo es introducido en el núcleo. Desde el punto de vista tecnológico tiene interés la utilización, como promotor nuclear, de protamina de bajo peso molecular en base a la similitud con el péptido TAT 1 HIV; es por ello por lo que se realiza la complejación de la protamina con un plásmido ADN antes de proceder a la inclusión en un nanosistema.

Como ejemplos que destacan la importancia que tienen los nuevos aspectos biofarmacéuticos podemos señalar los siguientes:

➤ Poliláctico-poliglicólico: Constituyen un grupo de polímeros biodegradables y biocompatibles que han sido aprobados por la FDA para su utilización en forma de nanopartículas. Estos nanosistemas son obtenidos generalmente por un proceso de de doble emulsificación w/o/w y evaporación del solvente empleando el alcohol polivinílico (PVA) como emulsificante.

Se ha demostrado que la internalización de estas nanopartículas es concentración y tiempo dependiente y tiene lugar parte por pinocitosis de fase fluida y parte a través de los hoyos de clatrina. El tamaño de partícula juega un papel fundamental ya que, con la misma composición, las nanopartículas < 100 nm muestran una transfección 27 veces mayor que las de tamaño > 100 nm. Son también de gran importancia factores como carga superficial, hidrofilia del polímero y proporción de PVA en el sistema. Una vez formado el endolisosoma se produce una protonización, por el pH ácido del medio, y modificación de la carga superficial de la nanopartícula lo que da lugar a la rotura de la membrana endolisosomal; por otra parte también se ha demostrado que una significativa fracción sufre un proceso de exocitosis el cual depende la proporción de alcohol

polivinílico (la exocitosis es menor cuando es baja la proporción de PVA), de su peso molecular y del grado de hidroxilación.

La lipofilia que presentan las nanopartículas a base éstos polímeros hace que in vivo se fijen rápidamente opsoninas y que sean identificadas por el sistema retículoendotelial. Por ello es por lo que se ha procedido a recubrir la superficie de las nanopartículas con los polímeros polietilenglicol y mas recientemente se ha propuesto la síntesis y utilización de copolímeros PLA-PLAG con polietilenglicol; éstos nuevos polímeros permiten que, a través de las cadenas de polietilenglicol se puedan unir otros componentes que permitan orientar el sistema hacia determinados tejidos.

Recientemente se ha revisado el papel de las cadenas de PEG y concluyéndose que éstas permiten que los nanosistemas (liposomas, nanopartículas) presenten una larga permanencia en la circulación pero disminuyen la interacción con las membranas celulares. La solución que se propone, para resolver éste dilema, consiste en emplear una cubierta lipídica (DOPE)-péptido-PEG sobre el vector. Las cadenas de PEG permiten que el sistema se mantenga en circulación durante un largo tiempo pero una vez que se acumula en el tejido tumoral la unión lípido-péptido es rota por la acción de metaloproteinasas liberadas al espacio extracelular por las células tumorales (Figura 7).

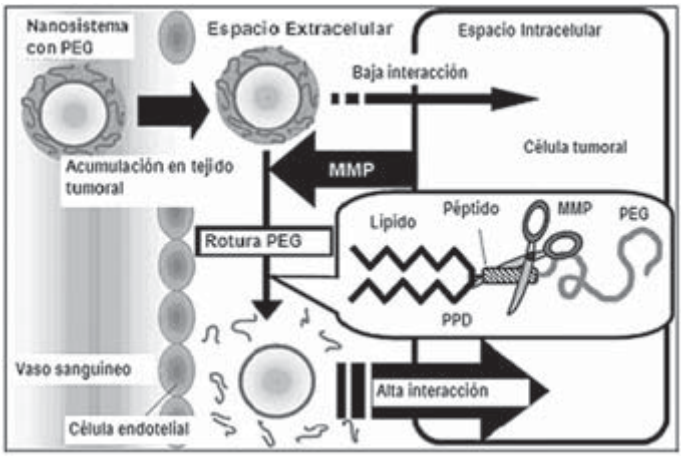


FIGURA 7. ***Nanosistema recubierto con PEG cuyas cadenas se liberan a nivel del tejido tumoral que contiene metaloproteasas.***

➤ Poloxamer: Son bien conocidas las interacciones que se pueden producir entre numerosos principios activos y los grupos carboxilo terminales de los polímeros poliláctico-glicólico así como el mayor número de ellos que se producen durante su proceso hidrolítico y que conducen a la formación de oligómeros y monómeros ácidos. Diversos autores han señalado que la encapsulación con excipientes protectores puede constituir una alternativa para disminuir la interacción entre fármaco y polímero así como neutralizar la acidificación del medio que tiene lugar durante su degradación. Entre las diversas alternativas destacan la inclusión de copolímeros bloque a base polioxietileno y polioxipropileno ya que aumentan de forma significativa la estabilidad y la eficiencia de encapsulación de diferentes proteínas.

En la Figura 8 se muestra que el plásmido ADN pEGFP (que codifica la proteína fluorescente verde), cuando se incluye en nanopartículas de poliláctico-glicólico:poloxamer L 121 en proporción 50:50, se encuentra en las dos formas biológicamente activas: superhelicoidal (aproximadamente en un 60%) y circular abierta (aproximadamente en un 40%). Durante el proceso de liberación de dos semanas se siguen observando las dos formas si bien se produce una conversión de la forma superhelicoidal a circular abierta. Este hecho demuestra que los copolímeros bloque mencionados previenen cambios estructurales del plásmido encapsulado que si se producen cuando se utilizan nanopartículas de poliláctco-glicólico.

Los poloxamer y poloxaminas han demostrado la capacidad de interaccionar con varias moléculas efectoras y activar la expresión de genes que son cruciales para inhibir el desarrollo del sistema

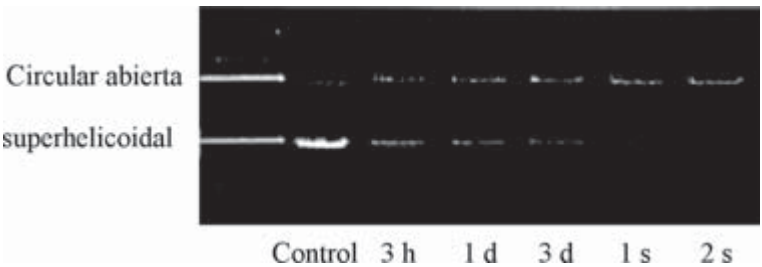


FIGURA 8. ***Análisis estructural del plásmido ADN pEGFP liberado a diferentes tiempos a partir de nanopartículas PLGA: Pluronic L 121.***

conocido como resistencia múltiple a fármacos (MDR), que se desarrolla rápidamente en ciertos tipos de células tumorales, y puede considerarse como una modificación del fenotipo provocado por fármacos. En los tumores con fenotipo MDR sobreexpresado aparecen transportadores como la glicoproteína P (MDR1), resistencia múliple a fármacos asociada a proteínas (MPR) y proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) que pertenecen a una superfamilia de casette de proteínas de unión a ATP las cuales dan lugar a bombas que transportan el fármaco al exterior de la célula reduciendose la citotoxicidad. Al mismo tiempo el sistema de detoxificación glutation/glutation S-transferasa está activado y finalmente el fármaco también es englobado en vesículas endoplasmáticas que participan en su salida al exterior.

Tal como se muestra en la Figura 9 el empleo de los poloxamer inhibe la glicoproteína P y aumenta de forma importante la citoxicidad de muchos antineoplásicos en células tumorales con elevada

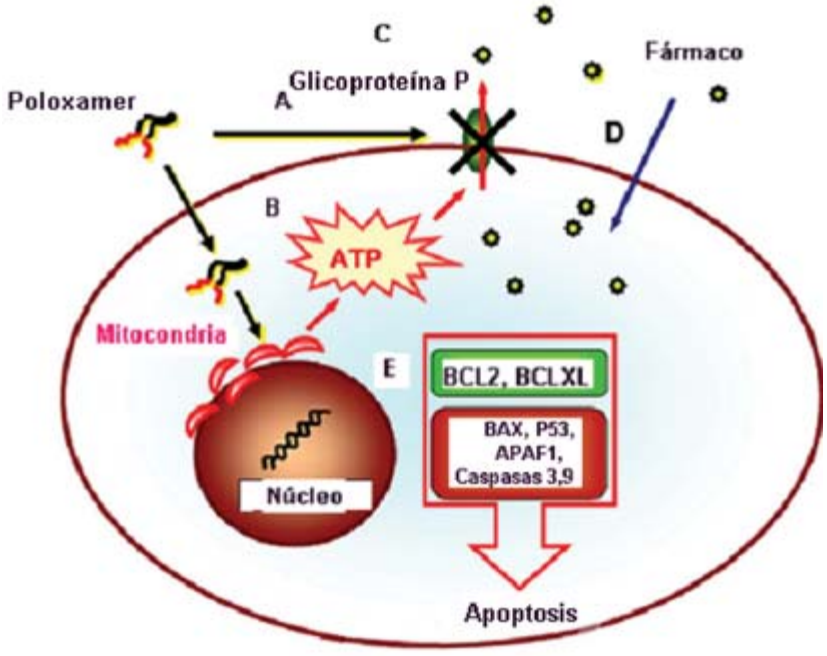


FIGURA 9. ***Mecanismos de actuación de los poloxamer sobre las células tumorales con fenotipo MDR1 sobrexpresado.***

actividad MDR. Este efecto es múltiple ya que por una parte se disminuye la actividad de la glicoproteína ATP-asa, tiene lugar una depleción intracelular de ATP así como una inhibición del sistema glutation-glutation S-transferasa y la formación de vesículas endoplasmáticas.

Las dos dianas de actuación de los poloxamer son la membrana celular, en la que se localiza la glicoproteína P, y la membrana de la mitocondria en la que afecta a los transportadores de flujo del fármaco y cadena respiratoria. La capacidad de inhibir el sistema glicoproteína P-ATPasa de los poloxamer aumenta al incrementarse la longitud hidrofóbica de polioxipropileno de tal forma que la mayor actividad de estos copolímeros se presenta en aquellos que poseen una longitud intermedia de la cadena de polioxipropileno y una relativamente corta cadena de polioxietileno.

En cuanto a la cadena respiratoria ésta se ve fuertemente inhibida por los poloxamer en células MDR en comparación con células no MDR lo cual parece que está relacionado con el hecho de que las primeras utilizan los ácidos grasos como fuente de energía en lugar de glucosa. La selectividad que muestran los poloxamer sobre las células con fenotipo MRD1 sobreexpresado es único y constituye un buen ejemplo de cómo el MDR1 es un buen marcador farmacogenómico para determinar la efectividad de formulaciones poloxamer-fármaco; además ello ha reforzado los ensayos clínicos de formulaciones de doxorubicina-poloxamer en cáncer de esófago y otros que muestran una alta sobreexpresión de MDR1 y en los que frecuentemente se presentan rápidas resistencias.

Aunque las formulaciones de medicamentos incorporados a polímeros son empleadas para mejorar la liberación del principio activo sin embargo existen cada vez mas evidencias que los polímeros pueden también modificar señales de transducción intracelular e incrementar la eficacia terapéutica del principio activo. Ejemplo de ello son antineoplásicos fijados a polímeros o bien éstos incluidos en micelas poliméricas o nanopartículas; así la doxorubicina fijada al poloxamer Pluronic P 85 incrementa su actividad debido a que el polímero incrementa la expresión de genes proapoptóticos BAX, P53, APAF1, caspasa 9 y 3 mientras que la defensa celular antiapoptótica BCL2 está disminuida.

➤ Polietilenglicoles: La camptotecina fijada sobre polietilenglicoles incrementa su efecto citotóxico al estar considerablemente incrementadas las expresiones de los genes activadores de caspasas SMAC y APAF1 así como las caspasas 9 y 3; en éste caso también se encuentran sobreexpresados los genes ligados a la defensa celular BCL2 y BCL-XL pero esta inducción se desarrolla mas lentamente por lo que el resultado final es un incremento de la muerte celular. Igualmente micelas poliméricas de polietilenglicol-ácido poliglutámico conteniendo cisplatino muestran una actividad diferente sobre los genes que regulan el ciclo celular, apoptosis, detoxificación y reparación de ADN; concretamente las micelas poliméricas muestran una disminución en la expresión de los genes que codifican integrinas y metaloproteasas mientras que estos genes se encuentran sobreexpresados cuando se administra solo cisplatino. Este hecho tiene interés ya que las mencionadas micelas pueden reducir la invasión tumoral, metástasis y angiogénesis proporcionando beneficios terapéuticos adicionales.

➤ Poliglutamatos: Constituyen un reciente grupo de polímeros (Polyglumex) patentados por Cell Therapeutics. Uno de estos polímeros ha sido unido al paclitaxel (Xyotax®). Basándose en los resultados de estudios clínicos, realizados sobre mas de 1.200 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, se encuentra que los niveles plasmáticos de paclitaxel son 100 veces mas bajos cuando se utiliza Xyotax® que cuando se emplea el citostático actualmente comercializado; este único perfil puede ser el responsable de que no se produzca una pérdida de pelo y de la baja incidencia de la neutropenia severa que se observa en los estudios clínicos. Al mismo tiempo se encuentra un significativo incremento de la supervivencia y que ésta es mayor en mujeres lo cual parece deberse a la correlación existente entre niveles plasmáticos de estrógenos y un aumento en la expresión de catepsina B.

➤ Polialquilcianoacrilatos: Estos polímeros se utilizan para la preparación de nanocápsulas y nanopartículas que contienen fármacos de muy diversa naturaleza desde antineoplásicos hasta oligonucleótidos antisentido o plásmidos de ADN. De entre los diversos polímeros de éste grupo se ha seleccionado el poliisohexilcianoacrilato por su tolerancia, bloqueo de las bombas implicadas en la resistencia celular a antineoplásicos y alta captación por parte células tumo-

rales hepáticas. Actualmente se encuentran en investigación clínica nanopartículas de 100-300 nm de este polímero conteniendo doxorrubicina (Transdrug®) con la indicación de tratamiento de hepatocarcinoma por administración intraarterial. La dosis inicial es de 10 mg/m², seguida, cada 4 semanas, de dosis de 20, 30 y 40 mg/m². La misma compañía BioAlliance Pharma (Francia) está desarrollando nanopartículas de este polímero conteniendo otros antineoplásicos como paclitaxel e irrinotecan.

Por último cabe señalar que el campo de la genómica de los polímeros ha comenzado a conocerse recientemente y afecta a polímeros no iónicos anfifílicos hidrosolubles así como a nanoestructuras (nanopartículas y micelas) que los contienen. Es importante señalar que dentro de estos polímeros se encuentran los polietilenglicoles y los copolímeros polióxido de etileno-polióxido de propileno que se consideran de la categoría GRAS (generally regarded as safe); sin embargo esta consideración debe tomarse con precaución cuando se mezclan o se conjugan covalentemente con agentes citotóxicos, derivados de ADN o antígenos ya que los polímeros pueden afectar drásticamente a las respuestas producidas por estos fármacos y que son genéticamente controladas. En algunos casos la actividad de estos polímeros puede tener efectos beneficiosos como por ejemplo en el caso de vacunas o superando la resistencia frente a citostáticos pero, en otros casos, puedan dar lugar a efectos secundarios insospechados y no deseados.

Tomando en consideración estos aspectos la EMEA recomienda que, desde las primeras etapas del desarrollo de nanomedicinas, los diferentes organismos (centros universitarios, centros de investigación o industrias) se pongan en contacto con la EMEA Innovation Task Force (http://www.emea.eu.int/htms/human/itf/itfintro.htm) y/o el Scientific Advice Procedure (http://www.emea.eu.int/pdfs/human/sciadvice/426001en.pdf). Igualmente el National Cancer Institute tiene asociado el Nanotecnology Characterization Laboratory (NCL) que realiza ensayos preclínicos de eficacia y toxicidad de nanopartículas para facilitar el paso de las estrategias nanotecnológicas a ensayos clínicos en el campo de la oncología (http://ncl.ncifcrf.gov/wp/upload.asp).

BIBLIOGRAFÍA

(1) DOMB, A.J.; TABATA, Y.; RAVI KUMAR, M. N.V. Y FARBER, S. (2007) Nanoparticles for pharmaceutical applications. Ed.: American Scientific Publishers. Los Angeles.

(2) CANCER NANOTECHNOLOGY PLAN: A STRATEGIC INITIATIVE TO TRANSFORM CLINICAL ONCOLOGY AND BASIC RESEARCH THROUGH THE DIRECT APPLICATION OF NANOTECHNOLOGY. (2004) U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. Health National Cancer Institute.

(3) EUROPEAN TECHNOLOGY PLATFORM: NANOMEDICINE. cordis.europa.eu/nanotechnology/nanomedicine.htm.

(4) EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2006) Reflection paper on nanotechology-based medicinal products for human use.

(5) UCHEGBU, I.F. (2006) Pharmaceutical nanotechnology: polymeric vesicles for drug and gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*. 3 (5): 629-640.

(6) ZAMBONI, W.C. (2005) Liposomal, nanoparticles and conjugatd formulations of anticancer agents. *Clin. Cancer Res*. 11 (23): 8230-8234.

(7) TORCHILIN, V.P. (2007) Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives: *Pharm. Res*. 24 (1): 1-16.

(8) HATAKEYAMA, H.; AKITA, H.; KOGURE, K.; OISHI, M.; NAGASAKI, Y.; KIHIRA, Y.; UENO, M.; KOBAYASHI, H.; KIKUCHI, H. AND HARASHIMA, H. (2007) Development of a ovel system gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Therapy*. 14: 68-77.

(9) YIH, T.C. AND AL-FANDI, M. (2006) Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J. Cell. Biochem.* 97: 1184-1190.

(10) CHENG, J.; TEPLY, B.A.; SHERIFI, I.; SUNG, J.; LUTHER, G.; GU, F.X.; LEVY-NISSENBAUM, E.; RADOVIS-MORENO, A.F.; LANGER, R. AND FAROKHZAD, O.C. (2007) Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*. 28: 869-876.

(11) XION, X.B.; HUANG, Y.; LU, W.L.; ZHANG, X.; NAGAI, T. AND ZHANG, G. (2005) Intracelular delivery of doxorubicine with RGD modified sterically stabilized liposomes for an improved antitumor efficacy in vitro and in vivo. *J. Pharm. Sci*. 4: 1782-1793.

(12) FAROKHZAD, O.C. AND LANGER, R. (2006) Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv. Drug Del. Rev*. 58: 1456-1459.

(13) NISHIYAMA, N. AND KATAOKA, K. (2006) Current state, achievements and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol. & Therapeutics*. 112: 630-648.

(14) KABANOV, A.V. (2006) Polymer genomics: An insight into pharmacology and toxicology of nanomedicines. *Adv. Drug Del. Rev*. 58: 1597-1621.

(15) AKHTAR, S. AND BENTER, I. (2007) Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 59: 165-182.

(16) COUVREUR, P. AND VAUTHIER, C. (2006) Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res*. 23: 1417-1450.

(17) VAN VLERKEN, L.E.; VYAS, T.K. AND AMIJI, M.M. (2007) Poly (ethylene glycol)-mofied nanocarriers for tumor targeted and intracelular delivery. *Pharm. Res*. 24 (8): 1405-1414.
(18) TORCHILIN, V.P. (2006) Multifuncional nanocarriers. *Adv. Drug Delivery Rev*. 58: 1532-1555.
(19) VASIR, J.K.; REDDY, M.K. AND LABHASETWARD. (2005) Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. *Current Nanoscience*. 1: 47-64.
(20) TORCHILIN, V.P. (2007) Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*. 9 (2): E 128-E 147.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 833-871

Revisión

Ácidos siálicos: distribución, metabolismo y función biológica

Recibido el 3 de octubre de 2007

ÁNGEL REGLERO*, IGNACIO G. BRAVO Y VANESA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ

Dpto. Biología Molecular. Universidad de León. Campus de Vegazana. 24071. León. Spain.

RESUMEN

Los ácidos siálicos están entre las moléculas de mayor importancia del reino animal encontrándose también en algunos microorganismos. Son cetoácidos con un esqueleto glucídico de nueve carbonos, están cargados negativamente y se descubrieron en mamíferos aunque se encuentran en la mayor parte de los celomados, en protostomados (por ejemplo, artrópodos), y deutorostomados (por ejemplo, cordados y equinodermos). La ruta biosintética del Neu5Ac tiene lugar a través de las siguientes reacciones: a) síntesis de ManAc-6-P, b) síntesis de ManNAc, c) síntesis de Neu5Ac, d) activación del monómero to CMP-β-Neu5Ac, y e) transferencia del Neu5Ac a un aceptor. En el catabolismo de estos compuestos las enzimas neuraminidasa y N-acetil neuraminato liasa tienen un papel importante. En animales los ácidos siálicos están involucrados en interacciones célula-célula e intervienen en la regulación de procesos de reconocimiento celular. En microorganismos están presentes en un número escaso de bacterias y hongos. Estos microorganismos los utilizan para establecer relaciones simbióticas o parasitarias con animales, para utilizarlos como fuente de nitrógeno o carbono o para sialilar su propia superficie.

Palabras clave: Ácido siálico, Neu5Ac, ácido N-acetil-neuramínico.

* **Correspondencia:**
Prof. Dr. Ángel Reglero. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Dpto. Biología Molecular. Universidad de León. Campus de Vegazana. 24071. León. Spain.
Teléfono: 987 29 12 25
Fax: 987 29 12 26
e-mail: angel.reglero@unileon.es

ABSTRACT

Sialic Acids: Ocurrence, Metabolism and Biological function.

Sialic acids are among the most important molecules in the animal kingdom and also occur in some microorganisms. They are α-ketoacids with a nine-carbon glycid backbone. They are negatively charged and they were first discovered in mammals, although it appears that they are present in most *Coelomata* in both protostomes (e.g. *Arthropoda*) and deutorostomes (e.g. *Chordata* or *Echinodermata*). The biosynthetic pathway of Neu5Ac proceeds through the following reactions: a) synthesis of ManAc-6-P, b) synthesis of ManNAc, c) synthesis of Neu5Ac, d) activation of the monomer to CMP-β-Neu5Ac, and e) transfer of Neu5Ac to the acceptor structure. In the catabolism of this compound, the neuraminidase and N-acetyl-neuraminidate-lyase activities play important roles. In animals, sialic acids are involved in cell-to-cell interactions and mediate the regulation of recognition process. In microorganisms they are present in a few taxonomically scattered bacterial and fungal species. These microorganisms establish either symbiotic or parasitic relationships with animals and use host sialic acids either as a carbon-nitrogen source or to sialylate their own cell surface.

Key words: Sialic acid, Neu5Ac, N-acetyl-neuraminic acid.

ÁCIDOS SIÁLICOS

Hoy en día, el término ácido siálico comprende una familia de más de 50 compuestos naturales que tienen en común un esqueleto de nueve carbonos (ácido neuramínico), siendo los únicos azúcares de nueve carbonos detectados en procariotas.

El término «ácido siálico» etimológicamente proviene del griego «sialos» cuyo significado es saliva. El compuesto fue descubierto por Blix, en 1936, (1) cuando lo aisló de la mucina bovina de las glándulas submaxilares y por Klenk, en 1941, (2) al aislar un derivado del ácido neuramínico ($C_9H_{17}O_8N$) a partir de glicolípidos del cerebro de enfermos con la enfermedad de Tay-Sachs (asociada a una acumulación de gangliósidos, en particular el GM2, por deficiencia en la enzima *N*-acetil-hexosaminidasa).

El ácido siálico más común es el ácido *N*-acetilneuramínico, $C_{11}H_{19}NO_9$, abreviado habitualmente como Neu5Ac, NeuNAc, NeuAc o NANA. En un principio, los términos ácido siálico y Neu5Ac eran

sinónimos; sin embargo, la aparición en los años 70 de otros compuestos derivados de este último, hizo que a partir de entonces estos términos no se puedan utilizar indistintamente.

ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS

Los ácidos siálicos tienen en su estructura un anillo piranósico constituido por cinco carbonos y un oxígeno formado por un hemiacetal en conformación en silla. En los glicoconjugados que existen en la naturaleza, los ácidos siálicos se presentan sólo en la configuración α excepto en un donador rico en energía, el CMP-ácido siálico, donde el carbono anomérico se encuentra en configuración β. Los ácidos siálicos más abundantes en la naturaleza son el Neu5Ac y el ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) que difieren en el radical que se encuentra unido al carbono de la posición 5. Existen otros ácidos siálicos generados por modificaciones de los grupos hidroxilo de las posiciones C4, C7, C8 y C9 por acetato, lactato, sulfato, ésteres fosfato o metil ésteres, además de las cuales existen lactonizaciones ínter o intramoleculares en las que están involucradas las posiciones C1 y C5 con lo que se amplia la variedad de estos compuestos (Figura 1).

DISTRIBUCIÓN DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS

En 1990, Woose *et al*. (3) clasificaron los organismos celulares en tres dominios: *Eukarya* (*Animalia*, *Plantae*, *Fungi* y *Protista*), *Bacteria* (*Eubacteria*) y *Archaea* (*Archaebacteria*). Durante varias décadas se creyó que los ácidos siálicos sólo se sintetizaban en *Deuterostomia* (*Chordata*, *Hemichordata* y *Echinodermata*) y excepcionalmente en otras formas de vida. Sin embargo, la presencia de estos compuestos ha sido demostrada en algunos eucariotas no deuterostomados, en bacterias y por estudios de secuencias genómicas se ha propuesto también su presencia en *Archaea*.

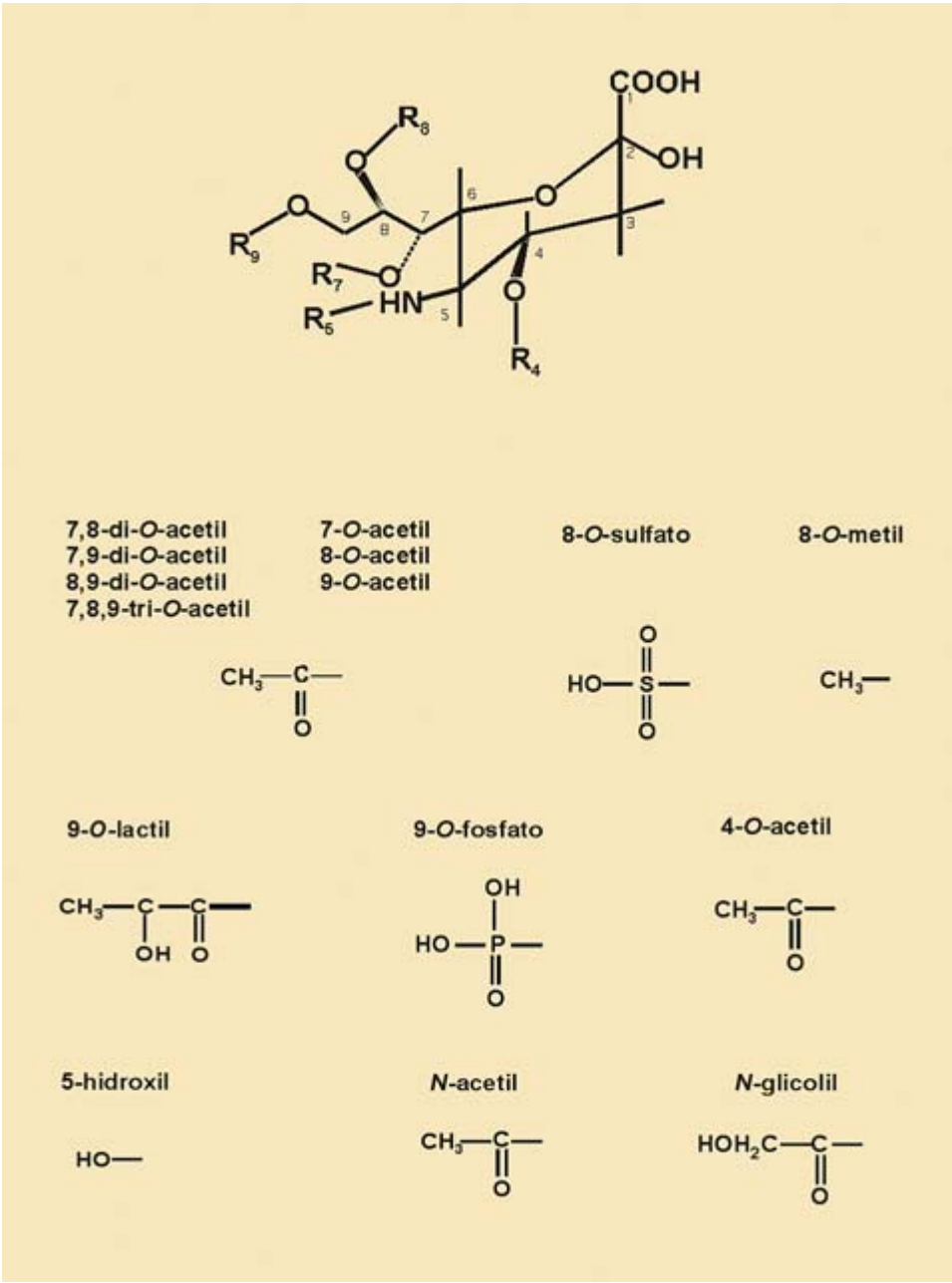


FIGURA 1. ***Familia de ácidos siálicos presentes en la naturaleza (4, 48).***

Eukarya

Animalia

Los deuterostomados sintetizan cuatro tipos de glicoconjugados: glicoproteínas, glicolípidos, proteoglicanos y glicosilfosfatidilinositol. En la mayoría de los casos, los ácidos siálicos ocupan los extremos distales de las cadenas de glicanos con uniones α(2-3) a galactosa, α(2-6) a galactosa y a GalNAc o α(2-8) a otros ácidos siálicos. Existen algunos ejemplos en equinodermos y anfibios donde los ácidos siálicos se encuentran como residuos internos (4).

En los equinodermos se sintetizan tal cantidad de ácidos siálicos modificados que incluso fue posible identificarlos hace años cuando los métodos analíticos que existían eran poco sensibles y poco fiables.

En todos los vertebrados, se han encontrado ácidos siálicos en forma libre o formando parte de estructuras macromoleculares. En forma libre, las concentraciones más elevadas de ácidos siálicos se detectaron en huevos de salmón (5), vesículas seminales de hámster dorado (6) y en extractos de jugo gástrico porcino (7). En el hombre están presentes en el líquido cefalorraquídeo, saliva, suero y orina, pero lo más frecuente es que se encuentren formando parte de estructuras macromoleculares glucídicas tales como glicoproteínas y gangliósidos. En los vertebrados existe menor variedad de ácidos siálicos que en los equinodermos, sin embargo, en tejidos de estos animales se encuentran ácidos siálicos poco habituales como el ácido 8-*O*-metil-Neu5Ac, el Neu5Ac-1,5-lactama y el ácido Neu5Ac-1,7-lactona, compuestos que intervienen en procesos de reconocimiento por selectinas (8, 9).

Los *Protostomia* (*Ecdysozoa* y *Lophotrochozoa*) parecen expresar glicoconjugados similares a los existentes en los deuterostomados. Además, artrópodos tales como insectos y crustáceos presentan un ectoesqueleto de quitina constituido por un polímero de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Otros estudios han demostrado que algunos insectos pueden expresar Neu5Ac durante las primeras etapas de su desarrollo (10, 11). En todo caso, se desconoce si los protostomados sintetizan sus propios ácidos siálicos o simplemente los incorporan a los glicoconjugados a través de la cadena alimentaria. Así, por

ejemplo, se sabe que *Drosophila melanogaster* no dispone de todos los genes necesarios para la biosíntesis completa de los ácidos siálicos por lo que es necesario que se incorporen algunos de los intermediarios biosintéticos a través de los alimentos (10).

Plantae

Estudios estructurales sobre glicoproteínas naturales y recombinantes de plantas no han demostrado evidencias sobre la presencia de ácidos siálicos en estos organismos, a excepción de la existencia de Neu5Ac localizado mediante espectrometría de masas en el trigo negro (12). Estudios posteriores sugieren que no es posible demostrar inequívocamente la síntesis de acidos siálicos en plantas, porque las cantidades de estos azúcares detectadas en tejidos vegetales son tan pequeñas que pueden deberse a contaminantes (13).

Fungi

Se han identificado algunos ácidos siálicos como Neu5Ac, Neu5Gc y el ácido 5,9-diacetilneuramínico (Neu5,9Ac_2) en los hongos patógenos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y *Sporothrix schenckii*, mediante estudios basados en uniones a lectinas capaces de reconocer ácidos siálicos y en espectrometría de masas. El análisis de las secuencias genómicas de algunas de estas especies no ha revelado la presencia de secuencias similares a las implicadas en la biosíntesis, activación o transferencia de los ácidos siálicos en bacterias y mamíferos, aunque es posible que hayan desarrollado una nueva vía de síntesis y expresión que sea específica de cepa como ocurre en muchas bacterias. Alternativamente, los ácidos siálicos pueden ser adquiridos de fuentes externas (12).

Protista

T. cruzi, causante de la enfermedad de Chagas, posee ácidos siálicos que obtiene a partir de glicoproteínas del organismo hospedador por la acción de una proteína llamada trans-sialidasa (14). Además, se han identificado Neu5Ac, Neu5Gc y el ácido 5,7-diacetilneuramínico (Neu5,7Ac_2) en *Dictyostelium discoideum*, *Crithidia*

fasciculata, *Theileria sergenti*, *Entamoeba invadens* y *E. histolytica*, aunque aún se desconoce si estos organismos son capaces de sintetizarlos (12).

Bacteria

En 1957, Barry y Goebel (15) descubrieron, por primera vez, la presencia de ácidos siálicos en *Escherichia coli* K-235 al aislar un polímero de Neu5Ac que fue nombrado posteriormente ácido colomínico.

La mayoría de las bacterias no producen ácidos siálicos, pero varias cepas patógenas entre las que se encuentran *E. coli* K1 (16), *Neisseria meningitidis* (17) y *Campylobacter jejuni* (18) son capaces de biosintetizarlos. Otras bacterias patógenas, como *N. gonorrhoeae* y *Haemophilus* spp., no pueden sintetizarlos, pero se encuentran en sus estructuras, ya que los adquieren desde el organismo hospedador. Además, algunos patógenos pueden catabolizar ácidos siálicos del medio como fuente de carbono, nitrógeno y energía o como fuente de aminoazúcares para biosintetizar la pared celular (19).

Los ácidos siálicos se encuentran, generalmente, formando parte de la estructura capsular de la bacteria y se han detectado en forma de homopolímeros (unidades repetidas de un mismo polímero) o de heteropolímeros (estructuras polisacarídicas formadas por diferentes tipos de monómeros) (20).

Entre las cepas que presentan homopolímeros (Tabla I) se encuentran *E. coli* K1 (15), *N. meningitidis* grupo B (21), *Mannheimia haemolytica* 2 (22) y *Moraxella nonliquefaciens* (23) donde los restos de Neu5Ac están unidos por enlaces glicosídicos α(2-8), en *N. meningitidis* grupo C por enlaces α(2-9) y en *E. coli* K92 por enlaces alternos α(2-8) y α(2-9). Estas bacterias han utilizado los ácidos siálicos para desarrollar estrategias efectivas que les permitan escapar de los mecanismos de defensa del hospedador. Fisiológicamente, los ácidos siálicos localizados en las superficies bacterianas reducen la capacidad defensiva del sistema inmune del hospedador, alterando las actividades de opsonización, citolisis e inflamación que tienen lugar durante una infección bacteriana. Además, dichos ácidos siálicos actúan como garantía de inmunotolerancia, puesto que también son constituyentes mayoritarios de las fracciones glicídicas de algunos

glicopéptidos y glicolípidos localizados en la superficie de las células del hospedador.

TABLA I. ***Ácidos siálicos en homopolímeros y heteropolímeros capsulares, y de antígeno O en bacterias.***

Bacterias	*Unidades y enlac*
Homopolímeros capsulares	
E. coli K1	-8)Neu5Ac α(2-8) Neu5Ac α(2-
E. coli K92	-9)Neu5Ac α(2-8) Neu5Ac α(2-
N. meningitidis grupo B	-8)Neu5Ac α(2-8) Neu5Ac α(2-
N. meningitidis grupo C	-9)Neu5Ac α(2-9) Neu5Ac α(2-
M. haemolytica 2	-8)Neu5Ac α(2-8) Neu5Ac α(2-
M. nonliquefaciens	-8)Neu5Ac α(2-8) Neu5Ac α(2-
Heteropolímeros capsulares	
N. meningitidis grupo W135	-4)Neu5Ac α(2-6) Gal β(1-
Photobacterium damsela JT0160	Neu5Ac α(2-3/6) Gal β(1-
N. meningitidis grupo 406Y	-4)Neu5Ac α(2-3) Gal β(1-
Streptococcus grupo B	Asociado a estructuras glucídicas complejas.
Antígeno	
S. toucra O:48	
S. arizona O:5 y O:29	
S. isazeg O:48	
S. djakarta O:48	
E. coli O:24 y O:56	-7)Neu5Ac α(2-3) Glc β(1-
C. jejuni	-8)Neu5Ac α(2-3) Gal β(1-
C. fetus	
V. cholerae	-4)Neu5Ac α(2-3) Gal β(1-
Hafnia alvei 2	-4)Neu5Ac α(2-3) Glc α
H. ducreyi 35000	Neu5Ac α(2-3/6) Gal β(1-
C. freundii	
N. meningitidis sp.	Neu5Ac α(2-3/6) Gal β(1-
N. gonorrhoeae	

Entre las cepas que presentan heteropolímeros (20) (Tabla I) se encuentran *N. meningitidis* W135 cuyos restos de Neu5Ac alternan

con D-glucosa o D-galactosa y *Streptococcus* grupo B donde el Neu5Ac aparece como residuo terminal de estructuras complejas donde existen también otros glúcidos.

También se ha observado que los ácidos siálicos pueden aparecer integrados en las estructuras lipopolisacarídicas de la pared celular (antígeno O), como ocurre en *Citrobacter freundii* O:5, O:29 y O:21; *Salmonella toucra* O:48; *S. arizona* O:5 y *E. coli* O:24 y O:56 entre otras (Tabla I). A pesar de que estas bacterias no parecen tener capacidad para sintetizar ácidos siálicos poseen, en sus membranas, sialiltransferasas específicas capaces de sialilar estructuras polisacarídicas capsulares a partir de CMP-Neu5Ac del hospedador. En estos casos, la sialilación del LPS también confiere a la bacteria capacidad de evadir el sistema inmune del hospedador, adquiriendo un mayor carácter infectivo.

Algunas bacterias sintetizan diferentes tipos de ácidos 3-deoxi-2-ceto-nonulosónico derivados del ácido legionámico originalmente descubierto en el LPS de *Legionella pneumophila* y del ácido pseudámico originalmente descubierto en el LPS de *P. aeruginosa*. Ambos ácidos son similares a los ácidos siálicos en su estructura (24) y probablemente en su biosíntesis. Muchas de las bacterias que expresan estos azúcares son patógenas en humanos, aunque también se han encontrado en bacterias no patógenas tales como *Sinorhizobium fredii* (bacteria simbiótica de leguminosas) (25), *Pseudoaltromonas distincta* (26) y *Pseudomonas. fluorescens* (27). En cambio, estos azúcares no han sido identificados en tejidos humanos.

M. haemolytica 2 presenta un ácido polisiálico formado por unidades de Neu5Ac unidas por enlaces α(2-8) similar al de *N. meningitidis* grupo B y *E. coli* K1, pero con restos de dextrano unidos por enlaces α(1-4) (22).

Archaea

Actualmente, no existen estudios publicados sobre la presencia de ácidos siálicos en integrantes del dominio *Archaea*. En 2002, Angata y Varki (12) encontraron similitud entre secuencias del genoma de *Methanococcus jannaschii* y las secuencias de las enzimas Neu5Ac sintetasa y CMP-Neu5Ac sintetasa, lo que sugiere que este microorganismo podría expresar ácidos siálicos o moléculas similares.

Virus

La frecuencia de los ácidos siálicos en los virus es escasa. Se han detectado en la fracción glicídica de estructuras glicoproteicas localizadas en su envoltura (28, 29). La glicosilación de las mismas se lleva a cabo por acción de las glicosiltransferasas presentes en la célula hospedadora (30). Así, las glicoproteínas virales pueden aparecer sialiladas o no en función de la capacidad de sialilación del organismo portador.

METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS

El estudio de la evolución de las enzimas que participan en el metabolismo de los ácidos siálicos es excitante, ya que hasta hace pocos años se pensaba que estos compuestos sólo existían en organismos superiores y en muy pocas bacterias. Warren, en 1963, (5) utilizando métodos químicos, determinó la distribución filogenética de los ácidos siálicos. Sus resultados indican que la síntesis de estos monosacáridos está limitada al complejo de los metazoanos del linaje de los deuterostomados, ya que ni las plantas ni los protostomados ni tampoco los hongos tienen cantidades detectables, sugiriendo que la evolución de la ruta biosintética de los ácidos siálicos ocurrió cerca de la divergencia de los celomados (protostomados y deuterostomados) aproximadamente hace 500 millones de años. La puesta a punto de nuevos métodos analíticos, así como la secuenciación completa del genoma de numerosas especies ha ampliado considerablemente el conocimiento que se tiene hoy día sobre la evolución de los ácidos siálicos.

Los ácidos siálicos son α-cetoácidos con un esqueleto de nueve carbonos en la cadena principal. Asimismo, existen otros α-cetoácidos con un esqueleto de ocho carbonos (ácido ceto-desoxi-octulosónico) y de siete carbonos (ácido desoxi-arabino-heptulosónico). Todos ellos son sintetizados por la adición de fosfoenolpiruvato (PEP) a un esqueleto glicídico de seis, cinco y cuatro carbonos respectivamente. Esta reacción de síntesis no es habitual, ya que procede por ruptura del enlace C-O en lugar de por ruptura del enlace P-O, más general. La similitud en la química de la reacción catalizada, así como las semejanzas a nivel de secuencia entre estas enzimas sugie-

re que todas ellas tienen un ancestro común. El metabolismo de los ácidos siálicos podría así haber evolucionado a partir de elementos pre-existentes implicados en la síntesis de aminoácidos aromáticos *via* shikimato. El escenario evolutivo propuesto para la aparición y evolución de la ruta de síntesis de los ácidos siálicos, y que explica también la distribución taxonómica de las especies que poseen ácidos siálicos en sus estructuras implica eventos de transferencia génica horizontal, como se indica a continuación (31, 32):

— Las 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO)-P sintasas y las Neu5Ac-P sintasas (y posiblemente las 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosónico (KDN)-P sintasas) han evolucionado a partir de desoxiarabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) sintasas procarióticas.

— En un proceso de transferencia génica horizontal, un ancestro de los celomados recibió una versión ancestral de una ceto-ácido sintasa y de una citidililtransferasa, desde un progenote bacteriano, posiblemente, en el linaje de *Clostridium tepidum* o de *Bradyrhizobium japonicum*.

— En el linaje de los celomados los genes transferidos evolucionaron generando la ruta de síntesis de ceto-ácidos de nueve carbonos, que dio lugar, finalmente, a los ácidos siálicos actuales.

— Recientemente, y quizá de manera independiente, diferentes organismos patógenos han aceptado por transferencia génica horizontal a partir de sus hospedadores algunos de los genes de la ruta de síntesis de ácidos siálicos. Ello les ha comportado ventajas evolutivas en términos metabólicos y/o de defensa ante la respuesta inmune.

— En un ancestro de proteobacteria los genes de síntesis y activación de ceto-ácidos dieron lugar a la ruta de síntesis de ceto-ácidos de ocho carbonos. El paradigma de estas moléculas es el KDO, que aparece formando parte de estructuras de la pared celular bacteriana, ejemplificadas en el LPS.

— Un ancestro de plantas recibió, posiblemente, desde un ancestro de *Chlamydiae*, los genes de síntesis del KDO. Estos glícidos se incorporaron también a las estructuras de la pared celular de plantas, ejemplificadas en las pectinas.

Actualmente, las principales rutas en el metabolismo de los ácidos siálicos han sido elucidadas por diferentes grupos de investigación (4, 14, 33, 34).

Desde el punto de vista biosintético todos los ácidos siálicos, a excepción de algunos azúcares sialilados específicos de ciertas bacterias, derivan del ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galacto-nonulosónico (KDN) y del Neu5Ac (35). La ruta para sintetizar ambos compuestos parece ser muy similar (36, 37), aunque las enzimas implicadas en la síntesis de KDN no están bien caracterizadas.

METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS EN EUCARIOTAS

Biosíntesis

Como se muestra en la Figura 2, la biosíntesis de Neu5Ac comienza con la formación de *N*-acetil-D-manosamina (ManNAc) desde UDP-*N*-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc) en el citosol, por acción de la enzima UDP-GlcNAc-2-epimerasa. La ManNAc es fosfo-

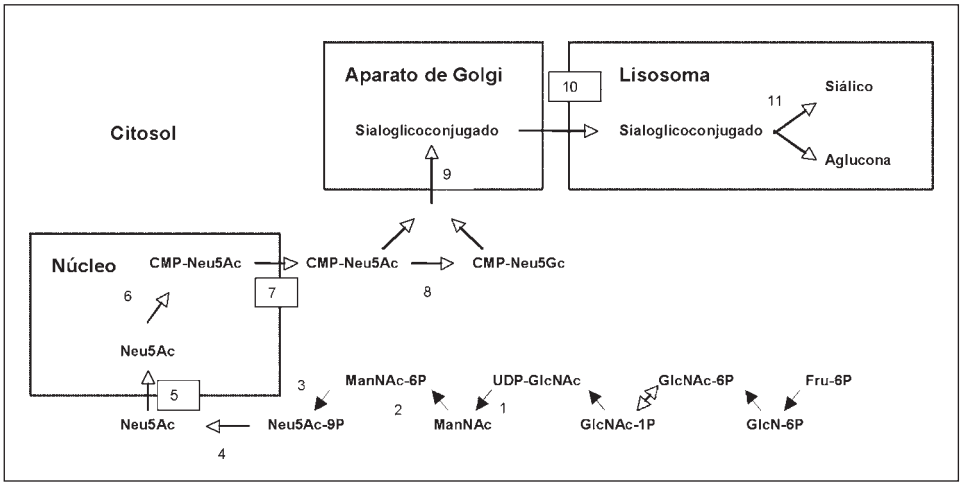


FIGURA 2. ***Metabolismo de ácidos siálicos en eucariotas.*** *1, UDP-GlcNAc-2-epimerasa; 2, ManNAc kinasa; 3, Neu5Ac-9P sintasa; 4, Neu5Ac-9P fosfatasa; 5, 7 y 10, Permeasa; 6, CMP-Neu5Ac sintetasa; 8, Hidroxilasa; 9, Sialiltrasferasa; 11, Neuraminidasa.*

rilada mediante ManNAc kinasa obteniéndose *N*-acetil-D-manosamina-6-fosfato (ManNAc-6P) que posteriormente se condensa con el fosfoenolpiruvato para generar ácido *N*-acetilneuramínico-9-fosfato (Neu5Ac-9P) mediante la Neu5Ac-9P sintasa. Este último compuesto (Neu5Ac-9P) es desfosforilado para obtener Neu5Ac por la enzima Neu5Ac-9P fosfatasa. La forma activa de ácido siálico, CMP-ácido siálico, es generada a partir de citidín trifosfato (CTP) y Neu5Ac en el núcleo mediante la CMP-Neu5Ac sintetasa. En su itinerario, el CMP-Neu5Ac puede ser modificado a CMP-Neu5Gc por la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa en el citosol. El CMP-ácido siálico (CMP-Neu5Ac y CMP-Neu5Gc) es el sustrato de las sialiltransferasas que incorporan los cetoácidos en cadenas nacientes de glicoproteínas y glicolípidos en el aparato de Golgi. Existe una familia numerosa de sialiltransferasas (38) donde los distintos miembros de la misma difieren en su especificidad hacia el glicano aceptor y el ácido siálico unido a éste (Figura 2).

Degradación

La degradación de sialilglicoconjugados normalmente comienza con la hidrólisis de los sialoconjugados por la acción de sialidasas extra o intracelulares. Las endo-sialidasas hidrolizan enlaces internos de los ácidos siálicos, mientras que las exo-sialidasas atacan los enlaces terminales de estos y desialilan glicoproteínas, glicopéptidos, gangliósidos, oligosacáridos y polisacáridos (39). La presencia de sustituyentes en los ácidos siálicos requiere la actuación previa de otras enzimas, por ejemplo, los grupos *O*-acetilo han de ser eliminados por esterasas, enzimas que están presentes en muchos tejidos (40, 41).

Estudios realizados acerca de la vida media de glicoproteínas de las membranas celulares sugieren que al menos parte de los glicoconjugados son resialilados en el aparato de Golgi regresando posteriormente a la superficie celular (42, 43, 44). Si los glicoconjugados son transportados a los lisosomas, las sialidasas lisosomales eliminarán ácidos siálicos que serán conducidos específicamente al citosol donde pueden ser reutilizados o degradados por una aldolasa citosólica (45).

Existe una sialidasa especializada, trans-sialidasa, que transfiere residuos de ácidos siálicos directamente desde un glicano a otro, evitando así la formación de un intermediario rico en energía, el CMP-ácido siálico (46, 47). Esta reacción enzimática tiene lugar en muy pocos microorganismos entre los que se destacan los tripanosomas africanos y americanos (48).

METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS EN BACTERIAS

Biosíntesis

La biosíntesis de los ácidos siálicos en bacterias se inicia por medio de los precursores comunes del metabolismo intermediario (Figura 3). A partir de D-glucosa se obtiene D-fructosa-6-fosfato (Fru-6P) que posteriormente se convierte en D-glucosamina-6-fosfato (GlcN-6P) que es acetilada para generar *N*-acetil-D-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6P) la cual, por acción de la enzima GlcNAc-6P-2-epimerasa, es epimerizada a ManNAc-6P. Posteriormente, ManNAc-6P es desfosforilada a ManNAc (49, 50), aunque otros autores (51) han indicado una ruta paralela a la citada en eucariotas donde ManNAc se obtiene desde UDP-GlcNAc. La síntesis de Neu5Ac parece ser diferente según el microorganismo donde se estudie. Así, se ha visto que en *E. coli* K1, *E. coli* K92 y *M. haemolytica* 2, la enzima Neu5Ac liasa condensa ManNAc con piruvato para generar Neu5Ac (45, 52, 53, 54), mientras que en otras cepas de *E. coli* y en *N. meningitidis* la síntesis de Neu5Ac se realiza por condensación de ManNAc con PEP mediante la enzima Neu5Ac sintetasa (21, 55, 56). Independientemente de la ruta de síntesis, el Neu5Ac libre es activado (CMP-Neu5Ac) por acción de la enzima CMP-Neu5Ac transferasa. El paso final en la biosíntesis de sialoglicoconjugados es realizado por sialiltransferasas que incorporan el Neu5Ac a un sustrato aceptor. En *E. coli* K1 el aceptor es la cadena de ácido polisiálico naciente, mientras que *N. meningitidis* presenta, al menos, dos sialiltransferasas para sintetizar ácido polisiálico y sialilar lipooligosacáridos (LOS), siendo estos últimos LPS que carecen de la cadena antígeno O (12, 57).

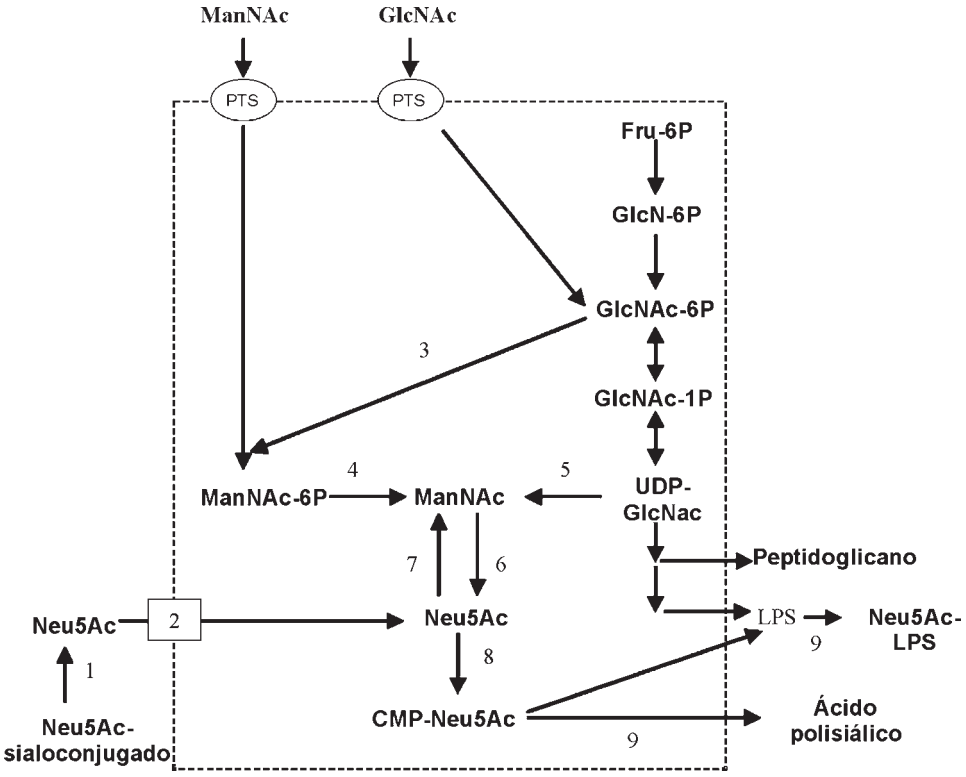


FIGURA 3. ***Metabolismo de Neu5Ac en bacterias***. *1: Neuraminidasa; 2: Permeasa; 3: GlcNAc-6P-2-epimerasa; 4: Fosfatasa; 5: UDP-GlcNAc-2-epimerasa; 6: Neu5Ac sintetasa; 7: Neu5Ac liasa; 8: CMP-Neu5Ac sintetasa; 9: Sialiltransferasa.*

Degradación

Existen dos enzimas importantes en la degradación de los ácidos siálicos en bacterias: la Neu5Ac liasa y la sialidasa o neuraminidasa (Ver Figura 3).

a) Neu5Ac liasa

La N-acetil-neuraminato-liasa (N-acetil-neuraminato piruvato liasa, acido-N-acetilneraninato aldolasa, EC.4.1.3.3) convierte el Neu5Ac en ManNAc y piruvato de forma reversible. La primera cita

de esta enzima fue dada en los años 1950 en *C. perfringens* (58) *y Vibrio cholerae* (59). La enzima ha sido purificada de *E. coli,* (60) *C. perfringens* (61) *y H. influenzae* (62). Las enzimas de *E. coli y H. influenzae* han sido cristalizadas y su estructura ha sido determinada (63). La estructura muestra que en *E. coli* la enzima es un tetrámero contrariamente a los resultados obtenidos por gel filtración que señalan que le enzima es un trímero. Esta proteína juega un papel primordial en el metabolismo de ácidos siálicos ya que pude regular la concentración intracelular de este metabolito y por lo tanto la concentración de CMP-Neu5Ac, por lo que esta liasa tiene una importante función catabólica en la detoxificación del Neu5Ac (64).

In Vitro, esta enzima tiene como sustratos el Neu5Ac y algunos de sus derivados (65). Vimr *et al* concluyen que la regulación de la enzima es necesaria no solamente para la degradación de los ácidos siálicos sino también para regular la concentración de los intermediarios en la ruta metabólica de estos compuestos (57, 64).

b) Sialidasa o Neuraminidasa

En 1941, Hirst (66) descubrió, por primera vez, actividad sialidásica mientras estudiaba la hemoaglutinación en presencia del virus influenza. Posteriormente (1946), Burnet *et al.* (67) identificaron una sialidasa bacteriana como enzima destructora de receptor. Los términos «sialidasa» y «neuraminidasa» fueron propuestos por Heimer y Meyer (1956) (68) y Gottschalk (1957) (69) respectivamente. El término «sialidasa» fue incluído en la nomenclatura IUB (Unión Internacional de Bioquímica) en el primer informe de la Comisión de Enzimas, en 1961, con el nombre de «neuraminidasa» (IUB, 1961). Este término se mantuvo en los informes de las ediciones de 1964 (IUB, 1964), 1972 (IUB, 1972) y 1978 (IUB, 1978). En 1976, Rosenberg y Schengrund (70) señalaron que el término «sialidasa» era el más apropiado para describir estas enzimas. En 1983, Cabezas *et al*. (71) propusieron el término «sialidasa» para las enzimas eucarióticas y el término «neuraminidasa» para las enzimas procarióticas. En la edición de 1984 (IUB, 1984), el término recomendado fue «sialidasa», quedando limitado el término «neuraminidasa» al epígrafe de «otro nombre», posiblemente, debido a que el Neu5Ac no es sustrato de la enzima, pero sí lo son aquellos compuestos en los que

están presentes residuos de ácidos siálicos. En 1991, Cabezas describió la nomenclatura IUB para las sialidasas (72).

La neuraminidasa (sialidasa, N-acilneuraminosil glicohidrolasa, EC 3.2.1.18) es una exoglicosidasa que hidroliza los enlaces α-glicosídicos de los ácidos siálicos que se encuentran unidos en posición terminal a glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos en animales superiores y en algunos microorganismos (14, 73).

Las neuraminidasas se encuentran frecuentemente en bacterias que tienen contacto estrecho con un hospedador animal, donde la enzima sirve como factor de colonización y virulencia (74), además de posibilitar la utilización de los ácidos siálicos como fuente de carbono y energía. Han sido detectadas en especies de *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Pasteurella*, además de *Bacteroide fragilis*, *A. viscosus*, *V. cholerae*, *S. typhimurium*, *Erysipelotrhrix rhusiopathiae*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Bifidobacterium bifidus*, *H. parasuis* y *A. pyogenes* (20).

Vimr (73) clasificó las neuraminidasas bacterianas en dos familias, en función del peso molecular. La primera incluye neuraminidasas de bajo peso molecular, en torno a 40 kDa, y la segunda neuraminidasas con un peso molecular próximo a 80 kDa (grandes neuraminidasas). Se ha de citar la gran controversia que existe en cuanto a los pesos moleculares de las neuraminidasas, así en *P. multocida* han sido estimados pesos entre los 36 y 500 kDa (75, 76).

Algunas neuraminidasas son secretadas como proteínas solubles, en cambio, otras están asociadas a fracciones de membrana como la neuraminidasa de *Haemophilus parasuis* (77). En algunas bacterias se han identificado varias neuraminidasas, por ejemplo, *C. perfringens* tiene dos neuraminidasas una de las cuales tiene una masa molecular de 71 kDa y es secretada, y la otra con 43 kDa permanece en la célula (78).

Las neuraminidasas comparten una pequeña parte de la secuencia idéntica, 30%, además de tener dos secuencias conservadas, la primera denominada RIP/RLP (Arg-Ile/Leu-Pro) y la segunda caja-Asp (Ser/Thr-X-Asp-[X]-Gly-X-Thr-Trp/Phe; donde la X representa cualquier aminoácido). Estas secuencias pueden aparecer varias veces a lo largo de la cadena (79) Estudios realizados sobre varias

neuraminidasas bacterianas han revelado una superfamilia de enzimas con multidominios ensamblados alrededor del pliegue de hélice β (80, 81, 82). En la Figura 4 se observa la estructura de la neuraminidasa de *Salmonella thiphimurium* y en la Figura 5 se comparan las estructuras secundarias de varias neuraminidasas (20).



FIGURA 4. ***Estructura tridimensional de la neuraminidasa de S. typhimurium.*** *Se muestran las α-hélices, las cadenas β y la zona sin estructura secundaria definida (9). Pueden observarse las seis hojas que conforman la «hélice propulsora, (6-bladed beta-propeller)».*

Mecanismo enzimático

El término *N*-acetilneuraminosil glicohidrolasa, también sialidasa o neuraminidasa, incluye un gran número de enzimas cuya frecuencia y cuantía de sustratos específicos indica su importancia en el metabolismo de los ácidos siálicos (70, 83, 84, 85).

a) Especificidad anomérica. Las sialidasas liberan los ácidos siálicos que se encuentran unidos por enlaces α-glicosídicos en los sialocompuestos (86). En la naturaleza, los ácidos siálicos se encuentran en sialoconjugados en conformación α-glicosídica con la

excepción del CMP-Neu5Ac que es un β-glicósido por lo que este último compuesto no es un sustrato para las neuraminidasas.

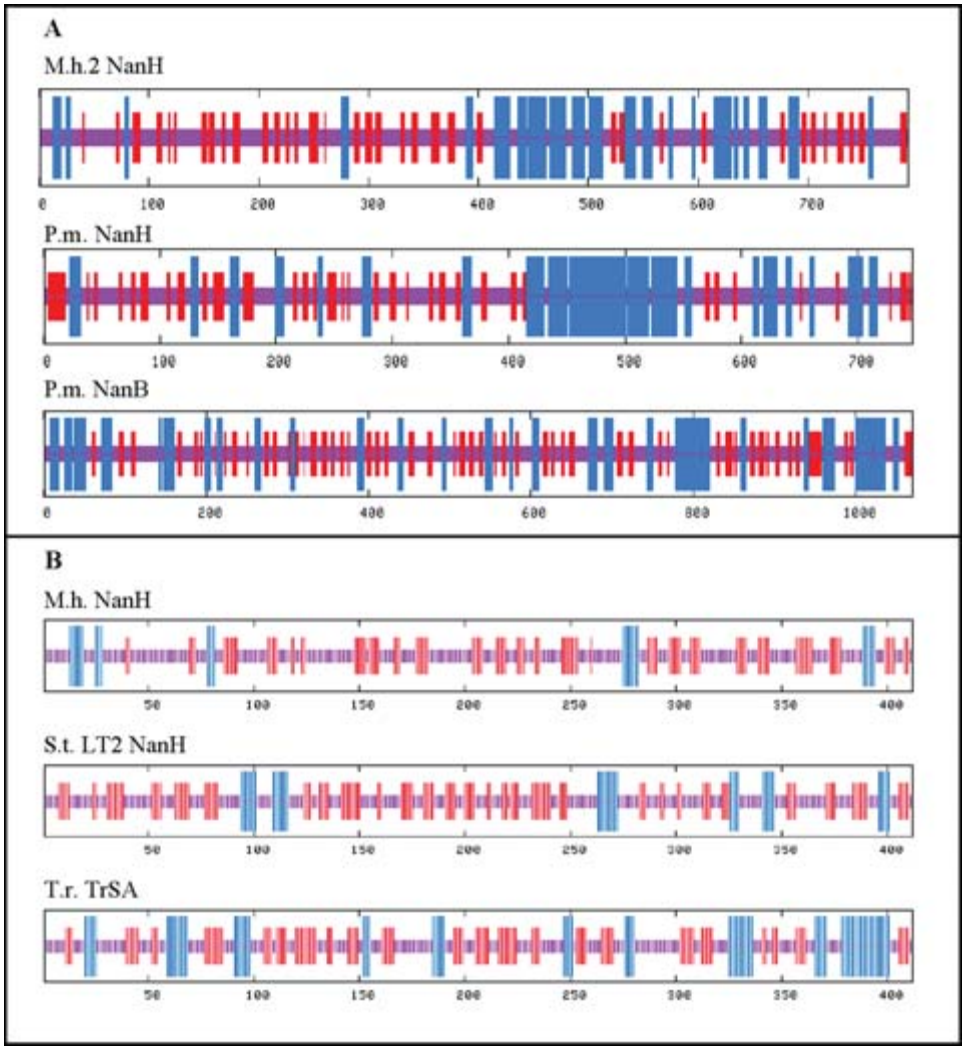


FIGURA 5. ***Predicción de la estructura secundaria de la neuraminidas (NanH) de M. haemolytica 2 mediante el método GOR IV. A)*** *Comparación de la estructura secundaria de la neuraminidasa (NanH) de M. haemolytica 2 con las neuraminidasas NanH y NanB de P. multocida.* ***B)*** *Comparación de la estructura secundaria de la neuraminidasa de M. haemolytica 2 con las neuraminidasa NanH de S. typhimurium LT2 y TrSA de T. rangeli. Símbolos: hélice (■), lámina (■) y cola (■) (20).*

b) El grupo carboxilo. Las sialidasas requieren para su actividad catalítica que el ácido siálico del α-sialoglicoconjugado tenga un grupo carboxilo cargado negativamente. Por ejemplo, en el ácido colomínico, los ésteres internos que se forman entre el grupo carboxilo y los grupos hidroxilo C7 o C9 impiden la acción de las sialidasas (87) lo cual puede ser evitado por saponificación (88). En este sentido, la sialidasa de *V. cholerae* tampoco hidroliza los metil ésteres de los ácidos siálicos que se encuentran en las glicoproteínas existentes en la secreción de la glándula submaxilar del ganado bovino (84). También es conocido que la reducción de la función carboxilo a alcohol primario y la preparación de la benzil-α-*N*-acetil-D-nonulosamina o el correspondiente II^3Neu5AcLac derivado inhibe la acción de las sialidasas de mamíferos, de virus y de bacterias (89).

c) *N*-sustitución. La naturaleza de los *N*-sustituyentes en los glicósidos de ácidos siálicos tiene una marcada influencia en la velocidad de hidrólisis de las sialidasas. Las modificaciones de los *N*-sustituyentes para originar residuos pequeños como el ácido *N*-formilneuramínico (90) o grandes como el ácido *N*-propionilneuramínico (14) y el ácido *N*-carbobenzoxineuramínico (91) producen una disminución en el grado de hidrólisis de los glicósidos de los ácidos *N*-formil y *N*-propionil neuramínico, y una inhibición total en los *N*-carbobenzoxi derivados.

d) *O*-sustitución. En la mayoría de las sialidasas se ha observado una disminución de la velocidad de hidrólisis de los enlaces en los que se encuentran implicados ácidos siálicos *O*-acetilados (92). La acetilación del grupo hidroxilo del C4 de la molécula de ácido siálico ha demostrado el bloqueo en la acción de las sialidasas. Las sialidasas virales son capaces de liberar cantidades bajas, pero significativas, de ácidos siálicos 4-*O*-acetilados a diferencia de lo que ocurre con las sialidasas de cerebro, corazón e hígado humanas o las de hígado de caballo (92).

e) Longitud de las cadenas laterales. La influencia de las cadenas laterales (C7 a C9) de la molécula de ácido siálico en la acción de las sialidasas ha sido demostrada, de modo que el progresivo acortamiento de la cadena permite una disminución en la velocidad de la hidrólisis de las sialidasas (93, 94). Se ha observado, en algunos casos, la resistencia a la hidrólisis por las sialidasas de aquellos

enlaces en los que los ácidos siálicos se encuentran en cadenas ramificadas en oligosacáridos.

f) Influencia de la fracción no glicánica. Se ha observado que la fracción no glicánica de los sustratos sintéticos de las sialidasas no influye en la velocidad de hidrólisis de las enzimas de *V. cholerae* y del virus influenza (14). También es conocido que la introducción de una carga positiva en la fracción no glicánica conduce a un incremento de los valores de la Km en la sialidasa de *V. cholerae*. Algunos estudios han destacado la existencia de un centro hidrofóbico distinto del centro catalítico tanto en la sialidasa de *V. cholerae* como en la enzima de *C. perfringens* (14). Estas observaciones han sido apoyadas por estudios realizados con sialidasas de mamíferos, protozoos y bacterias en los que se observó que las enzimas que demostraban afinidad por el ácido *N*-(4-nitrofenil) oxámico (ligando muy hidrofóbico) también demostraban baja actividad sialidásica en sustratos sintéticos con fracciones no glicánicas hidrofóbicas, mientras que las enzimas que no tenían tal afinidad hidrolizaban los sustratos sintéticos rápidamente tanto si tenían como si no fracciones no glicánicas hidrofóbicas (95).

g) Enlaces glicosídicos. La presencia de enlaces α(2-3), α(2-6) y α(2-8) en diferentes carbohidratos ha suscitado una serie de cuestiones acerca de la especificidad de las sialidasas frente a diferentes enlaces glicosídicos. Se sabe que las sialidasas virales hidrolizan los enlaces α(2-3) a mayor velocidad que la que realizan sobre uniones α(2-6), mientras que la velocidad de hidrólisis de los enlaces α(2-8) es entre moderada y escasa en diferentes sialidasas víricas (83, 96). Las sialidasas bacterianas tienen especificidad glicosídica menos marcada que la existente en las enzimas virales, llegando sólo a ser significativa a concentraciones bajas de la enzima (70, 83, 96). En cuanto a las sialidasas de mamíferos no existen muchos estudios sobre estos aspectos, pero algunos resultados sugieren que existe el mismo tipo de especificidad (14). Posteriormente, estudios realizados sobre el trabajo de (83, 96) establecieron diferencias entre actividades sialidásicas virales en función de los diferentes enlaces existentes α(2-3) y α(2-6), y de la naturaleza de la cadena oligosacarídica en los sustratos.

h) pH óptimo. El pH óptimo de las sialidasas bacterianas y víricas se encuentra, generalmente, en el intervalo de valores de pH

entre 5 y 6. Las variaciones en el mismo, dependen de la naturaleza del sustrato (97) la naturaleza de la solución amortiguadora (839 y la fuerza iónica cuando se hidrolizan sustratos glicolipídicos (98).

i) Activadores e inhibidores. Diversos estudios han demostrado que algunas sialidasas requieren cationes divalentes, siendo el más efectivo el Ca^{2+}, para su actividad enzimática (83, 96). En el caso de la sialidasa de *V. cholerae* los iones Ca^{2+} influyen más en la estabilidad de la enzima que en la unión enzima-sustrato.

Los compuestos inhibidores de la enzima sialidasa pueden ser divididos en cuatro grupos: 1) compuestos naturales de alto peso molecular; 2) compuestos naturales de bajo peso molecular; 3) compuestos sintéticos y 4) iones inorgánicos y EDTA (14).

MECANISMOS DE SIALILACIÓN DE LA SUPERFICIE CELULAR EN MICROORGANISMOS

Los microorganismos que modifican sus superficies celulares con ácidos siálicos frecuentemente no son reconocidos como agentes extraños por el hospedador por lo que son capaces de evitar o inhibir la respuesta inmune (57). Se han descrito cuatro mecanismos de sialilación de la superficie celular en microorganismos (99).

Síntesis «de novo»

Como se ha citado anteriormente, la mayoría de las bacterias no son capaces de sintetizar ácidos siálicos. *E. coli* K1 y *N. meningitidis* fueron los primeros microorganismos en los que se demostró la síntesis de Neu5Ac desde metabolitos simples (ver Tabla II). Los genes que codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis, activación y polimerización de Neu5Ac están localizados en un fragmento de ADN de 17-19 kb que puede diferenciarse en tres regiones (100, 101).

TABLA II. ***Resumen del metabolismo de ácidos siálicos en microorganismos (56).***

Clase	Microorganismo	Ácido siálico	Referencia
1	La mayoría de las cepas *de E. coli* *V. cholerae* *S. enterica* *S. pneumoniae* *C. perfringens* *Viridans Streptococci* *B. fragilis* *Actynomices* *Otros*	Microorganismos que degradan, pero normalmente no sintetizan ni usan ácido siálico exógeno para decorar su superficie celular.	(19)
2	*S. agalactiae* *S. schenckii* *T. cruzi* *Paracoccidioides brasiliensis* *T. brucei* *Fonsecaea pedrosoi* *Endotrypanum spp.* *C. neoformans* *N. meningitidis* *C. albicans* *N. gonorrhoeae* *A. fumigatus* *Pneumocystis carinii*	Microorganismos que no degradan ácidos siálicos, pero existe biosíntesis desde metabolitos simples. En el caso de *gonococcus* se obtienen desde el hospedador, mientras que *T. cruzi* y *T. brucei* disponen del mecanismo de transglicosilación.	(103, 104)
3	*3H. influenzae* *P. multocida* *Otros Haemophilus, Actinobacillus y Pasteurella (HAP)* *C. diphtheriae*	Microorganismos capaces de degradar y obtener ácidos siálicos exógenos.	(108-110)
4	*E. coli K1 y K92* Algunas *S. enterica spp.* *M. haemolytica 2*	Microorganismos capaces de degradar y biosintetizar ácidos siálicos desde metabolitos simples.	(111)

«Donor scavenging»

El segundo mecanismo de sialilación de la superficie celular fue descubierto en algunas cepas de *gonococci* causantes de la enfermedad de transmisión sexual, gonorrea en humanos (102). Harry Smith y sus colaboradores en Birmingham (Reino Unido) observaron que algunas cepas de *N. gonorrhoeae* perdían la resistencia al suero humano tras resiembras en el laboratorio en medios de cultivo tradicionales (57). Esta pérdida de resistencia se restablecía cuando las cepas eran crecidas en suero, lo que sugiere que en éste se encontraba el factor limitante que hacía que las cepas perdieran su virulencia. Diversos ensayos demostraron que este factor era el compuesto CMP-Neu5Ac existente en el suero y que es el sustrato de una sialiltransferasa de la superficie celular de *N. gonorrhoeae*. Por tanto, *N. gonorrhoeae* utiliza este método de sialilación a partir de una sialiltransferasa extracelular (103, 104) (ver Tabla II) y de CMP-Neu5Ac existente en pequeñas cantidades como un constituyente normal en las secreciones humanas. Además, la sialiltransferasa gonococcal es homóloga a una sialiltransferasa de *N. meningitidis* relacionada con la sialilación del LOS, está asociada a membrana y expuesta a la superficie celular donde tiene acceso al CMP-Neu5Ac presente en el suero (105).

Trans-sialidasa

El tercer mecanismo de sialilación de la superficie celular fue propuesto, primero, para *Trypanosoma cruzi* (106) que expresa una sialidasa, pero no sintetiza ni cataboliza ácidos siálicos libres, y más tarde para *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei brucei*, *T. congolense* (107), y *Corynebacterium diphtheriae* (108). En estos casos, una(s) sialidasa(s) de la superficie que normalmente funciona en el sentido de la hidrólisis puede transferir ácidos siálicos teniendo como aceptor bien un residuo de una galactosa o bien *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc) terminal de lactosa o lactosamina respectivamente (108, 109, 110) (Ver Tabla II). Esta actividad sialiltransferásica de la sialidasa es tanto mayor que su actividad hidrolítica cuanto mayor sea la disponibilidad de aceptor galactosil. Este mecanismo hace que *T. cruzi* pueda sialilar la superficie celular del pará-

sito, las células que le rodean y los glicoconjugados del suero, utilizando los sialoglicoconjugados del hospedador como donadores de los restos de ácido siálico en lugar de utilizar el CMP-siálico.

«Precursor scavenging»

El mecanismo más reciente de sialilación de la superficie celular, «precursor scavenging», ha sido elucidado por análisis fenotípico de mutantes *nanA* de *H. influenzae*. Este microorganismo codifica una CMP-Neu5Ac sintetasa y al menos una sialiltransferasa, pero carece de los genes de biosíntesis de ácidos siálicos (111) (Tabla II). *H. influenzae* transporta ácidos siálicos desde el hospedador y bien los degrada a ManNAc y piruvato o bien los activa a CMP-ácido siálico para posteriormente sialiltransferirlos al LOS aceptor (57). Este mecanismo ha sido confirmado para *H. ducreyi*. En dicho estudio, los autores explican que las concentraciones fisiológicas de Neu5Ac en el hospedador son suficientes para completar la sialilación del LOS de esta cepa (112).

ÁCIDOS SIÁLICOS Y VIRULENCIA

La función e importancia de los restos de ácidos siálicos de los glicoconjugados bacterianos es bien conocida, la sialilación del núcleo oligosacaridico del lipolisacarido (LOS) influyen la susceptibilidad a la actividad bactericida presente en los antisueros y además actua sobre la activación del complemento. Los LOS de bacterias patógenas como *N. meningitidis, N. gonorrea, H. ducreiy, H. influenzae, Moxarella catarralis, Campylobacter yeyuni y Helicobacter pylori*, mimetizan los restos oligosacarídicos de los glicoesfingolípidos presentes en las células animales, además estos LOS son química y antigénicamente idénticos a las fracciones oligosacarídicas de algunos gangliósidos y de antígenos de grupos sanguíneos (113, 114, 115, 116, 117). Este mimetismo molecular por lo tanto tiene gran importancia en la patogenicidad de estas bacterias ayudándolas a evadir el sistema inmune de los animales. Wetzler *et al* (118) indican que los LOS sialilados de gonococos hacen a estos microorganismos resistentes a la acción bactericida del suero ya que los residuos de los

ácidos siálicos impiden la unión de los LOS a los anticuerpos presentes en el suero. En *N. gonorrea* se ha demostrado que la sialilación del lipopolisacárido (LPS) regula la entrada de la bacteria en la célula, así cuando el LPS contiene pocos residuos de Neu5Ac su transporte es muy eficiente pero se elimina fácilmente, sin embargo cuando el LPS está muy sialilado la bacteria entra con dificultad pero no es destruido por los anticuerpos (119).

Inzama *et al* (120) han demostrado que la sialilación de los LOS de *H. somnus* incrementa la resistencia de este patógeno a la acción bactericida de los anti-LOS del suero, por lo que la sialilación de los LOS puede considerarse un importante factor de virulencia para proteger a *H. somnus* contra el hospedador.

El LPS sialilado de *H. influenzae* es un factor de virulencia en esta bacteria y es interesante hacer notar que el microorganismo no sintetiza de novo ácidos siálicos sino que los secuestran del hospedador utilizando sus propias sialil-transferasas.

IMPORTANCIA BIOLÓGICA Y FISIOPATOLÓGICA DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS

La posición externa de los ácidos siálicos en glicoproteínas y gangliósidos, así como en membranas celulares externas tiene una gran importancia en biología celular. Así, estos monosacáridos ácidicos pueden interaccionar con los componentes de otras superficies celulares, sustancias extracelulares y efectores, lo que se evidencia por los múltiples eventos de reconocimiento celular en los que están implicados (73, 100, 121).

La presencia de ácidos siálicos en estructuras glicoproteicas les confieren naturaleza ácida y microheterogeneidad electroforética (122), aportándoles, además, una serie de propiedades específicas que en muchos casos les permiten actuar como receptores para micoplasmas (123, 124), lectinas vegetales y animales (125, 126), virus animales (125, 127), toxinas bacterianas (125, 128) e interferón (129). Asimismo, son responsables de la antigenicidad de determinados anticuerpos de grupos sanguíneos específicos (125), intervienen en interacciones célula a célula relacionadas con la diferenciación

celular y en el desarrollo organogénico (130, 131), participan en procesos de adhesión celular (132) y contribuyen a la alta viscosidad de las mucinas protectoras de endotelios (intestino, superficie de peces o huevos de rana entre otros).

Los gangliósidos son un grupo de glicoesfingolípidos que contienen en su molécula varios residuos glucídicos a los que se une uno o varios restos de ácidos siálicos en posición terminal. Por su localización en la capa externa de la membrana plasmática de las células de vertebrados, estos ácidos siálicos juegan un papel importante en la señal mediada por receptores (128) y en interacciones célula a célula (133, 134), y participan en la regulación del crecimiento celular y de algunos procesos celulares (135). En los tejidos neuronales se encuentran en concentraciones importantes (aproximadamente el 6% de los lípidos de la sustancia gris corresponden a este tipo de compuestos, siendo esta proporción diez veces superior a la existente en la sustancia blanca), estando involucrados, entre otros procesos, en la transmisión del impulso nervioso (136, 137, 138, 139).

Estas propiedades físico-químicas de los ácidos siálicos pueden ser moduladas por sustituyentes hidrofóbicos tales como grupos *O*-acetil u *O*-metil o por la hidroxilación de grupos *N*-acetil, aportando más propiedades hidrofílicas e incluso un lugar más lejano para el enlace glicosídico. La introducción de un grupo sulfato en los ácidos siálicos produce compuestos más ácidos. Estos ácidos siálicos con azufre se han encontrado en equinodermos (121). La carga negativa de los ácidos siálicos también contribuye al efecto anti-proteolítico de los mismos en glicoproteínas e inhibe la acción de algunas endoglicosidasas (4).

Todas estas funciones que desempeñan los ácidos siálicos pueden ser influenciadas por modificaciones químicas (Figura 6). Algunos ejemplos se citan a continuación:

a) La hidroxilación de Neu5Ac mejora la unión a algunos receptores, tales como CD22 humano y murino. En cambio, otros receptores como la sialoadhesina y la glicoproteína asociada a mielina (MAG) no toleran residuos *N*-glicolil (140). También es conocido que la hidroxilación favorece el ataque de algunos virus (141).

b) La *O*-acetilación favorece el ataque del virus influenza C y del virus de la hepatitis en ratón, a diferencia de la 9-*O*-acetilación

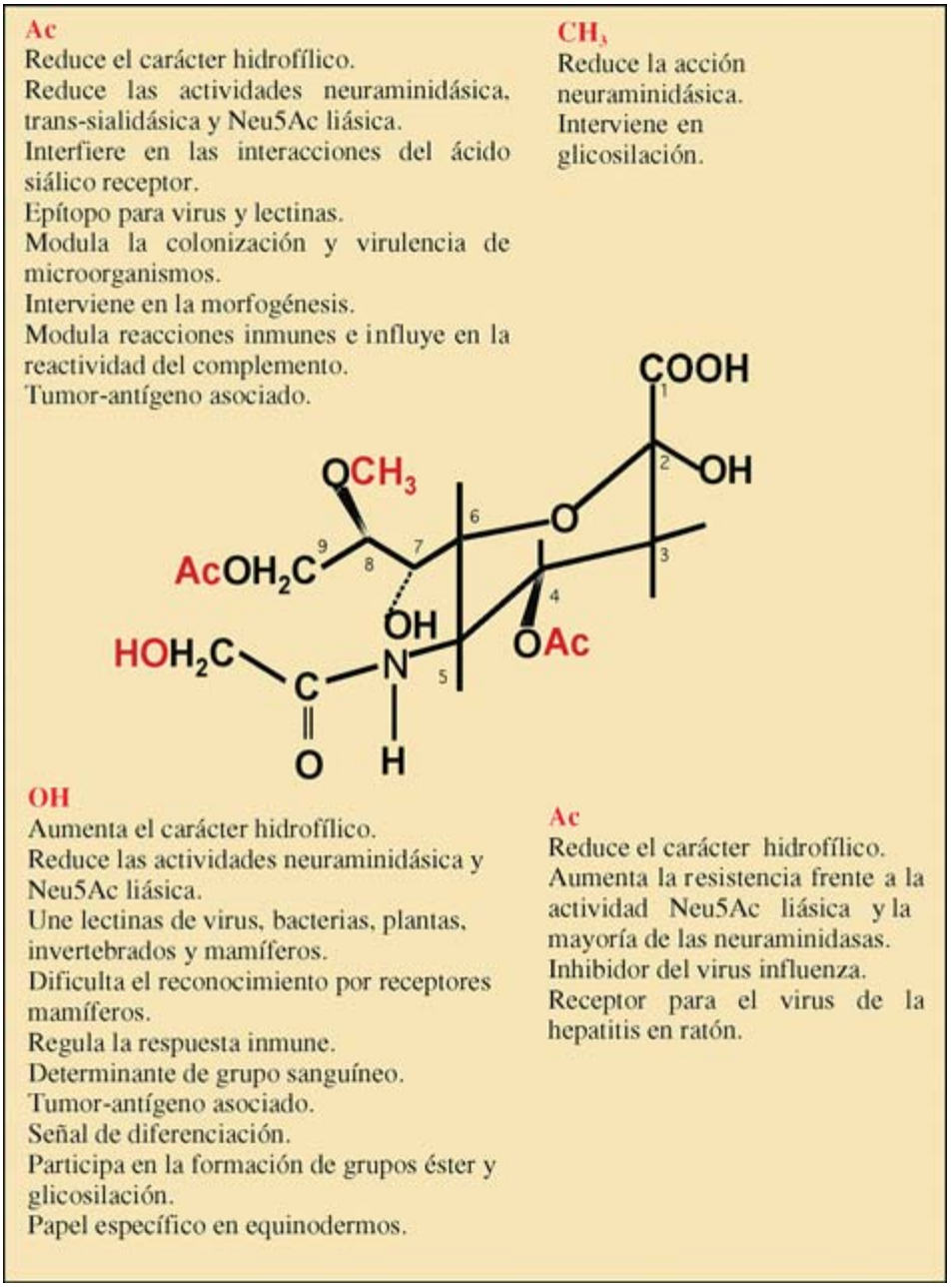


FIGURA 6. ***Importancia biológica de los sustituyentes de los ácidos siálicos (48).***

que previene el ataque de los virus influenza A y B, así como los parásitos de la malaria (40).

c) La interacción receptor-ligando, implicada en la colonización de *Helicobacter pylori*, agente causante de enfermedades gástricas, puede ser inhibida por ligandos solubles, oligosacáridos sialilados y glicoproteínas como las presentes en la leche (142).

d) Es posible que una sialilación reversible junto con otras estructuras glicosiladas regule la adherencia celular y movilidad durante la embriogénesis y el crecimiento de células malignas (4, 143).

Se ha señalado la expresión de pequeñas cantidades de Neu5Gc, por ejemplo en gangliósidos presentes en tumores humanos (4). Sin embargo, en estos tejidos no se ha identificado actividad hidrosilasa por lo que se ha sugerido la posible procedencia de Neu5Gc de la dieta (141). Los gangliósidos, especialmente el GD3 con Neu5,9Ac_2 como azúcar terminal, han sido considerados antígenos asociados a tumores. Se ha observado un aumento en tumores de origen neuroectodermal (tumores de cerebro, mama o piel), pero también existe un aumento en tejido sano de crecimiento rápido (41).

Por todo ello, es obvio que los ácidos siálicos están implicados en múltiples procesos biológicos, presentando principalmente funciones estructurales y de protección, especialmente en las membranas celulares, y regulando las interacciones entre células y agentes infecciosos (48). En la Figura 6 se indica la función de los diferentes sustituyentes de la molécula de los ácidos siálicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por MEC: AGL2006-01257 y por Junta de Castilla y León LE-039-06.

BIBLIOGRAFÍA

(1) BLIX, G. (1936) Uber die kohlenhydratgruppen des submaxillaris mucins. *Z. Physiol. Chem.* 240: 43-54.
(2) KLENK, E. (1941) Neuraminsaure, das sapltproduct eines neuen gehirnlipoids. *Z. Physiol. Chem.* 268: 50-58.

(3) WOOSE, C. R.; KANDLE, R. O. Y WHEELIS, M. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.
(4) SCHAUER, R. Y KAMERLING, J. P. (1997) Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. En Glycoproteins II, vol. 11, pp 243-402 (Montreuil, J., Vliegenthart, J. F G., Schachter, H. eds), Elsevier, Amsterdam.
(5) WARREN, L. (1963) The distribution of sialic acid in nature. *Comp. Biochem. Physiol.* 10: 153-171.
(6) FOUQUET, J. P. (1972) Free sialic acids in the seminal vesicle secretion of the golden hamster. *J. Reprod. Fertil.* 28: 273-275.
(7) CORFIELD, A. P. Y SCHAUER, R. (1982) Occurence of Sialic Acids. En Sialic Acids, Chemistry, Metabolism and Function, pp 37-39 (Schauer, R. ed.), Springer-Verlag Viena -New York.
(8) MITSUOKA, C.; OHMORI, K.; KIMURA, N.; KANAMORI, A. Y KANNAGI, R. (1999) Regulation of selectin binding activity by cyclization of sialic acid moiety of carbohydrate ligands on human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 1597-1602.
(9) ZANETTA, J. P.; PONS, A.; IWERSEN, M.; MARILLER, C.; TIMMERMAN, P. Y SCHAUER, R. (2001) Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiol.* 11: 663-676.
(10) ROTH, J.; KEMPF, A.; REUTER, G.; SCHAUER, R. Y GEHRING, W. J. (1992) Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* 256: 673-675.
(11) MALYKH, Y. N.; KRISCH, B.; GERARDY-SCHAHN, R.; LAPINA, E. B.; SHAW, L. Y SCHAUER, L. (1999) The presence of N-acetylneuramic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*. *Glycoconj. J.* 16: 731-739.
(12) ANGATA, T. Y VARKI, A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem. Rev.* 102: 439-469.
(13) ZELENY, R.; KOLARICH, D.; STRASSER, R. Y ALTMANN, F. (2006) Sialic acid concentrations in plants are in the range of inadvertent contamination. *Planta.* 224: 222-227.
(14) CORFIELD, A. P. Y SCHAUER, R. (1982) Metabolism of Sialic Acids. En Sialic Acids, Chemistry, Metabolism and Function, pp 37-39 (Schauer, R. ed.), Springer-Verlag Viena-New York.
(15) BARRY, G. T. Y GOEBEL, W. F. (1957) Colominic acid a substance of bacterial origin related to sialic acid. *Nature.* 179: 206.
(16) ANNUNZIATO, P. W.; WRIGHT, L. F.; VANN, W. F. Y SILVER, R. P. (1995) Nucleotide sequence and genetic analysis of the neuD and neuB genes in region 2 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol. J.* 177: 321-319.
(17) EDWADS, U.; MULLER, A.; HAMMERSCHMIDT, S.; GERARDY-SCHAHN, R. Y FROSCH, M. (1994) Molecular analysis of the biosynthesis pathway of the alpha-2,8-polysialic acid capsule by *Neisseria menigitidis* serogroup B. *Mol. Microbiol.* 14: 141-149.
(18) LINTON, D.; KARLYSEV, A. V.; HITCHEN, P. G.; MORRIS, H. R.; DELL, A.; GREGSON, N. A. Y WREN, B. W. (2000) Multiple N-acetyl neuraminic synthetase (neuB)

genes in *Campylobacter jejuni*: identification and characterization of the gene involved in sialylation of lipo-oligosaccharide. *Mol. Microbiol.* 35: 1120-1134.

(19) PLUMBRIDGE, J. Y VIMR, E. (1999) Convergent pathways for utilization of the amino sugars N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 47-54.

(20) FERNÁNDEZ V. (2007) Estudios Moleculares sobre la neuraminidasa de *Mannheimia haemolytica* 2 Secretariado de Publicaciones ,Universidad de León , León, España

(21) MASSON, L. Y HOLBEIN, B. E. (1983) Physiology of sialic acid capsular polysaccharide synthesis in serogroup B of *N. meningitidis*. *J. Bacteriol.* 54: 728-736.

(22) ADLAM, C.; KNIGHTS, J. M.; MUGRIDGE, A.; WILLIAMS, J. M. Y LINDON, J. C. (1987) Production of colominic acid by *P. haemolytica* serotipe A2 organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 42: 23-25.

(23) DEVI, S. J.; SCHNEERSON, R.; EGAN, W.; VANN, W. F.; ROBBINS, J. B. Y SHILOACH, J. (1991) Identity between polysaccharide antigens of *Moraxella nonliquefaciens,* group B *Neisseria meningitidis and Escherichia coli* K1 (non-O acetylated). *Infect. Immun.* 59: 732-736.

(24) TSVETKOV, Y. E.; SHASHKOV, A. S.; KNIREL, Y. A. Y ZAHRINGER, U. (2001) Synthesis and identification in bacterial lipopolysaccharides of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-D-glycero-D-galacto- and -D-glycero-D-talo-non-2-ulosonic acids. *Carbohydr. Res.* 12: 233-237.

(25) GIL-SERRANO, A. M.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; TEJERO-MATEO, P.; ESPARTERO, J. L.; MENÉNDEZ, M.; CORZO, J.; RUIZ-SAINZ, J. E. Y BUENDÍA-CLAVERIA, A. M. (1999) Structural determination of a 5-acetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-7-(3-hydroxybutyramido)-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid-containing homopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* HH103. *Biochem. J.* 342: 527-535.

(26) MULDOON, J.; SAHSHKOV, A. S.; SENCHENKOVA, S. N.; TOMSHICH, S. V.; ROMANDROVA, N. A.; KNIREL, Y. A. Y SAVAGE, A. V. (2001) Structure of an acidic polysaccharide from a marine bacterium *Pseudoaltromonas distincta* KMM 638 containing 5-acetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-7-formamido-L-glycero-L-manno-nonulosonic acid. *Carbohydr. Res.* 330: 231-239.

(27) KNIREL, Y. A.; GROSSKURTH, H.; HELBIG, J. H. Y ZAHRINGER, U. (1995) Structures of decasaccharide and tridecasaccharide tetraphosphates isolated by strong alkaline degradation of O-deacylated lipopolysaccharide of *Pseudomonas fluorescens* strain ATCC 49271. *Carbohydr. Res.* 279: 215-226.

(28) HUNT, L. A. Y SUMMERS, D. F. (1976) Glycosilation of vesicular stomatis virus proteins with Hela cell membranes and released virus. *J. Virol.* 20: 646-657.

(29) SHIRAISHI, H.; KOHOMA, T.; SHIPAISHI, R. Y ISHIDA, N. (1977) Carbohydrate composition of hepatitis B surface antigen. *J. Gen. Virol.* 36: 207-210.

(30) LENARD, J. Y COMANS, R. W. (1974) The membrane structure of lipid-containig viruses. *Biochim. Biophys Acta.* 344: 51-94.

(31) BRAVO, I. G. Y REGLERO, A. (2003) The cytidilyltransferases family: Properties, kinetics, genomic and phylogeny. *Recent. Res. Devel. Biochem.* 4: 223-254.

(32) BRAVO, I. G.; GARCÍA-VALLVÉ, S.; ROMEO, A. Y REGLERO, A. (2004) Prokaryotic origin of cytidylyltransferases and α-ketoacid synthases. *Trends in Microbiol.* 12: 120-128.

(33) VARKI, A. (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiol*. 2: 25-40.
(34) TRAVING, C. Y SCHAUER, R. (1998) Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 1330-1349.
(35) TANNER, M. E. (2005) The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Biorg. Chem.* 33: 216-228.
(36) TERADA, T.; KITAZUME, S.; KITAJIMA, K.; INOUE, S.; ITO, F.; TROY, F. A. E INOUE, Y. (1993) Synthesis of CMP-deaminoneuraminic acid (CMP-KDN) using the CTP: CMP-3-deoxynonulosonate cytidylyltransferase from rainbow trout testis. Identification and characterization of a CMP-KDN synthetase. *J. Biol. Chem.* 268: 2640-2648.
(37) ANGATA, T.; NAKATA, D.; MATSUDA, T.; KITAJIMA, K. Y TROY, F. A. II (1999) Biosynthesis of KDN (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid). Identification and characterization of a KDN-9-phosphate synthetase activity from trout testis. *J. Biol. Chem.* 274: 22949-22956.
(38) HARDUIN-LEPERS, A.; STOKES, D. C.; STEELANT, W. F.; SAMYN-PETIT, B.; KRZEWINSKI-RECCHI, M. A.; VALLEJO-RUIZ, V.; ZANETTA, J. P.; AUGE, C. Y DELANNOY, P. (2001) Cloning, expression and gene organization of a human Neu5Ac alpha 2-3Gal beta 1-3GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase: hST6GalNAcIV. *Biochem. J.* 352: 37-48.
(39) ACHYUTHAN, K. E. Y ACHYUTHAN, A. M. (2001) Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-α-sialidases (neuraminidases). *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 129: 29-64.
(40) SCHAUER, R.; REUTER, G. Y STOLL, S. (1988) Sialate O-acetylesterases: key enzymes in sialic acid catabolism. *Biochimie.* 70: 1511-1519**.**
(41) SCHAUER, R.; SCHMID, H.; POMMERENCKE, J.; IWERSEN, M. Y KOHLA, G. (2001) Metabolism and role of *O*-acetylated sialic acids. En Molecular Immunology of Complex Carbohydrates 2, Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 491, pp 325-342 (Wu, A. M. ed.), Kluver Academics, Plenum Publishers, New York.
(42) TAUBER, R.; REUTTER, W. Y GEROK, W. (1987) Role of membrane glycoproteins in mediating trophic reponses. *Gut*. 28: 71-77.
(43) TAUBER, R.; PARK, C. S.; BECKER, R.; GEYER, R. Y REUTTER, W. (1989) Rapid intramolecular turnover of N-linked glycans in plasma membrane glycoproteins. Extension of intramolecular turnover to the core sugars in plasma membrane glycoproteins of hepatoma. *Eur. J. Biochem.* 186: 55-62.
(44) KREISEL, W.; HILDEBRANDT, H.; MOSSNER, W.; TAUBER, R. Y REUTTER, W. (1993) Oligosaccharide reprocessing and recycling of a cell surface glycoprotein in cultured rat hepatocytes. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 374: 255-263.
(45) SCHAUER, R.; SOMMER, U.; KRUGER, H.; VAN UNEN, H. Y TRAVING, C. (1999) The terminal enzymes of sialic acid metabolism: acylneuraminate pyruvate-lyases. *Biosci. Rep.* 19: 373-83.
(46) SCHAUER, R.; REUTER, G.; MUHLPFORDT, H.; ANDRADE, A. F. Y PEREIRA, M. E. (1983) The occurrence of N-acetyl- and N-glycolylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 364: 1053-1057.
(47) ENGSTLER, M.; SCHAUER, R. Y BRUN, R. (1995) Distribution of developmentally regulated trans-sialidases in the Kinetoplastida and characterization of a

shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*. *Acta Trop*. 59. 117-29.
(48) SCHAUER, R. (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj. J.* 17: 489-499.
(49) ZAPATA, G.; CROWLEY, J. M. Y VANN, W. F. (1992) Sequence and expresion of the *Escherichia coli* NeuC gene product. *J. Bacteriol.* 174: 315-319.
(50) PETERSEN, M.; FESSNER, W.; FROSCH, M. Y LUNEBERG, E. (2000) The siaA gene involved in capsule polisaccharide biosynthesis of *Neisseria meningitidis* B codes for N-acylglucosamine-6-phosphate 2-epimerase activity. *FEMS Microbiol. Lett*. 184: 161-164.
(51) DAINES, D. A.; WRIGHT, L. F.; CHAFFIN, D. O.; RUBENS, C. E. Y SILVER, R. P. (2000) NeuD plays a role in the synthesis of sialic acid in *Escherichia coli* K1. *FEMS Microbiol. Lett*. 189: 281-284.
(52) SWARTLEY, J. S. Y STEPHENS, D. S. (1994) Identification of a genetic locus involved in the biosynthesis of N-acetyl-D-mannosamine, a precursor of the (alpha 2?8)-linked polysialic acid capsule of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 176: 1530-1534.
(53) RODRIGUEZ-APARICIO, L. B.; FERRERO, M. A. Y REGLERO, A. (1995) N-acetyl-D-neuraminic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 occurs through condensation of N-acetyl-D-mannosamine and pyruvate. *Biochem. J.* 308: 501-505.
(54) FERRERO, M. A.; REGLERO, A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; ORDÁS, R. Y RODRIGUEZ-APARICIO, L. B. (1996) N-acetyl-D-neuraminic acid lyase generates the sialic acid for colominic acid biosynthesis in *Escherichia coli* K1. *Biochem. J*. 317: 157-165.
(55) BROSSMER, R.; ROSE, U.; KASPAR, D.; SMITH, T. L.; GRASMUK, H. Y UNGER, F. M. (1980) Enzymic synthesis of 5-acetamido-9-azido-3,5,9-trideoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonic acid, a 9-azido-9-deoxy derivative of N-acetylneuraminic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 1282-1289.
(56) REGLERO, A.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, V.; GUTIÉRREZ, C. Y BRAVO, I. G. (2005) N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in bacteria: occurence, metabolism and associated virulence. *Current Topic in Biochem. Research.* 7: 17-28.
(57) VIMR, E. R. Y LICHTENSTEIGER, C. (2002) To sialylate, or not sialylate: that is the question. *Trends in Microbiol.* 10: 254-257.
(58) POPENOE, E.A. Y DREW, R.M. (1957) The action of an enzyme of *Clostridium perfringens* on orosomucoid. *J. Biol. Chem.* 228: 673-683
(59) BRUG, J.; ESSER, R.J. Y PAERELS, G.B. (1959) The enzymic cleavage of N-acetylneuraminic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 33: 241-242.
(60) UCHIDA, Y.; TSUKADA, Y. Y SUGIMORI, T. (1984) Purification and properties of N-acetylneuraminate lyase from . *J. Biochem.* 96: 507-522.
(61) DEIJL, C.M. Y VLIEGENTHART, J.F. (1983) Configuration of substrate and products of N-acetylneuraminate pyruvate-lyase from *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 668-674
(62) LILLEY, G.G.; BARBOSA, J.A.R.G., AND PEARCE, L.A. (1998) Expression in *Escherichia coli* of the putative N-acetylneuraminate lyase gene (nanA) from *Haemophilus influenzae*: overproduction, purification, and crystallization. *Protein Expression and Purification*. 12: 295-304.

(63) IZARD,T.; LAWRENCE, M. C.; MALBY, R. L.; LILLEY, G. AND COLMAN, P. M. (1994) The three-dimensional structure of N-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli*. *Structure*. 2: 361-369.
(64) Vimr, E. R., and Troy, F. A., (1985) Identification of an inducible catabolic system for sialic acids (nan) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 164: 845-853.
(65) MURAKAMI, M.; IKEDA, K. Y ACHIWA, K. (1996) Chemoenzymatic synthesis of neuraminic acid analogs structurally varied at C-5 and C-9 as potential inhibitors of the sialidase from influenza virus. *Carbohydr Res*. 280: 101-110.
(66) HIRST, G.K. (1941) The agglutination of red cells by allantoid fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*. 94: 22-23.
(67) BURNET, F. M.; MCCREA, J. F. Y STONE, J. D. (1946) Modification of human red cells by virus action. I. The receptor gradient for virus action in human red cells. *Br. J. Exp. Pathol*. 27: 228-236.
(68) HEIMER, P. Y MEYER, K. (1956) Studies on sialic acid of submaxillary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42: 728-734.
(69) GOTTSCHALK, A. (1957) Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochem. Biophys. Acta*. 23: 645-646.
(70) ROSENBERG, A. Y SCHENGRUND, C. L. (1976) Biological Roles of Sialic Acid. Plenum Press, New York-London.
(71) CABEZAS, J. A.; REGLERO, A. Y CALVO, P. (1983) Glycosidases (fucosidases, galactosidases, glucosidases, hexoaminidases and glucuronidase from some molluscs and vertebrates, and neuraminidase from virus). *Int. J. Biochem*. 15: 243-259.
(72) CABEZAS, J. A. (1991) Some questions and suggestions on the type references of the official nomenclature (IUB) for sialidase(s) and endosialidase. *Biochem. J*. 278: 311-312.
(73) VIMR, E. R. (1994) Microbial sialidases. Does bigger always mean better? *Trend Microbiol*. 2: 271-277.
(74) CORFIELD, A. P. (1992) Bacterial sialidases-roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiol*. 2: 509-521.
(75) IFEANYI, F. G. Y BAILIE, W. E. (1992) Passive protection of mice with antiserum to neuraminidase from *Pasteurella multocida* serotype A:3. *Vet. Res. Commun*. 16: 97-105.
(76) STRAUS, D. C.; JOLLEY, W. L. Y PURDY, C. W. (1996) Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun*. 64: 1446-1449.
(77) LICHTENSTEIGER, C. A. Y VIMR, E. R. (1997) Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiol. Lett*. 152: 269-274.
(78) ROGGENTIN, P.; KLEINEIDAM, R. Y SCHAUER, R. (1995) Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*. 376: 569-575.
(79) ROGGENTIN, P.; ROTHE, B.; KAPER, J. B.; GALEN, J.; LAWRISUD, L., VIMR, E. R. Y SCHAUER, R. (1989) Conserved sequences in bacterial and viral sialidases. *Glycoconj. J*. 6: 349-353.
(80) CRENNELL, S. J.; GARMAN, E. F.; LAVER, W. G., VIMR, E. R. Y TAYLOR, G. L. (1993) Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimu-*

rium LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 9852-9856.
(81) CRENNELL, S. J.; GARMAN, E. F.; LAVER, W. G.; VIMR, E. R. Y TAYLOR, G. L. (1994) Crystal structure of a *Vibrio cholerae* sialidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain. *Structure*. 2: 535-544.
(82) GASKELL, A.; KENNE, S. J. Y TAYLOR, G. L. (1995) The three domains of a bacterial sialidase: a β-propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. *Structure*. 3: 1197-1205.
(83) DRZENIEK, R. (1972) Viral and bacterial neuraminidases, *Topics Microbiol. Immunol.* 59: 35-74
(84) GOTTSCHALK, A. Y DRZENIEK, R. (1972) Neuraminidase as tool for structural analysis. En Glycoproteins: their composition, structure, and function, vol 5A, pp 381-402 (Gottschalk, A. ed.), Elsevier, North Holland Publishing Co., Amsterdam.
(85) CORFIELD, A. P.; VEH, R. W.; WEMBER, M.; MICHALSKI, J. C. Y SCHAUER, R. (1981) The release of N-acetyl- and N-glycolyl-neuraminic acid from soluble complex carbohydrates and erythrocytes by bacterial, viral and mammalian sialidases. *Biochem. J.* 197: 293-299.
(86) GOTTSCHALK, A. (1958) Neuraminidase; its substrate and mode of action. *Adv. Enzymol.* 20: 135-146.
(87) AMINOFF, D. (1961) Methods for quantitative estimation of N-acetilneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.* 81: 384-391.
(88) MCGUIRE, E. J. Y BLINKEY, S. E. (1964) The structure and chemistry of colominic acid. *Biochemistry* 3: 247-251.
(89) BROSSMER, R. Y HOLMQUIST, L. (1971) On the specificity of neuraminidase. Synthesis of 5-N-acetyl-D-nonulosamine (5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonamide) and their methyl and benzyl-ketosides. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 352: 1715-1719.
(90) BROSSMER, R. Y NEBELIN, E. (1969) Synthesis of N-formyl and N-succinyl-D-neuraminic acid on the specificity of neuraminidase. *FEBS Lett*. 4: 335-336.
(91) FAILLARD, H.; FERREIRA DO AMARAL, C. Y BLOHM, M. (1969) Studies on the enzymatic specificity of neuraminidase and N-acyl-neuraminatelyase in relation to N-substitution. *Hoppe-Seyler´s Z. Phylsiol. Chem.* 350. 798-802.
(92) SCHAUER, R. Y FAILLARD, H. (1968) Action specificity of neuraminidase. The action of bacterial neuraminidase on isomeric N,O-diacetylneuraminic acid glycosides in the submaxillary mucin of horse and cow. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 349: 961-968.
(93) SUTTAJIT, M. Y WINZLER, R. (1971) Effect of modification of N-acetylneuraminic acid on the binding of glycoproteins to influenza virus and on susceptibility to cleavage by neuraminidase. *J. Biol. Chem.* 246. 3389-3404.
(94) VEH, R. W.; CORFIELD, A. P.; SANDER, M. Y SCHAUER, R. (1976) Neuraminic acid-specific modification and tritium labelling of gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta0* 486: 145-160.
(95) BROSSMER, R.; KEILICH, G. Y ZIEGLER, D. (1977) Inhibition studies on *Vibrio cholerae* neuraminidase. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 358: 391-396.

(96) DRZENIEK, R. (1973) Substrate specificity of neuraminidases. *Histochem. J.* 5: 271-290.
(97) UCHIDA, Y.; TSUKADA, Y. Y SUGIMORI, T. (1979) Enzymatic properties of neuraminidases from *Arthrobacter urefaciens*. *J. Biochem.* 86: 1573-1585.
(98) SAITO, M.; SUGANO, K. Y NAGAI, Y. (1979) Action of *Arthrobacter ureafaciens* sialidase on sialoglycolipid substrates. Mode of action and highly specific recognition of the oligosaccharide moiety of ganglioside GM1. *J. Biol. Chem.* 254: 7845-7854.
(99) VIMR, E. R.; KALIVODA, A. K.; DSEZO, L. E. Y STEENBERGEN, M. S. (2004) Diversity of Microbial Acid Metabolism. *Microbiol. Mol. Biol.* 68; 132-153.
(100) REGLERO, A.; APARICIO-RODRIGUEZ, L. B. Y LUENGO, J. M. (1993) Polysialics acids. *Int. J. Biochem.* 11: 1517-1527.
(101) WHITFIELD, C. (2006) Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 39-68.
(102) PARSONS, N. J.; PATEL, V.; TAN, E. L.; ANDRADE, J. R.; NAIRN, C. A.; GOLDNER, M.; COLE, J. A. Y SMITH, H. (1988) Cytidine 5'-monophospho-N-acetyl neuraminic acid and a low molecular weight factor from human blood cells induce lipopolysaccharide alteration in gonococci when conferring resistance to killing by human serum. *Microl. Patol.* 5. 303-309.
(103) ALVIANO, C. S.; TRAVASSOS, L. R. Y SCHAUER, R. (1999) Sialic acids in fungi: a minireview. *Glycoconj. J.* 16: 545-554.
(104) BUSCHIAZZO, A.; TAVARES, G. A.; CAMPETELLA, O.; SPINELLI, S.; CREMONA, M. L.; PARIS, G.; AMAYA, M. F.; FRASCH, C. C. Y ALZARI, P. M. (2000) Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. *EMBO J.* 19: 16-24.
(105) SHELL, D. M.; CHILES, L.; JUDD, R. C.; SEAL, S. Y REST, R. F. (2002) The *Neisseria* lipooligosaccharide-specific alpha-2, 3-syaliltransferase is a surface-exposed outer membrane protein. *Infect. Immun.* 70: 3744-3751.
(106) PREVIATO, J. O.; ANDADE, A. F. Y PESSOLANI, M. C. (1985) Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 85-96.
(107) TIRALONGO, E.; SCHRADER, S., LANGE, H.; LEMKE, H.; TIRALONGO, J. Y SCHAUER R. (2003) Two trans-sialidase forms with different sialic acid transfer and sialidase activities from *Trypanosoma congolense*. *J. Biol. Chem.* 278: 23301-23310.
(108) MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. Y ANDRADE, A. F. B. (1998) Trans-sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol Lett.* 168: 167-172.
(109) FULLER, T. E.; KENNEDY, M. J. Y LOWERY, D. E. (2000) Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemis mouse using signature-tagged mutagenesis. *Microb. Pathog.* 29: 25-38.
(110) VIMR, E. R.; LICHTENSTEIGER, C. Y STEENBERGEN, S. (2000) Sialic acid metabolism's dual function in *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* 36: 1113-1123.
(111) RINGENBERG, M.; LICHTENSTEIGER, C. A. Y VIMR, E. R. (2001) Redirection of sialic acid metabolism in genetically engineered *Escherichia coli*. *Glycobiol.* 11: 533-539.

(112) SCHILLING, B.; GOON, S.; SAMUELS, N. M.; GAUCHER, S. P.; LEARY, J. A.; BERTOZZI, C. R. Y GIBSON, B. W. (2001) Biosynthesis of sialylated lipooligosaccharides in *Haemophilus ducreyi* is dependent on exogenous sialic acid and not mannosamine. Incorporation studies using N-acylmannosamine analogues, N-glycolylneuraminic acid, and 13C-labeled N-acetylneuraminic acid. *Biochemistry*. 40: 12666-12677.

(113) TSAI, C. M. (2001) Molecular mimicry of host structures by lipooligosaccharides of *Neisseria meningitidis*: characterization of sialylated and nonsialylated lacto-N-neotetraose (Galbeta1-4GlcNAcbeta1-3Galbeta1-4Glc) structures in lipooligosaccharides using monoclonal antibodies and specific lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 491: 525-442.

(114) GILBERT, M.; BRISSON, J.-R.; KARWASKI, M.-F.; MICHNIEWICZ, J.; CUNNINGHAM, A.-M.; WU, Y.; YOUNG, N.M. AND WAKARCHUK, W.W. (2000) Biosynthesis of ganglioside mimics in Campylobacter jejuni OH4384. Identification of the glycosyltransferase genes, enzymatic synthesis of model compounds, and characterization of nanomole amounts by 600-mhz (1)h and (13)c NMR analysis. *J Biol Chem*. 275: 3896-3906.

(115) MORAN, A.P.; PRENDERGAST, M.M. AND APPELMELK, B.J. (1996) Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16: 105-115.

(116) MANDRELL, R.E.; MCLAUGHLIN, R.; KWAIK, Y.A.; LESSE, A.; YAMASAKI, R.; GIBSON, B.; SPINOLA, S.M. AND APICELLA, M.A. (1992) Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids, and some LOS are sialylated. *Infect. Immun.* 60: 1322-1328.

(117) YUKI, N.; TAKI, T.; INAGAKI, F.; KASAMA, T.; TAKAHASI, M.; SAITO, K.; HANDA, S. Y MIYAKAT, T. (1993) A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillian-barré syndrome has a G_{M1} ganglioside-linde structure. *J. Exp. Med.* 178: 1771-1775.

(118) WETZLER, L.M.; BARRY, K.; BLAKE, M.S. AND GOTSCHLICH, E.C. (1992) Gonococcal lipooligosaccharide sialylation prevents complement-dependent killing by immune sera. *Infect. Immun*. 60: 39-43.

(119) VAN PUTTEN, J.P.M. (1993) Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J.* 12: 4043-4051.

(120) INZANA, T.J.; GLINDEMANNM G.; COX, A.D.; WAKARCHUK, W. Y HOWARD, M.D. (2002) Incorporation of N-acetylneuraminic acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infect. Immun.* 70: 4870-4879.

(121) SCHAUER, R. (2004) Victor Ginsburg's influence on my research of the role of sialic acids in biological recognition. *Arch. Biochem. Biophys.* 426: 132-141.

(122) GOTTSCHALK, A. (1969) Biosynthesis of glycoproteins and its relationship to heterogeneity. *Nature.* 222: 452-454.

(123) RAZIN, S.; KAHANE, I.; BANAI, M. Y BREDT, W. (1981) Adhesions of mycoplasmas to eukaryotic cells. *Ciba Found Symp.* 80: 98-118.

(124) LOOMES, L. M.; UEMURA, K.; CHILDS, R. A.; PAULSON, J. C.; HOUNSELL, E. F.; TAYLOR-ROBINSON, D. Y FEIZI, T. (1984) Erythrocyte receptors for *Mycoplasma*

pneumoniae are sialylated oligosaccharides of I antigen type. *Nature*. 307: 5951-5963.
(125) SCHAUER, R. (1982) Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem*. 40: 131-234.
(126) IMBERTY, A.; GAUTIER, C.; LESCAR, J.; PEREZ, S.; WYNS, L. Y LORIS, R. (2000) An unusual carbohydrate oligosaccharides. *J. Biol. Chem*. 23: 17541-17548.
(127) HARDUIN-LEPERS, A.; RECCHI, M. A. Y DELANNOY, P. (1995) «1994, The year of sialyltransferases». *Glycobiol*. 5: 741-758.
(128) EMSLE, P.; FOTINOU, C.; BLACK, I.; FAIRWEATHER, N. F.; CHARLES, I. G.; WATTS, C., HEITT, E. Y ISAACS, N. W. (2000) The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. *J. Biol. Chem*. 12: 8889-8894.
(129) ANKEL, H.; KRISHNAMURTI, C.; BESANCON, F.; STEFANOS, S. Y FALCOFF, E. (1980) Mouse fibroblast (type I) and inmune (type II) interferons: pronounced differences in affinity for gangliosides and antiviral and antigrowth effects on mouse leukemia L-1210R cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 77: 2528-2532.
(130) LACKIE, P. M.; ZUBER, C. Y ROTH, J. (1994) Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation*. 57: 119-131.
(131) MURAKAMI, S.; SEKI, T.; RUTISHAUSER, U. Y ARAI, Y. (2000) Enzymatic removal of polisialic acid from neural cell adhesion molecule perturbs the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing chick forebrain. *J. Comp. Neurol*. 420: 171-181.
(132) SCHEMELL, E.; SLIFE, C. W.; KUHLENSCHMID, M. S. Y ROSEMAN, S. (1982) Studies on the intracellular adhesion of rat and chicken hepatocytes. *J. Biol. Chem*. 257: 2171-3176.
(133) HAKOMORI, S. (1983) Tumor-associated glycolipid antigens defined by monoclonal antibodies. *Bull. Cance.r* 70: 118-126.
(134) PAN, X. L.; IZUMI, T.; YAMADA, H.; AKIYOSHI, K.; SUENOBU, S. Y YOKOYAMA, S. (2000) Ganglioside patterns in neuroepithelial tumors of chilhood. *Brain Dev*. 22: 196-198.
(135) CABEZAS, J. A. Y CALVO, P. (1984) Gangliósidos. *Investigación y Ciencia*. 94: 86-95.
(136) WIEGANDT, H. (1982) The gangliosides. *Adv. Neurochem*. 4: 149-223.
(137) RAHMANN, H. (1995) Brain gangliosides and memory formation. *Behav. Brain Res*. 66: 105-116.
(138) MURASE, S. Y SCHUMAN, E. M. (1999) The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell Biol*. 11: 549-553.
(139) BENSON, D. L.; SCHNAPP, L.; SHAPIRRO, L. Y HUNTLEY, G. W. (2000) Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends in Cell Biol*. 10: 473-482.
(140) KELM, S.; BROSSMER, R.; ISECKE, R.; GROÂ, H. J.; STRENGE, K. Y SCHAUER, R. (1998) Functional groups of sialic acids involved in binding to siglecs (sialoadhesins) deduced from interactions with synthetic analogues. *Eur. J. Biochem*. 255: 663-672.

(141) SCHAUER, R.; MALYKH, Y. N.; KRISCH, B.; GOLLUB, M. Y SHAW, L. (1999) Biosynthesis and biology of N-glycolilneuraminic acid. En Sialobiology and Other Novel Forms of Glycosilation, pp 17-27 (Inoue, Y., Lee, Y. C. y Troy, F. A. II eds.), Gakushin Publishing Co., Osaka. Japón.

(142) HIRMO, S.; KELM, S.; IWERSEN, M.; HOTTA, K.; GOSO, Y.; ISHIRA, K.; SUGURI, T.; MORITA, M.; WADSTRÖM, T. Y SCHAUER, R. (1998) Inhibition of *Helicobacter pylori* sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 20: 275-281.

(143) KELM, S. Y SCHAUER, R. (1997) Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytl.* 175: 137-240.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 873-900

Revisión

Ingeniería de tejidos: aplicaciones en el diseño de implantes cardiovasculares

Recibido el 4 de octubre de 2007

RAFFAELLA PAGANI[1]*, M. CONCEPCIÓN SERRANO[1], JUAN V. COMAS[2], GRACIÁN TRIVIÑO[3] Y M. TERESA PORTOLÉS[1]

[1]*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España.* [2]*Instituto Pediátrico del Corazón, Hospital Universitario «12 de Octubre», Madrid, 28040-Madrid, España.* [3]*Departamento de Tecnología Fotónica, Universidad Politécnica de Madrid, 28710-Madrid; European Centre for Soft Computing, Edificio Científico-Tecnológico, 33600-Mieres, Asturias, España.*

RESUMEN

El desarrollo de implantes biodegradables para Cirugía Cardiovascular mediante Ingeniería de tejidos es una de las áreas actualmente más prometedoras dentro de la investigación Biomédica para reparar patologías cardiovasculares congénitas

* **Correspondencia:**
Dra. Raffaella Pagani,
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria s/n, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, España.
e-mail: rpaganib@quim.ucm.es

Abreviaturas: ePTFE, Politetrafluoroetileno expandido (*Teflon*); PET, Tereftalato de polietileno (*Dacron*); PGA, Ácido poliglicólico; PLA, Ácido poliláctico; PCL, Poli(ε-caprolactona); T_m, Temperatura de fusión; T_g, Temperatura de transición vítrea; NaOH, Hidróxido sódico; SFM, Microscopía de fuerza de barrido; PCL-NaOH, Láminas de PCL tratadas con NaOH 2N durante 2 horas; SEM, Microscopía electrónica de barrido; MTT, Tetrametil tetrazolio; EC, Células endoteliales; SMC, Células de músculo liso vascular; ROS, Especies reactivas de oxígeno; ATP, Adenosín trifosfato; $\Delta\psi_m$, Potencial de membrana mitocondrial; ΔpH, Gradiente de protones; HUVEC, Células endoteliales derivadas de vena umbilical humana; EPC, Células progenitoras de endotelio.

o adquiridas en pacientes neonatos y adultos. Estos implantes deberán estar formados por un material biodegradable adecuado recubierto de células cultivadas que permitan una sustitución progresiva y completa del tejido dañado. El diseño y la obtención de implantes biodegradables funcionales requiere una aproximación multidisciplinar y una investigación coordinada en las áreas de Cirugía Cardiovascular, Biomateriales, Bioquímica, Biología Celular y Bioingeniería.

Los grupos de investigación Biomédica de las Universidades Complutense (UCM), Rey Juan Carlos (URJC), Politécnica (UPM) y el Instituto Pediátrico del Corazón (IPC) - Cirugía Cardiaca Infantil del Hospital Universitario «12 de Octubre» de Madrid, desarrollan un proyecto coordinado y multidisciplinar para la obtención de implantes biodegradables autólogos y no trombogénicos, mediante técnicas de Ingeniería de tejidos, que puedan cumplir todas las características requeridas desde el punto de vista de adecuación del soporte, funcionalidad bioquímica y resistencia mecánica a las técnicas quirúrgicas habituales y que presenten una capacidad de crecimiento acorde con el desarrollo del paciente, evitando las reoperaciones que se requieren en la actualidad al utilizar prótesis artificiales.

El biopolímero poli(ε-caprolactona) (PCL), modificado para mejorar la adhesión y proliferación celular, se ha seleccionado como soporte para el cultivo de distintas poblaciones celulares (endotelio, músculo liso vascular, HUVEC y células mesenquimales) realizándose estudios de biocompatibilidad, biofuncionalidad *in vitro* y pruebas de resistencia mecánica para comprobar la viabilidad de los bioimplantes.

Palabras clave: biocompatibilidad, biomaterial, cultivos celulares, bioingeniería, cardiocirugía.

ABSTRACT

Tissue engineering: designing cardiovascular grafts

The development of biodegradable grafts for Cardiovascular Surgery by Tissue Engineering techniques is at present a promising research field in Biomedical research for repairing both congenital and acquired cardiovascular diseases in neonatal and adult patients. These grafts should be constituted by a suitable biodegradable material covered with cultured cells that allows a progressive and complete substitution of the damaged tissue. The design and preparation of functional biodegradable grafts requires a multidisciplinary approach and a coordinated research in Cardiovascular Surgery, Biomaterials, Biochemistry, Cell Biology and Bioengineering fields. The biomedical research groups of the Universidad Complutense (UCM), Rey Juan Carlos (URJC), Politécnica (UPM) and the Instituto Pediátrico del Corazón (IPC) – Cirugía Cardiaca Infantil of the Hospital Universitario «12 de Octubre» de Madrid, develop a multidisciplinar coordinated project for obtaining autologue, non trombogenic and biodegradable grafts, by Tissue Engineering techniques, that fulfill specific characteristics, from the point of view of scaffold's adequacy, biochemical function and mechanical resistance to the usual surgical techniques with growth capacity in agreement with the patient develop-

ment avoiding the successive operations that are necessary nowadays when artificial prosthesis are used.

The biopolymer poli(ε-caprolactona) (PCL), modified to improve the cell adhesion and proliferation, has been selected as scaffold for culturing different cells (endothelial, vascular smooth muscle, HUVEC and mesenchymal cells) carrying out *in vitro* biocompatibility, biofunctionality studies and mechanical assays to evaluate the grafts' viability.

Key words: biocompatibility, biomaterial, cell culture, bioengineering, cardiosurgery.

INTRODUCCIÓN

Las **enfermedades cardiovasculares** causan la muerte de cerca de 17 millones de personas al año, casi la tercera parte de la totalidad de las defunciones en el mundo, estimándose que el número de fallecimientos por estas causas ascenderá a 20 millones en el año 2020. En este contexto, la Cirugía Cardiovascular Pediátrica adquiere especial relevancia, dada la incidencia que las patologías cardiovasculares congénitas alcanzan entre la población neonatal e infantil. Según datos de la Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular, en España nacen aproximadamente 5.000 niños al año con algún tipo de cardiopatía (1). Aunque en la mayoría de los casos se trata de dolencias leves que desaparecen con el tiempo, un porcentaje importante de los enfermos deben ser operados con urgencia porque su vida se encuentra gravemente comprometida. La estenosis pulmonar o aórtica, la comunicación interventricular o interauricular y la tetralogía de Fallot se encuentran entre las cardiopatías de mayor incidencia.

Así pues, la creciente prevalencia de las patologías cardiovasculares en los países industrializados ha incrementado la necesidad clínica de sustitutos apropiados que reemplacen el tejido vascular dañado. Este hecho ha obligado a buscar soluciones alternativas en el campo de la **Ingeniería de tejidos**, más allá de los implantes autólogos, heterólogos y sintéticos, convirtiéndose en los últimos años en una disciplina de futuro prometedor capaz de desarrollar sistemas que puedan ser utilizados para reemplazar vasos sanguíneos alterados (2). Este área multidisciplinar, de reciente desarrollo, incorpora los principios de la Ingeniería y la Química de polímeros

a las Ciencias de la vida con el propósito de desarrollar sustitutos biológicos de tejidos y órganos dañados (3). El principio básico de este novedoso campo de investigación radica en el aislamiento de células de un organismo donante, su cultivo sobre soportes de naturaleza polimérica y su posterior implantación en el receptor (Figura 1). Los implantes desarrollados mediante estas técnicas deben conservar la capacidad de crecimiento, reparación y remodelación dentro del paciente (4), con el propósito de restaurar, mantener y/o mejorar la función del tejido u órgano dañado (5). En este contexto surge el concepto de **biomaterial**, que incluye todos aquellos materiales biológicos o sintéticos que se emplean como parte de un dispositivo médico y que interaccionan con sistemas biológicos (6). Para satisfacer las necesidades que plantea este nuevo campo de la Biomedicina, en las últimas décadas se han desarrollado materiales que reúnen una gran variedad de propiedades físicas, químicas y mecánicas en función de la aplicación perseguida. Estas características específicas serán en gran medida las responsables del éxito de un implante.

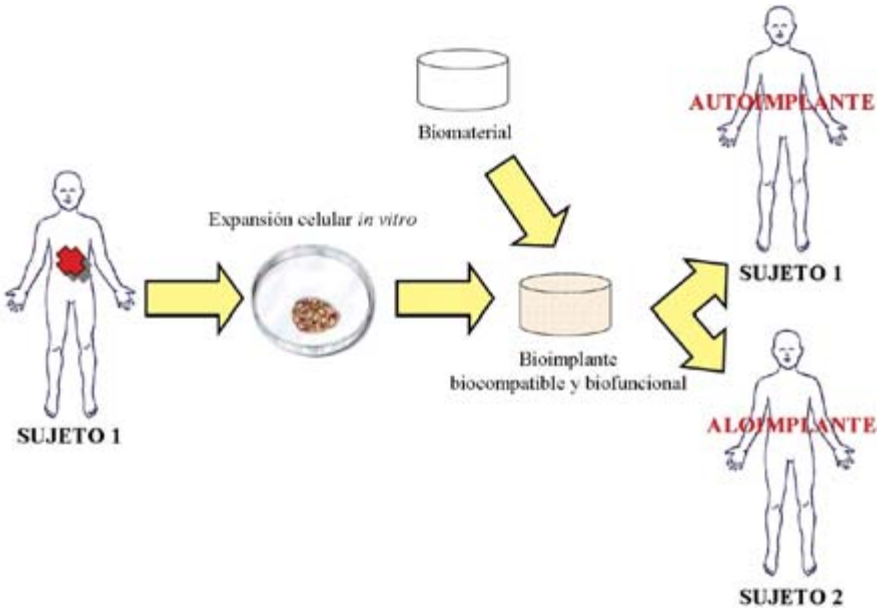


FIGURA 1. ***Fundamento de las técnicas de Ingeniería de tejidos.***

INGENIERÍA DE TEJIDOS VASCULAR: APROXIMACIÓN HISTÓRICA Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La obtención de un **implante vascular biodegradable** mediante la utilización de técnicas de Ingeniería de tejidos requiere la selección de un material biocompatible adecuado y el cultivo de tipos celulares específicos sobre dicho soporte, con el propósito de reproducir las características del tejido vascular (biomimetismo) (Figura 2). El uso de poblaciones celulares derivadas de tejidos del receptor posibilita el desarrollo de un implante autólogo y reduce las complicaciones derivadas del rechazo inmunológico del injerto. De esta manera, se hace posible la sustitución progresiva del tejido original dañado a expensas del crecimiento en paralelo del propio tejido del paciente.

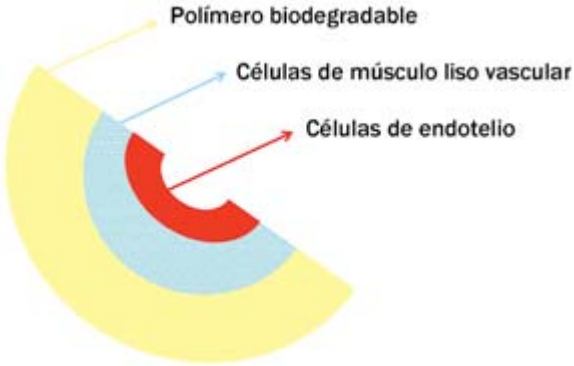


FIGURA 2. ***Esquema de un implante vascular biodegradable y biomimético.***

En 1912, Carrel fue el primero en describir el uso de tubos de vidrio o metal para corregir defectos arteriales en perros mediante técnicas de bypass (7). Sin embargo, no fue hasta principios de la década de los cincuenta cuando el primer material sintético para el reemplazo de arterias, denominado *Vinyon N*, fue introducido en clínica (8). A partir de entonces, diferentes tipos de polímeros, preferentemente derivados de etileno, han sido utilizados como sustitutos de arterias humanas. El tratamiento de patologías vasculares que afectan a arterias de gran calibre ha sido abordado con éxito me-

diante la utilización de implantes sintéticos constituidos por politetrafluoroetileno expandido (ePTFE, *Teflon*) y tereftalato de polietileno (PET, *Dacron*). Sin embargo, estos materiales han demostrado ser trombogénicos y, por lo tanto, inadecuados como sustitutos de vasos sanguíneos de pequeño calibre (diámetro interno inferior a 6 mm) (2). A pesar de los numerosos avances realizados, ninguno de los implantes sintéticos desarrollados hasta el momento ha conseguido superar el resultado obtenido con los vasos sanguíneos autólogos. Las principales razones que se han postulado como responsables de este bajo rendimiento de los implantes artificiales han sido la falta de recubrimiento endotelial y su incapacidad para reproducir las propiedades mecánicas de los vasos nativos. En la Tabla 1 se recogen los principales tipos de sustitutos vasculares disponibles en la actualidad, así como el estado de las investigaciones y la aplicación clínica para cada uno de ellos (9).

TABLA 1. ***Tipos de implantes vasculares.*** *Estado actual de investigación y uso.*

Tipo de implante	*Fase experimental*	*Fase clínica*	*Aplicación de rutina*
Vena autóloga	✓	✓	✓
Arteria radial	✓	✓	✓
Arteria mamaria interna	✓	✓	✓
Arteria gastro-epiploica	✓	✓	✓
ePTFE	✓	✓	✓
Dacron	✓	✓	✓
Implante de poliuretano	✓	✓	Uso inminente
Ingeniería de tejidos			
Polímeros con células	✓	✓	—
Implante completo	✓	—	—

Los primeros logros en el desarrollo de vasos sanguíneos mediante técnicas de Ingeniería de tejidos fueron llevados a cabo por Weinberg y Bell en 1986 (10), quienes obtuvieron un modelo de arteria a partir de células endoteliales, musculares y fibroblásticas bovinas crecidas sobre una malla de Dacron impregnada de colágeno. En 1998, L´Heureux y colaboradores diseñaron un vaso sanguíneo completo, constituido también por endotelio, músculo liso y fibroblastos,

basándose exclusivamente en el uso de células humanas cultivadas *in vitro* (11). Un año más tarde, el grupo de investigación de la doctora Niklason (1999) consiguió desarrollar arterias bovinas a partir de células endoteliales y células de músculo liso cultivadas sobre soportes de ácido poliglicólico (PGA) en biorreactores de flujo pulsátil (12). Sin embargo, y a pesar de los resultados obtenidos, la fabricación de un implante vascular adecuado de superficie hemocompatible sigue suponiendo en la actualidad un importante desafío para la comunidad científica.

En este contexto se inicia en 2002, un proyecto multidisciplinar y coordinado entre el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I (Universidad Complutense de Madrid, UCM), el Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica (UCM), el Departamento de Ciencias de la Salud (Universidad Rey Juan Carlos), el Departamento de Tecnología Fotónica (Universidad Politécnica de Madrid) y el Instituto Pediátrico del Corazón (Hospital Universitario «12 de Octubre»), con el objetivo de llevar a cabo los estudios necesarios para la preparación de implantes biodegradables con aplicación en cirugía pediátrica reparadora.

LA POLI(ε-CAPROLACTONA) COMO BIOMATERIAL

Una de las líneas de aproximación al desarrollo de implantes mediante técnicas de Ingeniería de tejidos incluye la utilización de **materiales naturales**, tales como colágeno, hidroxiapatita o alginato. En muchos casos se trata de constituyentes biológicos de la matriz extracelular con propiedades interactivas naturales, lo que reduce en gran medida las posibilidades de rechazo del implante. Como contrapartida, estos materiales carecen con frecuencia de las propiedades mecánicas adecuadas o presentan un tiempo de degradación no acorde con su aplicación (13).

Sin embargo, en los últimos años gran parte de las investigaciones se han centrado en el desarrollo de una amplia variedad de **materiales sintéticos**, degradables o no, con el propósito de satisfacer las necesidades que los soportes naturales no pueden cubrir. Se trata, en general, de polímeros muy versátiles que permiten el conformado de soportes en distintas formas y tamaños y cuyas pro-

piedades químicas y mecánicas pueden ser, en gran medida, controladas y manipuladas. La elección de polímeros que sean o no biodegradables depende de la aplicación perseguida para el implante, ya sea una sustitución temporal o un reemplazo permanente del tejido dañado, respectivamente. Los **polímeros biodegradables**, debido a sus especiales características físico-químicas y biológicas, permiten que sólo el tejido natural reparado permanezca después de la degradación y la reabsorción del polímero (13). Dentro de los polímeros biodegradables más utilizados en la actualidad se encuentran los homopolímeros y copolímeros basados en ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y policaprolactona (PCL).

Con el propósito de diseñar un implante vascular biodegradable, nuestro grupo de investigación seleccionó la **poli(ε-caprolactona)** (PCL) como biomaterial soporte. La PCL es un poliéster alifático (-[$CH_2COOCH_2CH_2CH_2CH_2$]$_n$-) cuyos polímeros, semicristalinos y biodegradables, presentan una temperatura de fusión (T_m) comprendida entre 59-64ºC, dependiendo de su contenido cristalino, y una temperatura de transición vítrea (T_g) definida en torno a los -60ºC, alcanzando textura de goma a temperatura ambiente (14). Sus propiedades fisico-químicas le confieren una degradación más lenta que la de otros miembros de la familia de los poliésteres alifáticos. Sin embargo, su capacidad para formar mezclas compatibles (15, 16) y copolímeros con una amplia variedad de moléculas (17, 18) ha ampliado en gran medida su campo de aplicación. La PCL ha sido estudiada como material útil para el recubrimiento de heridas desde la década de los años setenta (19). En la actualidad, es ampliamente utilizada como material biodegradable para Ingeniería de tejidos blandos y duros (19-21).

La baja **hidrofilicidad** de la superficie de los polímeros de PCL ha dirigido gran parte de las investigaciones en este campo hacia la mejora de sus características fisico-químicas. El tratamiento con hidróxido sódico se ha convertido en los últimos años en uno de los métodos de elección para la mejora de las propiedades de los polímeros de PCL debido al marcado beneficio que induce en la hidrofilicidad de la superficie, siendo, además, un método de muy sencilla aplicación (22). Con este objetivo, se han llevado a cabo modificaciones de la superficie del polímero inducidas por tratamiento con hidróxido sódico (23). Para ello, las láminas de PCL se han mantenido

sumergidas en una solución de NaOH 2N durante distintos tiempos (de 30 minutos a 24 horas), evaluando posteriormente la rugosidad y el grado de hidrofilicidad de la superficie de las mismas. La Figura 3 incluye imágenes de microscopía de fuerza de barrido (SFM) de las láminas de PCL no tratadas (Figura 3A) y después del tratamiento con NaOH 2N durante 2 horas (PCL-NaOH) (Figura 3B). En la Figura 3C se observa la variación del ángulo de contacto con el tiempo de tratamiento. Los resultados muestran un incremento significativo en la rugosidad de la superficie sólo después de tratamientos de 24 horas, mientras que los estudios del ángulo de contacto revelan un aumento del grado de hidrofilicidad a las dos horas de tratamiento. En consecuencia, las láminas PCL-NaOH han sido seleccionadas, dentro de este estudio, como soporte biodegradable más adecuado para el desarrollo de los implantes vasculares.

BIOCOMPATIBILIDAD DEL POLÍMERO

Una de las características esenciales que deben presentar los materiales potencialmente útiles en el campo de la Ingeniería de tejidos es su **biocompatibilidad**, inicialmente definida como *«la cualidad de no inducir efectos tóxicos o dañinos sobre sistemas biológicos»* (24), facilitando así la adaptación del implante al entorno biológico en el que será incluido. El estudio de la biocompatibilidad de un material debe englobar tanto la evaluación de los efectos del entorno fisiológico sobre el material como los que el propio material pueda inducir en dicho ambiente (25).

La evaluación de la **citotoxicidad** *in vitro* es el paso inicial en los estudios de biocompatibilidad, y normalmente se lleva a cabo con líneas celulares establecidas (25), como los fibroblastos murinos L929. Con esta línea de referencia se ha evaluado la biocompatibilidad de las láminas de PCL mediante el estudio de parámetros que describen la colonización celular del biomaterial (adhesión y proliferación), el mantenimiento de la morfología de las células sobre su superficie y la conservación de su funcionalidad (actividad mitocondrial e integridad de la membrana plasmática) (26). Los resultados obtenidos proporcionan evidencias de una adecuada adhesión y proliferación sobre las láminas de PCL, así como del mantenimiento de

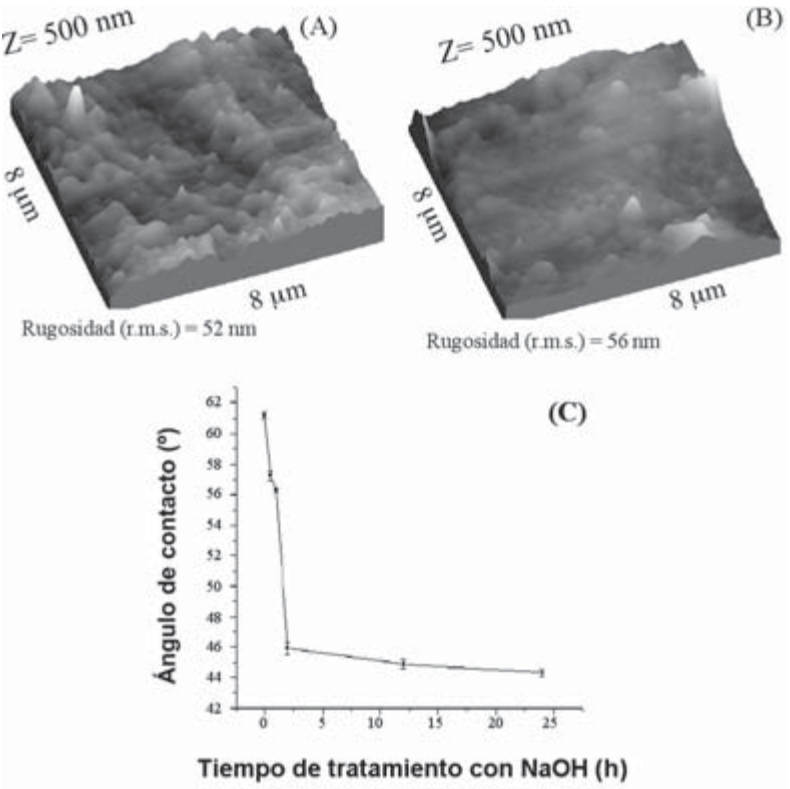


FIGURA 3. ***Caracterización por microscopía de fuerza de barrido (SFM) de láminas de poli(e-caprolactona):*** *no tratadas (**A**) y tratadas con NaOH 2M durante 2h (**B**). Variación del ángulo de contacto con el tiempo de tratamiento con NaOH 2M (**C**). Los datos se expresan como media ± desviación estándar.*

la integridad de la membrana plasmática. Por otro lado, las células en cultivo sobre el biomaterial mantienen la morfología característica de los fibroblastos, tal y como revelan los estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 4). No obstante, el polímero induce una estimulación transitoria pero significativa de la actividad mitocondrial, evaluada como reducción del reactivo MTT (Figura 5). La adecuada respuesta de los fibroblastos en cultivo sobre el biomaterial permite determinar la posible utilización de la PCL para el desarrollo de implantes vasculares con tipos celulares de origen vascular, es decir, células endoteliales y células de músculo liso.

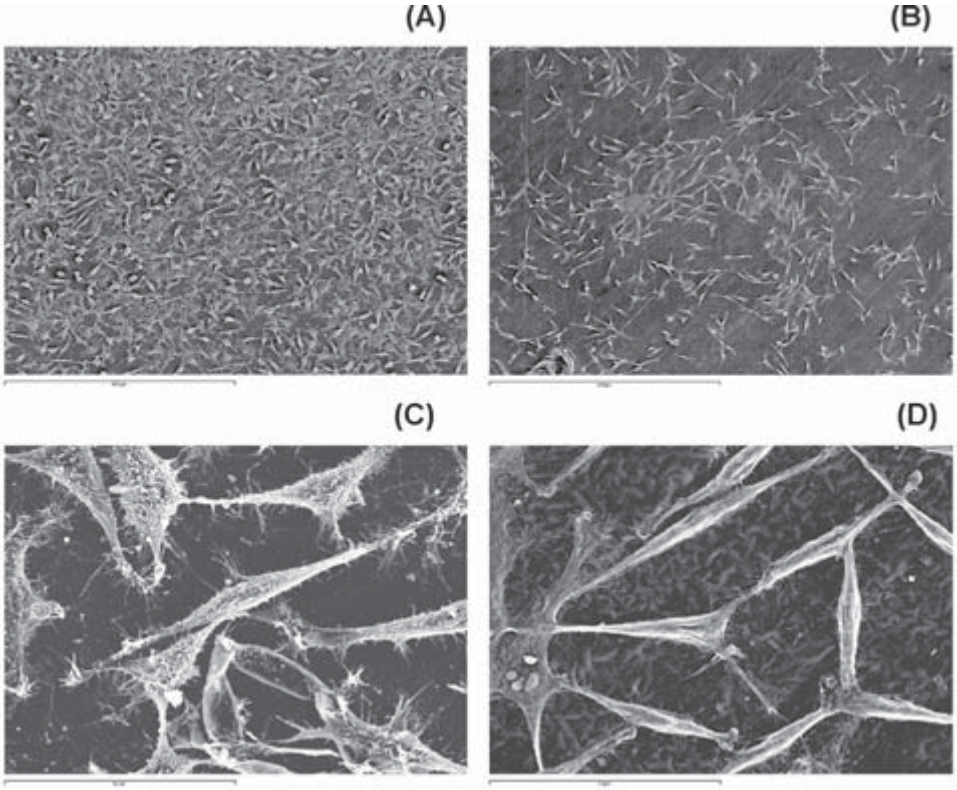


FIGURA 4. ***Caracterización morfológica de fibroblastos L929 en cultivo sobre TCP (A, C) y láminas de poli(ε-caprolactona) (B, D)*** *mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Magnificación: 100x (A, B), 1000x (C, D).*

Los procesos de **adhesión** y **proliferación** celular sobre un polímero dependen en gran medida de las características de superficie del material, tales como el grado de hidrofilicidad, la carga, la energía libre de superficie y la topografía. La importancia de las propiedades de superficie radica en la influencia que éstas ejercen en la composición y la conformación de la capa de proteínas adsorbida al material (27). Las superficies moderadamente hidrofílicas, que permiten la adsorción de proteínas séricas mediante enlaces débiles y reversibles, favorecen la adhesión celular (28). Además, las células pueden depositar sus propias proteínas de adhesión, siendo posible un rápido intercambio con las proteínas séricas previamente adsor-

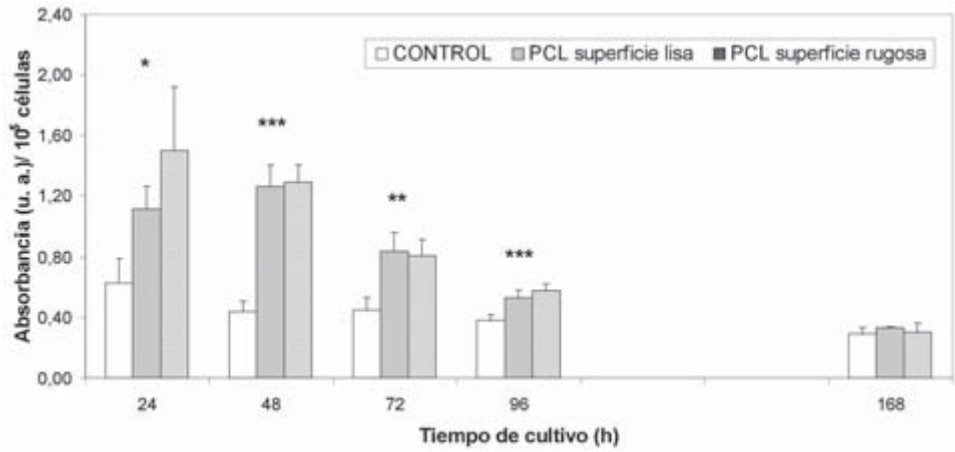


FIGURA 5. ***Actividad mitocondrial de fibroblastos L929 en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL).*** *Los datos del ensayo de MTT están referidos al número de células y se expresan como media ± desviación estándar. Significación estadística: *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,005.*

bidas. También se ha descrito que ciertas propiedades químicas del polímero, tales como la presencia de grupos carboxílicos o hidroxílicos, pueden ejercer una influencia significativa en los mecanismos de adhesión y crecimiento dependiente del tipo celular (25). La influencia que la **topografía** de la superficie del polímero ejerce sobre el comportamiento celular sigue siendo un parámetro ampliamente discutido. En este sentido, estudios realizados con fibroblastos L929 cultivados sobre láminas de PCL de distinta rugosidad (láminas lisas con una rugosidad media de 37 nm y láminas rugosas, de 62 nm) no han revelado diferencias significativas en el crecimiento celular sobre el polímero (26).

Por otro lado, aspectos celulares como la morfología, la proliferación y la diferenciación también pueden verse influidos significativamente por las **propiedades mecánicas** del soporte (29). Por este motivo, un implante ideal debería reunir las propiedades mecánicas adecuadas con el fin de mimetizar aquellas que presenta el tejido al que pretende reemplazar, siendo necesario que su integridad estructural se mantenga hasta que el nuevo tejido se haya formado. Dependiendo de las aplicaciones perseguidas, propiedades como la elasticidad, la resistencia a la rotura o la fatiga adquirirán mayor o menor

relevancia, siendo especialmente importantes en el caso concreto de los implantes vasculares.

Con el propósito de evaluar las propiedades mecánicas de las láminas de PCL nuestro grupo de investigación ha diseñado un aparato de medida específico a través del cual se obtienen, de manera precisa, las curvas de presión-deformación características del comportamiento mecánico del material (30). La Figura 6 muestra el esquema del aparato de medida, que consta de un controlador electrónico que permite aplicar presiones uniformes y omnidireccionales progresivamente crecientes sobre la lámina completa, que es anclada uniformemente al aparato y sumergida en medio líquido. Las curvas obtenidas con las láminas de PCL revelan la capacidad de estas membranas para soportar presiones comprendidas dentro del rango fisiológico, así como una influencia significativa del espesor de la membrana (Figura 7A) y del tiempo de tratamiento con hidróxido sódico (Figura 7B) en el comportamiento mecánico de las láminas.

COMPONENTES CELULARES DE ORIGEN VASCULAR

La Ingeniería de tejidos fue desarrollada originalmente como una aproximación al transplante celular selectivo, que permite la inoculación de tipos celulares específicos en las áreas tisulares en las que son requeridos (13). Sea cual fuere el origen de las células, las características ideales que deben reunir se resumen en: fácil accesibi-

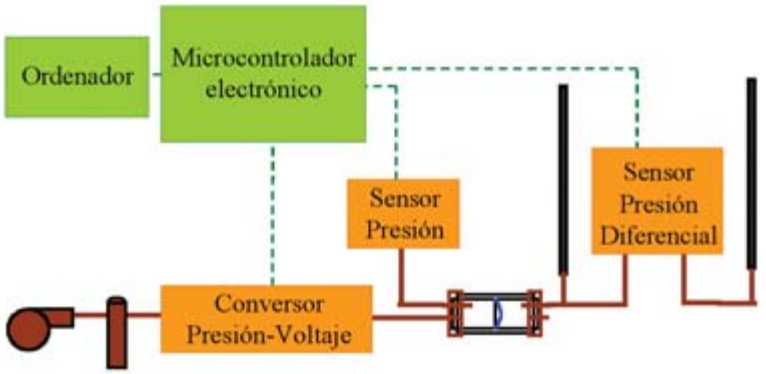


FIGURA 6. ***Instrumento de medida de las propiedades mecánicas.*** *En el esquema se incluyen los distintos componentes del sistema.*

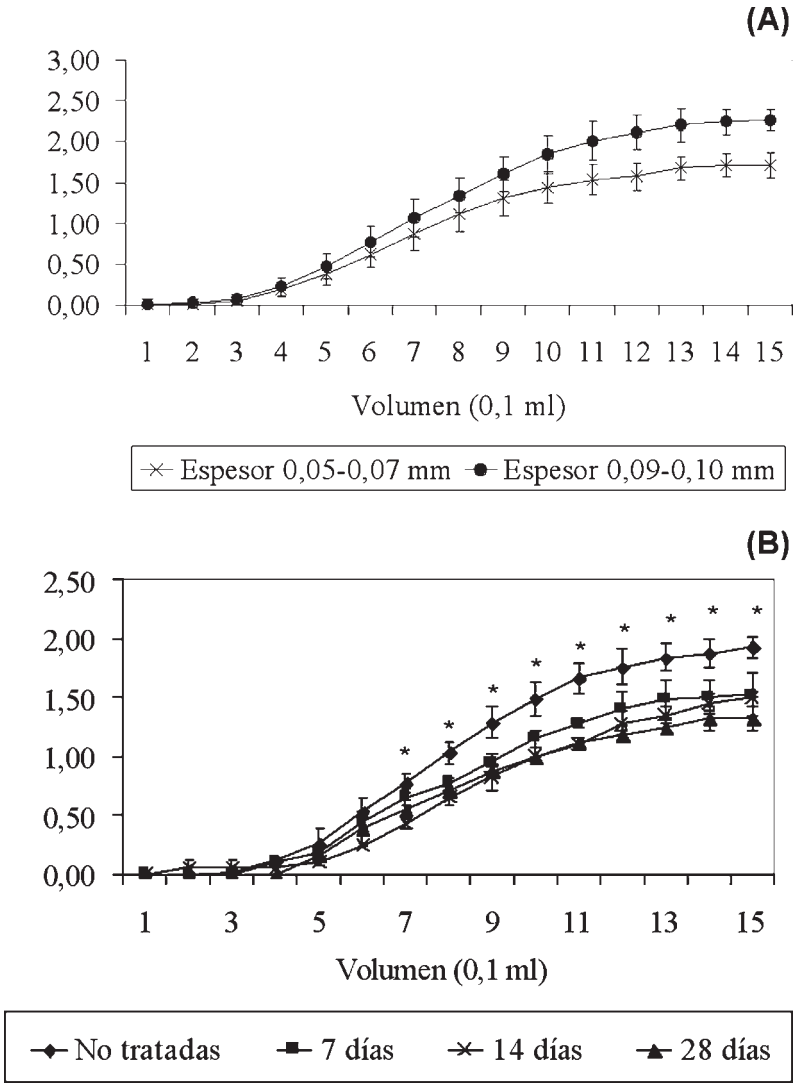


FIGURA 7. ***Curvas de presión-deformación de las láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL).*** *Efecto del espesor de las membranas (**A**) y del tiempo de tratamiento con NaOH 2M (**B**). Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Significación estadística: *p<0,05.*

lidad; potencialidad para diferenciarse o transdiferenciarse en una amplia variedad de células organo-específicas con funciones especia-

lizadas; alta tasa proliferativa *in vitro*, pero sin mutagenicidad durante su crecimiento *in vivo*, y la aceptación por parte del sistema inmune del receptor sin necesidad de terapias inmunosupresoras (13).

La gran diferencia en rendimiento descrita para los implantes autólogos de venas y los implantes sintéticos ha sido atribuida en gran medida a la presencia o ausencia, respectivamente, de un recubrimiento de células endoteliales (7). En la Tabla 2 se recogen los resultados de algunos de los más destacados estudios llevados a cabo *in vivo* con la finalidad de reemplazar vasos sanguíneos dañados o alterados (9). La búsqueda de soluciones para solventar las limitaciones encontradas en este campo ha llevado a la utilización de las **células endoteliales** (EC) como recubrimiento biológico y funcional de la cara luminal del soporte antes de su implante (31, 32).

TABLA 2. ***Resultados de los principales ensayos clínicos*** *llevados a cabo con implantes vasculares de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) con recubrimiento endotelial en las últimas décadas.*

Autores	*Uso*	*Tipo de EC*	*Implantes*	*Eficacia*
Meinhart et al., 2001	*PVBG*	*Vena*	*153*	*84% a 4 años*
Laube et al., 2000	*CABG*	*Vena*	*14*	*91% a 2.5 años*
Deutsch et al., 1999	*PVBG*	*Vena*	*113*	*65% a 9 años*
Williams, 1999	*PVBG*	*Grasa*	*11*	*60% a 4 años*
Leseche et al., 1995	*PVBG*	*Vena*	*21*	*67% a 6.3 años*
Herring et al., 1994	*PVBG*	*Vena*	*66*	*38% a 2.5 años*
Meerbaum et al., 1990	*PVBG*	*Grasa*	*34*	*42% a 2.5 años*

CABG: Bypass coronario; PVBG: Bypass vascular periférico (Vara et al., 2005).

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales tienen una función antitrombogénica, sirven como superficie anticoagulante y desempeñan un destacado papel protector frente a la hiperplasia de la capa íntima vascular (7). Las células endoteliales desempeñan, además, un papel esencial en el proceso de angiogénesis, a través del cual se consigue el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a expensas de estructuras vasculares existentes. Conviene también destacar que las interacciones entre células de endotelio y de músculo liso juegan un papel primordial en el funcionamiento de la pared vascu-

lar, participando en el control de aspectos tan importantes como el diámetro del vaso, la proliferación de las **células musculares** o el fenotipo celular (33). Esta comunicación, vía puentes mioendoteliales, convierte a ambos tipos celulares en componentes esenciales de un implante vascular.

Con el propósito de desarrollar un implante vascular biodegradable y minimizar las complicaciones anteriormente descritas, se ha procedido a cultivar células endoteliales y células de músculo liso (SMC) de origen vascular sobre láminas de PCL, tratadas o no con hidróxido sódico (23). Ambos tipos celulares crecen adecuadamente sobre el biomaterial (Figura 8), confirmando además que el trata-

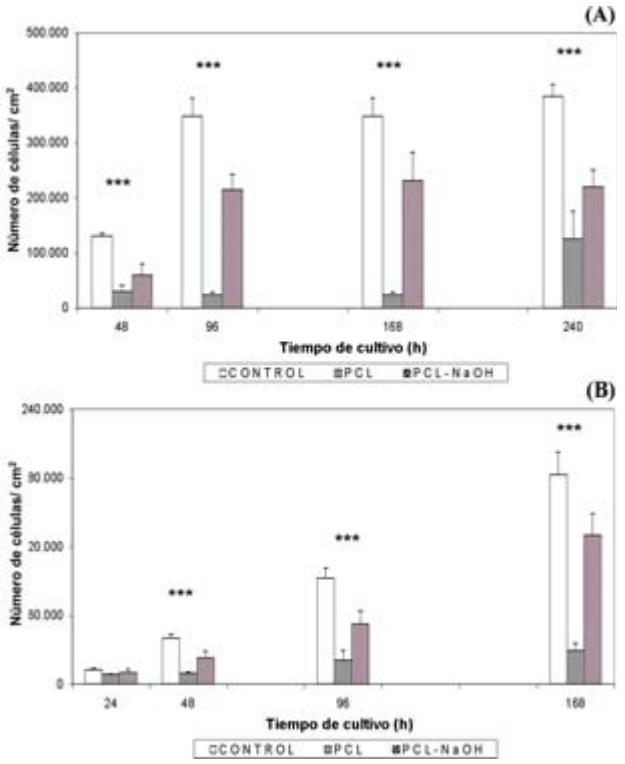


FIGURA 8. ***Proliferación de las células endoteliales (A) y las células de músculo liso (B)*** *sobre las láminas de poli(ε-caprolactona) sin tratamiento (PCL) o tratadas con NaOH 2 M (PCL-NaOH). El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control. Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Significación estadística: ***p<0,005.*

miento con NaOH mejora de forma significativa la adhesión y la proliferación de los dos tipos celulares. Las células EC y SMC en cultivo sobre PCL conservan su morfología característica (Figura 9) y la viabilidad celular tampoco se ve afectada por el cultivo sobre el polímero. No obstante, y coincidiendo con los resultados obtenidos con fibroblastos L929, en ambos tipos celulares se ha encontrado un ligero aumento de la actividad mitocondrial a tiempos cortos de cultivo, aspecto que requiere un estudio más detallado.

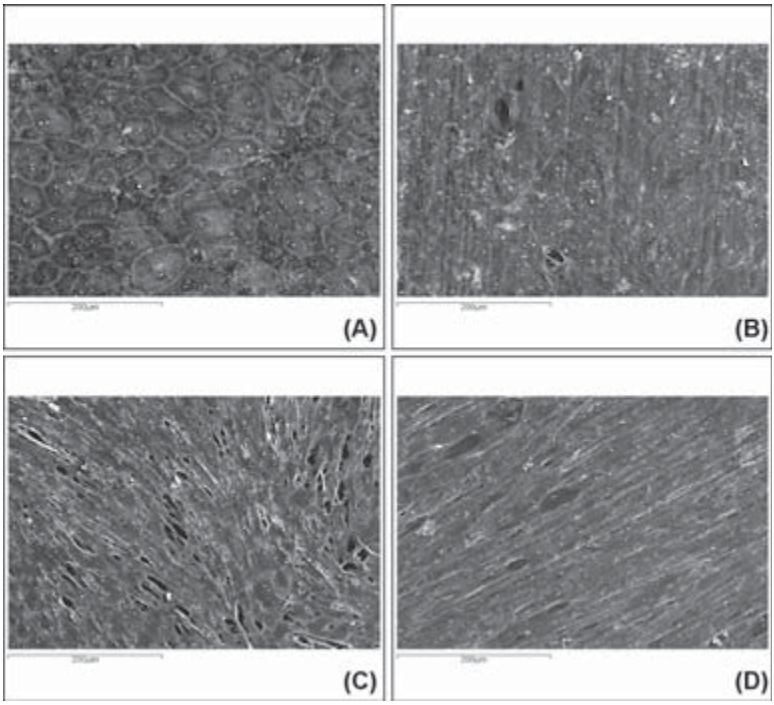


FIGURA 9. ***Caracterización morfológica de células endoteliales (B) y células de músculo liso (D)*** *en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las células fueron cultivadas sobre cristal como superficie control (**A**, **C**). Magnificación: 250x.*

ESTRÉS OXIDATIVO

Entre los parámetros asociados a la viabilidad celular sobre los biomateriales, el estrés oxidativo puede considerarse como uno de los más sensibles. El estrés oxidativo se produce como consecuencia

de un desequilibrio creado por la exposición a agentes oxidantes que alteran el estado redox de los principales sistemas antioxidantes celulares.

Cuando el metabolismo celular se ve comprometido, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede ser estimulada, especialmente a nivel mitocondrial. Las ROS incluyen moléculas como el oxígeno singlete o el peróxido de hidrógeno, así como los radicales libres de oxígeno anión superóxido y radical hidroxilo. Estas moléculas, altamente reactivas, son capaces de oxidar los componentes celulares (principalmente proteínas, lípidos y ácidos nucleicos), induciendo modificaciones que pueden comprometer su funcionalidad. Sin embargo, estas moléculas también participan en importantes funciones fisiológicas. El peróxido de hidrógeno, por ejemplo, desempeña un destacado papel como segundo mensajero en las rutas de señalización celular (34). Recientemente, se han encontrado importantes evidencias que indican la participación de estas moléculas en los procesos de apoptosis (35, 36). En condiciones metabólicas normales, las ROS son inactivadas a través de los sistemas antioxidantes celulares, entre los que destacan el glutatión, la superóxido dismutasa y la catalasa, sistemas de distribución ubicua en las células eucariotas.

Las mitocondrias son los orgánulos encargados de la síntesis de ATP mediante el acoplamiento del proceso de fosforilación oxidativa a la cadena respiratoria. Este acoplamiento requiere la existencia de un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y un gradiente de protones (ΔpH) generado por la cadena de transporte de electrones. De esta manera, un incremento en la formación de radicales a nivel mitocondrial podría desestabilizar el potencial de membrana mitocondrial y alterar, en consecuencia, la función mitocondrial, comprometiendo el metabolismo energético y desencadenando procesos de apoptosis (37). El colapso del potencial de la membrana mitocondrial interna está asociado con la liberación de proteínas apoptóticas (38) y con la aparición de la fracción celular subG_1 en los perfiles de ciclo celular, característica de células apoptóticas.

Con estos antecedentes, es importante analizar en profundidad si la estimulación transitoria de la función mitocondrial, detectada tanto en fibroblastos como en células vasculares primarias cultivadas sobre láminas de PCL, está relacionada con un desequilibrio

redox celular. Estos estudios se han realizado inicialmente en fibroblastos L929, dado que han sido ampliamente utilizados en la bibliografía como sistema de evaluación de citotoxicidad inducida por estrés oxidativo y perturbaciones en la actividad mitocondrial (36). Se ha evaluado el contenido en especies reactivas de oxígeno y el estado de las reservas de glutatión (principal sistema antioxidante celular) en fibroblastos L929 cultivados sobre láminas de PCL (39). Aunque las ROS juegan un papel fisiológico relevante, una producción excesiva puede provocar la disfunción del endotelio, causar daño oxidativo a las células de la pared vascular, oxidar lipoproteínas y acelerar procesos de aterosclerosis. Por este motivo, el contenido en ROS ha sido igualmente evaluado en las células vasculares primarias EC y SMC en cultivo sobre PCL, en las que además se ha analizado el estado del potencial de membrana mitocondrial (40). Para completar el estudio, se han evaluado en los tres tipos celulares otros parámetros como el tamaño, la complejidad y el ciclo celular a diferentes tiempos de cultivo sobre el biomaterial.

Los resultados obtenidos indican que la PCL induce un estrés oxidativo transitorio aunque significativo en los fibroblastos en cultivo sobre el polímero, tal y como revelan el incremento en el contenido intracelular de ROS (Figura 10) y los ensayos del estado redox de las reservas de glutatión (Figura 11). También se observan cambios en la complejidad y el tamaño celular (Figura 12). Sin

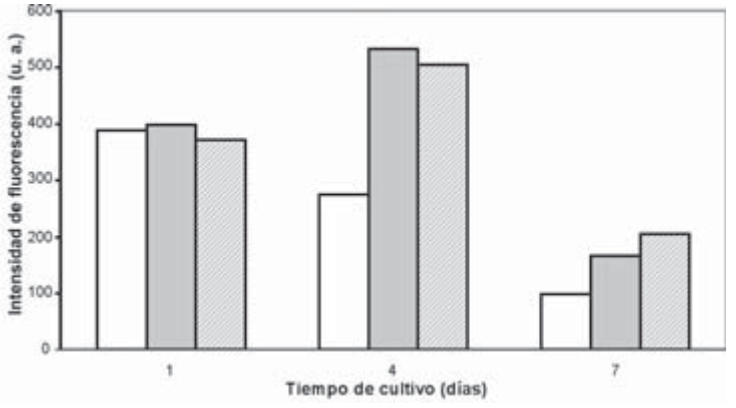


FIGURA 10. ***Contenido en especies reactivas de oxígeno de fibroblastos L929 en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL).*** *El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control.*

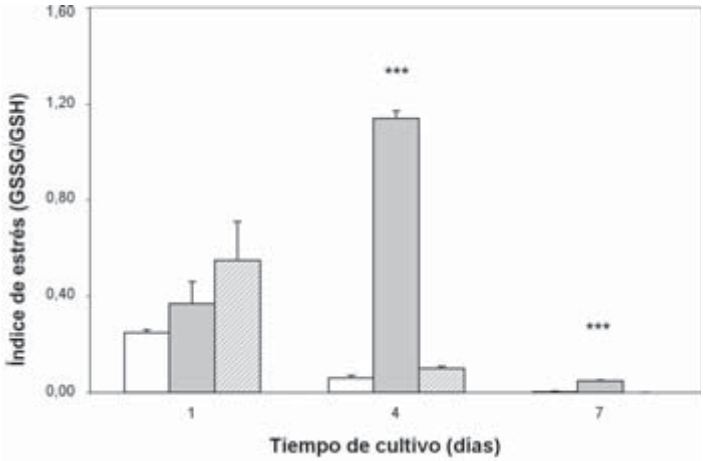


FIGURA 11. ***Índice de estrés oxidativo (cociente glutatión oxidado/ glutatión reducido) de fibroblastos L929 en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL).*** *El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control. Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Significación estadística: ***p<0,005.*

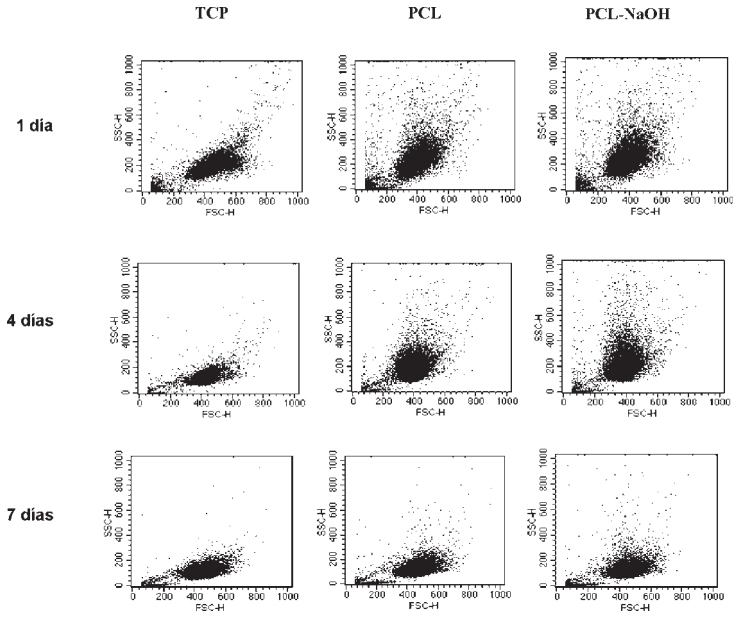


FIGURA 12. ***Tamaño y complejidad de fibroblastos L929 en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) (PCL).*** *Las propiedades ópticas de dispersión de las células han sido analizadas mediante citometría de flujo.*

embargo, después de 7 días en cultivo, las células alcanzan los niveles control para todos los parámetros estudiados. Los resultados también revelan que el tratamiento con hidróxido sódico reduce estos efectos. Ni el ciclo celular ni la integridad de la membrana plasmática parecen verse afectados en ninguno de los tiempos evaluados. Los resultados obtenidos con células vasculares primarias muestran que el cultivo sobre PCL disminuye el contenido en ROS en las células endoteliales a lo largo del cultivo (Figura 13A), pero produce un incremento de estos niveles en las células musculares después de 7 días (Figura 13B). El polímero induce variaciones en el potencial

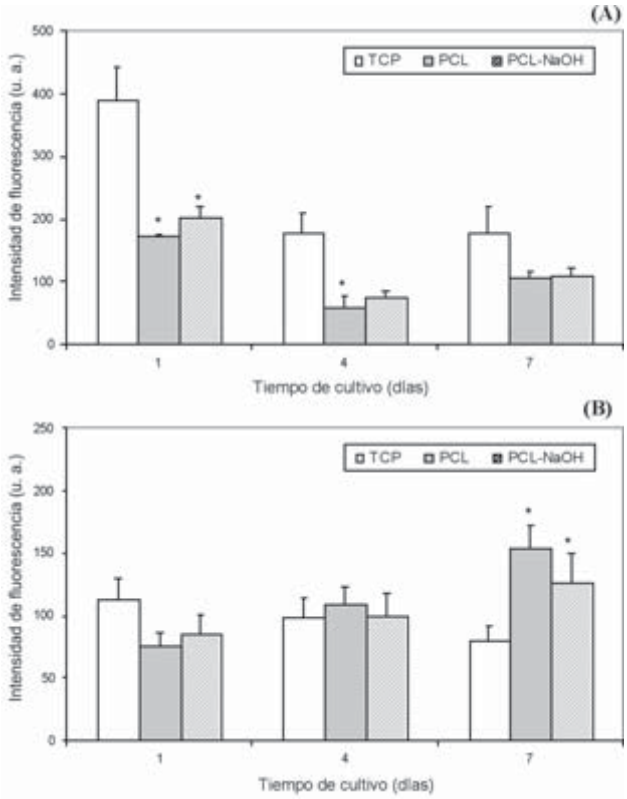


FIGURA 13. ***Contenido en especies reactivas de oxígeno de células endoteliales (A) y células de músculo liso (B) en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) sin tratar (PCL) o tratadas con NaOH 2M (PCL-NaOH).***
*El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control. Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Significación estadística: *p<0,05.*

de membrana mitocondrial que muestran un paralelismo significativo con los cambios observados en los niveles de ROS (Figura 14), demostrando la importancia y sensibilidad de estas medidas como indicadores de la función mitocondrial. El tratamiento de las láminas con NaOH también disminuye, en este caso, los efectos inducidos por el polímero, tal y como se ha observado previamente con los fibroblastos L929, poniendo de manifiesto los beneficios de incrementar la hidrofilicidad de la superficie antes del cultivo celular. Dado que no se detectan cambios importantes en la fracción $subG_1$ ni en EC (Tabla 3) ni en SMC (Tabla 4), los cambios en $\Delta\psi_m$ observados en este estudio no pueden atribuirse a procesos de apoptosis.

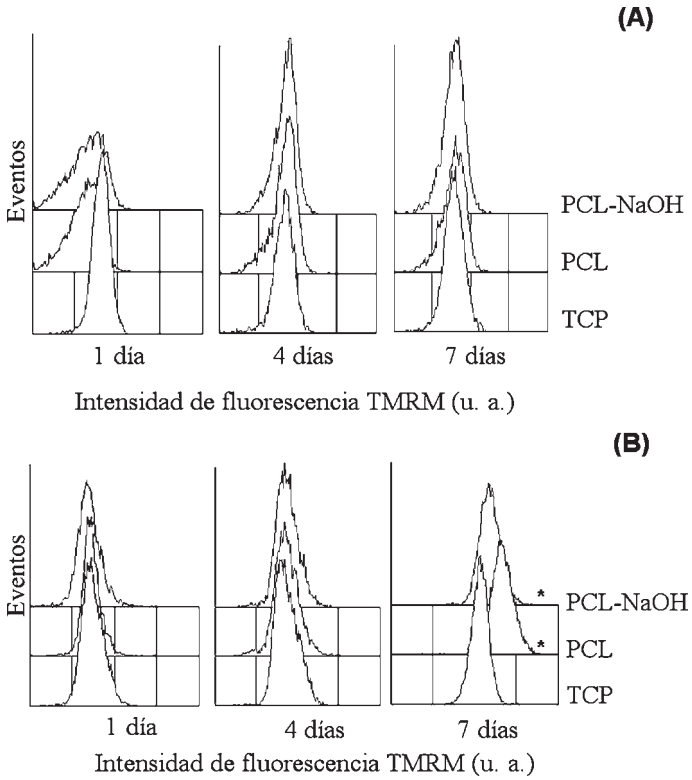


FIGURA 14. ***Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células endoteliales (A) y células de músculo liso (B)*** *en cultivo sobre láminas de poli(ε-caprolactona) sin tratar (PCL) o tratadas con NaOH 2M (PCL-NaOH). El plástico de cultivo (TCP) se ha utilizado como superficie control.*

TABLA 3. ***Porcentajes de células incluidas en cada una de las diferentes fases del ciclo celular*** *de células endoteliales cultivadas en láminas de poli(ε-caprolactona) sin tratar (PCL) o tratadas con NaOH (PCL-NaOH). El plástico de cultivo (TCP) ha sido utilizado como superficie control. La tabla recoge los resultados de tres experimentos similares.*

Días de cultivo	*subG$_1$*	*G$_0$/G$_1$*	*S*	*G$_2$/M*
TCP				
1	**1.57**	84.70	8.81	5.27
4	**0.73**	77.92	15.53	5.95
7	**0.65**	92.40	4.59	2.34
PCL				
1	**2.58**	85.91	3.01	8.79
4	**2.25**	74.64	16.68	6.47
7	**1.15**	65.72	25.42	7.02
PCL-NaOH				
1	**1.93**	84.56	7.80	6.01
4	**1.01**	86.40	7.36	5.36
7	**0.53**	88.55	5.77	4.84

TABLA 4. ***Porcentajes de células incluidas en cada una de las diferentes fases del ciclo celular*** *de células de músculo liso cultivadas en láminas de poli(ε-caprolactona) sin tratar (PCL) o tratadas con NaOH (PCL-NaOH). El plástico de cultivo (TCP) ha sido utilizado como superficie control. La tabla recoge los resultados de tres experimentos similares.*

Días de cultivo	*subG$_1$*	*G$_0$/G$_1$*	*S*	*G$_2$/M*
TCP				
1	**0.18**	78.05	10.16	11.73
4	**0.89**	91.26	4.01	3.95
7	**4.09**	85.71	6.57	3.91
PCL				
1	**0.75**	91.20	3.94	4.18
4	**0.59**	92.83	3.86	3.03
7	**1.03**	95.37	1.91	1.89
PCL-NaOH				
1	**0.33**	89.02	4.96	5.80
4	**0.27**	93.07	3.67	3.18
7	**1.10**	93.85	2.96	2.52

CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo con polímeros de poli(ε-caprolactona) confirman su biocompatibilidad tanto con la línea establecida de fibroblastos L929 como con células vasculares primarias y permiten proponer este polímero como soporte biodegradable adecuado para el desarrollo de un implante vascular mediante técnicas de Ingeniería de tejidos.

No obstante, el diseño y obtención de implantes vasculares presenta aún hoy en día numerosos aspectos que deben ser mejorados para conseguir un implante compatible y funcional *in vivo*, entre ellas la identificación de poblaciones celulares adecuadas, la eliminación de procesos trombogénicos y la optimización de su funcionalidad.

En primer lugar, y con la finalidad de evitar los inconvenientes derivados del uso de células endoteliales primarias de origen vascular, se ha iniciado una búsqueda activa de fuentes alternativas para la obtención de estas células. Entre ellas cabe destacar la utilización de **células endoteliales derivadas de cordón umbilical** (HUVEC) que pueden proporcionar importantes ventajas, entre las que destacan su mayor tasa proliferativa y la posibilidad de desarrollar implantes autólogos ideales para el tratamiento de cardiopatías en neonatos. Asimismo, la identificación de **células progenitoras de endotelio** (EPC) en sangre periférica ha revolucionado la investigación en procesos de angiogénesis, convirtiéndose en los últimos años en una de las fuentes utilizadas preferentemente para la endotelización de los implantes vasculares (41, 42).

Por otro lado, la evaluación de la biocompatibilidad de los materiales que van a estar en contacto directo con el torrente circulatorio y/o algún componente sanguíneo debe incluir el estudio de su **hemocompatibilidad**, ya que las complicaciones trombogénicas, así como los riesgos de hemorragias asociados a la terapia anticoagulante administrada, siguen representando un punto crítico en el desarrollo y uso clínico de los implantes cardiovasculares.

Por último, y dado que el funcionamiento fisiológico de las estructuras vasculares y, en gran medida, el proceso de vasculogénesis, implica la participación y contacto con el torrente circulatorio, el desarrollo de arterias o venas *in vitro* debe realizarse bajo condiciones de **estrés mecánico pulsátil**. Recientemente, se ha demostrado

que el cultivo en condiciones de flujo dinámico favorece la maduración del implante vascular diseñado al aumentar el espesor de la pared y el contenido en colágeno del mismo (12), lo que le otorga, en consecuencia, un comportamiento funcional más acorde con la estructura vascular que pretende reemplazar.

AGRADECIMIENTOS

Estos estudios han sido posibles gracias a la financiación de los proyectos de investigación de la Comunidad de Madrid (08.4/0004.3/2001) y de la Fundación Mutua Madrileña Automovilística (2004-033), coordinados por el Dr. J. V. Comas (Instituto Pediátrico del Corazón, Hospital Universitario «12 de Octubre», Madrid) y forman parte de la Tesis Doctoral de la Dr. M. C. Serrano realizada gracias a una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Los autores desean expresar su agradecimiento a la Dra. M. Vallet-Regí y al Dr. J. Peña (Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica, Facultad de Farmacia, UCM) por la preparación de las láminas del polímero y la realización de los estudios de caracterización del material; al Dr. L. Galletti y a la Dra. L. Polo (Instituto Pediátrico del Corazón, Hospital Universitario «12 de Octubre», Madrid) por el suministro de las muestras de vena cava de cerdo. Los fibroblastos L929 fueron generosamente cedidos por la Dr. M. A. Lizarbe y la Dr. N. Olmo (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, UCM). Los autores quieren expresar también su agradecimiento al personal del Servicio de Citometría de Flujo y Microscopía Confocal (CAI, UCM) y al Dr. Alberto Álvarez-Barrientos (Servicio de Citometría de Flujo, CNIC, Instituto Carlos III) por la asistencia técnica recibida para los estudios de citometría.

BIBLIOGRAFÍA

(1) VILLAGRÁ, F. Unidad de Cardiopatías Congénitas. Cardiopatías Congénitas. © Fernando Villagrá 2004. Fecha de la última consulta: 9 de Mayo de 2006. Disponible en web: http://www.cardiopatiascongenitas.net/.

(2) RATCLIFFE, A. (2000) Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol.* 19: 353-357.

(3) NIKLASON, L.E. Y LANGER R.S. (1997) Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. *Transplant Immunology* 5: 303-306.
(4) KADNER A.; HOERSTRUP S.P.; TRACY J.; BREYMANN C.; MAURUS C.F.; MELNITCHOUK S.; KADNER G.; ZUND G. Y TURINA M. (2002) Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. *Ann. Thorac. Surg.* 74: S1422-1428.
(5) LANGER, R. Y VACANTI, J.P. (1993) Tissue Engineering. *Science* 260: 920-926.
(6) ABRAHAM, G.A.; GONZALEZ, M.F. Y CUADRADO, T.R. (1998) La ciencia y la ingeniería de los biomateriales, un desafío interdisciplinario. *Ciencia Hoy* 9 (49).
(7) HEYLIGERS, J.M.M.; ARTS, C.H.P.; VERHAGEN, H.J.M.; DE GROOT, P.G. Y MOLL F.L. (2005) Improving small-diameter vascular grafts: From the application of an endotelial cell lining to the construction of a tissue-engineered blood vessel. *Ann. Vasc. Surg.* 19: 1-9.
(8) VOORHEES, A.B.; JARETZKI, A. Y BLAKEMORE, A.H. (1952) The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. *Ann. Surg.* 135: 332-336.
(9) VARA, D.S.; SALACINSKI, H.J.; KANNAN, R.Y.; BORDENAVE, L.; HAMILTON, G. Y SEIFALIAN, A.M. (2005) Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathol. Biol. (Paris)* 53: 599-612.
(10) WEINBERG, C. Y BELL, A. (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science.* 231: 397-400.
(11) L´HEREUX, N.; PAQUET, S.; LABBE, R.; GERMAIN, L. Y AUGER, F.A. (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 12: 47-56.
(12) NIKLASON, L.E.; GAO, J.; ABBOTT, W.M.; HIRSCHI, K.K.; HOUSER, S.; MARIN, R. Y LANGER, R. (1999) Functional arteries grown in vitro. *Science.* 284: 489-493.
(13) NASSERI, B.A.; OGAWA, K. Y VACANTI, J.P. (2001) Tissue engineering: An evolving 21st-century science to provide biologic replacement for reconstruction and transplantation. *Surgery.* 130: 781-784.
(14) DUMITRIU, S. (2001) Polymeric Biomaterials. 2nd Ed. Rev. Marcel Dekker Inc: New York. p95-7, 107-9, 402-3.
(15) LOWRY, K.J.; HAMSON, K.R.; BEAR, L.; PENG, Y.B.; CALALUCE, R.; EVANS, M.L.; ANGLEN, J.O. Y ALLEN, W.C. (1997) Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model. *J. Biomed. Mater. Res.* 36: 536-541.
(16) KIM, H.W.; KNOWLES, J.C. Y KIM, H.E. (2004) Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(ε-caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings. *J. Biomed. Mate.r Res.* 70B: 240-249.
(17) IMMIRZI, B.; MALINCONICO, M.; ORSELLO, G.; PORTOFINO, S. Y VOLPE, M.G. (1999) Blends of biodegradable polyesters by reactive blending: preparation, characterization and properties. *J. Mat. Sci.* 34: 1625-1640.
(18) KWON, I.K.; KIDOAKI, S. Y MATSUDA, T. (2005) Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials.* 26: 3929-3939.
(19) Khor, H.L.; Ng, K.W.; Schantz, J.T.; Phan, T.-T.; Lim, T.C.; Teoh, S.H. y Hutmacher, D.W. (2002) Poly(ε-caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering an epidermal equivalent. *Mater. Sci. Eng. C.* 20: 71-75.

(20) COOMBES, A.G.; RIZZI, S.C.; WILLIAMSON, M.; BARRALET, J.E.; DOWNES, S. Y WALLACE, W.A. (2004) Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*. 25: 315-325.
(21) LI, W.J.; TULI, R.; OKAFOR, C.; DERFOUL, A.; DANIELSON, K.G.; HALL, D.J. Y TUAN, R.S. (2005) A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 26: 599-609.
(22) KHOR, H.L.; NG, K.W.; HTAY, A.S.; SCHANTZ, J.-T.; TEOH, S.H. Y HUTMACHER, D.W. (2003) Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 14: 113-120.
(23) SERRANO, M.C.; PORTOLÉS, M.T.; VALLET-REGÍ, M.; IZQUIERDO-BARBA, I.; GALLETTI, L.; COMAS, J.V. Y PAGANI, R. (2005) Vascular endothelial and smooth muscle cell culture on NaOH-treated poly(å-caprolactone) films as a preliminary study for vascular graft development by tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*. 5: 415-423.
(24) WILLIAMS, D.F. (1999) The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool, UK: University Press; p.40.
(25) MARQUES, A.P.; REIS, R.L. Y HUNT, J.A. (2002) The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: In vitro studies. *Biomaterials*. 23: 1471-1478.
(26) SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; RÁMILA, A.; IZQUIERDO, I. Y PORTOLÉS, M.T. (2004) In vitro biocompatibility assessment of poly(ε-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials*. 25: 5603-5611.
(27) GROTH, T.H.; KLOSZ, K.; CAMPBELL, E.J.; NEW, R.C.; HALL, B. Y GOERING, H. (1994) Protein adsorption, lymphocyte adhesion and platelet adhesion/activation on polyurethane ureas is related to hard segment content and composition. *J. Biomater. Sci. Polyme.r Edn*. 6: 497-510.
(28) VAN WACHEM, P.B.; BENGELING, T.; FEIJEIN, J.; BANTJES, A.; DETMERS, J.P. Y VAN AKEN, W.G. (1985) Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials*. 6: 403-408.
(29) HUBBELL, J.A. (1995) Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology*. 13: 565-576.
(30) TRIVIÑO, G.; SERRANO, M.C.; PAGANI, R. Y PORTOLÉS, M.T. (2005) A customizable instrument for measuring the mechanical properties of thin biomedical membranes. *Macromol. Mater. Eng*. 290: 953-960.
(31) JARRELL, B.E.; WILLIAMS, S.K.; STOKES, G.; HUBBARD, F.A.; CARABASI, R.A.; KOOLPE, E.; GREENER, D.; PRATT, K.; MORITZ, M.J. Y RADOMSKI, J. (1986) Use of freshly isolated capillary endothelial cells for the immediate establishment of a monolayer on a vascular graft at surgery. *Surgery*. 100: 392-399.
(32) DEUTSCH, M.; MEINHART, J.; FISCHLEIN, T.; PREISS, P. Y ZILLA, P. (1999) Clinical autologous in vivo endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience. *Surgery*. 126: 847-855.
(33) FILLINGER, M.F.; SAMPSON, L.N.; CRONENWETT, J.L.; POWELL, R.J. Y WAGNER, R.J. (1997) Coculture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models. *J., Surg. Res*. 67: 169-178.
(34) LANDER, H.M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*. 11: 118-124.

(35) QUILLET-MARY, A.; JAFFREZOU, J.P.; MANSAT, V.; BORDIER, C.; NAVAL, J. Y LAURENT, G. (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 272: 21388-21395.
(36) TAKEYAMA, N.; MIKI, S.; HIRAKAWA, A. Y TANAKA, T. (2002) Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release in hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Experimental Cell Research*. 274: 16-24.
(37) DING, W.X.; SHEN, H.M. Y ONG, C.N. (2000) Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial permeability transition in microcystin-induced rapid apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 32: 547-555.
(38) ZAMZAMI, N.; SUSIN, S.A.; MARCHETTI, P.; HIRSCH, T.; GÓ, M.I.; CASTEDO, M. Y KROEMER, G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med*. 183: 1533.
(39) SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; PEÑA, J. Y PORTOLÉS, M.T. (2005) Transitory oxidative stress in L929 fibroblasts cultured on poly(ε-caprolactone) films. *Biomaterials*. 26: 5827-5834.
(40) SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; MANZANO, M.; COMAS, J.V. Y PORTOLÉS, M.T. (2006) Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species content of endothelial and smooth muscle cells cultured on poly(ε-caprolactone) films. *Biomaterials*. 27: 4706-4714.
(41) ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; VAN DER ZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHATTEMAN, G. Y ISNER, J.M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 275: 964-967.
(42) WALENTA, K.; FRIEDRICH, E.B.; SEHNERT, F.; WERNER, N. Y NICKENING, G. (2005) In vitro differentiation characteristics of cultured human mononuclear cells-implications for endothelial progenitor cell biology. *Biochem. Biophys. Res. Com*. 333: 476-482.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 901-925

Revisión

Roles of Protein Phosphatase Type 1 in *Schizosaccharomyces pombe*

Recibido el 4 de octubre de 2007

ISABEL ÁLVAREZ-TABARÉS[1-3], IAIN M. HAGAN[2] AND JOSÉ-MIGUEL ORTIZ MELÓN[1]*

[1]*Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Unidad de Biomedicina-CSIC, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain.*

[2]*CRUK Cell Division Group, Paterson Institute for Cancer Research, University of Manchester, Wilmslow Road, Manchester M20 4BX, UK.*

[3]*Present address: Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Campus de Cantoblanco-UAM, 28049 Madrid, Spain.*

ABSTRACT

Protein phosphatases are considered to be global regulators in many biological processes. They are divided in families on the basis of substrate specificity, mechanisms of catalysis and evolutionary relations. Protein Phosphatase Type 1 (PP1) holoenzymes are composed of a small number of catalytic subunits and an array of regulatory, targeting, subunits. The *S. pombe* genome encodes two highly related catalytic subunits, Dis2 and Sds21. We fused enhanced green fluorescence

* **Correspondence:** José-Miguel Ortiz Melón. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Unidad de Biomedicina-CSIC, Universidad de Cantabria, 39011 Santander. Tel. 942202941. Fax: 942201945.

e-mail: ortizjm@unican.es

Abbreviations: PP, Protein Phosphatase; ***S. pombe,*** *Schizosaccharomyces pombe*; **EGFP,** Enhanced Green Fluorescent Protein; **RNA,** Ribonucleic Acid; **RNAi,** Interfering RNA; **Dis,** Defective in sister chromatid disjoining; **Tyr,** Tyrosine; **PTP,** Protein Tyrosine Phosphatase; **Asp,** Aspartic Acid; **Ser,** Serine; **Thr,** Threonine; ***S. cerevisiae,*** *Saccharomyces cerevisiae*; ***A. thaliana,*** *Arabidopsis thaliana;* ***D. melanogaster,*** *Drosophila melanogaster;* ***C. elegans,*** *Cenorabditis elegans;* **DNA,** Deoxyribonucleic Acid; **BIM,** Bloked in mitosis; **GFP,** Green Fluorescent Protein.

protein (EGFP) coding sequences to the aminus-termini of endogenous *dis2*$^+$ and *sds21*$^+$ genes. We have described that Dis2 and Sds21 localize in different cell compartments and structures as centromeres- kinetochores, nucleoli, a ring at the cell equator in dividing cells, endocytic vesicles and the cell tips. Each of these locations suggests different functions of a single catalytic PP1 subunit mediated by its interaction with different targeting proteins. This converts PP1 into a multifunctional enzyme that acts as a global regulator in many cellular processes.

Key words: Protein phosphatases, mitosis, endocytosis, polarised growth, fission yeast.

RESUMEN

Funciones de Proteína Fosfatasa Tipo 1 en *Schizosaccharomyces pombe*

Las proteína fosfatasas están consideradas reguladores globales en muchos procesos biológicos. Se clasifican en distintas familias según su especificidad de sustrato, sus mecanismos de catálisis y sus relaciones evolutivas. Los holoenzimas de proteína fosfatasas de tipo 1 (PP1) están compuestos por un pequeño número de subunidades catalíticas y un amplio número de subunidades reguladoras. El genoma de *S. pombe* codifica dos subunidades catalíticas muy relacionadas, Dis2 y Sds21. Hemos fusionado la proteína verde fluorescente «mejorada» (EGFP) al extremo amino-terminal de los genes endógenos de *dis2*$^+$ y *sds21*$^+$. Hemos descrito que Dis2 y Sds21 se localizan en distintos compartimentos y estructuras celulares, como los centromeros-kinetocoros, núcleo, un anillo en el ecuador de células en división, vesículas endocíticas y extremos celulares. Cada una de estas localizaciones sugiere diferentes funciones para las subunidades catalíticas de PP1 que interaccionan con distintas proteínas reguladoras. Esto convierte a PP1 en un enzima multifuncional que actúa como un regulador global en muchos procesos celulares.

Palabras clave: Proteína fosfatasas, mitosis, endocitosis, crecimiento polarizado, levadura de fisión.

INTRODUCTION

Protein phosphorylation is a global cell regulatory mechanism that controls many cellular processes. Gene expression, cell shape, metabolism, movement and proliferation, are examples of processes regulated by phosphorylation. Approximately one third of all intracellular proteins are regulated by phosphorylation and this

reflects the diversity and extension of this regulatory mechanism (1, 2). In contrast to initial views of signalling pathways as simple linear arrangements of phosphorylation cascades that function in isolation, it is now clear, that there are multiple signalling networks that function in coordination. The level of phosphorylation of a protein within a signalling pathway is thus a dynamic process that is determined by the concerted action of protein kinases and phosphatases (3).

Protein phosphorylation has also been linked to human diseases and many protein kinases have been characterized (4). It has been reported recently that protein kinases have become the second largest drug targets for the pharmaceutical industry (5). In contrast, protein phosphatases have lagged behind and only more recently have been recognized as partners in the regulation of signalling responses. The distinct but complementary function of these enzymes have found their role in controlling the rate and duration of the cellular response activated by protein kinases (6).

The physiological importance of protein phosphatases was demonstrated initially when they were shown to be the targets of many naturally occurring toxins and they could also function as tumour suppressors. Later they were found to be the target of viral proteins, including the viral oncoprotein E4orf4 and the middle-T and small-T antigens (7, 8). More recently, large-scale loss-of-function RNA interference (RNAi) screens have revealed that a surprising number of phosphatases are promoters of cell survival and cell death as well as having roles in the regulation of cell cycle progression (8, 9).

CLASSIFICATION OF PROTEIN PHOSPHATASES

Protein phosphatases can be classified into three groups on the basis of sequence, structure and catalytic mechanism (Figure 1A). The first group comprises the classic Ser/Thr phosphatases: the large phosphoprotein phosphatase family (PPP family) that includes PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 and PP7 and the protein phosphatase, Mg^{2+} or Mn^{2+} dependent (PPM) family (PP2C). The protein Tyr phosphatase (PTP) superfamily forms the second group, and the

third group consists of the Asp-based protein phosphatase with a DXDXT/V catalytic signature (10).

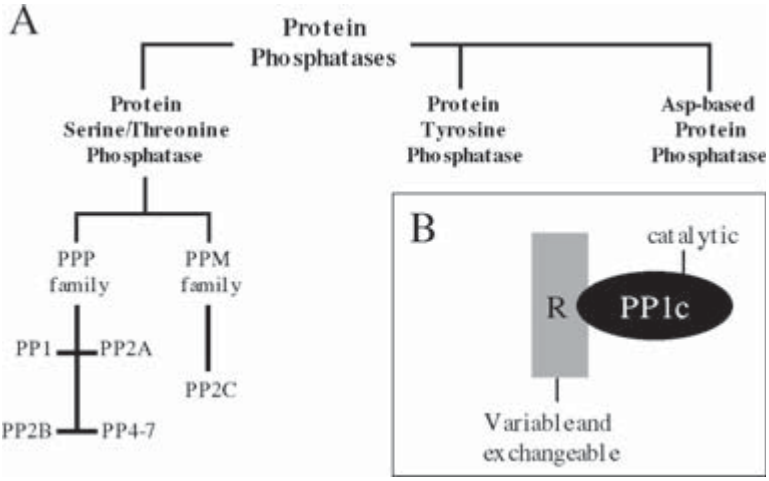


FIGURE 1. ***Classification of protein phosphatases and core configuration of PP1. A)*** *Schematic representation of the different families and subfamilies of protein phosphatases.* ***B)*** *PP1 consists of a catalytic subunit (PP1c) and a variable and exchangeable regulatory subunit (R).*

Genomic studies have provided a catalogue of protein phosphatases for several eukaryotic organisms. Human DNA encodes 518 protein kinases with 428 known or predicted to phosphorylate Ser and Thr residues and 90 belonging to the tyrosine kinase family. By contrast, there are only 147 human protein phosphatase catalytic subunits with 107 belonging to the Tyr phosphatase family (2, 11). Of these 107 catalytic subunits, 81 are predicted to be active protein phosphatases (12). Interestingly, although more than 98% of protein phosphorylation events take place on Ser and Thr side chains, only 40 of the 147 known protein phosphatase are specific for these aminoacids. Of these 40 phosphatases, 18 are PP2C enzymes that do not have additional regulatory subunits. For the remaining Ser/Thr phosphatases, function is defined by additional regulatory subunits or interacting proteins that bind the phosphatase catalytic subunits (and holoenzymes) target them to specific locations and/or substrates and control their activity.

PP1 AND ISOFORMS

In humans, Protein Phosphatases Type 1 are encoded by three highly related genes (PP1α, PP1βδ and PP1γ) and alternative splicing generates the γ1 and γ2 isoforms. With the exception of *S. cerevisiae*, which has one PP1 gene, all eukaryotes have multiple genes with 8 in *A. thaliana*, 4 in *D. melanogaster* and a predicted 30 in *C. elegans* (13).

Although the cytosolic forms of mammalian PP1, such as those targeted to glycogen and myosin, have been studied in greatest detail, a PP1 activity enriched in the nucleus. The significance of the different PP1 isoforms remains unclear; however, *in vivo* data show that they have distinct subcellular localization patterns (14, 15). All isoforms are found in the nucleus in interphase cells, with PP1γ and PP1βδ showing additional accumulations in nucleoli. PP1 isoforms localization patterns are also dynamic and change both through the cell cycle and in response to various cellular perturbations. It is important to note that global patterns of localization that are observed for each isoform represent the sum of many different PP1-targeting subunit complexes, as shown by the immunostaining of several nuclear targeting subunits with overlapping localization patterns. The distinct localization patterns of the PP1 isoforms therefore imply difference in the specificity of interaction with particular targeting subunits, and so preferential incorporation into different signalling complexes.

It is commonly assumed among enzymologists that the substrate specificity of an enzyme is determined primarily by sterochemical complementarity between a substrate and the active site. The multiplicity of localizations and functions in the case of PP1 suggest that the preference for a phosphorylated sequence in the different protein substrates is not very stringent and does not explain *in vivo* specicificity. PP1 has evolved effective catalytic machinery but lacks strong substrate specificity in its active site. PP1 finds its targets via a large number of regulatory subunits, which influence the activity, and cellular localization of the phosphatase (Figure 1B) (16). To date, more than 50 PP1-protein interactions have been identified (6, 17, 18). With few exceptions so far, PP1 associates with its targeting subunits through the small motif RVXF. Co-crystallization of PP1

with a synthetic peptide encompassing the RVSF sequence established the RVXF motif as a conserved binding sequence that associates with a hydrophobic pocket on the surface of the PP1 catalytic subunit (19). Recently a systematic analysis of structural elements that mediate the binding specificity of PP1 interacting proteins proposed a refined consensus motif for high affinity PP1 ligands (20). Application of the results of this study to protein sequence databases searches enabled the authors to predict PP1-interacting partners and mutational analysis have demonstrated that differences in peptide-protein interactions dictate the affinity of PP1 for cellular regulators and control the dynamic physiological regulation of PP1 functions in the cell.

PP1 IN *S. pombe*

While mammalian cells contain four isoforms of the PP1 catalytic subunit (α, β, γ and δ), fission yeast contains two (6, 21). The unicellular lifestyle, sophisticated genetics and systematic approaches to study phosphorylation (22) makes yeasts particularly attractive models to study PP1 function (23).

The *S. pombe* genome encodes two highly related PP1 catalytic subunits Dis2 and Sds21. PP1 localisation was determined by fusing sequences encoding EGFP to the N-termini of Dis2 and Sds21. In order to maximise the likelihood that the tagged proteins were expressed at their normal physiological levels, the «marker switch approach» (24) to integrate the manipulated versions of *dis2* and *sds21* genes at their native loci was used. Either gene can be individually deleted, however, simultaneous deletion of both is lethal (21, 25). Importantly, both N-terminally EGFP-tagged proteins were shown to be functional as *Δsds21* cells expressing a Dis2.NEGFP at the *dis2*$^{+}$ locus and *Δdis2* cells expressing Sds21.NEGFP at the *sds21*$^{+}$ locus were viable and did not show any apparent defect in morphology, generation time and the actin and microtubule cytoskeletons.

PP1 has been localised to the nucleus in all organisms studied to date, such as *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Aspergillus nidulans*, and mammalian cells. Consistent with these previous studies, Dis2.

NEGFP and Sds21.NEGFP were greatly enriched in the nucleus, being Sds21.NEGFP concentrated in the nucleolus (Figure 2A, B). Intriguingly, in addition to the anticipated nuclear localisation, new locations for Dis2.NEGFP, but not for Sds21.NEGFP, were also observed. Dis2.NEGFP appeared as a bright dot at the nuclear periphery, at the cell tips, endocytotic vesicles and in a ring at the cell equator in early anaphase (Figure 2A, inset). Deletion of *dis2*$^{+}$ from *sds21.NEGFP* cells led to an increase in Sds21.EGFPN protein levels and the incorporation of Sds21.NEGFP into all of the locations normally occupied by Dis2, with the exception of chromatin and the staining around the cell equator during division (Figure 2C).

The bright nuclear dot of Dis2.NEGFP colocalised with a centromeric marker, Cnp1.Cherry, and chromatin immunoprecipitation showed that Dis2.Npk associated with centromeric sequences of the central core non-repetitice domains of the centromeres (Figure 2D).

The cytoplasmic Dis2.NEGFP foci could be divided into two distint subpopulations. One appearing at the cell cortex and moving from it into the cytoplasm for a short distance and another one associated with the cell tips (Figure 3A). The internalisation was dependent on a functional F-actin cytoskeleton and on the endocytotic factor Sla2. The recruitment to cell tips was dependent on the *S. pombe* Bud14 homologue, Wsh3/Tea4 (26, 27) (Figure 3B), and the Kelch domain protein Tea1 (Figure 3C). Wsh3/Tea4 co-localised with Dis2 and physically associated with it (Figure 3D, E). This association relied upon the conserved PP1 binding consensus site in Wsh3/Tea4 ($RV^{223}XF^{225}$) (Figure 3E). Mutation of this sequence blocked the recruitment of Dis2 to cell tips, but neither Tea1 nor Wsh3/Tea4 itself. Moreover, mutation of the PP1 binding site of Wsh3/Tea4 compromised the control over the establishment and choice of polarised tip growth that accompanies cell cycle progression of unperturbed cultures and led to a major deficiency in re-establishing polarised growth from existing tips following osmotic stress. This function may be due, in part, to the impact of Wsh3/Tea4 upon actin polymerisation as the ability of excess Wsh3/Tea4 to induce excessive F-actin cables was abolished by mutation of the PP1 binding sites (28).

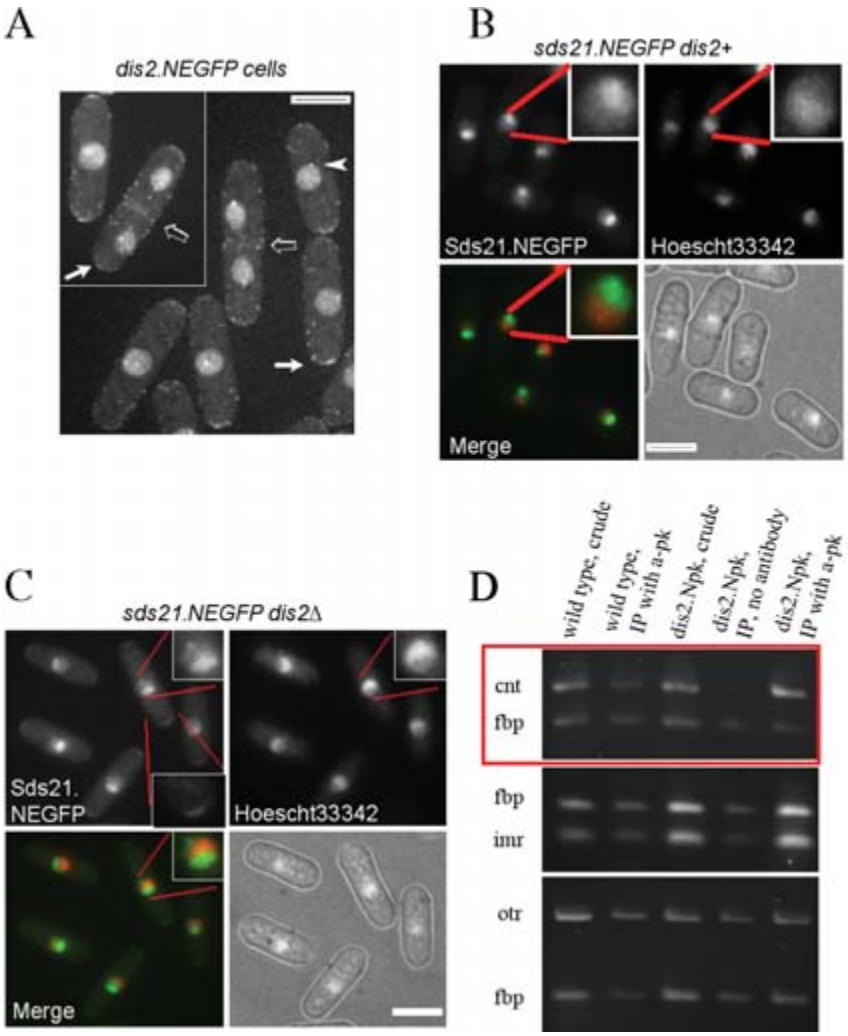


FIGURE 2.- ***Subcellular localisation of Dis2.NEGFP and Sds21.NEGFP.*** ***A)*** *Dis2.NEGFP localized in the nucleus and diffusely in the cytoplasm. It also associated with a bright nuclear dot (➤), the cell tips (➙), cell equator (⇨) and endocytic vesicles.* ***B)*** *Sds21.NEGFP localized in the nucleolus, not stained with Hoescht 33342 which stains the chromatin rich region.* ***C)*** *Sds21.NEGFP in dis2Δ cells localized in the nucleolus, the bright nuclear dot and the cell tips (insets).* ***D)*** *ChIP analysis showed a clear enrichment of the signal arising from PCR with primers to the central but no other sequences in immunoprecipitates from dis2.Npk cells (lane 5), but not when antibodies were not conjugated to the beads (lane 4) or the strain did not contain the tagged dis2⁺ gene (lane 2). Bar, 5 μm (A, B, C).*

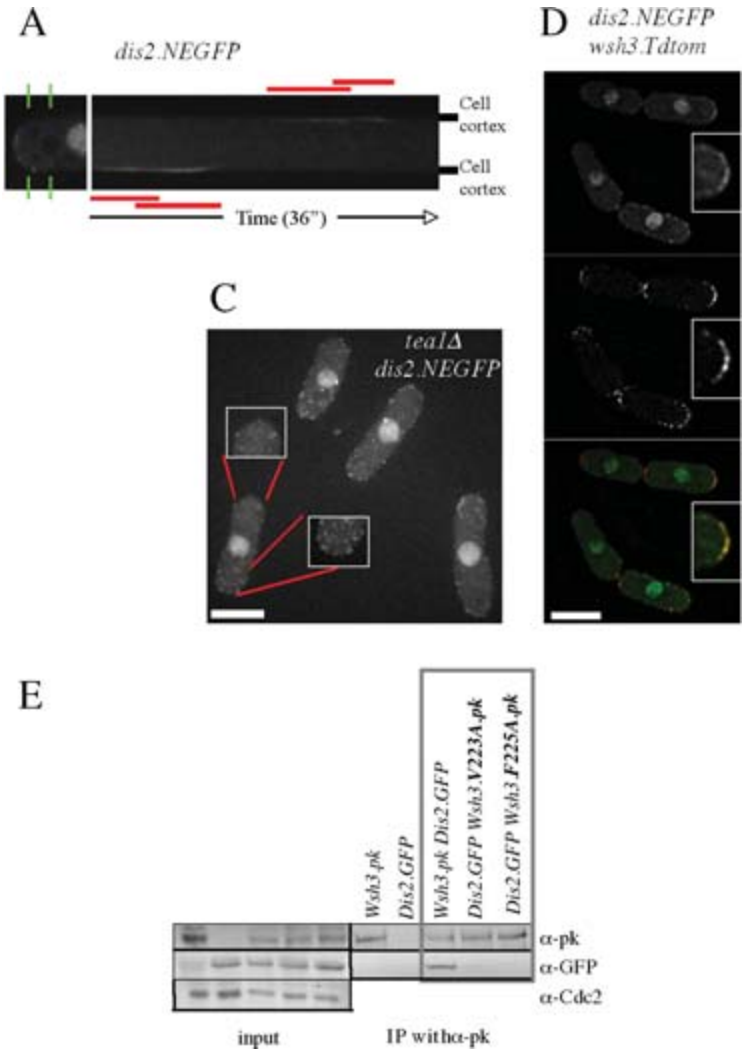


FIGURE 3.- ***Dis2 internalisation and recruitment to the cell tips. A)*** *Kymograph of the area between the green lines shows the internalisation movement of Dis2.NEGFP.* ***B, C)*** *In wsh3Δ* ***(B)*** *and tea1Δ* ***(C)*** *cells the Dis2.NEGFP cap structure at the cell tips was absent.* ***D)*** *Consecutive green and red images of dis2.NEGFP wsh3.tdTom cells showed the colocalisation of Dis2.NEGFP and Wsh3.tdTom at cell tips.* ***E)*** *Extracts were prepared and Pk immunoprecipiates were isolated and blotted with antibodies to recognise the Pk or GFP epitopes. Dis2 and Wsh3 co-immunoprecipitated. Mutations of the PP1 binding site of Wsh3 (V223A or F225A) abolished Dis2 and Wsh3 interaction. Bar, 5 μm (B, C, D).*

POSSIBLE FUNCTIONS OF DIS2 AND SDS21 IN THE NUCLEUS

While PP1 has been found in the nucleus of all organisms, there are differences between the localisation of specific isoforms and cell cycle stages between organisms. In mammalian cells, fluorescence microscopy revealed specific and distinct *in vivo* localisation patterns for PP1α-GFP, PP1β/δ-GFP and PP1γ-GFP (14). These localisations agreed with immunolocalisation data shown for endogenous isoforms using anti-peptide antibodies specific for each isoform (29). In *S. cerevisiae*, GFP-Glc7 localises in the nucleus throughout the mitotic cell cycle, and is enriched in the nucleolus (30). Finally, BIMG-GFP, in *Aspergillus nidulans*, also localises to the nucleus. However, its localisation is dependent upon nutritional conditions; on a poor growth medium, BIMG-GFP shows a greater affinity for the nucleolus than the nucleoplasm, whereas on rich medium, it is more evenly distributed between the two nuclear regions (31). PP1 also changes its distribution in response to nutritional conditions in mammalian tissue cultures, where PP1 is located primarily in the cytoplasm in quiescent cells, but accumulates in the nucleus upon addition of serum and entry into the mitotic cell cycle (32). Likewise, in budding yeast, GFP-Glc7 is uniformly dispersed throughout the cell in stationary phase (33). In the case of PP1 in *S. pombe*, changes in Dis2 and Sds21 nuclear localisation have not been observed in response to different nutritional conditions.

Not much is known about the possible roles for PP1 in the nucleolus. An *Aspergillus nidulans* PP1 mutant, *bimG11*, has hyperphosphorylated nucleolar proteins, supporting the idea that substrates for PP1 are found in the nucleolus (34). In contrast to the uncertainty about the possible role of PP1 in the nucleolus, many studies have linked PP1 function to key nuclear processes such as cell-cycle progression, replication, transcription and RNA processing.

One of the most supported roles for chromatin-associated PP1 is the reversal of signalling by protein kinases of the Aurora family. One of the mitotic substrates of Aurora kinases is histone H3, which is phosphorylated on serine 10 (Ser 10) by the unique Aurora protein kinase in budding yeast, IplI (35) and in fission yeast, Ark1 (36), and Aurora B protein kinase in *Drosophila* (37). Various studies have

reported a correlation between the phosphorylation of histone H3 along chromosomes in G2 and chromosome condensation (35, 37, 38) and also between chromosome decondensation in telophase and PP1 activity or histone H3 dephosphorylation (39, 40). Accordingly, in fission yeast and in *Drosophila*, phosphorylation of histone H3 by Ark1 and Aurora B, respectively, is involved in the recruitment of condensin complex to mitotic chromatin, and chromosome condensation (36, 37, 41). Moreover, it has been published that histone H3 is an *in vivo* mitotic substrate of PP1 in budding yeast (35) and an *in vitro* one in *Xenopus* (42). These observations have led to the hypothesis that chromosome (de)condensation requires histone H3 (de)phosphorylation. However, differences seem to exist between species since mutation of Ser 10 of histone H3 to alanine did not cause any observable growth defect in budding yeast (35) and neither Ser 10 nor the entire N-terminal tail of *Xenopus* histone H3 is essential for chromosome condensation (43). The histone H3 kinase activity of *Xenopus* Aurora-B depends on its phosphorylation by an unknown kinase, which may well be Aurora-B itself, as its budding yeast counterpart, Ipl1, is known to undergo autophosphorylation (42-44). Interestingly, in *Xenopus* this Aurora-B activation has been shown to be antagonized by PP1 (42).

Although the antagonistic relationship between Aurora and PP1 seems to be conserved from yeast to human, the possible interaction in fission yeast between Ark1 and Dis2/Sds21 and the involvement of Dis2/Sds21 in the dephosphorylation of H3 have not been studied yet. Interestingly, *ark1*$^+$ overexpression greatly inhibited cell growth of the cold sensitive conditional *dis2.11* mutant at the permissive temperature, and exacerbated the mitotic defects of *dis2.11* resulting in a complete absence of colony formation at the restrictive temperature (our unpublished results). Wild type cells tolerate *ark1*$^+$ overexpression, and only display a minor phenotype, as 3% of the population prematurely commit to mitosis (36). Thus, the effect of *ark1*$^+$ overexpression in *dis2.11* could suggest a genetic interaction between *dis2*$^+$ and *ark1*$^+$ and antagonising relationship between these proteins in *S. pombe*.

Recently it has been suggested that Dis2 controls the release of cells from the G2 DNA damage checkpoint (45, 46). Dis2 overexpression sensitises cells to DNA damage so that they are unable

to arrest in G2 phase after DNA damage. Instead they go into mitosis and cells undergo a catastrophic mitosis. Consistent with a role for Dis2 in release from G2 DNA damage checkpoint arrest, *dis2Δ* and *dis2.11* cells have a prolonged delay in response to DNA damage in the G2 phase. However, Dis2 is unlikely to be the only protein responsible for cell cycle re-entry following DNA damage checkpoints arrest because the majority of *dis2Δ* cells do eventually recover, albeit several hours after wild type cells. Moreover, the study by Elzen and O'Connell also showed that Dis2, but not Sds21, was able to dephosphorylate and inactivate Chk1 kinase *in vitro* and *in vivo*. However, whether this dephosphorylation is responsible for the release of the checkpoint arrest remains to be determined.

POSSIBLE FUNCTIONS OF DIS2 AT THE CENTROMERES

Multiple studies carried out in budding yeast and animals suggest that PP1 may be counteracting Aurora kinase at the kinetochore. In *S. cerevisiae*, temperature sensitive *ipl1* mutants missegregate chromosomes severely and die at elevated temperatures (47). The ts^- growth phenotype of such mutants can be partially suppressed by mutations of *S. cerevisiae* PP1, $GLC7^+$ (48). Furthermore, increasing the dosage of *GLC7* results in chromosome missegregation in wild-type cells and lethality in *ipl1* mutant cells, presumably due to exacerbation of the *ipl1* mutant phenotype. These observations indicate that a reduction in Ipl1 protein kinase activity can be compensated for by a reduction in PP1 activity, and exacerbated by an increase in PP1 activity. This suggests that PP1 opposites Ipl1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation.

PP1 and Aurora may be counteracting each other in the control of the phosphorylation state of kinetochore proteins. And the phosphorylation state of kinetochore proteins may affect their binding to centromeric DNA, their competence to bind microtubules and/or their association with other kinetochore proteins.

In budding yeast, the phosphorylation state of Ndc10, a component of the kinetochore complex CBF3, affects the microtubule-binding activity of kinetochores reconstituted in cell extracts. Interestingly, Ndc10 is hyperphosphorylated in *glc7.10* mutant cell

extracts, which display low microtubule-binding activity of kinetochore complexes *in vitro* and exhibit a high frequency of chromosome loss *in vivo* (49) Thus, a role for Glc7 in the regulation of kinetochore-microtubule attachment by phosphorylation can be inferred. However, Ndc10 has not yet been shown to be a substrate of Glc7. Moreover, even when Biggins and colleagues demonstrated that Ndc10 was phosphorylated by Ipl1 *in vitro* (44), its phosphorylation status *in vivo* has not been studied yet.

Recent studies in *S. cerevisiae* have generated insight into the molecular mechanisms of kinetochore bipolar microtubule attachment (chromosome bi-orientation). One of the key players in establishing and monitoring bi-orientation is the chromosome passenger complex Aurora B/survivin (Ipl1/Sli15) (50, 51). The complex Ipl1-Sli15 has been proposed to facilitate the re-orientation of kinetochore-spindle pole connections until tension is exerted on sister kinetochores by bipolar microtubule attachment (51). Sli15 associates with Ipl1 and stimulates its kinase activity (52, 53). Interestingly, in *S. cerevisiae* the temperature-sensitive mitotic defects of *sli15* mutants are attenuated by overexpression of a dominant-negative truncated version of Glc7 (53) Moreover, it seems that Ipl1 is also required to activate the spindle checkpoint when tension is not exerted on kinetochores (44).

Furthermore, it has been found that Ipl1 phosphorylates Dam1 *in vitro* and that Dam1 phosphorylation is dependent on Ipl1 *in vivo* (52). Dam1 is a component of the multimeric spindle-associated DASH complex that is required for bi-orientation of sister kinetochores and for mitotic spindle integrity (54, 55). Interestingly, *dam1* mutants that might mimic constitutive phosphorylation of Dam1 are able to partially suppress the defects of *ipl1.2* but are synthetically lethal with *glc7.10*. Furthermore, overexpression of Glc7 exacerbates the temperature-sensitive growth defect of *dam1* mutant cells, indicating that Dam1 may also be a substrate of PP1 (52). Recently, Cheeseman and co-workers have shown that Dam1 phosphorylation does not reduce DASH complex binding to microtubules *in vitro* or change the composition of the complex (52). Instead, they suggest that Dam1 phosphorylation weakens/abolishes the association between the DASH complex and the rest of the kinetochore (56, 57). Interestingly, this hypothesis has been recently

supported by the work of Shang and colleagues (58). They have shown that the interactions between Dam1 and Spc34 (a subunit of the Dam1 complex) and Ndc80 (a subunit of the Ndc80 complex), are weakened by mutations mimicking phosphorylation at Ipl1 sites (58). A model has been proposed in which phosphorylation of essential kinetochore components, such as Dam1 and Ndc80 complexes, weakens their physical interactions and therefore results in the detachment of the kinetochore from microtubules. Dephosphorylation by Glc7 enables the re-association of the DASH complex with the kinetochore. This process of dissociation and reassociation may facilitate the re-orientation of kinetochores and may continue until bi-orientation is eventually established (Figure 4).

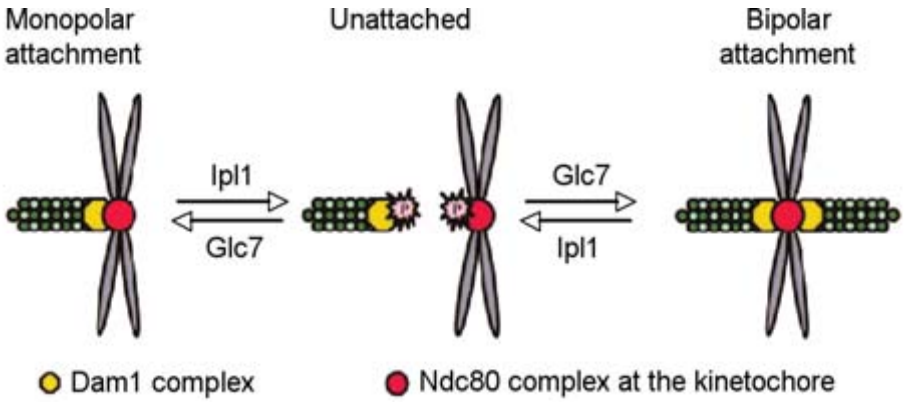


FIGURE 4. ***Model for phosphoregulation at the yeast kinetochore.*** *Interactions between the Dam1 complex and the Ndc80 complex are proposed to be weakened when Dam1 and Ndc80 are phosphorylated by Ipl1. The weakening of this association facilitates the subsequent establishment of new kinetochore-microtubule attachments and the establishment of bipolar attachment. Glc7 might be counteracting Ipl1. Model adapted from (56) and (58).*

POSSIBLE FUNCTIONS OF DIS 2 IN ENDOCYTOSIS

The extensive characterisation of endocytosis in *S. cerevisiae* provides a framework within which to view Dis2 association with

endocytic vesicles. Dis2.EGFPN dots were moving from the cell cortex towards the interior of the cell for a short distance. This pattern of movement was very similar to that recently described in budding yeast for proteins involved in endocytic internalisation. In basis of the analysis of the motility of fusions between endocytotic proteins and GFP a model for the early endocytotic pathway has been proposed (59-61) (Figure 5).

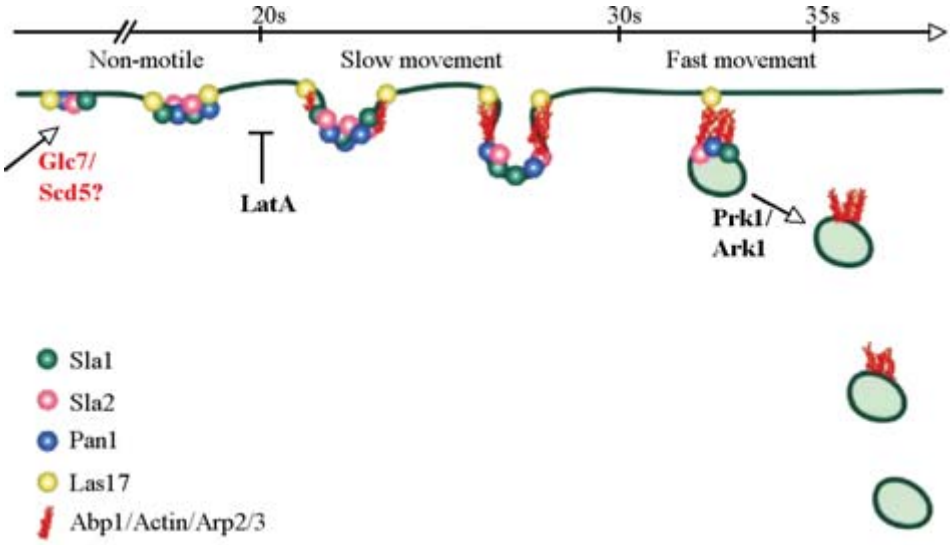


FIGURE 5. ***Pathway for the association of receptors, adaptors and actin during endocytic internalisation.*** *First, Sla1, Sla2, Pan1 and Las17 assemble in a nonmotile complex at the plasma membrane. Then, actin, Abp1, and the Arp2/3 complex are recruited, whereupon the complex containing Sla1, Sla2 and Pan1 slowly moves away from the plasma membrane, towards the interior of the cell. The early patch components are disassembled during this slow movement phase. The patches containing only late components change then to a fast movement phase during which the late components are disassembled. Actin polymerisation is required for the movement of the presumed endocytic vesicles and its associated protein complex, and for subsequent disassembly of the complex. The early components of the patches (Sla1, Sla2 and Pan1) are likely to be disassembled as a response to phosphorylation by the Ark1 and Prk1 kinases. This phosphorylation might disrupt the association of Sla1 with Pan1. If Pan1 and Sla1 are phosphorylated and then lost from the complex, dephosphorylation might allow their re-incorporation into cortical complexes. This dephosphoryaltion might be carry out by the Glc7-Scd5 complex. Adapted from Kaksonen et al. (59).*

The site of endocytosis is determined in a non-motile phase by the co-operative action of molecules such as clathrin, Sla1, Sla2 and Pan1. The association of these proteins with the emerging vesicle persists through the next, slow motile, phase during which the recruitment of myosin 5 and polymerisation of actin accompanies the formation of the clathrin pit. The vesicle then enters a rapid motile phase following the cessation of further actin polymerisation, the departure of myosin 5 and the scission of the pit to form the vesicle. Actin polymerisation is accompanied by the recruitment of homologues of the higher eukaryotic proteins N-WASP and the Arp2/3 complex which harness actin polymerisation to promote scission and the eventual long range, fast motility of the free vesicle in the final phase (60, 61). The early components of the patches (Sla1, Sla2 and Pan1) are likely to be disassembled as a response to phosphorylation by the Ser/Thr kinases Ark1 and Prk1 (note that *S. cerevisiae* Ark1 is not related to the fission yeast aurora-related kinase Ark1). Ark1 and Prk1 localise to actin patches in an Abp1-dependent manner (62) and are thus likely to be components of late patches. Recent data support a model in which, following the association of actin with the endocytic machinery, Ark1 and Prk1 can phosphorylate Sla1 and Pan1 and this Prk1-dependent phosphorylation disrupts the association of Sla1 with Pan1 (63). If Pan1 and Sla1 are phosphorylated and then lost from the complex, dephosphorylation might allow their re-incorporation into cortical complexes. This remains to be shown, as the role of phosphatases in endocytosis has not been extensively studied. However, interactions between Sla1 and the yeast homologue of PP1, Glc7 (64, 65), as well as between Pan1 and Glc7 have been reported (66). Interestingly, the *glc7* conditional mutant *glc7.10* has been shown to be defective in vacuolar fusion and in secretory and endocytic vesicular transport (67). Similar phenotypes are observed after the functional disruption of proteins involved in endocytosis such as Scd5 or Sla2 (67, 68).Scd5 has been identified as a PP1-binding protein in various screens (65, 69, 70). Scd5 binds to Glc7 via a classic PP1 binding motif and the disruption of the RVXF motif of Scd5 severely compromised endocytosis, actin structure and confers temperature sensitive lethality. Sla2 interacts physically and genetically with Scd5 (71, 72), and Scd5 is required in conjunction with clathrin for the association of Sla2 with cortical actin (73). A possible scenario could be that

Scd5 targets PP1 to actin patches and vesicles, where the Glc7/Scd5 holoenzyme counteracts Prk1 phosphorylation being potential substrates of Glc7/Scd5 the phosphoproteins Sla2, Sla1 and Pan1 (73, 74). As Prk1 phosphorylation acts at multiple levels to regulate actin dynamics and the association of endocytic proteins a dynamic interplay between Scd5/Glc7 and Prk1 is likely to be critical to control endocytosis.

Although endocytosis is less extensively characterised in fission yeast, where it has been studied, it mirrors that of budding yeast. The fission yeast Sla2/End4 gene product localises in the identical manner to its budding yeast orthologue and is similarly required for endocytosis (75). By analogy with the three phases in budding yeast, we found that Dis2 associates with vesicles during the non-motile phase and leaves just prior to the highly motile one. It was recruited to the patches after Sla2/End4. As has been previously reported for Sla2/End4, de-polymerisation of actin with LatA did not block recruitment of Dis2 to the cell cortex but did block Dis2.NEGFP foci at the cell cortex before internalisation (76-78).

POSSIBLE FUNCTIONS OF DIS 2 IN POLARIZED CELL GROWTH

The recruitment of a second population of Dis2.NEGFP foci to cell tips by Wsh3/Tea4 in a manner that is dependent upon the Kelch domain protein Tea1 is highly reminiscent of budding yeast, where Bud14 protein relies upon the Kelch domain proteins Kel1 and Kel2 to recruit Glc7 to the bud tip to control dynein activity during spindle orientation. The *S. pombe* Bud14 homologue, Wsh3/Tea4 (26, 27) both co-localised with Dis2 and physically associated with it. The binding of PP1 to Wsh3/Tea4 is critically important for the role played by Wsh3/Tea4 in maintaining polarised tip growth as cells transit the cell cycle or recover from osmotic stress. This function is likely to involve modulation of the F-actin cytoskeleton as the ability of Wsh3/Tea4 to promote F-actin polymerisation is compromised when it cannot bind PP1 (Figure 6).

Thus, like its *A. nidulans* homologue BimG, Dis2 function is required for tip growth. The requirement for PP1 function during

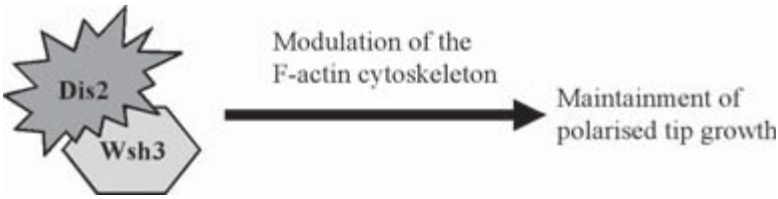


FIGURE 6. ***Involvement of Dis2 and Wsh3 in polarised tip growth.*** *Recruitment of Dis2 to the cell tips by Wsh3 is required for the maintainment of polarised tip growth, most likely due to the modulation of the F-actin cytoskeleton.*

recovery from stress echoes the requirement for phosphorylation of the polo kinase Plo1 on serine 402 to promote tip growth during recovery from centrifugation and heat stress (79). However, it remains to be established whether Dis2 counteracts the action of polo kinase or any of the other protein kinases, such as Pom1, Kin1, Pck2 and Pck3 that modulate cell morphogenesis in fission yeast (80-82). Alternatively it could play a critical role in modulating the activity of the kinases of the stress response pathway that associates with Wsh3/Tea4 (27). In this scenario the impact on morphogenesis would be mediated by stress signalling to either halt growth in the initial response to the stress, or to re-initiate it once cell composition has been changed to deal with this altered state.

Although Bud14/Glc7 is required for spindle orientation rather than cell morphogenesis the conservation of Bud14 related molecules across species indicates that the identification of the substrates of the Dis2-Wsh3/Tea4 holoenzyme and clarifying its relationship with the cell polarity/morphogenesis kinases will shed much light on the control of the microtubule cytoskeleton and cell morphogenesis by protein phosphorylation.

FUTURE PERSPECTIVES

The field of protein phosphorylation research has entered a new era for several reasons. First, because of what is a nearly complete list of catalytic subunits in several organisms, it is now possible to do functional genomic screens for the role of phosphatases in specific biological processes. Second, as more phosphatase-targeting subunits

are identified and characterized, it is increasingly clear that they have a fundamental role in phosphatase function and that a comprehensive catalogue of these proteins is crucial to our understanding of the varied intracellular functions of their associated catalytic subunits (83).

Targeting these regulatory subunits or disrupting their interaction with the catalytic subunit might also represent a feasible means to treat specific diseases. The potential of this idea was typified in the large-scale loss of function screen done by MacKeigan and colleagues (84) This group found that 32% of the phosphatases screened promoted cell survival, whereas 10 protein phosphatases were classifies as «cell death phosphatases» (that is, the reduction of their cellular levels caused resistance to apoptosis-inducing agents), and can therefore be considered as putative tumour suppressors.

Mass spectrometry-based proteomics has become a powerful tool to identity the components of multiprotein complexes, and more recently, several techniques have exploited the use of heavy isotope tags to compare and quantitate relative protein levels under different biological conditions. Clearly, mass spectrometry-based approaches and large-scale functional genomics will be driving forces in this new era in which protein phosphatases will sit on centre stage with their protein kinase counterparts.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Cancer Research UK (CRUK), Direccion General de Investigacion Cientifica y Tecnica (DYGYCYT) and the Basque Government.

BIBLIOGRAPHY

(1) PAWSON, T. (1994) Introduction: protein kinases. *Faseb J*. 8: 1112-1113.
(2) MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTINEZ, R.; HUNTER, T. AND SUDARSANAM, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 298: 1912-1934.
(3) OLSEN, J. V.; BLAGOEV, B.; GNAD, F.; MACEK, B.; KUMAR, C.; MORTENSEN, P. AND MANN, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 127: 635-648.

(4) COHEN, P. (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur. J. Biochem*. 268: 5001-5010.
(5) COHEN, P. (2002) Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug. Discov*. 1: 309-315.
(6) CEULEMANS, H. AND BOLLEN, M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev*. 84: 1-39.
(7) MACKINTOSH, C. AND MACKINTOSH, R. W. (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends. Biochem. Sci*. 19: 444-448.
(8) JANSSENS, V. AND GORIS, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J*. 353: 417-439.
(9) MUKHERJI, M.; BELL, R.; SUPEKOVA, L.; WANG, Y.; ORTH, A. P.; BATALOV, S.; MIRAGLIA, L.; HUESKEN, D.; LANGE, J.; MARTIN, C.; SAHASRABUDHE, S.; REINHARDT, M.; NATT, F.; HALL, J.; MICKANIN, C.; LABOW, M.; CHANDA, S. K.; CHO, C. Y. AND SCHULTZ, P. G. (2006) Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 103: 14819-14824.
(10) INGEBRITSEN, T. S. AND COHEN, P. (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur. J. Biochem*. 132: 255-261.
(11) ALONSO, A.; SASIN, J.; BOTTINI, N.; FRIEDBERG, I.; FRIEDBERG, I.; OSTERMAN, A.; GODZIK, A.; HUNTER, T., DIXON, J. AND MUSTELIN, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 117: 699-711.
(12) ANDERSEN, J. N.; JANSEN, P. G.; ECHWALD, S. M.; MORTENSEN, O. H.; FUKADA, T.; DEL VECCHIO, R.; TONKS, N. K. AND MOLLER, N. P. (2004) A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *Faseb J*. 18: 8-30.
(13) MOORHEAD, G. (2007) Protein phosphatase protocolsHumana Press. Totowa, N.J.
(14) TRINKLE-MULCAHY, L.; SLEEMAN, J. E. AND LAMOND, A. I. (2001) Dynamic targeting of protein phosphatase 1 within the nuclei of living mammalian cells. *J. Cell. Sci*. 114: 4219-4228.
(15) LESAGE, B.; BEULLENS, M.; CEULEMANS, H.; HIMPENS, B. AND BOLLEN, M. (2005) Determinants of the nucleolar targeting of protein phosphatase-1. *FEBS Lett*. 579: 5626-5630.
(16) BARFORD, D.; DAS, A. K. AND EGLOFF, M. P. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomo.l Struct*. 27: 133-164.
(17) EGLOFF, M. P.; JOHNSON, D. F.; MOORHEAD, G.; COHEN, P. T.; COHEN, P. AND BARFORD, D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Embo J*. 16: 1876-1887.
(18) ORTIZ MELON, J. M. (2006) La diversidad funcional de protein fosfatasa-1 y el papel de nuevas subunidades reguladoras. *An. R. Acad. Nac. Farm*. 72: 283-299.
(19) TERRAK, M.; KERFF, F.; LANGSETMO, K.; TAO, T. AND DOMINGUEZ, R. (2004) Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature*. 429: 780-784.

(20) MEISELBACH, H.; STICHT, H. AND ENZ, R. (2006) Structural analysis of the protein phosphatase 1 docking motif: molecular description of binding specificities identifies interacting proteins. *Chem. Biol*. 13: 49-59.
(21) OHKURA, H.; KINOSHITA, N.; MIYATANI, S.; TODA, T. AND YANAGIDA, M. (1989) The Fission Yeast *dis2*$^{+}$ Gene Required for Chromosome Disjoining Encodes One of Two Putative Type 1 Protein Phosphatases. *Cell*. 57: 997-1007.
(22) PTACEK, J.; DEVGAN, G.; MICHAUD, G.; ZHU, H.; ZHU, X.; FASOLO, J.; GUO, H.; JONA, G.; BREITKREUTZ, A.; SOPKO, R.; MCCARTNEY, R. R.; SCHMIDT, M. C.; RACHIDI, N.; LEE, S. J.; MAH, A. S.; MENG, L.; STARK, M. J.; STERN, D. F.; DE VIRGILIO, C.; TYERS, M.; ANDREWS, B.; GERSTEIN, M.; SCHWEITZER, B.; PREDKI, P. F. AND SNYDER, M. (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*. 438: 679-684.
(23) STARK, M. J. (1996) Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast*. 12: 1647-1675.
(24) MACIVER, F. H.; TANAKA, K.; ROBERTSON, A. M. AND HAGAN, I. M. (2003) Physical and functional interactions between polo kinase and the spindle pole component Cut12 regulate mitotic commitment in S. pombe. *Genes Dev*. 17: 1507-1523.
(25) SANGRADOR, A.; ANDRES, I.; EGUIRAUN, A.; LORENZO, M. L. AND ORTIZ, J. M. (1998) Growth arrest of Schizosaccharomyces pombe following overexpression of mouse type 1 protein phosphatases. *Mol. Gen. Genet*. 259: 449-456.
(26) MARTIN, S. G.; MCDONALD, W. H.; YATES, J. R. 3RD AND CHANG, F. (2005) Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev. Cell*. 8: 479-491.
(27) TATEBE, H.; SHIMADA, K.; UZAWA, S.; MORIGASAKI, S. AND SHIOZAKI, K. (2005) Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr. Biol*. 15: 1006-1015.
(28) ALVAREZ-TABARES, I.; GRALLERT, A.; ORTIZ, J. M. AND HAGAN, I. M. (2007) Schizosaccharomyces pombe protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and a partnership with Wsh3/Tea4 to control polarised growth. *J Cell Sci*.
(29) ANDREASSEN, P. R.; LACROIX, F. B.; VILLA-MORUZZI, E. AND MARGOLIS, R. L. (1998) Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells. *J. Cell. Biol*. 141: 1207-1215.
(30) BLOECHER, A. AND TATCHELL, K. (2000) Dynamic localization of protein phosphatase type 1 in the mitotic cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol*. 149: 125-140.
(31) FOX, H.; HICKEY, P. C.; FERNANDEZ-ABALOS, J. M.; LUNNESS, P.; READ, N. D. AND DOONAN, J. H. (2002) Dynamic distribution of BIMG(PP1) in living hyphae of *Aspergillus* indicates a novel role in septum formation. *Mol. Microbiol*. 45: 1219-1230.
(32) FERNANDEZ, A.; BRAUTIGAN, D. L. AND N.J., L. (1992) Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis:chromosomal localization and involvement in mitotic exit. *J. Cell. Biol.* 116: 1421-1430.

(33) Bloecher, A. and Tatchell, K. (1999) Defects in *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase type I activate the spindle/kinetochore checkpoint. *Genes Dev*. 13: 517-522.
(34) DOONAN, J. H. AND MORRIS, N. R. (1989) The bimG gene of *Aspergillus nidulans* required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian protein phosphatase 1. *Cell*. 57: 987-996.
(35) HSU, J. Y.; SUN, Z. W.; LI, X.; REUBEN, M.; TATCHELL, K.; BISHOP, D. K.; GRUSHCOW, J. M.; BRAME, C. J.; CALDWELL, J. A.; HUNT, D. F.; LIN, R.; SMITH, M. M. AND ALLIS, C. D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*. 102: 279-291.
(36) PETERSEN, J. AND HAGAN, I. M. (2003) *S. pombe* aurora kinase/survivin is required for chromosome condensation and the spindle checkpoint attachment response. *Curr. Biol*. 13: 590-597.
(37) GIET, R. AND GLOVER, D. M. (2001) *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J. Cell. Biol*. 152: 669-682.
(38) ADAMS, R. R.; MAIATO, H.; EARNSHAW, W. C. AND CARMENA, M. (2001) Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J. Cell. Biol*. 153: 865-880.
(39) AXTON, J. M.; DOMBRADI, V.; COHEN, P. T. W. AND GLOVER, D. M. (1990) One of the protein phosphatase1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell*. 63: 33-46.
(40) TOURNEBIZE, R.; ANDERSEN, S. S.; VERDE, F.; DOREE, M.; KARSENTI, E. AND HYMAN, A. A. (1997) Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *Embo J*. 16: 5537-5549.
(41) MORISHITA, J.; MATSUSAKA, T.; GOSHIMA, G.; NAKAMURA, T.; TATEBE, H. AND YANAGIDA, M. (2001) Bir1/Cut17 moving from chromosome to spindle upon the loss of cohesion is required for condensation, spindle elongation and repair. *Genes Cells*. 6: 743-763.
(42) MURNION, M. E.; ADAMS, R. R.; CALLISTER, D. M.; ALLIS, C. D.; EARNSHAW, W. C. AND SWEDLOW, J. R. (2001) Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J. Biol. Chem*. 276: 26656-26665.
(43) DE LA BARRE, A. E.; ANGELOV, D.; MOLLA, A. AND DIMITROV, S. (2001) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J*. 20: 6383-6393.
(44) BIGGINS, S.; SEVERIN, F. F.; BHALLA, N.; SASSOON, I.; HYMAN, A. A. AND MURRAY, A. W. (1999) The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev*. 13: 532-544.
(45) DEN ELZEN, N. R. AND O'CONNELL, M. J. (2004) Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *Embo J*. 23: 908-918.
(46) LATIF, C.; ELZEN, N. R. AND O'CONNELL, M. J. (2004) DNA damage checkpoint maintenance through sustained Chk1 activity. *J. Cell. Sci*. 117: 3489-3498

(47) CHAN, C. S. AND BOTSTEIN, D. (1993) Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics*. 135: 677-691.
(48) FRANCISCO, L.; WANG, W. AND CHAN, C. S. (1994) Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol*. 14: 4731-4740.
(49) SASSOON, I.; SEVERIN, F. F.; ANDREWS, P. D.; TABA, M. R.; KAPLAN, K. B.; ASHFORD, A. J.; STARK, M. J.; SORGER, P. K. AND HYMAN, A. A. (1999) Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* kinetochores by the type 1 phosphatase Glc7p. *Genes Dev*. 13: 545-555.
(50) BIGGINS, S.; BHALLA, N.; CHANG, A.; SMITH, D. L. AND MURRAY, A. W. (2001) Genes involved in sister chromatid separation and segregation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 159: 453-470.
(51) TANAKA, T. U.; RACHIDI, N.; JANKE, C.; PEREIRA, G.; GALOVA, M.; SCHIEBEL, E.; STARK, M. J. AND NASMYTH, K. (2002) Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*. 108: 317-329.
(52) KANG, J.; CHEESEMAN, I. M.; KALLSTROM, G.; VELMURUGAN, S.; BARNES, G. AND CHAN, C. S. (2001) Functional cooperation of Dam1, Ipl1, and the inner centromere protein (INCENP)-related protein Sli15 during chromosome segregation. *J. Cell. Biol*. 155: 763-774.
(53) KIM, J. H.; KANG, J. S. AND CHAN, C. S. (1999) Sli15 associates with the ipl1 protein kinase to promote proper chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol*. 145: 1381-1394.
(54) JANKE, C.; ORTIZ, J.; TANAKA, T. U.; LECHNER, J. AND SCHIEBEL, E. (2002) Four new subunits of the Dam1-Duo1 complex reveal novel functions in sister kinetochore biorientation. *Embo J*. 21: 181-193.
(55) LI, Y.; BACHANT, J.; ALCASABAS, A. A.; WANG, Y.; QIN, J. AND ELLEDGE, S. J. (2002) The mitotic spindle is required for loading of the DASH complex onto the kinetochore. *Genes Dev*. 16: 183-197.
(56) CHEESEMAN, I. M.; ANDERSON, S.; JWA, M.; GREEN, E. M.; KANG, J.; YATES, J. R. 3RD; CHAN, C. S.; DRUBIN, D. G. AND BARNES, G. (2002) Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell*. 111: 163-172.
(57) CHEESEMAN, I. M.; BREW, C.; WOLYNIAK, M.; DESAI, A.; ANDERSON, S.; MUSTER, N.; YATES, J. R.; HUFFAKER, T. C.; DRUBIN, D. G. AND BARNES, G. (2001) Implication of a novel multiprotein Dam1p complex in outer kinetochore function. *J. Cell. Biol*. 155: 1137-1145.
(58) SHANG, C.; HAZBUN, T. R.; CHEESEMAN, I. M.; ARANDA, J.; FIELDS, S.; DRUBIN, D. G. AND BARNES, G. (2003) Kinetochore protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p. *Mol Biol Cell*. 14: 3342-3355.
(59) KAKSONEN, M.; SUN, Y. AND DRUBIN, D. G. (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*. 115: 475-487.
(60) KAKSONEN, M.; TORET, C. P. AND DRUBIN, D. G. (2005) A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*. 123: 305-320.

(61) KAKSONEN, M.; TORET, C. P. AND DRUBIN, D. G. (2006) Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 7: 404-414.
(62) COPE, M. J.; YANG, S.; SHANG, C. AND DRUBIN, D. G. (1999) Novel protein kinases Ark1p and Prk1p associate with and regulate the cortical actin cytoskeleton in budding yeast. *J. Cell. Biol*. 144: 1203-1218.
(63) ZENG, G.; YU, X. AND CAI, M. (2001) Regulation of yeast actin cytoskeleton-regulatory complex Pan1p/Sla1p/End3p by serine/threonine kinase Prk1p. *Mol. Biol. Cell*. 12: 3759-3772.
(64) GUPTA, M. B.; NATH, C.; PATNAIK, G. K. AND SAXENA, R. C. (1996) Effect of calcium channel blockers on withdrawal syndrome of lorazepam in rats. *Indian J. Med. Res*. 103: 310-314.
(65) VENTURI, G. M.; BLOECHER, A.; WILLIAMS-HART, T. AND TATCHELL, K. (2000) Genetic interactions between GLC7, PPZ1 and PPZ2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 155: 69-83.
(66) UETZ, P.; GIOT, L.; CAGNEY, G.; MANSFIELD, T. A.; JUDSON, R. S.; KNIGHT, J. R.; LOCKSHON, D.; NARAYAN, V.; SRINIVASAN, M.; POCHART, P.; QURESHI-EMILI, A.; LI, Y.; GODWIN, B.; CONOVER, D.; KALBFLEISCH, T.; VIJAYADAMODAR, G.; YANG, M.; JOHNSTON, M.; FIELDS, S. AND ROTHBERG, J. M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 403: 623-627.
(67) PETERS, C.; ANDREWS, P. D.; STARK, M. J.; CESARO-TADIC, S.; GLATZ, A.; PODTELEJNIKOV, A.; MANN, M. AND MAYER, A. (1999) Control of the terminal step of intracellular membrane fusion by protein phosphatase 1. *Science*. 285: 1084-1087.
(68) NELSON, K. K.; HOLMER, M. AND LEMMON, S. K. (1996) SCD5, a suppressor of clathrin deficiency, encodes a novel protein with a late secretory function in yeast. *Mol. Biol. Cell*. 7: 245-260.
(69) TU, J.; SONG, W. AND CARLSON, M. (1996) Protein phosphatase type 1 interacts with proteins required for meiosis and other cellular processes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. 16: 4199-4206.
(70) HO, Y.; GRUHLER, A.; HEILBUT, A.; BADER, G. D.; MOORE, L.; ADAMS, S. L.; MILLAR, A.; TAYLOR, P.; BENNETT, K.; BOUTILIER, K.; YANG, L.; WOLTING, C., DONALDSON, I.; SCHANDORFF, S.; SHEWNARANE, J.; VO, M.; TAGGART, J.; GOUDREAULT, M.; MUSKAT, B.; ALFARANO, C.; DEWAR, D.; LIN, Z.; MICHALICKOVA, K.; WILLEMS, A. R.; SASSI, H.; NIELSEN, P. A.; RASMUSSEN, K. J.; ANDERSEN, J. R.; JOHANSEN, L. E.; HANSEN, L. H.; JESPERSEN, H.; PODTELEJNIKOV, A.; NIELSEN, E.; CRAWFORD, J.; POULSEN, V.; SORENSEN, B. D.; MATTHIESEN, J.; HENDRICKSON, R. C.; GLEESON, F.; PAWSON, T.; MORAN, M. F.; DUROCHER, D.; MANN, M.; HOGUE, C. W.; FIGEYS, D. AND TYERS, M. (2002) Systematic identification of protein *complexes in Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*. 415: 180-183.
(71) HENRY, K. R.; D'HONDT, K.; CHANG, J.; NEWPHER, T.; HUANG, K.; HUDSON, R. T.; RIEZMAN, H. AND LEMMON, S. K. (2002) Scd5p and clathrin function are important for cortical actin organization, endocytosis, and localization of sla2p in yeast. *Mol. Biol. Cell*. 13: 2607-2625.
(72) MULHOLLAND, J.; WESP, A.; RIEZMAN, H. AND BOTSTEIN, D. (1997) Yeast actin cytoskeleton mutants accumulate a new class of Golgi-derived secretary vesicle. *Mol. Biol. Cell*. 8: 1481-1499.

(73) HENRY, K. R.; D'HONDT, K.; CHANG, J. S.; NIX, D. A.; COPE, M. J.; CHAN, C. S.; DRUBIN, D. G. AND LEMMON, S. K. (2003) The actin-regulating kinase Prk1p negatively regulates Scd5p, a suppressor of clathrin deficiency, in actin organization and endocytosis. *Curr. Biol*. 13: 1564-1569.
(74) CHANG, J. S.; HENRY, K.; GELI, M. I. AND LEMMON, S. K. (2006) Cortical recruitment and nuclear-cytoplasmic shuttling of Scd5p, a protein phosphatase-1-targeting protein involved in actin organization and endocytosis. *Mol. Biol. Cell*. 17: 251-262.
(75) IWAKI, T.; TANAKA, N.; TAKAGI, H.; GIGA-HAMA, Y. AND TAKEGAWA, K. (2004) Characterization of end4+, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 21: 867-881.
(76) CASTAGNETTI, S.; BEHRENS, R. AND NURSE, P. (2005) End4/Sla2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell. Sci*. 118: 1843-1850.
(77) GE, W.; CHEW, T. G.; WACHTLER, V.; NAQVI, S. N. AND BALASUBRAMANIAN, M. K. (2005) The novel fission yeast protein Pal1p interacts with Hip1-related Sla2p/End4p and is involved in cellular morphogenesis. *Mol. Biol. Cell*. 16: 4124-4138.
(78) SIROTKIN, V.; BELTZNER, C. C.; MARCHAND, J. B. AND POLLARD, T. D. (2005) Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J. Cell. Biol*. 170: 637-648.
(79) PETERSEN, J. AND HAGAN, I. M. (2005) Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature*. 435: 507-512.
(80) BAHLER, J. AND PRINGLE, J. R. (1998) Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev*. 12: 1356-1370.
(81) DREWES, G. AND NURSE, P. (2003) The protein kinase kin1, the fission yeast orthologue of mammalian MARK/PAR-1, localises to new cell ends after mitosis and is important for bipolar growth. *FEBS Lett*. 554: 45-49.
(82) TODA, T.; SHIMANUKI, M. AND YANAGIDA, M. (1993) Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J*. 12: 1987-1995.
(83) MOORHEAD, G. B.; TRINKLE-MULCAHY, L. AND ULKE-LEMEE, A. (2007) Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 8: 234-244.
(84) MACKEIGAN, J. P.; MURPHY, L. O. AND BLENIS, J. (2005) Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat. Cell. Biol*. 7: 591-600.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 927-945

Revisión

Derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y enfermedades olvidadas

Recibido el 15 de octubre de 2007

ESTHER VICENTE, RAQUEL VILLAR, BEATRIZ SOLANO, ASUNCIÓN BURGUETE, SAIOA ANCIZU, SILVIA PÉREZ-SILANES*, IGNACIO ALDANA, ANTONIO MONGE

Unidad de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada (CIFA), Universidad de Navarra, C/ Irunlarrea s/n, 31080 Pamplona, Spain.

RESUMEN

Las enfermedades olvidadas son un grupo de enfermedades infecciosas médicamente diversas entre las que se encuentran tuberculosis, malaria, leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, que afectan a millares de personas en todo el mundo pero, principalmente, a la gente pobre en países en vías de desarrollo. Son un reto para la Salud Pública Internacional ya que no existen vacunas parar controlarlas y los medicamentos existentes para su tratamiento no son adecuados. La necesidad de buscar nuevas terapias económicamente accesibles para la población afectada es cada vez más urgente y palpable, lo que ha dado lugar a la puesta en marcha de nuevas iniciativas internacionales que buscan la erradicación de estas enfermedades. A lo largo de los años, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo el diseño y la síntesis, mediante métodos sintéticos sencillos y de bajo coste, de

* **Contacto:**
Silvia Pérez-Silanes. Unidad de Investigación y Desarrollo de Medicamentos, Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada (CIFA), Universidad de Navarra, C/ Irunlarrea s/n, 31080 Pamplona, España. Tel.: +34 948 425653; Fax +34 948 425652.
e-mail: sperez@unav.es

Abreviaturas: TAACF, Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Faciliy; **CIM,** Concentración Inhibitoria Mínima (del 90% del crecimiento micobacteriano); **CI_{50},** Concentración Inhibitoria media; **IS,** Índice de Selectividad; **CE_{90},** Concentración mínima Eficaz para la reducción del 90% de micobacterias; **DI_{50},** Dosis Infectiva media.

diversos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina con el objetivo de encontrar nuevos líderes para el tratamiento de algunas enfermedades olvidadas. Como resultado de varios proyectos de investigación, se han desarrollado nuevas estructuras activas como agentes antituberculosos, antimaláricos, antichagas y, más recientemente, como agentes antileishmania. Este resumen presenta los resultados más importantes obtenidos en este campo, de los que se puede concluir que el núcleo de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina representa un posible avance en la búsqueda de nuevos compuestos activos.

Palabras clave: tuberculosis, malaria, chagas, leishmaniasis, países en vías de desarrollo.

ABSTRACT

Quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives and Neglected Diseases

Neglected diseases are diseases that affect thousands of people around the world, but who do not have effective or suitable treatments. They are mainly infectious tropical diseases that fundamentally affect the poorest population; some examples are tuberculosis, leishmaniasis, malaria and Chagas, which generate a devastating impact on humanity. This fact highlights the necessity to search for new economically accessible therapies for the affected population. Throughout the years our research group has carried out the design and synthesis of several quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives with the aim of finding new leaders for the treatment of these types of diseases by means of simple, low cost synthetic methods. This work has resulted in the development of new active structures such as antitubercular, antimalarial and antichagas agents, and more recently, antileishmania agents. This summary displays the most important results obtained in this field, and it may be concluded that the quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide nucleus represents a possible advance in the search of new active compounds.

Key words: tuberculosis, malaria, chagas, leishmaniasis, developing countries.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades olvidadas

El término «enfermedad olvidada» se introdujo en el vocabulario de las reuniones de Salud Pública a principios del siglo XXI. No existe una definición estándar para este término, pero sí artículos científicos que identifican cuáles son las características comunes

que las distinguen (1, 2). Se puede decir que las enfermedades olvidadas son un grupo de enfermedades infecciosas médicamente diversas que afectan principalmente a gente pobre en países en vías de desarrollo para las cuales las intervenciones de Salud e I+D son inadecuadas a sus necesidades.

La mayoría de los autores consideran que las enfermedades olvidadas son, en términos de investigación y desarrollo de medicamentos, ciertas enfermedades infecciosas tropicales tales como malaria, leishmaniasis, filariasis linfática, enfermedad de Chagas y esquistosomiasis, además de tuberculosis (3). Casi todas ellas son enfermedades parasitarias transmitidas por un insecto. Por esta razón, las medidas de control y prevención están basadas en evitar el contacto con estos insectos o en eliminarlos utilizando insecticidas o repelentes, si bien el control total es muy complicado.

La cura de las enfermedades olvidadas es un reto de Salud Pública ya que causan 35.000 muertes diarias (4), no existen vacunas para controlarlas y los medicamentos existentes para su tratamiento no son adecuados debido a su toxicidad, larga duración, modo de administración o, cada vez más frecuente, desarrollo de resistencias. De entre las enfermedades olvidadas destacan la tuberculosis y la malaria por ser las enfermedades contagiosas que más vidas humanas se cobran en el mundo (véase Tabla 1), estando consideradas como prioritarias por la Organización Mundial de la Salud (5).

Para reducir el gran problema que suponen las enfermedades olvidadas es necesario incrementar la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, vacunas y métodos de diagnosis. Son conocidas ciertas colaboraciones entre universidades, industrias farmacéuticas, fundaciones filantrópicas y gobiernos que abordan problemas como los que plantean la malaria y la tuberculosis, y que son la prueba de que se están realizando esfuerzos a nivel internacional para que estas enfermedades dejen de ser tan olvidadas. Entre las iniciativas puestas en marcha para la erradicación de estas enfermedades se encuentran el programa de la OMS «Research and Training in Tropical Diseases (TDR)», las sociedades público-privadas «Medicines for Malaria Venture (MMV)», «Global Alliance for Tuberculosis Drug Development (GATB)», «Institute for One World Health

(iOWH)» y «Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi)», las fundaciones privadas que realizan importantes donaciones filantrópicas como Bill and Melinda Gates Foundation, Médecins Sans Frontières, Rockefeller Foundation y The Wellcome Trust, los nuevos Centros de Investigación desarrollados por compañías farmacéuticas como el Developing World Centre de Glaxo-Smith-Kline situado en Tres Cantos (Madrid) y el Novartis Institute for Tropical Diseases en Singapur, además de otras iniciativas del ámbito académico como Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility.

TABLA 1. ***Cuadro-resumen de las enfermedades olvidadas que se tratan en esta revisión.***

Enfermedades	Alcance	Agente causante	Transmisión
Enfermedad de Chagas	21.000 muertes al año	*Trypanosoma cruzi*	Contacto con heces del chinche Assasin (sub-familia *Triatominae*).
Leishmaniasis	57.000 muertes al año	*Leishmania* spp.	Picadura de la hembra del mosquito chupador de sangre del género *Phlebotomus*.
Malaria	1,09 millones de muertes al año	*Plasmodium* spp.	Picadura de la hembra del mosquito del género *Anopheles*.
Tuberculosis	1,66 millones de muertes al año	*Mycobacterium tuberculosis*	Inhalación de aire infectado

Los 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina

Los derivados de quinoxalina muestran numerosas propiedades biológicas, de ahí que el interés por estas estructuras en el campo de la Química Médica continúe en progreso. El anillo de quinoxalina está descrito como bioisóstero de los de quinoleína, naftaleno, benzotiofeno y otros ciclos aromáticos como piridina y pirazina (6), algunos de los cuales son la base de conocidos agentes antimaláricos y antituberculosos de uso clínico (Figura 1).

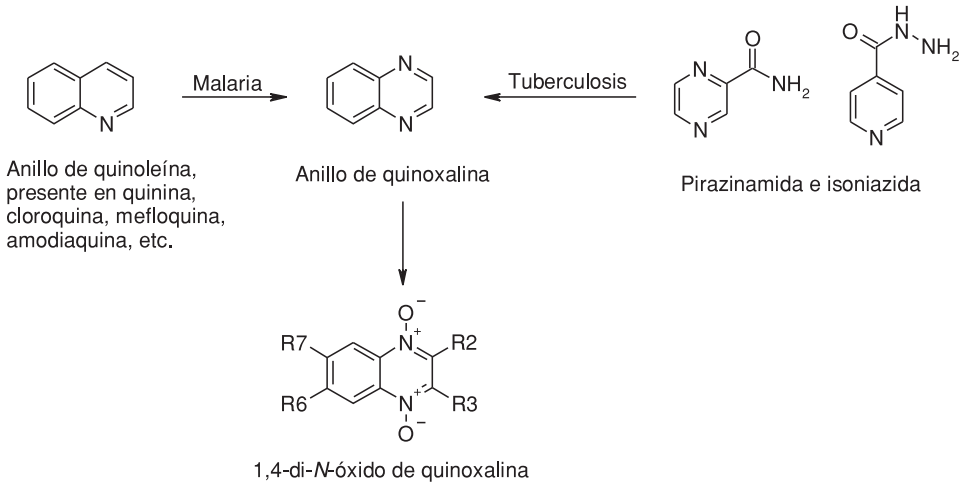


FIGURA 1. ***Estructura del anillo de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina y sus bioisósteros.***

Las quinoxalinas 1,4-di-*N*-óxido, obtenidas por oxidación de los átomos de nitrógeno del sistema heterocíclico, amplían las actividades biológicas de sus análogos reducidos. De hecho, los 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina son conocidos como potentes agentes antibacterianos desde los años 40, y se han utilizado en concentraciones subterapéuticas como potenciadores del crecimiento animal en aditivos nutritivos (7, 8). Estas estructuras también han demostrado citotoxicidad selectiva frente a células hipóxicas presentes en tumores sólidos (9-11). Estudios recientes defienden que los 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina también poseen propiedades mutagénicas (12-14) así como actividad frente a micobacterias, protozoos (15, 16) y cándidas (17). En las dos últimas décadas se han publicado muchos trabajos en los que se describen derivados de mono- y di-*N*-óxidos de quinoxalina con interesantes actividades biológicas (18, 19). Cabe destacar el gran desarrollo en estudios preclínicos de los 1,4-di-*N*-óxidos de quinoxalina como agentes antituberculosos.

Como resultado de diversos proyectos de investigación, nuestro grupo ha sintetizado diferentes series de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina, con una gran variedad de sustituyentes en las posiciones 2, 3, 6 y 7 (Figura 1).

Con respecto a la posición 2, en la cual se sitúa el grupo principal, nuestro equipo ha trabajado, principalmente, con derivados de amidas, cetonas y ésteres, además del grupo carbonitrilo. Los sustituyentes estudiados en posición 3 son, entre otros, metilo, trifluorometilo, piperazinilo, amina y fenilo. Por último, la sustitución de los hidrógenos de las posiciones R6 y/o R7 por los grupos flúor, cloro, metil, trifluorometil y metoxi ha permitido la obtención de una gran variedad de compuestos.

DERIVADOS DE 1,4-DI-*N*-ÓXIDO DE QUINOXALINA Y TUBERCULOSIS

Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF)

El programa Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF) se encarga de la evaluación biológica de nuevos candidatos a fármacos antituberculosos de forma gratuita para laboratorios de investigación interesados en el descubrimiento y desarrollo de este tipo de medicamentos. El primer nivel de evaluación consiste en el ensayo de los compuestos frente a la cepa $H_{37}Rv$ de *M. tuberculosis* a una concentración de 6,25 μg/mL; los derivados que demuestran un porcentaje de inhibición del crecimiento micobacteriano menor al 90% dejan de ser estudiados, ya que su Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) será superior a 6,25 μg/mL. En el nivel 2 de evaluación, se determina el valor exacto de CIM así como su citotoxicidad en células VERO, lo que da lugar al cálculo del Índice de Selectividad (IS), que debe ser superior a 10 para continuar en el programa. Los compuestos seleccionados son evaluados en macrófagos de médula ósea de ratón para determinar la Concentración mínima Efectiva para la reducción del 90 (CE_{90}) y 99% (CE_{99}) de la infección. Los derivados que presentan un valor de CE_{90}/CIM inferior a 16 pasan a niveles superiores de evaluación: ensayos frente a cepas mono- y multirresistentes, frente a tuberculosis latente (ensayo adaptado a bajos niveles de oxígeno), determinación de si el compuesto es bactericida o bacterioestático, y finalmente, ensayos *in vivo*.

Primeras aproximaciones

Las primeras publicaciones que relacionan los derivados de quinoxalina con la actividad antimicobacteriana datan de finales de los noventa (20-23). Dentro de estas primeras investigaciones, nuestro grupo publicó resultados interesantes de algunos derivados de quinoxalina-2-carbonitrilo con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis,* además de determinar la influencia de los grupos *N*-óxido del anillo de quinoxalina sobre la actividad antimicobacteriana, confirmándose su importancia. Al mismo tiempo el equipo de Carta evaluó la actividad de derivados de quinoxalin-2-onas.

A comienzos del siglo XXI, se obtuvieron resultados de estudios más avanzados, a la vez que se continuaba la síntesis de nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina para su evaluación frente a *M. tuberculosis*. Debido a que los derivados de 2-quinoxalinacarbonitrilo presentaban cierta toxicidad (24, 25), se propuso reemplazar el grupo carbonitrilo por otros como carboxamidas (26), cetonas (27) o ésteres (28), Figura 2.

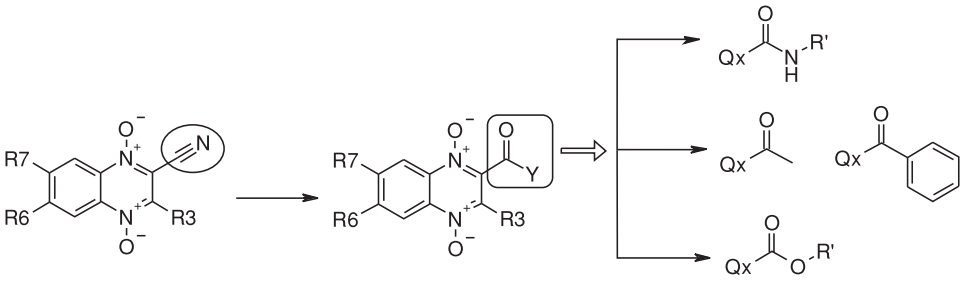
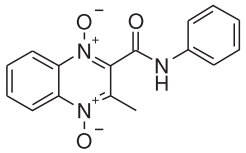


FIGURA 2. ***Modificaciones estructurales propuestas.***

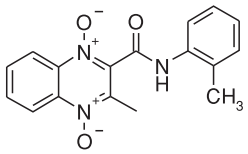
Derivados de amidas

Se prepararon y evaluaron un grupo de treinta y un derivados de 3-metilquinoxalina-2-carboxamida 1,4-di-*N*-óxido, ocho de los cuales presentaban un valor de CIM inferior a 6,25 μg/mL. No obstante, solo tres de estos ocho compuestos demostraron ser suficientemente selectivos y poseer buenos resultados en el ensayo de macrófagos (5) (nivel 3 de evaluación del TAACF), como se muestra en la Figura 3.

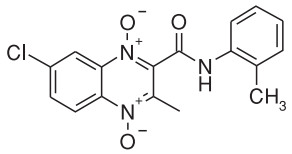
Estos datos justifican el desarrollo de estudios más avanzados para estas tres estructuras que presentan, por un lado, un átomo de cloro (**3**) o hidrógeno (**1** y **2**) en la posición R7 y, por otro, un fenilo o un *o*-metil fenilo como sustituyente del grupo amida.



1
CIM(μg/mL) = 3,13
IS > 20
CE_{90}/CIM = 0,89



2
CIM(μg/mL) = 6,25
IS > 10
CE_{90}/CIM = 0,42

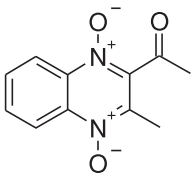


3
CIM(μg/mL) = 6,25
IS > 10
CE_{90}/CIM = 0,14

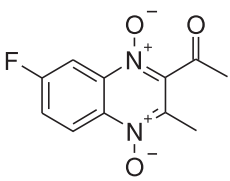
FIGURA 3. ***Derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina-2-carboxamida activos frente a M. tuberculosis.***

Derivados de cetonas

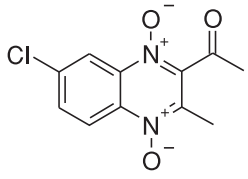
En 2003 fueron evaluados veintisiete 2-acetil y siete 2-benzoil derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina (27). De entre ellos, dieciocho demostraron valores de CIM iguales o menores que 6,25 μg/mL, valor máximo necesario para superar el primer corte establecido por el TAACF. Seis de estos derivados, además, presentaban



4
CIM(μg/mL) = 3,13
IS > 20
CE_{90}/CIM = 0,87



5
CIM(μg/mL) = 3,13
IS > 20
CE_{90}/CIM = 0,79



6
CIM(μg/mL) = 0,78
IS = 20
CE_{90}/CIM = 3,13

FIGURA 4. ***Derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina 2-cetona más activos como agentes antituberculosos.***

buenos resultados en los ensayos de citotoxicidad (eran selectivos) y de macrófagos. De los resultados obtenidos se extrae que todos los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de 2-acetil-3-metilquinoxalina son compuestos más potentes y selectivos que los derivados 2-benzoil; de entre los 2-acetil derivados destacan los compuestos **4-6** (Figura 4.) que presentan valores de CE_{90}/CIM de entre 0,79 y 3,13.

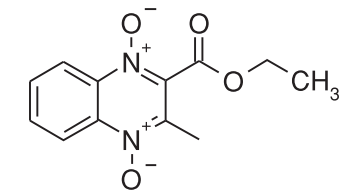
Derivados de ésteres

La evaluación llevada a cabo sobre veintinueve derivados de ésteres 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina (28) mostró que veintidós de ellos alcanzaban o mejoraban el CIM establecido como valor de corte por el TAACF (6,25 μg/mL). Además, quince de ellos demostraron ser selectivos tras el ensayo de citotoxicidad y también activos en el ensayo de macrófagos. Los resultados disponibles para los ensayos *in vitro* demuestran que, de entre las series evaluadas, los derivados de carboxilato de etilo y bencilo con un átomo de cloro en posición 7 del anillo de quinoxalina (**8** y **10**) y los mismos derivados no sustituidos en posiciones 6 y 7 (compuestos **9** y **11**) tienen los mejores datos de actividad antimicobacteriana, con unos valores de CE_{90}/CIM en el rango de 0,01 a 2,30 (Figura 5).

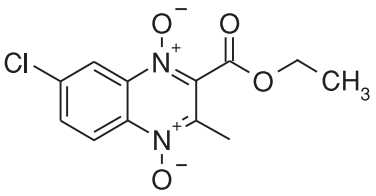
Así, estos nuevos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina surgen como nuevos candidatos-líderes para el tratamiento de la tuberculosis debido a su potencia, selectividad y baja citotoxicidad.

Otros grupos de investigación

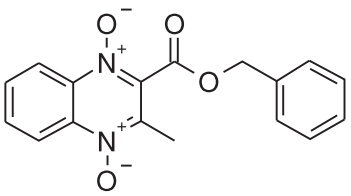
Mientras tanto, otros equipos continuaron sus trabajos con derivados de quinoxalinas reducidas como agentes antimicobacterianos (29-31). Seitz y colaboradores prepararon nueve derivados de carboxilato de quinoxalina, pero sólo dos de ellos consiguieron el valor de CIM de 6,25 μg/mL (31). El grupo de Guillon trabajó con derivados de hidrazida pirrolo[1,2-*a*]quinoxalina y, de nuevo, sólo dos compuestos alcanzaron el valor del primer corte (29).



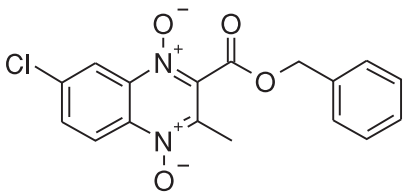
7
CIM(μg/mL) = 1,56
IS = 30
CE_{90}/CIM = 0,56



8
CIM(μg/mL) = 0,20
IS > 50
CE_{90}/CIM = 2,30



9
CIM(μg/mL) = 0,10
IS = 470
CE_{90}/CIM = 1,50



10
CIM(μg/mL) = 0,10
IS = 77
CE_{90}/CIM = 0,01

FIGURA 5. ***Derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina 2-carboxilato de etilo y bencilo más potentes como agentes antimicobacterianos.***

El equipo de Carta publicó una serie de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de 3-metilquinoxalina con un átomo de azufre (reducido, mono- o dioxidado) directamente unido a la posición 2 del anillo de quinoxalina. Este trabajo se completó con otro estudio de derivados de 6,7-difluoroquinoxalinas, análogos a los compuestos anteriores, entre los que, además, se reemplazaba el átomo de azufre por el de nitrógeno (Figura 6). Los resultados publicados demuestran la importancia del átomo de cloro en la posición 7 del anillo de quinoxalina para la actividad antimicobacteriana, siendo la serie de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de 3-metil-2-tiofenilquinoxalina la que mejores datos de CIM presenta (17, 32).

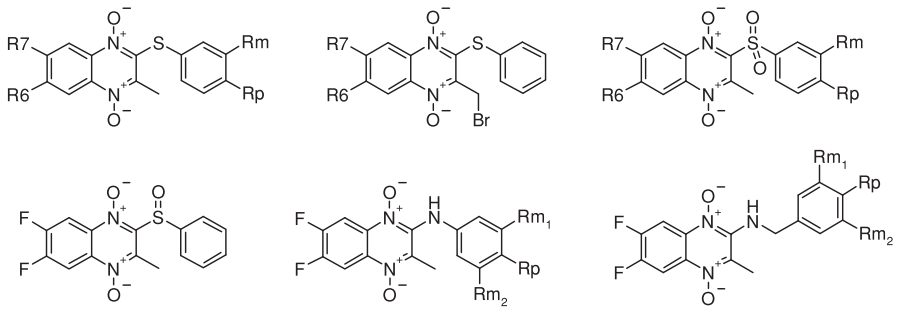


FIGURA 6. ***Estructuras generales de los derivados de 1,4-di-N-oxido de quinoxalina*** *publicados por el grupo de Carta en 2002 y 2004.*

Datos más recientes

Desde la creación del programa TAACF en los años 90, se han aprobado y procesado para su evaluación más de 87.000 compuestos procedentes de todo el mundo. De todos estos, sólo el 0,9% consigue la relación actividad/toxicidad *in vitro* requerida para profundizar en su estudio como candidato antituberculoso. En el caso de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina este porcentaje es muy superior y por esta razón se han convertido en una de las cinco series-líderes de antituberculosos investigadas por el TAACF (33).

De entre las estructuras preparadas por nuestro equipo, los derivados de ésteres han sido los que, en general, han mostrado los mejores resultados, debido a que es la serie con mayor proporción de compuestos en estudios de profundización.

Por otro lado, parece que el átomo de cloro en posición 7 del anillo de quinoxalina es importante para la actividad antituberculosa en este tipo de derivados ya que está presente en los compuestos más activos de cada serie.

Actualmente, los cabezas de serie presentados en este trabajo están siendo estudiados en ensayos de niveles más avanzados. Con los datos de que disponemos hasta la fecha se puede decir que hay dos compuestos que destacan extraordinariamente ya que ambos son bactericidas y activos frente a cepas multi-resistentes, en tuberculosis latente e *in vivo* (en un modelo de ratón infectado con tuberculosis).

DERIVADOS DE 1,4-DI-*N*-ÓXIDO DE QUINOXALINA Y MALARIA

Primeras aproximaciones

Debido a la semejanza entre quinoleína y quinoxalina, además de por la presencia de la estructura de quinoxalina en varios antibióticos de amplio espectro, se esperaba que los derivados de quinoxalina análogos a las quinoleínas antimaláricas pudieran presentar también dicha actividad.

Las primeras publicaciones que describen derivados de quinoxalina como agentes antiplasmódicos datan de principios de la década de los setenta (34-37). El equipo de Moreno y Schultz evaluó derivados de 2-metanolquinoxalina, 2-quinoxalinil cetoximas y derivados de 5,8-dimetoxiquinoxalina, frente a *Plasmodium berghei* en ratones. Desafortunadamente, todos los compuestos resultaron inactivos.

Entre 1976 (38) y 2001 (39), no existe ninguna referencia en la literatura que describa derivados de quinoxalina como agentes antimaláricos. Rangisetty y sus colaboradores evaluaron, en ratones, la actividad antimalárica de nuevos derivados de arilaminoquinoxalina frente a *Plasmodium yoelii* a dosis de 75 mg kg^{-1}. Sólo tres de los compuestos descritos demostraron una actividad antimalárica moderada.

Primeras quinoxalinas *N*-oxidadas

Parecía que la hipótesis inicial fallaba; sin embargo, todos estos trabajos habían sido realizados con derivados de quinoxalina reducidos. Basados en la idea de que los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina mejoraban la actividad antimicobacteriana de sus análogos reducidos, nuestro grupo decidió llevar a cabo la evaluación *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum* de algunos compuestos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina que habían sido sintetizados previamente. Se empezó estudiando la actividad antiplasmódica de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de 2-quinoxalinacarbonitrilo (40). Así, nuestro grupo presentó resultados interesantes para derivados de 7-

cloro-3-piperazinilquinoxalina-2-carbonitrilo (Figura 7) en la cepa F32-Tanzania, sensible a cloroquina. En ese tiempo, nuestro grupo también estudió la influencia de los grupos *N*-óxido en el anillo de quinoxalina sobre la actividad antiplasmódica, confirmándose su importancia (41). Además de los derivados de 1,4-di-*N*-óxido de 2-quinoxalinacarbonitrilo, también se estudió la actividad antiplasmódica de algunos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de 3-trifluorometilquinoxalina-2-carbonilo (42, 43). En general, parece que la parte del carbonilo o el grupo trifluorometilo son esenciales para que un derivado de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina demuestre actividad antiplasmódica (Figura 7).

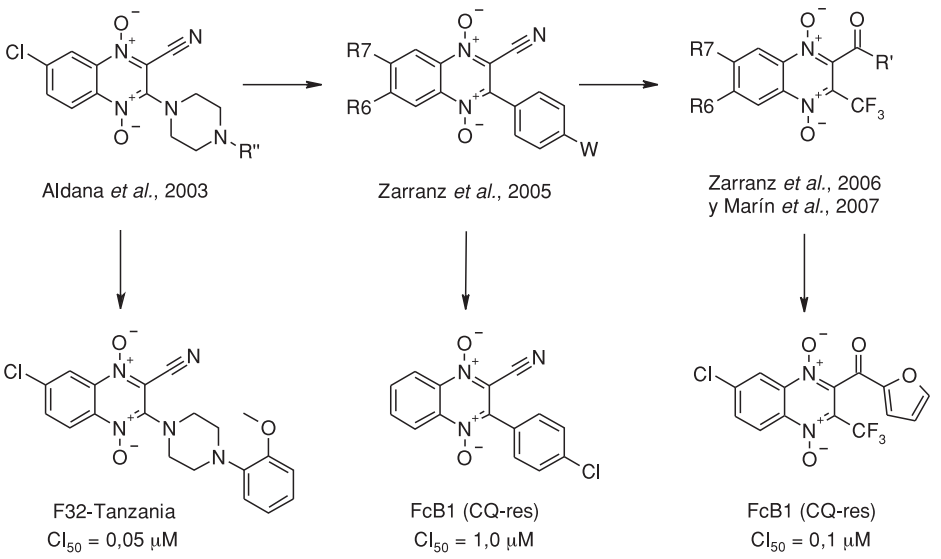


FIGURA 7. ***Estructura general de derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina*** *como agentes antiplasmódicos publicados por nuestro grupo desde 2003.*

Otros grupos de investigación

En paralelo a los trabajos de nuestro equipo, otros grupos intentaban conseguir candidatos antimaláricos entre los derivados de quinoxalina reducida. El equipo de Guillon sintetizó dieciocho derivados de pirrol y bispirrol[1,2-*a*]quinoxalina, cuya actividad *in vitro*

fue evaluada frente a distintas cepas de *Plasmodium falciparum*: cepa Thain (sensible a cloroquina) y cepas FcB1 y K1 (resistentes a cloroquina). En general, los derivados de bispirrol demostraron una actividad antiplasmódica superior a la de sus análogos monopirrol. Además, se observó que la presencia de un grupo metoxi en el núcleo de pirrol[1,2-*a*]quinoxalina incrementaba la actividad. También se ensayó el efecto de estos compuestos sobre la formación de la β-hematina, demostrando inhibiciones similares o superiores a la de la cloroquina (44).

Datos más recientes

Este proyecto de búsqueda de agentes antimaláricos es mucho más joven que el de antituberculosos, razón por la que se dispone de muchos menos datos biológicos. Se están realizando estudios de citotoxicidad para discriminar los compuestos potentes y selectivos de los meramente tóxicos. Este es uno de los pasos más críticos, como se desprende de lo explicado anteriormente para los candidatos antituberculosos.

Además, también se está avanzando en el estudio del mecanismo de acción de estos compuestos, aunque es necesaria la puesta a punto de algunos ensayos descritos en la literatura pero que son difícilmente reproducibles.

Los compuestos que demuestran potencia y selectividad antiplasmódica, pasarán a ser evaluados *in vivo*, generalmente en modelos de ratón. Uno de los inconvenientes que presenta la malaria a este respecto es que la especie de *Plasmodium* que infecta a humanos no infecta a ratones y viceversa, por lo que los datos no son del todo extrapolables.

DERIVADOS DE 1,4-DI-*N*-ÓXIDO DE QUINOXALINA, CHAGAS Y LEISHMANIASIS

En base a la actividad antiplasmódica que presentaban algunos derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina, algunos equipos de investigación ensayaron este tipo de compuestos frente a otros proto-

zoos: *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp*. agentes causantes de la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis, respectivamente.

Estos trabajos son muy recientes. Las primeras publicaciones al respecto datan de 1999, para actividad antitripanosómica (45), y 2003, para actividad antileishmánica (46).

Nuestro grupo de investigación, en colaboración con el equipo de Cerecetto, trabaja en el descubrimiento y desarrollo de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina frente a la enfermedad de Chagas (15, 16) (Figura 8).

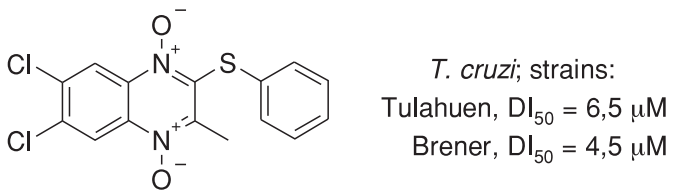


FIGURA 8.- ***Estructura del cabeza de serie de los derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina*** *publicados como agentes antitripanosoma por el grupo de Cerecetto.*

Actualmente estamos iniciando un proyecto de investigación referente a la Leishmaniasis, en colaboración con el equipo de Deharo (Institut de Recherche pour le Développement, IRD), pero aún no se dispone de resultados suficientes.

Hay otros grupos que han publicado recientemente resultados de derivados de quinoxalina reducida con actividad antitripanosómica (47) y/o antileishmánica (29, 47), pero también son datos muy recientes y preliminares.

NUEVAS METAS

Uno de los grandes retos que se nos presenta es descubrir el mecanismo de acción de los compuestos presentados en cada una de las enfermedades discutidas. El mayor problema al que nos enfrentamos es que se sabe muy poco de las dianas moleculares contra las que deberían ir los fármacos diseñados para sanar estas enfermeda-

des olvidadas. Esto quiere decir que aún queda mucho por estudiar e investigar sobre estas enfermedades para poder entenderlas un poco más y, de esta forma, intentar contribuir a su erradicación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a la ayuda del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia otorgada a E. Vicente (AP2003-2175) y a la financiación de la Universidad de Navarra a través del proyecto PiUNA. Los datos de actividad antimicobacteriana han sido proporcionados por Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF) a través de un contrato de investigación y desarrollo con el Nacional Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).

BIBLIOGRAFÍA

(1) CAINES, K. (2004) GHP study paper 4: Global health partnerships and neglected diseases. DFID Health Resource. London.
(2) FEHR, A.; THURMANN, P. Y RAZUM, O. (2006) Editorial: Drug development for neglected diseases: a public health challenge. *Trop. Med. Int. Health.* 11: 1335-1338.
(3) TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R. Y FORD, N. (2002) Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet.* 359: 2188-2194.
(4) DNDI (2005) *Newsletter (11)* Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi), Geneva.
(5) WORLD HEALTH ORGANIZATION. http://www.who.int/tdr.
(6) LIMA, L. M. A. Y BARREIRO, E. J. (2005) Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* 12: 23-49.
(7) CIHAK, R. Y VONTORKOVA, M. (1985) Cytogenetic Effects of Quinoxaline-1,4-Dioxide-Type Growth-Promoting Agents. 3. Trans-Placental Micronucleus Test in Mice. *Mutat. Res.* 144: 81-84.
(8) CIHAK, R. Y VONTORKOVA, M. (1985) Cytogenetic Effects of Quinoxaline-1,4-Dioxide-Type Growth-Promoting Agents Evaluated by the Trans-Placental Micronucleus Test. *Mutat. Res.* 147: 289-289.
(9) GALI-MUHTASIB, H. U.; HADDADIN, M. J.; RAHHAL, D. N. Y YOUNES, I. H. (2001) Quinoxaline 1,4-dioxides as anticancer and hypoxia-selective drugs. *Oncol. Rep.* 8: 679-684.
(10) MONGE, A.; PALOP, J. A.; DECERAIN, A. L.; SENADOR, V.; MARTINEZCRESPO, F. J.; SAINZ, Y.; NARRO, S.; GARCIA, E.; DEMIGUEL, C.; GONZALEZ, M.; HAMILTON, E.; BAR-

KER, A. J.; CLARKE, E. D. Y GREENHOW, D. T. (1995) Hypoxia-Selective Agents Derived from Quinoxaline 1,4-Di-*N*-Oxides. *J. Med. Chem.* 38: 1786-1792.

(11) AZQUETA, A.; PACHON, G.; CASCANTE, M.; CREPPY, E. E.; MONGE, A. Y DE CERAIN, A. L. (2005) Selective toxicity of a quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivative in human tumour cell lines. *Arzneim.-Forsch.* 55: 177-182.

(12) AZQUETA, A.; PACHON, G.; CASCANTE, M.; CREPPY, E. E. Y DE CERAIN, A. L. (2005) DNA damage induced by a quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivative (hypoxic selective agent) in Caco-2 cells evaluated by the comet assay. *Mutagenesis.* 20: 165-171.

(13) CHOWDHURY, G.; KOTANDENIYA, D.; DANIELS, J. S.; BARNES, C. L. Y GATES, K. S. (2004) Enzyme-activated, hypoxia-selective DNA damage by 3-amino-2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-*N*-oxide. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 1399-1405.

(14) GANLEY, B.; CHOWDHURY, G.; BHANSALI, J.; DANIELS, J. S. Y GATES, K. S. (2001) Redox-activated, hypoxia-selective DNA cleavage by quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide. *Bioorg. Med. Chem.* 9: 2395-2401.

(15) AGUIRRE, G.; CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZALEZ, M.; ALFARO, M. E. M.; JASO, A.; ZARRANZ, B.; ORTEGA, M. A.; ALDANA, I. Y MONGE-VEGA, A. (2004) Quinoxaline *NN* '-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity YP relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3835-3839.

(16) URQUIOLA, C.; VIEITES, M.; AGUIRRE, G.; MARIN, A.; SOLANO, B.; ARRAMBIDE, G.; NOBLIA, P.; LAVAGGI, M. L.; TORRE, M. H.; GONZALEZ, M.; MONGE, A.; GAMBINO, D. Y CERECETTO, H. (2006) Improving anti-trypanosomal activity of 3-amino-quinoxaline-2-carbonitrile *N*-1,*N*-4-dioxide derivatives by complexation with vanadium. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 5503-5509.

(17) CARTA, A.; LORIGA, M.; PAGLIETTI, G.; MATTANA, A.; FIORI, P. L.; MOLLICOTTI, P.; SECHI, L. Y ZANETTI, S. (2004) Synthesis, anti-mycobacterial, anti-trichomonas and anti-candida *in vitro* activities of 2-substituted-6,7-difluoro-3-methylquinoxaline 1,4-dioxides. *Eur. J. Med. Chem.* 39: 195-203.

(18) BROWN, D. J. (2004) Quinoxalines. Supplement II. Wiley & Sons. New York.

(19) CARTA, A.; CORONA, P. Y LORIGA, M. (2005) Quinoxaline 1,4-dioxide: A versatile scaffold endowed with manifold activities. *Curr. Med. Chem.* 12: 2259-2272.

(20) MONTOYA, M. E.; SAINZ, Y.; ORTEGA, M. A.; DE CERAIN, A. L. Y MONGE, A. (1998) Synthesis and antituberculosis activity of some new 2-quinoxalinecarbonitriles. *Farmaco.* 53: 570-573.

(21) ORTEGA, M. A.; SAINZ, Y.; MONTOYA, M. E.; DE CERAIN, A. L. Y MONGE, A. (1999) Synthesis and antituberculosis activity of new 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-*N*-oxides. *Pharmazie.* 54: 24-25.

(22) SAINZ, Y.; MONTOYA, M. E.; MARTINEZ-CRESPO, F. J.; ORTEGA, M. A.; DE CERAIN, A. L. Y MONGE, A. (1999) New quinoxaline 1,4-di-*N*-oxides for treatment of tuberculosis. *Arzneim.-Forsch.* 49: 55-59.

(23) SANNA, P.; CARTA, A.; LORIGA, M.; ZANETTI, S. Y SECHI, L. (1999) Preparation and biological evaluation of 6/7-trifluoromethyl(nitro)-, 6,7-difluoro-3-alkyl (aryl)-substituted-quinoxalin-2-ones. Part 3. *Farmaco.* 54: 169-177.

(24) ORTEGA, M. A.; MONTOYA, M. E.; JASO, A.; ZARRANZ, B.; TIRAPU, I.; ALDANA, I. Y MONGE, A. (2001) Antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carbonitrile and quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-*N*-oxide derivatives. *Pharmazie.* 56: 205-207.

(25) ORTEGA, M. A.; SAINZ, Y.; MONTOYA, M. E.; JASO, A.; ZARRANZ, B.; ALDANA, I. Y MONGE, A. (2002) Anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents derived from quinoxaline-2-carbonitrile and quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-*N*-oxide. *Arzneim.-Forsch.* 52: 113-119.

(26) ZARRANZ, B.; JASO, A.; ALDANA, I. Y MONGE, A. (2003) Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-*N*-oxide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 11: 2149-2156.

(27) JASO, A.; ZARRANZ, B.; ALDANA, I. Y MONGE, A. (2003) Synthesis of new 2-acetyl and 2-benzoyl quinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *Eur. J. Med. Chem.* 38: 791-800.

(28) JASO, A.; ZARRANZ, B.; ALDANA, I. Y MONGE, A. (2005) Synthesis of new quinoxaline-2-carboxylate 1,4-dioxide derivatives as anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. *J. Med. Chem.* 48: 2019-2025.

(29) GUILLON, J.; REYNOLDS, R. C.; LEGER, J. M.; GUIE, M. A.; MASSIP, S.; DALLEMAGNE, P. Y JARRY, C. (2004) Synthesis and preliminary *in vitro* evaluation of antimycobacterial activity of new pyrrolo[1,2-*a*]quinoxaline-carboxylic acid hydrazide derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 19: 489-495.

(30) KUNES, J.; SPULAK, M.; WAISSER, K.; SLOSAREK, M. Y JANOTA, J. (2000) Quinoxaline derivatives as potential antituberculotic agents. *Pharmazie.* 55: 858-859.

(31) SEITZ, L. E.; SULING, W. J. Y REYNOLDS, R. C. (2002) Synthesis and antimycobacterial activity of pyrazine and quinoxaline derivatives. *J. Med. Chem.* 45: 5604-5606.

(32) CARTA, A.; PAGLIETTI, G.; RAHBAR NIKOOKAR, M. E.; SANNA, P.; SECHI, L. Y ZANETTI, S. (2002) Novel substituted quinoxaline 1,4-dioxides with *in vitro* antimycobacterial and anticandida activity. *Eur. J. Med. Chem.* 37: 355-366.

(33) GOLDMAN, R. C.; LAUGHON, B. E.; REYNOLDS, R. C.; SECRIST, J. A.; MADDRY, J. A.; GUIE, M. A.; POFFENBERGER, A. C.; KWONG, C. A. Y ANANTHAN, S. (2007) Programs to Facilitate Tuberculosis Drug Discovery: The Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility. *Infectious Disorders - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets – Infectious).* 7: 92-104.

(34) FISHER, G. H.; MORENO, H. R.; OATIS, J. E. Y SCHULTZ, H. P. (1975) Quinoxaline Studies. 23. Potential Antimalarials - Substituted 5,8-dimethoxyquinoxalines. *J. Med. Chem.* 18: 746-752.

(35) MORENO, H. R. Y SCHULTZ, H. P. (1970) Quinoxaline Studies. 15. Potential Antimalarials. Some (RS)-Alpha(Dialkylaminomethyl)-2-Quinoxalinemethanols. *J. Med. Chem.* 13: 119-121.

(36) MORENO, H. R. Y SCHULTZ, H. P. (1970) Quinoxaline Studies. 17. Potential Antimalarials. 17. Some (RS)-Alpha-(Dialkylaminomethyl)-6-Chloro-2-Quinoxalinemethanols. *J. Med. Chem.* 13: 1005-1008.

(37) MORENO, H. R.; SCHULTZ, H. P. Y OATIS, J. E. (1972) Quinoxaline Studies. 20. Potential Antimalarials - Synthesis of Anti-*N,N*-Dialkylaminomethyl and Syn-*N,N*-Dialkylaminomethyl 2-Quinoxalinyl Ketoximes. *J. Med. Chem.* 15: 433-434.

(38) DJUDOVIC, P.; MAIER, W.; PIEKARSKI, G.; SCHORNSTEIN, U. Y ZYMALKOWSKI, F. (1976) Synthesis of Quinoline-3-Derivatives and Quinoxaline-2-Derivatives and Their Actions against Various Malarial Parasites. *Pharmazie* 31: 845-849.

(39) RANGISETTY, J. B.; GUPTA, C.; PRASAD, A. L.; SRINIVAS, P.; SRIDHAR, N.; PARIMOO, P. Y VEERANJANEYULU, A. (2001) Synthesis of new arylaminoquinoxalines and their antimalarial activity in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 1409-1413.

(40) ALDANA, I.; ORTEGA, M. A.; JASO, A.; ZARRANZ, B.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; MONGE, A. Y DEHARO, E. (2003) Anti-malarial activity of some 7-chloro-2-quinoxalinecarbonitrile-1,4-di-*N*-oxide derivatives. *Pharmazie.* 58: 68-69.

(41) ZARRANZ, B.; JASO, A.; ALDANA, I.; MONGE, A.; MAUREL, S.; DEHARO, E.; JULLIAN, V. Y SAUVAIN, M. (2005) Synthesis and antimalarial activity of new 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile derivatives. *Arzneim.-Forsch.* 55: 754-761.

(42) MARIN, A.; LIMA, L. M.; SOLANO, B.; VICENTE, E.; SILANES, S. P.; MAUREL, S.; SAUVAIN, M.; ALDANA, I.; MONGE, A. Y DEHARO, E. (2008) Antiplasmodial Structure-activity relationship of 3-trifluoromethyl-2-arylcarbonylquinoxaline 1,4-di-*N*-oxide derivatives. *Exp. Parasitol.* 118: 25-31.

(43) ZARRANZ, B.; JASO, A.; LIMA, L. M.; ALDANA, I.; MONGE, A.; MAUREL, S. Y SAUVAIN, M. (2006) Antiplasmodial activity of 3-trifluoromethyl-2-carbonylquinoxaline di-*N*-oxide derivatives. *Braz. J. Pharm. Sci.* 42: 357-361.

(44) GUILLON, J.; GRELLIER, P.; LABAIED, M.; SONNET, P.; LEGER, J. M.; DEPREZ-POULAIN, R.; FORFAR-BARES, I.; DALLEMAGNE, P.; LEMAITRE, N.; PEHOURCQ, F.; ROCHETTE, J.; SERGHERAERT, C. Y JARRY, C. (2004) Synthesis, antimalarial activity, and molecular modeling of new pyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, bispyrrolo[1,2-*a*]quinoxalines, bispyrido[3,2-*e*]pyrrolo[1,2-*a*]pyrazines, and bispyrrolo[1,2-*a*]thieno[3,2-*e*]pyrazines. *J. Med. Chem.* 47: 1997-2009.

(45) CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZALEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C. Y OLEA-AZAR, C. (1999) 1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: Structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 42: 1941-1950.

(46) LORIGA, M.; PIRAS, S.; PAGLIETTI, G.; COSTI, M. P. Y VENTURELLI, A. (2003) Quinoxaline chemistry. Part 15. 4-[2-Quinoxalylmethylenimino]-benzoylglutamates and -benzoates, 4-[2-quinoxalylmethyl-*N*-methylamino]-benzoylglutamates as analogues of classical antifolate agents. Synthesis, elucidation of structures and *in vitro* evaluation of antifolate and anticancer activities. *Il Farmaco.* 58: 51-61.

(47) HUI, X.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M.; FRANCK, X.; HOCQUEMILLER, R. Y FIGADERE, B. (2006) Synthesis and antiprotozoal activity of some new synthetic substituted quinoxalines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 815-820.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 947-962

Revisión

Melatonin Makes Me Feel Awake! Seven Years of Lab Experience (2000-2007)

Recibido el 18 de octubre de 2007

TERESA PELÁEZ, ARÁNZAZU MEDIERO, PILAR ALARMA-ESTRANY, PATRICIA LOMA, ANA I. GUZMÁN-ARÁNGUEZ, ALMUDENA CROOKE, BASILIO KOLLIGRIS, ASSUMPTA PERAL AND JESÚS PINTOR*

Departamento de Bioquímica, E. U. Óptica. Universidad Complutense de Madrid.

ABSTRACT

The research on the effect of melatonin on intraocular pressure (IOP) is reviewed from the hystorical point of view of our laboratory. The original idea of melatonin modulating intraocular pressure has been improved by using selective compounds for MT_2 and specially melatonin MT_3 receptors. The selective compound 5-methoxyamino N-acetyltryptamine (5-MCA-NAT) has been an attractive compound due to its ability to reduce IOP about 40%, therefore being a good candidate to the treatment of the ocular hypertension linked to glaucoma. More compounds have been developed and tested permitting us to have a more accurate panorama of those receptors controlling the relevant process of intraocular pressure.

Key words: Melatonin, melatonin receptors, intraocular pressure, MT3 receptor.

RESUMEN

¡La melatonina me hace sentir despierto! Siete años de experiencia en el laboratorio (2000 – 2007)

La investigación sobre el efecto de la melatonina sobre la presión intraocular (PIO) es revisada desde la perspectiva histórica de nuestro laboratorio. La idea

* **Dirección de contacto:**
Dr. Jesús Pintor.
Dep. Bioquímica. E.U. Óptica. Universidad Complutense de Madrid. C/ Arcos de Jalón, s/n. 28037. Madrid. Tel.: +34-91-3946859. Fax.: +34-91-3946885.
e-mail: jpintor@vet.ucm.es

original sobre la melatonina modulando la presión intraocular ha sido mejorada gracias al empleo de nuevos compuestos selectivos para el receptor MT_2 y especialmente para el MT_3. El compuesto selectivo 5-metoxiamino N-acetil-triptamina (5-MCA-NAT) se ha convertido en un compuesto muy atractivo debido a su capacidad de reducir la PIO hasta un 50%, convirtiéndose en un compuesto muy interesante para el tratamiento de la hipertensión ocular asociada al glaucoma. Se han desarrollado y ensayado más compuestos que nos han permitido tener un panorama más preciso acerca de como estos receptores controlan el proceso fisiológico de la presión intraocular.

Palabras clave: Melatonina, presión intraocular, receptores de melatonina, receptor MT3.

MY HISTORICAL PERSPECTIVE

In May 1999, when I was flying back to Spain from an Ophthalmology meeting in Florida (USA) I started to talk with a colleague about those persons who take *melatonin* to avoid *jet-lag* in long distance trips. Some people comment that this neurohormone helps to recover the light/night cycles faster than when you allow your body to do it without any help.

When I was back in the lab, I had a look to melatonin in the internet looking for some references regarding jet-lag, and I was surprised when I saw a graph in which the concentrations of melatonin along 24 hours was presented. That plot showed that this indole presented higher concentrations in the night and lower during the day. There was something funny about this plot: it was just opposite to one I saw in one of the most popular Ocular Physiology books (Adler's Physiology of the Eye) in which intraocular pressure (IOP) was analysed along 24 hours. If you overlap both graphs you may see that when melatonin was higher IOP was lower and vice versa (Figure 1). Did that mean that melatonin levels modify IOP?

At that moment we were working on the effect of nucleotides on IOP in New Zealand rabbits (1), so it would not be difficult to check whether or not melatonin was able to change IOP. We performed that single experiment and indeed melatonin significantly reduced IOP, but its effect was transitory lasting no more than one hour. This result was interesting and in some way indebted me to carry on working on this topic, but not immediately since I was involved in

the studies regarding nucleotides and dinucleotides as modulators of IOP I wanted to finish.

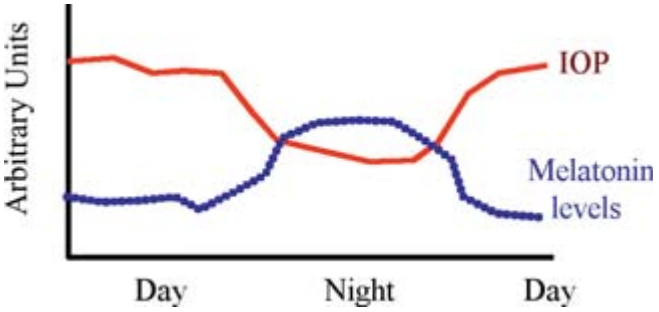


FIGURE 1. ***Comparison between the concentration of melatonin and the changes in IOP along day and night.***

This delay was positive since in the months that passed from the moment I did the experiments with melatonin to the one I started to continue it, January 2000, a paper appeared describing some new compounds which selectively activate the three different subtypes of melatonin receptors, MT_1, MT_2 and MT_3 (2) (Figure 2). Basically my idea was to repeat that melatonin experiment and then to assay different agonists and antagonists of the melatonin receptors in order to pharmacologically characterise the receptor reducing IOP in rabbits.

So, after getting a positive hypotensive effect with melatonin, the next decision was to choose which one was going to be the following compound to be assayed. At that moment I had bought a battery of compounds so it was at the beginning a bit difficult to decide how to start. I thought that assaying the newest compounds would provide an attractive starting point if, of course, they work. The newest substance was 5-methoxyamino N-acetyltryptamine (5-MCA-NAT) and this was the first I assayed. When the experiments were performed with this compound the results were amazing: IOP was reduced almost 40 % and the duration of the effect was longer than 8 hours, just with a single dose of 100 μM 5-MCA-NAT. Compared to melatonin, this agonist was much better than the naturally occurring substance (Figure 3). Moreover, 5-MCA-NAT was a selective melatonin MT_3 receptor (3).

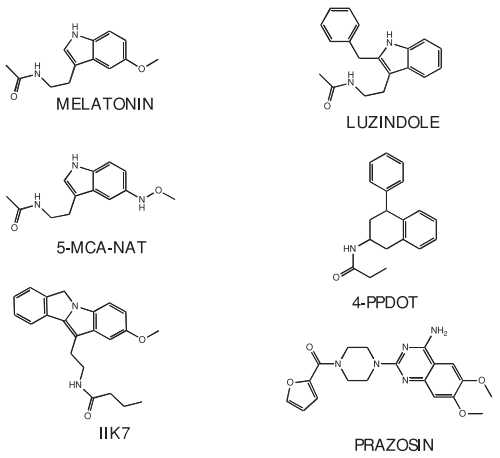


FIGURE 2. ***Chemical structure of agonists and antagonists of melatonin receptors.*** *Melatonin is the naturally occurring agonist of melatonin receptors, while 5-MCA-NAT and IIK7 are MT_3 and MT_2 selective agonists. On the other hand antagonists are represented by luzindole (non selective), 4-PPDOT (MT_2) and Prazosin (MT_3 and α1-adrenergic).*

A review of the existing literature in the field brought some interesting papers but none of them reported the existence of melatonin MT_3 receptors modulating intraocular pressure. In that moment, melatonin and its receptors became an important part of the research developed in the laboratory.

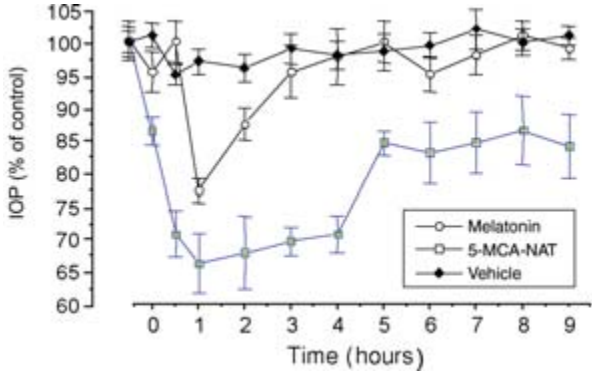


FIGURE 3. ***Changes in IOP produced by melatonin and 5-MCA-NAT.*** *The selective MT_3 agonist presented a more profound and long lasting effect when compared to melatonin.*

LOOKING FOR MELATONIN ANALOGUES FOR THE TREATMENT OF OCULAR HYPERTENSION AND GLAUCOMA

Working on the MT_3 melatonin receptor

Most of the pharmacological approaches for the treatment of ocular hypertension and glaucoma lie in the reduction of IOP that is, in general, abnormally elevated in these patients. In this sense all the approaches reduce IOP by acting on different targets (tissues) that are relevant for the correct physiology of the aqueous humour dynamics. These compounds, independently of their chemical nature can be classified into three classes based on the mechanism of action. Class I drugs act by reducing the production of the aqueous humour and these include carbonic anhydrase inhibitors and beta-blockers, among others. Class II drugs improve trabecular meshwork outflow and these include cholinergics and epinephrines. Class III drugs work by enhancing the uveoscleral outflow being the most representative the prostaglandins (4).

Can we add a new group of compounds to the existing list of pharmaceutical compounds for the treatment of glaucoma? It is a bit soon to provide an answer to this question, nevertheless progress has been carried out to, at least to suggest *melatonins* as candidates for the treatment of this pathology (5).

Our interest in that moment was to fully characterise the effect of melatonin and 5-MCA-NAT in New Zealand white rabbits. Therefore, single dosage, dose-response studies and preliminary antagonist studies permitted us to publish our first paper in the field, paper which was cited as one of the breakthrough in the glaucoma literature in 2001 (3). This experimental work permitted not only to introduce *melatonins* as possible new drugs for the treatment of glaucoma, but also allowed us to fill a patent which open us some gates that permitted us to grow as a competitive laboratory.

Both paper and patent were an excellent starting point to «make business» with pharmaceutical companies, due to their interests in finding new approaches to the treatment of glaucoma. Nevertheless there were lots of things to do in order to clarify what receptors for

melatonin are in the eye and how they can modulate IOP. So, next was to fully characterise the changes in IOP by using all the available melatonin compounds. Studies with agonists and antagonists depicted a clear panorama: 5-MCA-NAT was the most potent and effective compound reducing IOP, but not the only one, since all the tested agonist presented effects, but no so profound to that produced by 5-MCA-NAT. This was suggesting a major effect through MT_3 receptors but never discarded the presence of the other two (MT_1 and MT_2). Antagonist demonstrated a predominant effect mediated by the MT_3, but again they did not discard other melatonin receptors. This work was developed during 2001-2003 and was published finally in 2003 (6). Another interesting result that was obtained was the fact of blocking melatonin effect by means of cholinergic and adrenergic receptor antagonists. These aspects revealed the close relation between melatonin receptors and the neural components that control both the production and the drainage of the aqueous humour. We will come back to this point later.

Designing and synthesising analogues for the MT_3 receptor

In the meantime we were carrying out the experiments previously reported, and at the end of 2000, we started a research project with the company INSPIRE PHARMACEUTICALS in which they improved the pharmacological properties of these compounds by modifying the chemical structure of the indole ring. During the following couple of years we tested a big number of melatonin analogues that provided interesting information on the structure-function of the different melatonin structures regarding IOP changes in our experimental model. Among the 50 or so tested analogues, 3 were particularly interesting since they reduced IOP to values closer to that obtained with 5-MCA-NAT. Together with INSPIRE we filled a US patent as well as a PCT one (worldwide). Also, INSPIRE and other researchers were testing whether 5-MCA-NAT was useful in a different model: The glaucomatous monkey. The group of Dr. Janet Serle in Mount Sinai Hospital demonstrated that the topical application of 5-MCA-NAT during two consecutive weeks significantly reduced IOP in glaucomatous monkeys (7). These fantastic results animated us to continue investigating with the analogues

provided by INSPIRE. Therefore, dose-response analysis and anatagonism experiments were performed with the best three synthetic compounds. Dose-response analysis was OK, as expected, but surprisingly antagonism analysis demonstrated that at least two of the three tested compounds were acting through MT_2 receptors rather than on MT_3 as expected. Another couple of questions arise: Do we have more than the MT_3 melatonin receptor controlling IOP? Is there a MT_2 as well?

MT_2 receptors and IOP

It was quite evident by our previous results that a MT_2 melatonin receptor may exist and that this receptor would control IOP together with the MT_3 melatonin receptor. So, acting in a similar way as we proceeded with 5-MCA-NAT we looked for a selective MT_2 agonist, N-butanoyl-2-(2-methoxy-6H-isoindolo [2,1-α]indol-11-yl) ethanamine, abbreviated IIK7. The application of this compound to the experimental animals reduced IOP, and this reduction was avoided by the MT_2 antagonists 4-PPDOT and DH-97.

The discovery of a receptor for melatonin that belongs to the MT_2 subtype permitted us to expand our knowledge on the melatonin physiology in the eye since this receptor has been cloned and there are antibodies raised against it. In this sense out studies using MT_2 receptor antibodies permitted to localise this receptor in the ciliary processes, which is the place where the aqueous humour is synthesised (Figure 4). So combining the fact that melatonin and IIK7 reduce IOP and that the receptors are located in the ciliary body it seems clear that MT_2 receptors should reduce the production of the aqueous humour and that reduction may be the reason for a decrease in IOP. This makes sense since MT_2 receptors are negatively coupled to adenylate cyclase. Beta-adrenergic receptors are typically antagonised in the pharmaceutical treatments for glaucoma, and they are positively coupled to adenylate cyclase. Altogether the topical application of IIK7 or melatonin finally inhibits PKA with the concomitant fall in the IOP, which at the end is the same ultimate effect beta-receptor antagonists produce.

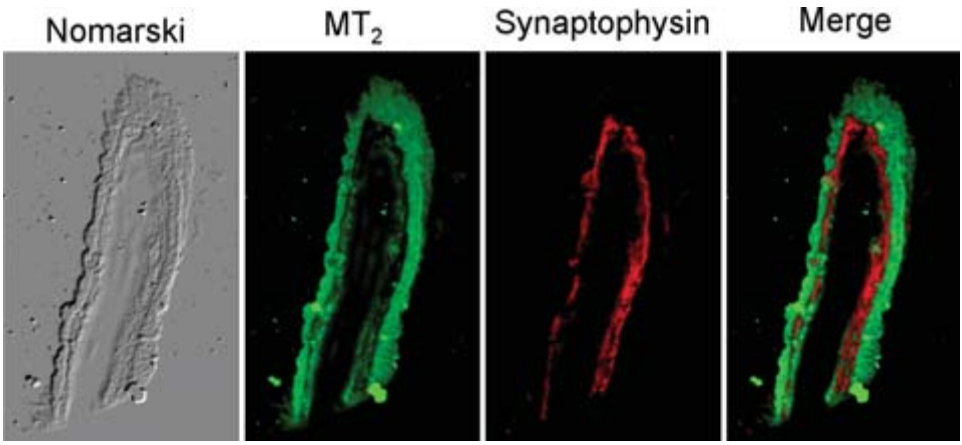


FIGURE 4. ***Immunohystochemical localization of MT_2 melatonin receptors.*** *Four different views are presented in the present figure, Nomarski interferential contrast, MT_2 labelling in green, nervous system (synaptophysin) and a combination MT_2/synaptophysin (merge).*

Melatonin receptors and the nervous system

In our preliminary studies about the changes in IOP by melatonins, we were able to demonstrated that the neural components that naturally modulate the dynamics of the aqueous humour. Apparently both the sympathetic, the parasympathetic components and melatonin (its receptors) are connected since the use of cholinergic and adrenergic receptor antagonists diminished the hypotensive effect of melatonin and 5-MCA-NAT.

Very recently we have demonstrated the importance of the sympathetic component on the effects of melatonin and 5-MCA-NAT. When New Zealand rabbits were treated with reserpine or 6-hydroxydopamine (6-OHDA), the effects almost completely disappeared (Figure 5) (8). We still do not know how these chemical denervation abolishes the effect of indoles. Two main hypothesis can be drawn, either MT_3 melatonin receptors are located in the noradrenergic terminals innervating the cilliary processes or melatonin receptors need the presence of noradrenaline to be fully functional. In the latter, noradrenaline by acting on beta receptors may modulate melatonin receptors by phosharylation.

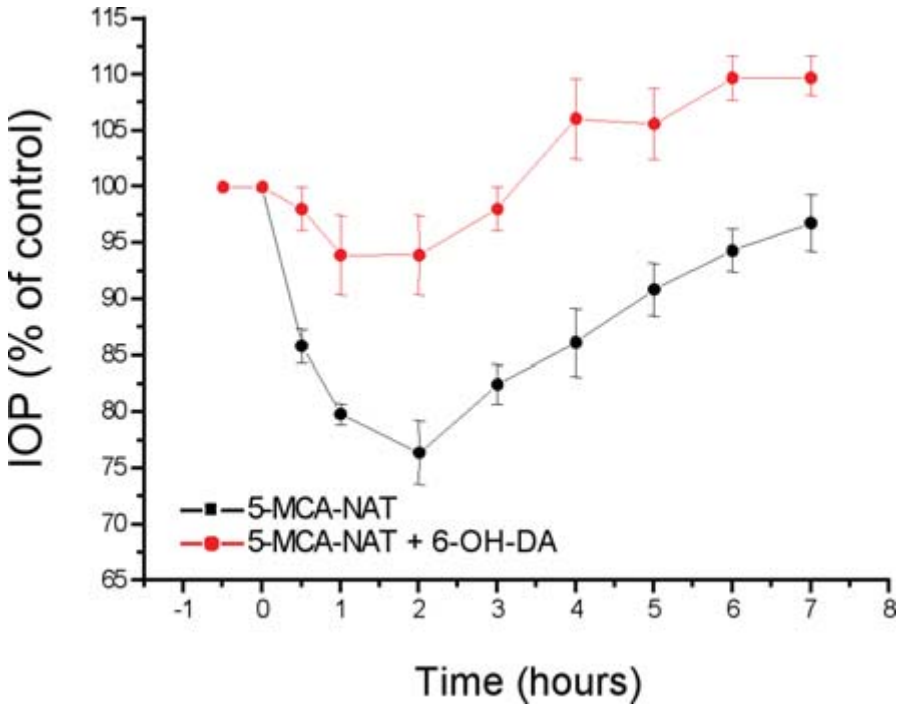


FIGURE 5. ***Effect of the chemical denervation after treatment with 6-OH dopamine.*** *The application of this chemical destroys noradrenergic terminals and this is reflected in a clear reduction in the effect of 5-MCA-NAT.*

MELATONIN ON THE OCULAR SURFACE

Melatonin and its role in corneal wound healing

Corneal wound healing experiments we performed in New Zealand white rabbits, demonstrated that after a superficial wound, melatonin at low micromolar concentrations, significantly accelerate the rate of healing closing the wounds faster than in the absence of this neurohormone (9). This effect is antagonised by luzindole, this is suggesting the presence of MT_1 or MT_2 melatonin receptors. We jumped to a primary rabbit corneal epithelial cell culture in order to perform more detailed biochemical studies. In the in vitro model the same behaviour carried out by melatonin and luzindole was

observed. It has been possible to demonstrate that melatonin effect is to increase the rate of cell migration rather than mitosis. Moreover, immunocytochemical staining of these cells demonstrate the presence of MT_2 melatonin receptors (5). So, till date both MT_1 and MT_2 receptors are present in the corneal epithelium but it is not still clear if both contribute to acelarate the rate of epithelial cell migration or if they combine sequencially: one to facilitate cell migration and other triggering mitosis to complete corneal re-epithelialisation.

Melatonin and diadenosine polyphosphates two good teammates

Very recently, it has been possible to investigate the role of melatonin on the ocular surface and in particular on tear secretion. Melatonin alone, topically applied to New Zealand rabbits, inhibits tear production. This is an interesting aspect since melatonin is elevated in the night and the rate of tear production during the nigh, specially when sleeping is significantly reduced. So, it seems that the general scheme fits well, when less tear is necessary melatonin is increased therefore reducing tear production.

On the other hand the dinucleotide diadenosine tetraphoshate, Ap_4A, enhances tear production. Surprisingly, when melatonin and Ap_4A are both applied simultaneously, the amount of tear production is enhanced 34 %, by means of a mechanism which is sensitive to luzindole, therefore melatonin receptor dependent (10). The cross-talk between melatonin and purinergic receptors may be the reason for such an increase in tear production, although the detailed mechanism is still under study.

OTHER RELEVANT ASPECTS OF MELATONIN IN THE EYE

The controversy: MT_3 or QR2?

Some authors discuss on the possibility that the MT_3 receptor is not an independent melatonin receptor and it is the enzyme quinone reductase 2. Uniquely, the MT_3 has been identified as quinone

reductase 2 (QR2), an enzyme involve in detoxification in mouse (11). QR2 seems to have antioxidants properties although is difficult to establish a clear role in detoxification on the basis of the currently available experiments. Furthermore, many tissues deprived of QR2 genes lack melatonin binding sites. These data indicate that in many cases is indeed QR2 the MT_3 melatonin receptor (12). Nevertheless, there are other cases in which it has not been possible to match the presence of QR2 and the putative MT_3 melatonin receptor (11). Moreover unexpectedly, the binding of melatonin and derivatives to QR2 does not inhibit the activity of the enzyme when the natural substrate is present (menadione), although it occupies the enzyme active site (12). The notion that arises is that binding approaches for melatonin and derivatives on the QR2/MT_3 receptor is not enough to discard the existence of a real receptor with a clear-cut physiological action. Moreover, in both mammals and non-mammals there is a correlation between the pharmacological profile of the putative MT_3 receptor and the generation of IP_3 and diacylglycerol (13). Nevertheless, it is necessary investigate the possibility of cloning a different protein from QR2 that may match with the putative MT_3 receptor to fully dissipate this controversial point.

Cloning the MT_3 receptor

This is indeed one of our main tasks at the moment. Based on the sequences of QR2, MT_1 and MT_2 receptors, we are trying to hunt the putative MT_3 receptor. We have started to dive in ocular tissues and we have cloned a DNA sequence which presents the sequence of the MT_2 melatonin receptor but which has an insert of 90 pb suggesting it is a new specie. It is clear that it can be either a splice variant or the MT_3 receptor. The insert is not only increasing the length of the protein encoded by the gene but also is altering the reading frame that probably will generate a different protein from the cloned MT_2. This interesting discovery is more significant because the ocular tissue where it has been obtained, the cornea, lacks of the QR2 gene. We need to conclude this research since either we have the MT_3 receptor or we have a MT_2 receptor (splicing variant) with a different selectivity for *melatonins,* in particular for 5-MCA-NAT.

CONCLUSIONS

There is still a long way until we fully understand the relevance of melatonin in all the ocular structures. We hope that with our modest contribution along the recent years, we may established the foundations for the development of new pharmacological treatments for the ocular hypertension associated to glaucoma. A good review on melatonin in the eye, including our findings on IOP, has been recently published (14). The introduction of new compounds for the treatment of glaucoma is especially relevant if we take into account the various side effects that happen with some of the commercially available compounds. Additionally we wish to get deeper into the molecular mechanism underlying all these physiological effects, including the cloning of the MT_3 receptor.

ADDENDUM

Melatonin receptors overview

The actions of melatonin in tissues are carried out by several receptors. The melatonin receptors are referred to by the letters MT. «MT» represents melatonin receptors with a well defined functional pharmacology in a native tissue, as well as known molecular structure, followed by a number subscript (15).

Three mammalian melatonin receptors have been cloned so far: MT_1 (16, 17), MT_2 (17), and MT_3 (18). Two first are classified as unique subtypes based on their molecular structure and chromosomal localization, and the third have been affinity-purified from Syrian hamster kidney (18).

It is particularly interesting to note that non-mammalian melatonin receptors have been deeply investigated. We are aware that mammalian melatonin receptors are indeed the ones reported and classified by the IUPHAR, nonetheless many works originally were developed in non-mammalian species providing clues for the search of the corresponding orthologues in mammalian tissues.

Non-mammalian melatonin receptors are classified depending on their pharmacology and kinetics. Therefore, the ML_1 melatonin

receptor is defined as a high-affinity (picomolar) site and a ML_2 as a low-affinity, (nanomolar) site (15). Originally, the nomenclature ML_1 / ML_2 was the one used for both mammals and non-mammals before the receptors were cloned. It is currently used in non-mammalian experimental models, for that reason we consider of interest to illustrate them.

ML_1 includes the non-mammalian melatonin receptor isoforms Mel1a, Mel1b and Mel1c. The Mel1a receptor sequence is homologous to the mammalian MT_1 receptor while the Mel1b is equivalent to the mammalian MT_2 receptor. There is another subtype without a corresponding orthologue in mammals termed Mel1c.

Mammalian melatonin receptors types MT_1 and MT_2 belong to class A rhodopsin-like $GPCR_s$ and present seven transmembrane hydrophobic helices. MT_1 and MT_2 melatonin receptors are formed from 350 and 362 aminoacids, respectively, with molecular weights of 39-40 kDa (19). These two melatonin receptors are encoded by genes located in different chromosomes (20). The gene for the MT_1 receptor is located in position 4q35-1 (21) and the gene for the MT_2 receptor in 11q21-22 (20). Both share approximately 60% homology with each another (17). The existence of three extracellular loops alternating with three intracellular loops to link the seven transmembrane regions, indicate the presence of potential sites for phosphorylation and glycosylation. The MT_1 melatonin receptor has two potential glycosylation sites in the N-terminal region (19), and it may exist in more than one glycosylated form (17), while MT_2 has one potential glycosylation site in the N-terminal region (17, 19).

The signal transduction system associated to the activation of MT_1 or MT_2 in target cells results in the inhibition of adenylate cyclase activity (Figure 6) (22). Activation of these receptors inhibits forskolin-induced cAMP formation with a subsequent decrease in activated protein kinase A (23). This is the common rule in the biochemical pathways for these two receptors, but it is not the only mechanism in signal transduction they can trigger. Depending on the location, organ and species, melatonin by acting on the same receptor can activate different second messenger cascades. This fact provides a rich variability of mechanism that are probably related to the physiological processes that are biochemically modulated.

Concerning the MT_3 melatonin receptor, some authors have indicated that after receptor stimulation the intracellular concentration of IP_3 and diacylglycerol in increased in hamster melanoma cells and in *Xenopus* melanophores (13).

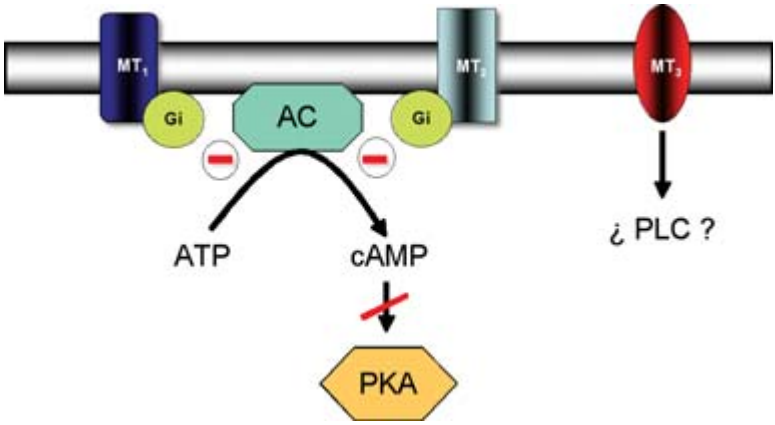


FIGURE 6. ***Schematic diagram showing the main melatonin receptors and the second messengers system to which they are coupled.***

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by research grants from the Ministerio de Educacion y Ciencia (SAF2004-06119-C2-01 and SAF2007-60835), Fundación La Caixa (BM05-102-0) and Universidad Complutense PR1/07-14890. PA-E holds a fellowship from Fundación La Caixa. AM holds a fellowship from Universidad Complutense de Madrid and PL holds fellowship from Art. 83 (CENIT proyect).

BIBLIOGRAFÍA

(1) PINTOR, J. AND PERAL, A. (2001) Therapeutic potential of nucleotides in the eye. *Drug Dev. Res.* 52: 190-195.

(2) MOLINARI, E.J.; NORTH, P.C. AND DUBOCOVICH, M.L. (1996) 2-[125I]Iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 301: 159-168.

(3) PINTOR, J.; MARTIN, L.; PELAEZ, T.; HOYLE C.H.V. AND PERAL, A. (2001) Involvement of melatonin MT3 receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 416: 251-254.
(4) Weinreb R.N. and Khaw P.T. (2004) Primary open-angle glaucoma. *The Lancet*. 363:1711-1720.
(5) PINTOR, J. (2005) Nuevas perspectivas farmacológicas de la melatonina en el tratamiento de las patologías oculares. *An. R. Acad. Nac. Farm*. 71: 429-438.
(6) PINTOR, J.; PELAEZ, T.; HOYLE C.H.V. AND PERAL, A. (2003) Ocular hypotensive effect of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor. *Brit. J. Pharmacol.* 138: 831-836.
(7) SERLE, J.B.; WANG, R.-F.; PETERSON, W.M.; PLOURDE R. AND YERXA, B.R. (2004) Effect of 5-MCA-NAT, a putative melatonin MT3 receptor agonist on intraocular pressure in glaucomatous monkeys eyes. *J. Glaucoma*. 13: 385-388.
(8) ALARMA-ESTRANY, P.; CROOKE, A.; PERAL, A. AND PINTOR, J. (2007) Requirement of intact sympathetic transmission for the ocular hypotensive effects of melatonin and 5-MCA-NAT. *Auton. Neurosc.: Basic and Clinical.* In press.
(9) PINTOR, J.; CARRACEDO, G.; MEDIERO, A.; GUZMAN-ARANGUEZ, A.; IRAZU, M.; PELAEZ, T. AND PERAL, A. (2005) Melatonin increases the rate of re-epithelialization in New Zealand white rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46: A2152.
(10) HOYLE, C.H.V.; PERAL, A. AND PINTOR, J. (2006) Melatonin potentiates tear secretion induced by diadenosine tetraphosphate in the rabbit. *Eur. J. Pharmacol.* 552: 159-161.
(11) NOSJEAN, O.; NICOLAS, J.-P.; KLUPSCH, F.; DELAGRANGE, P.; CANET E. AND BOUTIN, J. A. (2001) Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: mt1, mt2 and mt3/qr2. Tissue distribution of mt3/qr2. *Biochem. Pharmacol.* 61: 1369-1379.
(12) MAILLIET, F.; FERRY, G.; VELLA, F.; THIAM, K.; DELAGRANGE P. AND BOUTIN, J.A. (2004) Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT3. *FEBS Lett.* 578: 116-120.
(13) MULLINS, U.L.; FERNANDES, P.B. AND EISON, A.S. (1997) Melatonin Agonists Induce Phosphoinositide Hydrolysis in *Xenopus laevis* Melanophores. *Cell. Signal.* 9: 169-173.
(14) ALARMA-ESTRANY, P. AND PINTOR, J. (2007) Melatonin receptors in the eye: Location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol. Ther.* 113: 507-522.
(15) DUBOCOVICH, M.L. (1995) Melatonin receptors: Are there multiple subtypes?, *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 50-56.
(16) REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R. AND EBISAWA, T. (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.* 13: 1177-1185.
(17) REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; EBISAWA, T.; MAHLE, C.D. AND KOLAKOWSKI, L.F. (1996) Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Letts*. 386: 219-224.
(18) NOSJEAN, O.; FERRO, M.; COGE, F.; BEAUVERGER, P.; HENLIN, J.; LEFOULON, F. AND DELAGRANGE, P. (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275: 31311-31317.

(19) NAVAJAS, C.; KOKKOLA, T.; POSO, A.; HONKA, N.; GYNTHER, J. AND LAITINEN, J.T. (1996) A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 304: 173-183.

(20) REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; CASSONE, V.M.; GODSON, C. AND KOLAKOWSKI, J.L.F. (1995) Melatonin receptors are for the birds: Molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*. 15: 1003-1015.

(21) SLAUGENHAUPT, S.A.; ROCA, A.L.; LIEBERT, C.B.; ALTHERR, M.R.; GUSELLA, J.F. AND REPPERT, S.M. (1995) Mapping of the Gene for the Mel1a-Melatonin Receptor to Human Chromosome 4 (MTNR1A) and Mouse Chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics*. 27: 355-357.

(22) VON GALL, C.; STEHLE, J. AND WEAVER, D.R. (2002) Mammalian melatonin receptors: Molecular biology and signal transduction. *Cell Tis. Res.* 309: 151-162.

(23) VANECEK, J. AND KLEIN, D.C. (1995) Mechanism of melatonin signal transduction in the neonatal rat pituitary. *Neurochem. Inter.* 27: 273-278.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 963-985

Revisión

Physiology of penile vasculature: endothelium and erectile dysfunction

Recibido el 19 de octubre de 2007

DOLORES PRIETO Y ALBINO GARCÍA SACRISTÁN*
Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain.

ABSTRACT

Erectile dysfunction (ED) is considered as an early sign of endothelial dysfunction and cardiovascular disease. The present review gives an overview of the physiological factors involved in the regulation of penile vasculature with special regard to the role of the vascular endothelium. Sympathetic nerves maintain flaccidity and mediate detumescence through the release of the vasoconstrictor noradrenaline that down-regulates its own release and that of nitric oxide (NO). The sympathetic cotransmitter neuropeptide Y (NPY) enhances noradrenergic vasoconstriction and also elicits non-NO endothelium-dependent relaxations. α_1-adrenoceptor-mediated vasoconstriction involves Ca^{2+} influx through L-type and receptor-operated (ROC) Ca^{2+} channels, as well as Ca^{2+} sensitization mechanisms mediated by protein kinase C (PKC), tyrosine kinases (TKs) and Rho kinase (RhoK) in penile small arteries. Rho kinase (RhoK) can regulate Ca^{2+} entry in addition to its role in Ca^{2+} sensitization. Vasodilatation of penile arteries and large veins during erection is mediated by neurally-released NO and the subsequent increased arterial inflow and shear stress activates endothelial NO production through Akt-phosphorylation of endothelial NO synthase (eNOS). cyclic guanonin 3´-monophosphate (cGMP)-stimulated K^+ efflux through Ca^{2+}-activated (K_{Ca}) and voltage-dependent Ca^{2+} (K_v) channels is involved in the NO relaxant responses of penile arteries and veins, respectively. Phoshodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors are potent vasodilators of penile arteries and increase the effects of basally released endothelial NO. Endothelium-dependent relaxations of penile small arteries include an endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-type response which is

* e mail: agarsac@farm.ucm.es

impaired in diabetes and hypertension associated ED. The changes in structure and function in the penile vasculature in cardiovascular risk situations leading to ED remain to be elucidated.

Key words: Penile arteries, nerves, endothelial cells, nitric oxide, vasculogenic erectile dysfunction.

RESUMEN

Fisiología de los vasos sanguíneos peneanos: endotelio y disfunción eréctil

Se considera la disfunción eréctil (DE) una manifestación temprana de disfunción endotelial y enfermedad cardiovascular. En el presente trabajo se resumen los factores fisiológicos implicados en la regulación de los vasos sanguíneos peneanos, con especial referencia al papel del endotelio vascular. Los nervios simpáticos mantienen la flacidez y median la detumescencia a través de la liberación de noradrenalina que regula su propia liberación y la de óxido nítrico (NO). El cotransmisor simpático neuropéptido Y (NPY) potencia la vasoconstricción noradrenérgica y también produce relajación endotelial no mediada por NO. La vasoconstricción α_1-adrenérgica está mediada por la entrada de Ca^{2+} a través de canales tipo L y canales operados por receptor, así como también mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} mediados por la proteína kinasa C (PKC), tirosina kinasas y la kinasa Rho (RhoK). La RhoK puede regular la entrada de Ca^{2+} además de su papel en la sensibilización al Ca^{2+}. La vasodilatación de las arterias y venas grandes durante la erección está mediada por NO de origen nervioso y el posterior incremento del influjo de sangre arterial y *shear-stress* activa la producción de NO endotelial a través de la fosforilación Akt de la enzima NOS endotelial (eNOS). El eflujo de K^+ estimulado por el guanosín monofosfato cíclico (GMPc) a través de canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) y por voltaje (K_v) está implicado en el efecto relajante del NO en arterias y venas peneanas. Los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) son potentes vasodilatadores de las arterias peneanas que incrementan los efectos del NO endotelial liberado basalmente. Las respuestas relajantes dependientes del endotelio incluyen una respuesta de tipo *factor hiperolarizante derivado del endotelio* (EDHF) en las arterias peneanas pequeñas que está alterada en la DE asociada a la diabetes y la hipertensión. Los cambios en estructura y función de los vasos sanguíneos penenanos en situaciones de riesgo cardiovascular que ocasionan DE están todavía por clarificar.

Palabras clave: Arterias peneanas, nervios, célula endotelial, óxido nítrico, disfunción eréctil vasculogénica.

INTRODUCTION

Erectile dysfunction (ED), defined as the consistent inability to achieve and maintain a penile erection sufficient for adequate sexual performance (1), is a predominantly vascular disease with a high prevalence in patients with vascular disorders such as diabetes, aging, hypercholesterolemia, hypertension, sedentary life style and cigarette smoking (2, 3). Loss of endothelium integrity and subsequent endothelial dysfunction during the latter pathological conditions plays an essential role in the pathogenesis of ED. Therefore, ED is considered as an early manifestation of systemic endothelial dysfunction and cardiovascular disease (4).

The nitric oxide (NO) pathway is of critical importance in the physiology of penile erection and also in the pathophysiology and pharmacological management of ED (4-6). The constitutive endothelial NO synthase (eNOS) and neuronal NO synthase (nNOS) isoforms are tightly regulated and produce relevant levels of NO in endothelial cells and autonomic nerve endings of the penis (4). Penile erection occurs when NO released from nerve terminals and endothelium upon sexual stimulation decreases vascular resistance and increases blood flow through cavernous and helicine arteries. This allows the filling of the sinoids, the rise in intracavernosal pressure (ICP) and the restriction of venous outflow by compression of subtunical veins against the tunica albuginea with entrapment of pressurized blood in the corpora cavernosa, which is referred to as *veno-occlusive mechanism* (5, 7, 8). ED can be considered as a three-fold process where arterial insufficiency is followed by inability to obtain tumescence due to deffective filling of the corpum cavernosum (CC) and faulty veno-occlusion (9).

Penile erection and flaccidity are ultimately regulated by the relaxation and contraction, respectively, of erectile smooth muscle, and a metabolic imbalance between contractile and relaxant factors in the CC, penile arterties and veins is one of the main causes of organic ED. The present review summarizes the research work carried out by our group for more than a decade on the mechanims underlying the contractile/relaxant processes of the penile vasculature, with special regard to the role of the vascular endothelium in the phsyiology of erection, in the pathophsyiology of

ED and in the action of vasoactive drugs currently used in the therapy of ED.

REGULATION OF PENILE VASOCONSTRICTION AND FLACCIDITY

Sympathetic nerves

Sympathetic adrenergic nerves are responsible for the detumescence of the erect penis and also contribute to the maintenance of penile flaccidity through the tonic release of noradrenaline (10). Noradrenaline induces contraction of CC smooth muscle and arterial vasoconstriction, which leads to the reduction of arterial inflow and to the collapse of the lacunar spaces, respectively, allowing decompression of subtunical venules and venous drainage of the corpora (5, 7, 11). Neural-released noradrenaline evokes vasoconstriction through a mixed population of postjunctional α_1- and α_2-adrenoceptors in the isolated cavernous artery (12), and only through α_1-adrenoceptors in horse penile resistance arteries (13). Noradrenaline down-regulates its own release from adrenergic nerves acting on inhibitory prejunctional α_2-adrenoceptors in intracavernous arteries (13).

Besides the mechanical restriction of the venous outflow during the *veno-occlusive* mechanism, there is evidence for an active regulation of penile veins and adrenergic stimuli induce venoconstriction through and heterogenous population of α_1- and α_2-postjunctional adrenoceptors in both circumflex (14) and deep dorsal veins (15). In the latter, noradrenergic nerve terminals penetrate deep in the smooth muscle effector layer which represents a mechanism to respond faster and more extensively to the vasoconstrictor nerve activity.

In addition to its classical vasoconstrictor role, adrenergic transmitters can also induce vasodilatation in penile arteries through β-adrenoceptors, which is related to the increased plasma adrenaline levels during erection. By acting on β_2-adrenoceptors (7, 13), adrenaline would further increase arterial inflow to the penis in connection with the increased metabolism and physical activity during sexual intercourse.

Activation of sympathetic nerves still has antierectile effects under conditions of α-adrenoceptor blockade suggesting that neurotransmitters other than noradrenaline may contribute to the vasoconstrictor sympathetic activity in the penis (10). Neuropeptide Y (NPY), a 36-aminoacid peptide usually colocalized with noradrenaline in sympathetic perivascular nerves, is widely distributed in penile erectile tissues with a particularly high density around helicine arteries (16, 17). Although NPY was initially suggested to have a role in detumescence (10), earlier *in vitro* studies on the contractile effects of the peptide on erectile tissue rendered controversial results (16), and *in vivo* investigations showed that intracavernous injection of NPY increased intracavernous pressure in rabbits (18). We have recently provided an explanation for this controversy between the rich presence of NPY-containing nerves in the penis and the lack of clear antierectile/vasconstrictor effects of the peptide (17). Thus, NPY has a dual facilitatory/inhibitory modulatory role on the noradrenergic vasoconstriction of horse penile resistance arteries, the ability to enhance and decrease noradrenaline-induced contractions being achieved through a heterogenous population of NPY receptors. Both Y_1 and Y_2 postsynaptic receptors are involved in the NPY-induced enhancement of noradrenaline contractions, and presynaptic inhibitory Y_2 receptors limit noradrenaline release form nerve terminals. The Y_1 receptor is a G-protein-coupled receptor that usually enhances other constrictors responses in small arteries by depolarizing arterial smooth muscle and by inhibiting cAMP-mediated relaxations (19, 20). Under conditions of Y_1 and Y_2 receptor blockade, NPY can also induce NO-independent relaxations in penile resistance arteries through atypical receptors located at the endothelium, which could account for the *in vivo* proerectogenic effects reported for the peptide (18).

Local factors regulating penile vasoconstriction

Several contractile prostanoids are locally synthesized and metabolized in penile erectile tissues (21). Whereas in CC basal prostanoid production is involved in the maintenance of the myogenic spontanous tone consisting of phasic and tonic contractions (21), in penile resistance arteries arterial spontaneous tone is modulated by

basal-released relaxant prostanoids (22). On the other hand, agonist-induced endothelial stimulation of both human and rabbit CC and horse deep dorsal penile veins evokes the release of contractile prostanoids (23, 24). The main receptor involved in the contractile effect of prostanoids in the human penis belongs to the PGH_2/TP type (25, 26).

Angiotensin II (AII) is locally formed in the endothelium and smooth muscle of the CC, where its contractile effects are mediated by muscular AT-1 receptors (27-29). Since AII levels are increased in the cavernous blood during detumescence (29), this peptide has been suggested to be involved in the initiation of detumescence as a consequence of enhanced sympathetic activity. However, the functional role of AII in penile arteries and veins remains to be established.

Endothelins (ETs) are potent vasoconstrictor peptides synthesized by endothelial cells that induce both contraction and ET_B-mediated relaxation of erectile tissues (30, 31). ET_A and ET_B receptors subtypes are located at penile smooth muscle and nerves, respectively (30), and infusion of ET-1 and ET-3 in the rat increases intracavernosal pressure at low doses, and produces vasoconstriction followed by decrease in pressure at high concentrations (32).

Intracellular mechanisms of penile vasoconstriction

Although elevation of $[Ca^{2+}]_i$ is considered as a classical trigger for force development, smooth muscle contraction can also be modulated through inhibition of myosin light chain (MLC) phosphatase (MLCP) by Ca^{2+}-independent mechanisms resulting in an increased MLC phosphorylation and force at constant $[Ca^{2+}]_i$, which is referred to as *Ca^{2+} sensitization* (33). Vasoconstrictor agonists binding G-protein-coupled receptors can stimulate both Ca^{2+} mobilization from intracellular stores and Ca^{2+} entry through both dihydropyridine-sensitive L-type and non L-type Ca^{2+} channels (34).

Whereas in rat and human CC, there is a significant contribution of Ca^{2+} from intracellular stores to phenylephrine-induced contractions (35), in penile small arteries, α_1-adrenoceptor- and TP receptor-mediated contractions are largely dependent on Ca^{2+} entry

through both voltage-dependent L-type and receptor-operated Ca^{2+} channels (ROCs), with a minor role for either intracellular Ca^{2+} mobilization or store-operated Ca^{2+} (SOC) entry (36, 37). A *capacitative* Ca^{2+} entry through SOCs not coupled to contraction but probably related to non-contractile functions of vascular smooth muscle cells, such as protein and gene expression, is also present in penile small arteries. Despite the large extracellular Ca^{2+} dependence of penile vasoconstriction, there are also potent mechanisms of Ca^{2+} sensitization of the contractile proteins involving several kinases such as protein kinase C (PKC), tyrosine kinases (TKs) and Rho kinase (RhoK) (37), which suggests that Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization may cooperate to elicit vasoconstriction upon α_1-adrenergic receptor stimulation. Rho A is a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins and Rho kinase (RhoK) is a serine-threonine kinase which is activated by RhoA (33) and has been shown to play a key role in the physiology of erection. Thus, inhibition of RhoK in a rat *in vivo* model markedly increases intracavernosal pressure and leads to erection (38) and adeno-associated viral gene transfer of dominant negative RhoA mutant enhances erectile function (39). In human CC, RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization contributes to smooth muscle contraction and flaccidity (40). Interestingly, we have recently shown that RhoK is involved not only in the Ca^{2+} sensitization of the contractile apparatus but also in the regulation of Ca^{2+} entry through ROC channels upon α_1-adrenoceptor activation in rat penile small arteries (41). These findings suggest that RhoK and other kinases involved in Ca^{2+} homeostasis of penile arteries represent potential therapeutic targets for the treatment of organic ED (Figure 1).

REGULATION OF PENILE VASODILATATION AND ERECTION

Accumulating experimental evidence for more than a decade now has supported nitric oxide (NO) as a central component of the major signal transduction pathway mediating penile erectile responses. Wheras the role of NO as a neurotransmiter in the reflex arc that initiates erection was early established, endothelial-derived NO is becoming increasingly recognized as a key factor in the vascular homeostasis and physiology of penile erection.

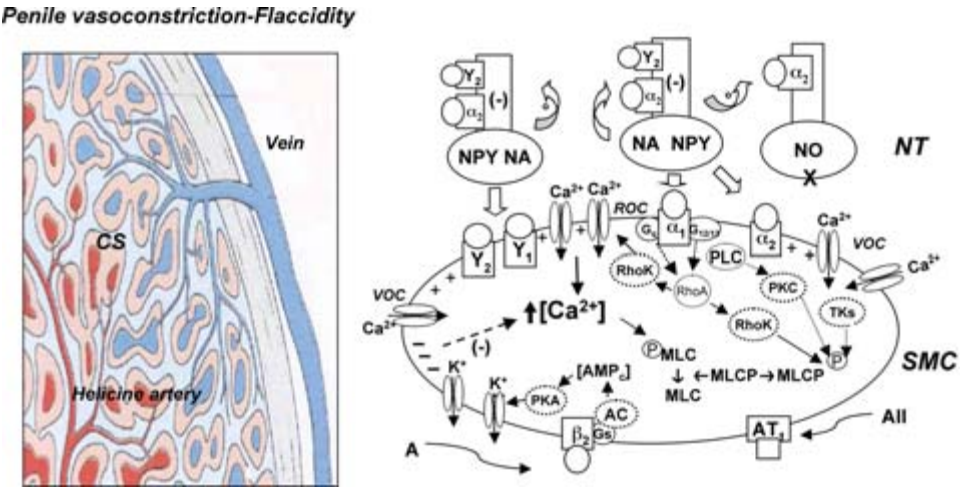


FIGURE 1. ***Penile vasoconstriction and flaccidity.*** *Noradrenaline (NA) released from sympathetic nerves acts on a_1 and a_2 postsynaptic receptors to elicit vasoconstrcition and on a_2 presynaptic receptors to down regulate its own release and that of nitric oxide (NO). Activation of a_1 adrenoceptors evokes Ca^{2+} entry through voltage.dependent (VOC) and receptor-operated channels (ROC) regulated by Rho kinase (RhoK), thus activating myosin light chain (MLC) kinase (MLCK) which phosphorylates MLC. Ca^{2+} sensitization is also activated through RhoK, protein kinase C (PKC) and tyrosine kinases (TKs) leading to phosphorylation of MLC phosphatase (MLCP). Neuropeptide Y (NPY) is coreleased with NA from sympathetic nerves and acts Y_1 and Y_2 postsynaptic receptors to enhance NA contractions and on Y_2 receptors to limit NA. Adrenaline (A) can elicit relaxation through b_2 adrenoceptors linked to adenylate cyclase (AC), increase of cAMP and activation of protein kinase A (PKA) to enhance K^+ efflux and decrease intracellular Ca^{2+} and contraction. AII: angiotensin II; NT: Nerve terminal; SMC: Smooth muscle cell.*

Non-adrenergic Non-cholinergic (NANC) NO-containing nerves

Penile erection is initiated by activation of parasympathetic nerves leading to vasodilatation of cavernous and helicine arteries and to the relaxation of trabecular smooth muscle. However, classical physiological studies carried out in several animal species and man showed that erection induced by activation of pelvic or cavernous nerves was atropine-resistant (5). The neurotransmitter involved in the erectile responses was further shown to be NO, and it is now well established that NO locally released from nerves and

endothelium is the main chemical mediator of the vasodilatation and trabecular relaxation involved in penile erection.

The catalytic production of NO requires the enzyme NO synthase, expressed in many biological tissues as 3 main isoforms: two constitutive isoforms, neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (eNOS), that require Ca^{2+} and calmodulin for activity, and one inducible isoform (iNOS), that is Ca^{2+}- and calmodulin- independent and is expressed in response to inflammatory mediators (42). nNOS and eNOS are the principal isoforms involved in penile erection and are present in the nerves and endothelium of the penis, respectively (43-45). nNOS is present in the pelvic plexus and in terminal branches of the cavernous nerves innervating the trabecular smooth muscle and penile vasculature (43, 46). nNOS and vesicular ACh transporter (VAChT) are co-localized in most nerve terminals surrounding penile small arteries which suggests that ACh and NO coexist in the same parasympathetic cholinergic neurons that control penile arterial tone (44, 45).

Investigations by our group first provided functional evidence for the involvement of NO in the NANC inhibitory neurotransmission of penile resistance arteries or *helicine arteries*. Thus, the NANC relaxations elicited by electrical field simulation (EFS) were endothelium-independent, inhibited by the L-arginine analogue, N^G-nitro-L-arginine, by the NO scavenger, oxyhaemoglobin, and by inhibitors of guanylate cyclase (47, 48). Moreover, exogenous NO and nitrosothiols mimicked the vasodilatation induced by EFS (22, 47, 48), which suggests that NO or a NO-like substance released form nitrergic nerves mediates the neurogenic relaxations of penile resistance arteries.

Until recently, the defined role of nNOS and eNOS in penile erection has been a subject of debate, specially because erectile function and mating behaviour are preserved in mice lacking the genes for eNOS and nNOS (49, 50). Recently, a nNOS gene variant resulting from alternative mRNA splicing of the βnNOS in exon 1 has been confirmed as a major mediator in penile erection by using nNOS, eNOS and doubly mutant deficient mice (51).

Concerning the role of other neural mediators released from parsympathetic nerve terminals during penile erection, the classical

cholinergic neurotransmitter acetylcholine (ACh) relaxes CC smooth muscle and penile arteries and veins (5, 22, 24, 52), despite the fact that erection is atropine-resistant. ACh released from cholinergic nerves during erection probably has a role decreasing sympathetic adrenergic tone, though its action on prejunctional muscarinic receptors at sympathetic nerve terminals as reported in other small arteries and CC (7, 8, 53).

There is a rich presence of peptidergic nerves containing Vaoactive Intestinal Peptide (VIP) in the penis and nNOS, VIP and VAChT are co-localized in the same perivascular nerve terminals around penile arteries and in trabecular smooth muscle (44, 45). VIP induces potent relaxations in penile arteries and veins (5, 54). However, VIP antagonists do not inhibit neurogenic relaxations in penile small arteries but VIP relaxant responses are partially blocked by NOS inihibition, which suggests that VIP may have a presynaptic facilitatory role in the nitregic neurotranmission (54).

The synthesis and release of NO in the penile vasculature is modulated by several factors such as neurotransmitters, hormones, autacoids and O_2 tension. Noradrenaline from sympathetic nerves down-regulates NO release through α_2-adrenoceptors in penile resistance arteries (55). The expression and activity of NOS can also be regulated by protaglandins and PGE_1 exerts a long term up-regulation of NO synthesis by increasing the penile content of both nNOS and eNOS after repeat treatment (56).

Partial O_2 pressure (pO_2) in the blood of the CC plays a key role in the regulation of penile haemodynamics. pO_2 values are similar to those of venous blood during flaccidity and they rise to 90-100 mm Hg during erection, as a result of the increased arerial inflow to the sinuses (57). Since molecular O_2 is a substrate for NO synthesis, pO_2 regulates the ability of CC smooth muscle to relax in response to EFS of the nerves and endothelium-dependent vasodilators such as ACh, these NO-dependent responses being progressively inhibited as a function decreasing pO_2 levels (57). Furthermore, both nNOS and eNOS proteins dramatically decrease in the erectile tissue during chronic cavernosal isquemia which suggests that arterial insufficiency and subsequent exposure of erectile tissue to hypoxia impairs NOS expression and thus NO synthesis and relaxation (58).

This probably underlies arteriogenic ED induced by atherosclerosis and other arterial occlusive diseases.

Local factors regulating penile vasodilatation

Relaxant prostanoids synthesized by both smooth muscle and endothelial cells, are involved in the maintenance of penile arteriolar tone (22, 26) and in the endothelium-dependent vasodilatations of penile arteries in some animal species (54). Since PGE_1 is the most efficacious drug used in the intracavernous therapy of ED, its relaxant effects are well characterized in both arterial and trabecular smooth muscle of the penis. Thus, PGE_1 evokes endothelium- and NO-independent relaxations mediated by cAMP in horse penile resistance arteries (59, 60), this relaxant effect of PGE_1 in human arteries being correlated with its clinical effectiveness when injected intracavernously in patients (61). The vasodilator effects of PGI_2 and PGE_1 are mediated by IP and EP (EP_2/EP_4) receptors coupled to Gs proteins and to the activation of adenylate cyclase, in human penile arteries (26).

Role of the endothelium in the regulation of penile vasculature

The endothelium, located at the interphase between blood and the vascular wall, regulates the underlying vascular smooth muscle tone by synthesizing short life vasoactive mediators such as NO, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), prostacyclin (PGI_2), AII and endothelins (ETs) (62).

Endothelial-derived NO is produced in the penis by activation of eNOS in response to both hemodynamic stimuli like *shear stress* and pulsatile stretch generated by increased blood flow, and by neurohumoral factors such as ACh, bradikynin and histamine acting on specific endothelial receptors (7, 8, 22, 24, 52). Activation of eNOS by agonists is induced by increases in intracellular Ca^{2+} resulting from activation of G-protein-coupled receptors. Ca^{2+} binds to calmodulin and this classic mode of eNOS activation by Ca^{2+}/calmodulin accounts for rapid and transient production of endothelial NO (63).

NO is basally released from the arterial endothelium, as shown by the increase in sponaneous myogenic tone after blockade of NOS in human and equine penile small arteries (22, 48). The relative contribution of endothelial NO to the agonist-induced vasodilations of the erectile tissues is variable, being more relevant in CC and large penile arteries and veins (23, 24, 48) than in the small penile resistance arteries where a non-NO non-prostanoid factor is a major component of the endothelium-dependent relaxant responses (22, 64, 65).

The physiological contribution of endothelial NO released by shear-stres to penile vasodilatation has recently been suggested by cllinical investigations demonstrating a flow-dependent arterial dilatation, measured by the changes in the cavernous artery diameter after 5 min occlusion of penile flow (66). These studies showed that flow-induced vasodilatation is strongly impaired in patients with organic ED and prosposed this measurement as a clinical test to evaluate penile endothelial function. However, the involvement of NO in the flow-dependent dilatation of penile arteries awaits further confirmation, although recent studies have elucidated the link between increased blood flow to the penis and eNOS activity, thus also clarifying the physiological interaction between endothelial and nerve-derived NO during penile erection. Thus, erection elicited by cavernosal neve stimulation is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) and activation of the protein kinase Akt. (67). This pathway phosphorylates eNOS at Ser-1177 thereby increasing endothelial-derived NO (68) and is responsible for sustained NO production and the maintenance of maximal erection (67, 69). The most important physiological agonist for such eNOS activation is shear stress, although several hormones and growth factors also increase the activity of PI3-K and endothelial NO production after phosphorylation of eNOS. This pathway thus explains the role and interactions nNOS and eNOS during penile erection. Neural NO–mediated vasodilatation and increased blood flow to the CC produced by parasympathetic activation during the initiation of erection leads to shear-stress mediated stimulation of the endothelial lining in penile arteries, which in turn releases NO from the endothelium and produces further vasodilatation and sustained erection.

The subcellular location of eNOS, its interaction with the protein caveolin-1 and the phophorylation state of serine and treonine

residues of the enzyme play a role in the posttranslational regulation of eNOS (63, 67, 68).

EDHF

In systemic small arteries including penile resistance arteries, there is a significant NOS- and cyclooxygenase-resistant relaxation evoked by endothelium-dependent agonists under conditions of NOS blockade, in contrast to that observed in CC where the endothelium-dependent vasodilatation evoked by ACh is blunted by blockade of NOS (22,48,63). This non-NO non-prostanoid endothelial is associated with cyclic nucleotide-independent hyperpolarization of arterial smooth muscle thereby being referred to as «*endothelium-derived hyperpolarizing factor*» (*EDHF*) (62). As reported for the systemic circulation, in both penile arteries and veins there is also a correlation between vessel size and the relative contribution of EDHF to the endothelium-dependent relaxations, the smaller the vessel the larger the component of the relaxation resistant to NOS blockade (22, 24, 48, 54).

In horse penile small arteries, we first observed that the component of the endothelium-dependent relaxations resistant to NOS- and cyclooxygenase blockade was inhibited by raising extracellular K^+ and by a combination of intermediate- and small-conductance Ca^{2+}-activated K^+ (K_{Ca}) channel blockers, thus suggesting the involvement of a hyperpolarizing factor (22). These findings were further confirmed in human penile arteries, where the EDHF-mediated relaxations were enhanced by calcium dobesilate (64). In horse penile arteries, the EDHF-type response is also markedly inhibited by ouabain which suggests an involvement of the Na^+-K^+ ATPase (22). The identity of EDHF still remains controversial and there is probably more than one EDHF (62, 70). The available experimental evidence supports three explanations for the identity and actions of EDHF: a) increased $[Ca^{2+}]_i$ triggers the synthesis of a CP450 metabolite which is essential for the EDHF-type responses, b) endothelial cell hyperpolarization is transmitted to the smooth muscle cell through myoendothelial *gap-junctions* that couple both types of cells providing a low-resistance electrical pathway; c) K^+ ions released from endothelial cells through K_{Ca} induce

hyperpolarization of the adjacent smooth muscle cells by activating K^+ channels and/or the Na^+-K^+ ATPase (62, 70). In penile small arteries, endothelial intermediate-conductance K_{Ca} channels have been shown to be involved in the release of a non-NO non-prostanoid factor in rat intracavernous arteries (71), although the identity of EDHF remains to be clarified.

Intracellular signalling pathways underlying penile vasodilatation

NO constitutively produced and released from nerve terminals and endothelial cells diffuses into adjacent vascular or trabecular smooth muscle cells and binds to the enzyme guanylate cyclase to increase intracellular cGMP levels and the activity of the cGMP-dependent protein kinase (PKG) (5, 6, 63). The essential role of the PKG-mediated relaxation in the erectile process has been shown in PKG-deficient mice that are unable to reproduce and have impaired relaxations in response to neural- and endothelial-derived NO (72).

Both PKG and the cAMP-dependent kinase PKA can modulate the activity of K^+ channels thereby enhancing K^+ efflux and reducing $[Ca^{2+}]_i$ to elicit vasodilatation (73,74). K_{Ca} channels are activated by intracellular Ca^{2+} and depolarization and they are involved in the maintenance of resting tone and are downstream mediators of the NO/cGMP signalling cascade in both CC and penile resistance arteries (7, 8, 22, 47, 75). Thus, the relaxations induced by NO and NO donors in horse penile resistance arteries are inhibited by charybdotoxin and iberiotoxin, and this inhibition is not further increased by blockers of PKG thus suggesting that the relaxant effect of NO is due in part to activation of large conductance K_{Ca} (BK_{Ca}) through a PKG-dependent mechanism (22, 47, 75). In horse deep dorsal penile veins, voltage-dependent K^+ channels are involved in the maintenance of basal tone and also in the cGMP-mediated NO-induced vasodilatation (24).

The NO/cGMP signalling pathway underlying penile erection involves several targets available for pharmacological intervention in ED, the most prominent identified thus far being phosphodiesterase 5 (PDE5), the enzyme which enzymatically converts cGMP to its

inactive form (76). The cGMP-specific cGMP binding PDE5 is the main cGMP catalyzing enzyme in penile smooth muscle and selective inhibitors of the enzyme are safe and well tolerated drugs in the oral therapy of organic ED (76). PDE5 is abundant in the smooth muscle layer of human penile cavernous and helicine arteries, where the functional effects of the selective inhibitor sildenafil have been characterized (77, 78). In contrast to the CC, where sildenafil produces little or no relaxation but enhances the effects of neural-released NO (79), sildenafil potently relaxed cavernous and helicine arteries (54, 77, 78). This vasodilatation was endothelium-dependent and blocked by inhibitors of NOS, guanlylate cyclase and BK_{Ca} channels which suggests that by inhibiting cGMP break-down sildenafil augments the relaxing effects of endothelial-derived NO (75, 78). These observations are consistent with studies showing that sildenafil cannot normalize the impaired endothelium-dependent responses of human penile arteries in diabetic patients with ED (65) and could explain the suboptimal responses to oral PDEs inhibitors in these patients, in whom endothelial NO availability is decreased (69).

Several agonists acting on G-protein coupled receptors, such as β-adrenoceptor agonists, relaxant prostanoids and VIP activate adenylate cyclase and increase intracellular cAMP levels. In penile small arteries, PGE_1 relaxant reponses are mediated by cAMP and activation of ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}) (59,80), in contrast to CC where K_{Ca} channels are involved (81). The activity of cAMP is terminated by the cAMP-specific PDE4 and the cGMP-inhibited cAMP-specific PDE3. They have been localized in the smooth muscle layer of intracavernous and penile resistance arteries, and in the case of PDE4 also in the cytoplasm of endothelial cells lining the cavernous arteries (77). Selective inhbition of PDE4 and PDE3 evoked potent relaxations in penile resistance arteries, which suggests an enhancement of the effects of basal cAMP production in the arterial wall; the fact that relaxations evoked by the selective PDE4 inhibitor rolipram are inhibited by cycloxygenase blockade in turn indicates an involvement of PDE4 in the release and/or effects of relaxant prostanoids (59) (Figure 2).

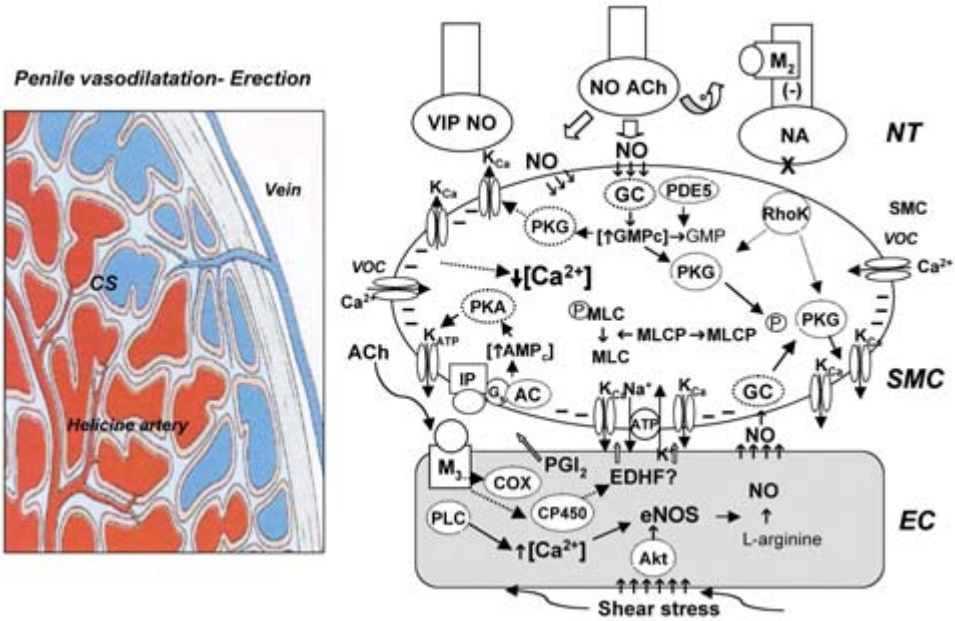


FIGURE 2. ***Penile vasodilatation and erection.*** *Nitric oxide (NO) is released from parasympathetic nerve terminals and difusses into adjacent smooth muscle to activate guanylate cyclse (GC). Increased cGMP levels activate protein kinase G (PKG) which can either stimulate Ca^{2+}-activated K^+ channels (K_{Ca}) and reduce intracellular Ca^{2+}, or phosphorylate myosin light chain phosphatase (MLCP) and reduce Ca^{2+} sensitivity. PKG can phosphorylate Rho kinase (RhoK) and thus reduce its activity. Relaxation induced by neural NO increases blood flow and shear stress on the endothelial cells thereby increasing Akt phophorylation of eNOS and NO production, and also releasing prostanoids and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Nerve-derived acetylcholine (ACh) can either limit noradrenaline (NA) release from sympathetic nerves through M_2 receptors or stimulate endothelial M_3 receptors to induce NO, EDHF and prostanoids release. Prostanoids activate IP/EP receptors coupled to adenylate cyclase (AC) and increased cAMP activate protein kinase A (PKA). COX: Cyclooxygenase; CP450: Cytochrome P 450; EC: Endothelial cell.; NT: Nerve terminal; PDE: Phosphodiesterase; PGI_2: Prostacyclin; PLC: Phospholipase C; SMC: Smooth muscle cell.*

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND ERECTILE DYSFUNCTION

The high prevalence of ED in patients with cardiovascular disorders such as aging, hypercholesterolemia and hypertension, in

which there is endothelial dysfunction and reduced NO bioavailability (2-4), suggests the essential role of the vascular endothelium in the physiology of penile erection, as well as its importance in the pathogenesis of ED.

Mechanisms that may be related to the endothelial dysfunction and to the loss of NO bioavailability during vasculogenic ED include decreased eNOS expression and activity, dysregulation of eNOS phosphorylation, increased NO scavenging by reactive O_2 species (ROS), eNOS uncoupling, decreased levels of eNOS cofactors and substrate and increased interaction with contractile signalling pathways (63). Decreased erectile responses associated with impaired endothelium-dependent vasodilation and eNOS expression/activity in CC have been demonstrated in experimental animal models of diabetes, hypercholesterolemia and hypertension (63, 82-84). However, little is known about the impaired function of the penile vasculature and recent evidence suggests that arterial insufficiency precedes the structural and functional changes in CC leading to ED. On the other hand, whereas in CC there is a functional impairment of the NO-mediated endothelium-dependent responses during vasculogenic ED (82-84), endothelial abnormalities also include reduced EDHF-type relaxations in penile small arteries from diabetic men and from a rat model of renal hypertension (65, 85). These observations suggest the need to investigate the altered functional responses associated to cardiovascular risk situations leading to ED in penile arteries and veins.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants nº SAF2006-09191 and BFU2007-67732 from Ministerio de Educación y Ciencia (España).

REFERENCES

(1) LUE, T.F. (2000) Erectile dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 1802-1813.
(2) SULLIVAN, M.E.; THOMPSON, C.S.; DASHWOOD, M.R.; KHAN, M.A.; JEREMY, J.Y.; MORGAN, R.J. AND MIKHAILIDIS, D.P. (1999) Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc. Res*. 43: 658-665.

(3) MONTORSI, P., MONTORSI, F; SCHULMAN, C. (2003) Is erectile dysfunction the tip of the iceberg of a systemic vascular disorder? *Eur. Urol.* 44: 352-354.
(4) MUSICKI, B. AND BURNETT, A.L. (2007) Endothelial dysfunction in dabetic erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 19: 129-138.
(5) ANDERSSON, K.E. AND WAGNER, G. (1995) Physiology of penile erection. *Physiol. Rev.* 75: 191-236.
(6) PRIETO, D. AND GARCÍA-SACRISTÁN, A. (2003) Óxido nítrico y disfunción eréctil. En *Bioquímica y Fisiopatología del Envejecimiento,* Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia, pp.: 291-314.
(7) SIMONSEN, U.; GARCÍA-SACRISTÁN, A. AND PRIETO, D. (2002) Penile arteries and erection. *J. Vas. Res.* 39: 283-303.
(8) PRIETO, D. (2007) Physiological regulation of penile arteries and veins. *Int. J. Impot. Res.* (en prensa).
(9) BRODERICK, G.A. (1998) Evidence based assessment of erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 10: S64-S73.
(10) GIULIANO F, BERNABE J, JARDIN A, ROUSSEAU JP. (1993) Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. *J. Urol.* 150: 519-524.
(11) SAENZ DE TEJADA I.; KIM, N.; LAGAN, I.; KRANE, R.J. AND GOLDSTEIN I. (1989) Regulation of adrenergic activity in penile corpus cavernosum. *J. Urol.* 142:1117-1121.
(12) HEDLUND, H. AND ANDERSSON, K.-E. (1985) Comparison of the responses to drugs acting on adrenoreceptors and muscarinic receptors in human isolated corpus cavernosum and cavernous artery. *J. Auton. Pharmacol.* 5: 81-88.
(13) SIMONSEN, U.; PRIETO, D.; HERNÁNDEZ, M. AND GARCÍA SACRISTÁN, A. (1997) Adrenoceptor –mediated regulation of the contractility in horse penile resistance arteries. *J. Vasc Res* 34: 90-102.
(14) KIRKEBY, H.J.; FORMAN, A.; SORENSEN, S. AND ANDERSSON, K.-E. (1989) Alpha-adrenoceptor function in isolated penile circumflex veins from potent and impotent men. *J. Urol.* 142:1369-1371.
(15) RECIO, P.; PRIETO, D.; MARTINEZ, M.P.; GARCÍA, P., RIVERA, L.; BENEDITO, S., MARTINEZ, A.C., SACRISTAN, A.G.; ORENSANZ, L.M. AND HERNANDEZ, M. (2004) Immunohistochemical and functional evidence for a noradrenergic regulation in the horse penile deep dorsal vein. *Int. J. Impot. Res.* 16: 486-491.
(16) KIRKEBY, H.J.; JORGENSEN, J.C. AND OTTESEN, B. (1991) Neuropeptide Y (NPY) in human penile corpus cavernosum tissue and circumflex veins—occurrence and in vitro effects. *J. Urol.* 145: 605-609.
(17) PRIETO, D.; RIVERA, L.; MARTÍNEZ, P.; BENEDITO, S.; GARCÍA-SACRISTÁN, A, AND HERNÁNDEZ, M. (2004) Heterogeneity of the neuropeptide Y (NPY) contractile and relaxing receptors in horse penile small arteries. *Br J Pharmacol* 143: 976-86.
(18) KIRKEBY, H.J., LUNDBECH, P.E., DJURHUUS, J.C. AND FORMAN, A. (1992) Effects of vasoactive intestinal peptide, peptide histidine methionine, and neuropeptide Y on intracavernous pressure in the rabbit. *Urology.* 40: 270-276.
(19) PRIETO, D.; BUUS, C.; MULVANY, M.J. AND NILSSON, H. (1997) Interactions between neuropeptide Y and the adenylate cyclase pathway in rat mesenteric small arteries: role of membrane potential. *J. Physiol.* 502: 281-292.

(20) PRIETO, D.; BUUS, C.L.; MULVANY, M.J. AND NILSSON, H. (2000) Neuropeptide Y regulates intracellular calcium through different signalling pathways linked to a Y(1)-receptor in rat mesenteric small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 129:1689-1699.

(21) MINHAS, S.; CARTLEDGE, J.; EARDLEY, I. (2000) The role of prostaglandins in penile erection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 62: 137-146.

(22) PRIETO, D.; SIMONSEN, U.; HERNÁNDEZ, M. AND GARCÍA-SACRISTÁN, A. (1998) Contribution of K^+ channels and ouabain-sensitive mechanisms to the endothelium-dependent relaxations of horse penile small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 123: 1609-1620.

(23) AZADZOI, K.M.; KIM, N.; BROWN, M.L.; GOLDSTEIN, I.; COHEN, R.A. AND SAENZ DE TEJADA, I. (1992) Endothelium-derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J. Urol.* 147: 220-225.

(24) MARTINEZ, A.C.; PRIETO, D.; HERNÁNDEZ, M.; RIVERA, L.; RECIO, P.; GARCÍA-SACRISTÁN, A. AND BENEDITO, S. (2005) Endothelial mechanisms underlying responses to ACh in the horse deep dorsal penile vein. *Eur. J. Pharmacol.* 515: 150-159.

(25) HEDLUND, H.; ANDERSSON, K.E.; FOVAEUS, M.; HOLMQUIST, AND USKI T. (1989) Characterization of contraction-mediating prostanoid receptors in human penile erectile tissues. *J. Urol.* 141: 182-186.

(26) ANGULO, J.; CUEVAS, P.; LA FUENTE, J.M.; POMEROL, J.M.; RUIZ-CASTANE, E.; PUIGVERT, A.; GABANCHO, S.; FERNANDEZ, A.; NEY, P. AND SAENZ DE TEJADA I. (2002) Regulation of human penile smooth muscle tone by prostanoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 136: 23-30.

(27) KIFOR, I.; WILLIAMS, G.H.; VICKERS, M.A.; SULLIVAN, M.P.; JODBERT, P. AND DLUHY, R.G. (1997) Tissue angiotensin II as a modulator of erectile function. I. Angiotensin peptide content, secretion and effects in the corpus cavernosum. *J. Urol.* 157: 1920-1925.

(28) PARK, J.K.; KIM, S.Z.; KIM, S.H.; PARK, Y.K. AND CHO, K.W. (1997) Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum: functional characterization of angiotensin II receptors. *J. Urol.* 158: 653-658.

(29) BECKER, A.J.; UCKERT, S.; STIEF, C.G.; TRUSS, M.C.; MACHTENS, S.; SCHELLER, F.; KNAPP, W.H.; HARTMANN, U. AND JONAS, U. (2001) Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. *Urology*. 57: 193-198.

(30) HOLMQUIST, F.; KIRKEBY, H.J.; LARSSON, B.; FORMAN, A.; ALM, P. AND ANDERSSON K.-E. (1992) Functional effects, binding sites and immunolocalization of endothelin-1 in isolated penile tissues from man and rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261: 795-802.

(31) PARKKISENNIEMI, U.M.; PALKAMA, A.; VIRTANEN, I. AND KLINGE, E. (2000) The endothelin ET(B) receptor agonist [125I]BQ-3020 binds predominantly to nerves in the bovine retractor penis muscle and penile artery. *Pharmacol. Toxicol.* 87: 234-241.

(32) ARI, G.; VARDI, Y.; HOFFMAN, A.; AND FINBERG, J.P. (1996) Possible role for endothelins in penile erection. *Eur. J. Pharmacol.* 307: 69-74.

(33) SOMLYO, A.P. AND SOMLYO, A.V. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J. Physiol.* 522: 177-85.
(34) MCFADZEAN, I. AND GIBSON, A. (2002) The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 135: 1-13.
(35) WILLIAMS, B.A.; LIU, C.; DEYOUNG, L.; BROCK, G.B. AND SIMS, S.M. (2005) Regulation of intracellular Ca^{2+} release in corpus cavernosum smooth muscle: synergism between nitric oxide and cGMP. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288: C650-C658.
(36) PRIETO, D.; SIMONSEN, U.; STANCKEVICIUS, E.; GARCÍA-SACRISTÁN, A. AND VILLALBA, N. (2006) Role of calcium calcium in the vasoconstriction of rat penile arteries. *J. Sex. Med.* 47.
(37) VILLALBA, N.; STANKEVICIUS, E.; GARCIA SACRISTÁN, A.; SIMONSEN, U. AND PRIETO, D. (2007) Contribution of both Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization to the α_1-adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292: H1157-H1169.
(38) CHITALEY, K.; WINGARD, C.J.; WEBB, C.R.; BRANAM, H., STOPPER, V.S., LEWIS, R.W. AND MILLS, T.M. (2001) Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway. *Nature Med.* 7: 119-122.
(39) CHITALEY, K.; BIVALACQUA, T.J.; CHAMPION, H.C.; USTA, M.F.; HELLSTROM, W.J.; MILLS, T.M.; WEBB, R.C. (2002) Adeno-associated viral gene transfer of dominant negative RhoA enhances erectile function in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298: 427-432.
(40) WANG, H.; ETO, M.; STEERS, W.D.; SOMLYO, A.P. AND SOMLYO, A.V. (2002) RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization in erectile function. *J. Biol. Chem.* 277: 30614-30621.
(41) VILLALBA, N.; STANCKEVICIUS, E.; SIMONSEN, U. AND PRIETO, D. (2007) Role of Rho kinase in calcium handling of rat penile arteries. *Acta Physiologica*. 190, Suppl 665: 48.
(42) MONCADA, S. AND HIGGS, E.A. (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 147: Suppl 1:S193-201.
(43) BURNETT, A.L.; LOWENSTEIN, C.J.; BREDT, D.S.; CHANG, T.S. AND SNYDER, S.H. (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science.* 257: 401-403.
(44) HEDLUND, P.; ALM, P. AND ANDERSSON, K.-E. (1999) NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br. J. Pharmacol.* 127: 349-360.
(45) HEDLUND, P.; NY, L.; ALM, P. AND ANDERSSON, K.-E. (2000) Cholinergic nerves in human corpus cavernosum and spongiosum contain nitric oxide synthase and heme oxygenase. *J. Urol.* 164: 868-875.
(46) DAIL, W.G.; BARBA, V.; LEYBA, L. AND GALINDO, R. (1995) Neural and endothelial nitric oxide synthase activity in rat penile erectile tissue. *Cell Tissue Res.* 282: 109-116.
(47) SIMONSEN, U., PRIETO, D., SÁENZ DE TEJADA I. AND GARCIA-SACRISTAN, A. (1995) Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neuro-

transmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K(+)-channels. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2582-2590.

(48) SIMONSEN, U.; PRIETO, D.; DELGADO, J.A.; HERNANDEZ, M.; RESEL, L.; SÁENZ DE TEJADA, I. AND GARCÍA-SACRISTÁN, A. Nitric oxide is involved in the inhibitory neurotransmission and endothelium-dependent relaxations of human small penile arteries. *Clin. Sci.* 92: 269-275.

(49) BURNETT, A.L.; NELSON, R.J.; CALVIN, D.C.; LIU, J.X.; DEMAS, G.E.; KLEIN, S.L.; KRIEGSFELD, L.J.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. AND SNYDER, S.H. (1996) Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol. Med.* 2: 288-296.

(50) BURNETT, A.L.; CHANG, A.G.; CRONE, J.K.; HUANG, P.L.; SEZEN, S.E. (2002) Non-cholinergic penile erection in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *J. Androl.* 23: 92-97.

(51) HURT, K.J.; SEZEN, S.F.; CHAMPION, H.C.; CRONE, J.K; PALESE, M.A.; HUANG, P.L.; SAWA, A.; LUO, X.; MUSICKI, B.; SNYDER, S.H. AND BURNETT, A.L. (2006) Alternatively spliced neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 3440-3443.

(52) MARTINEZ, A.C.; HERNANDEZ, M.; RIVERA, L.; RECIO, P.; GARCIA-SACRISTAN, A. AND BENEDITO, S. (2003) Muscarinic receptor subtypes mediate vasorelaxation in isolated horse deep dorsal penile vein. *Urology*. 62: 357-361.

(53) SIMONSEN, U.; TRIGUERO, D.; GARCÍA-SACRISTÁN, A. AND PRIETO, D. (1999) Cholinergic modulation of non-adrenergic non-cholinergic relaxation in isolated, small coronary arteries from lambs. *Pflügers Arch.- Eur. J. Physiol.* 438: 177-186.

(54) SIMONSEN, U.; CONTRERAS, J,; GARCIA-SACRISTAN, A, AND MARTINEZ, AC. (2001) Effect of sildenafil on non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in bovine penile small arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 412: 155-169.

(55) SIMONSEN, U.; PRIETO, D.; HERNÁNDEZ, M.; SAÉNZ DE TEJADA, I. AND GARCÍA-SACRISTÁN, A. (1997) Prejunctional alpha$_2$-adrenoceptors inhibit the non-adrenergic non-cholinergic neurogenic relaxations in horse penile resistance arteries. *J. Urol.* 157: 2356-2360.

(56) ESCRIG, A.; MARIN, R. AND MAS, M. (1999) Repeated PGE1 treatment enhances nitric oxide and erection responses to nerve stimulation in the rat penis by upregulating constitutive NOS isoforms. *J. Urol.* 162: 2205-2210.

(57) KIM, N.; VARDI, Y.; PADMA-NATHAN, H.; DALEY, J.; GOLDSTEIN, I. AND SAENZ DE TEJADA, I. (1993) Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. *J. Clin. Invest.* 91: 437-442.

(58) AZADZOI, K,M. (2006) Vasculogenic erectile dysfunction: beyond the haemodynamic changes. *B. J. U. Int.* 97: 11-16.

(59) RUIZ RUBIO, J.L.; HERNANDEZ, M.; RIVERA DE LOS ARCOS, L.; MARTINEZ, A.C.; GARCIA-SACRISTAN, A. AND PRIETO, D. (2004) Mechanisms of prostaglandin E1-induced relaxation in penile resistance arteries. *J. Urol.* 171: 968-973.

(60) RIVERA DE LOS ARCOS, L.R.; PRIETO, D.; MARTINEZ, A.C.; BENIEDITO, S.; HERNANDEZ, M. AND GARCIA-SACRISTAN, A. (2004) An in vitro method of studying functional responses of penile resistance arteries under isobaric conditions. *J. Urol.* 171: 1974-1978.

(61) ANGULO, J.; CUEVAS, P.; MONCADA, I.; MARTIN-MORALES, A.; ALLONA, A.; FERNANDEZ, A.; GABANCHO, S.; NEY, P. AND SAENZ DE TEJADA, I. (2000): Rationale for the combination of PGE(1) and S-nitroso-glutathione to induce relaxation of human penile smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295: 586-593.

(62) BUSSE, R. AND FLEMING, I. (2003) Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 24-29.

(63) MUSICKI, B. AND BURNETT, A.L. (2006) eNOS Function and Dysfunction in the penis. *Exp. Biol. Med.* 231: 154-165.

(64) ANGULO. J.; CUEVAS, P.; FERNANDEZ, A.; GABANCHO, S.; VIDELA, S. AND SAENZ DE TEJADA, I. (2003) Calcium dobesilate potentiates endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation of human penile resistance arteries. *Br. J. Pharmacol.* 139: 854-862.

(65) ANGULO, J.; CUEVAS, P.; FERNANDEZ, A.; GABANCHO, S.; ALLONA, A.; MARTIN-MORALES, A.; MONCADA, I.; VIDELA, S. AND SAENZ DE TEJADA, I. (2003) Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312: 1202-1208.

(66) VIRAG, R.; FLORESCO, J. AND RICHARD, G. (2004) Impairment of shear-stress-mediated vasodilation of cavernous arteries in erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 16: 39-42.

(67) HURT, K.J.; MUSICKI, B.; PALESE, M.A.; CRONE, J.K.; BECKER, R.E.; MORIARITY, J.L.; SNYDER, S.H. AND BURNETT, A.L. (2002) Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 4061-4066.

(68) DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE. R. AND ZEIHER, A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 399: 601-605.

(69) BIVALACQUA, T.J.; USTA, M.F.; CHAMPION, H.C.; KADOWITZ, P.J. AND HELLSTROM, W.J. (2003) Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. *J. Androl.* 24: S17-S37.

(70) BUSSE, R.; EDWARDS, G.; FELETOU, M.; FLEMING, I., VANHOUTTE, P.M. AND WESTON, A.H. (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol. Sci* 23: 374-380.

(71) KUN, A.; MARTINEZ, A.C.; TANKO, L.B.; PATARICZA, J.; PAPP, J.G. AND SIMONSEN, U. (2003) Ca^{2+}-activated K^+ channels in the endothelial cell layer involved in modulation of neurogenic contractions in rat penile arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 474: 103-115.

(72) HEDLUND, P.; ASZODI, A.; PFEIFER, A.; ALM, P.; HOFMANN, F.; AHMAD, M.; FASSLER, R. AND ANDERSSON, K.E. (2000) Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2349-2354.

(73) SCHLOSSMANN, J.; FIEL, R. AND HOFMANN, F. (2003) Signalling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann. Med.* 35: 21-27.

(74) CHRIST, G.J. (2002) K^+ channels as molecular targets for the treatment of erectile dysfunction. *J. Androl.* 23: S10-S9.

(75) PRIETO. D.; RIVERA, L.; BENEDITO, S.; RECIO, P.; VILLALBA, N.; HERNANDEZ, M. AND GARCIA-SACRISTAN, A. (2006) Ca2+-activated K+ (KCa) channels are involved in

the relaxations elicited by sildenafil in penile resistance arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 531: 232-237.

(76) SEFTEL, A.D. (2005) Phosphodiesterase type 5 inhibitors: molecular pharmacology and interactions with other phosphodiesterases. *Curr. Pharm. Des.* 11: 4047-4058.

(77) WALDKIRCH, E.; UCKERT, S.; YILDIRIM, H.; SOHN, M.; JONAS, U.; STIEF, C.G., ANDERSSON, K.-E. AND HEDLUND, P. (2005) Cyclic AMP-specific and cyclic GMP-specific phosphodiesterase isoenzymes in human cavernous arteries—immunohistochemical distribution and functional significance. *World. J. Urol* 23: 405-410.

(78) PRIETO, D.; RIVERA, L.; RECIO, P.; RUBIO, J.L.; HERNANDEZ, M. AND GARCIA-SACRISTAN, A. (2006) Role of nitric oxide in the relaxation elicited by sildenafil in penile resistance arteries. *J. Urol.* 175: 1164-1170.

(79) BALLARD, S.A.; GINGELL, C.J.; TANG, K.; TURNER, L.A.; PRICE, M.E. AND NAYLOR, A.M. (1998) Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J. Urol.* 159: 2164-2171.

(80) RUIZ RUBIO, J.L.; HERNANDEZ, M.; RIVERA DE LOS ARCOS, L.; BENEDITO, S.; RECIO, P.; GARCIA, P.; GARCIA-SACRISTAN, A. AND PRIETO, D. (2004) Role of ATP-sensitive K+ channels in relaxation of penile resistance arteries. *Urology* 63: 800-805.

(81) LEE, S.W.; WANG, H.Z.; ZHAO, W.; NEY, P:, BRINK, P.R. AND CHRIST, GJ. (1999) Prostaglandin E1 activates the large-conductance KCa channel in human corporal smooth muscle cells. *Int. J. Impot. Res.* 11: 189-199.

(82) SEO, K.K.; YUN, H.Y.; KIM, H. AND KIM, S.C. (1999) Involvement of endothelial nitric oxide synthase in the impaired endothelium-dependent relaxation of cavernous smooth muscle in hypercholesterolemic rabbit. *J. Androl.* 20: 298-306.

(83) BIVALACQUA, T.J.; CHAMPION, H.C.; USTA, M.F.; CELLEK, S.; CHITALEY, K.; WEBB, R.C.; LEWIS, R.L.; MILLS, T.M.; HELLSTROM, W.J. AND KADOWITZ, P. J. (2004) RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 9121-9126.

(84) BEHR-ROUSSEL, D.; GORNY, D.; MEVEL, K.; COMPAGNIE, S.; KERN, P.; SIVAN, V.; BERNABE, J.; BEDIGIAN, M.P.; ALEXANDRE, L. AND GIULIANO F. (2005) Erectile dysfunction: an early marker for hypertension? A longitudinal study in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R276-R283.

(85) MARTINEZ, A.C.; STANKEVICIUS, E.; JAKOBSEN, P. AND SIMONSEN, U. (2006) Blunted non-nitric oxide vasodilatory neurotransmission in penile arteries from renal hypertensive rats. *Vascul. Pharmacol.* 44: 354-62.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 987-1008

Revisión

Contribution of TNF-α to Obesity-Associated Insulin Resistance

Recibido el 25 de octubre de 2007

MARGARITA LORENZO*, SONIA FERNÁNDEZ-VELEDO, ROCÍO VILA-BÉDMAR, LUCÍA GARCÍA-GUERRA, CRISTINA DE ÁLVARO AND IRIA NIETO-VÁZQUEZ

Departamento de Bioquimica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain

ABSTRACT

Insulin resistance is an important contributor to the pathogenesis of type 2 diabetes, and obesity is a risk factor for its development, due in part to the fact that adipose tissue secretes proteins called adipokines, that may influence insulin sensitivity. Among these molecules, TNF-α has been proposed as a link between obesity and insulin resistance because TNF-α is overexpressed in adipose tissues of obese animals and humans, and obese mice lacking either TNF-α or its receptor show protection for developing insulin resistance. The direct exposure to TNF-α induced a state of insulin resistance on glucose uptake in myocytes and brown adipocytes, due to the activation of pro-inflammatory pathways that impair insulin-signaling at the level of the IRS proteins. In this regard the residue Ser307 in IRS-1 has been identified as a site for TNF-α-inhibitory effects in myotubes, with

* **Corresponding author:** Margarita Lorenzo. Tel: 34-913941858, Fax 34-:913941779, e-mail: mlorenzo@farm.ucm.es

Abbreviations: AMPK, AMP-activated protein kinase; **AS160,** AKT substrate of 160 kDa; **BAT,** brown adipose tissue; **ERK,** extracelullar-signal regulated kinase; **FFA,** free fatty acids; **GLUT4,** insulin-regulated glucose transporter; **HSL,** hormone sensitive lipase; **IGF,** insulin-like growth factor; **IKK,** inhibitor kB kinase; **IR,** insulin receptor; **IRS,** insulin receptor substrate; **JNK,** c-Jun N-terminal kinase; **LPL,** lipoprotein lipase; **LXR,** liver X receptor; **MAPK,** mitogen-activated protein kinase; **PI3K,** phosphatidylinositol 3-kinase; **PLC,** phospholipase C; **PP,** protein-phosphatase; **PPAR,** peroxisome proliferator activated receptor; **PTP,** protein-tyrosine phosphatase; **TNF,** tumor necrosis factor; **TZD,** thiazolidinediones; **UCP,** uncoupling-protein; **WAT,** white adipose tissue.

p38MAPK and IKK being involved in the phosphorylation of this residue. Conversely, serine phosphorylation of IRS-2 mediated by TNF-α activation of MAPKs was the mechanism found in brown adipocytes. The phosphatase PTP1B acts as a physiological negative regulator of insulin signaling by dephosphorylating the phosphotyrosine residues of the insulin receptor and IRS-1, and PTP1B expression is increased in muscle and white adipose tissue of obese and diabetic humans and rodents. Moreover, up-regulation of PTP1B expression was recently found in cells treated with TNF-α. Accordingly, myocytes and primary brown adipocytes deficient on PTP1B are protected against insulin resistance by this cytokine. Furthermore, down-regulation of PTP1B activity is also possible by the use of pharmacological agonists of nuclear receptors that restore insulin sensitivity in the presence of TNF-α. In conclusion, the lack of PTP1B in muscle and brown adipocytes increases insulin sensitivity and glucose uptake and could confer protection against insulin resistance induced by adipokines.

Key words: glucose uptake, LXR, PTP1B, p38MAPK, rosiglitazone.

RESUMEN

Contribución del TNF-α a la insulinorresistencia asociada a la obesidad

Entre las complicaciones asociadas a la Obesidad**,** tiene una especial relevancia el desarrollo de resistencia a la insulina, siendo el primer eslabón de una amplia patología conocida como diabetes tipo 2. La Obesidad se considera como un estado crónico de inflamación de baja intensidad, como indican los niveles circulantes elevados de moléculas proinflamatorias. Se ha propuesto al TNF-α como el nexo de unión entre adiposidad y desarrollo de resistencia a insulina ya que la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 son obesos y tienen aumentada la expresión de TNF-α en sus adipocitos, y los animales obesos deleccionados para la función del TNF-α o su receptor no desarrollan resistencia a insulina. Las citocinas proinflamatorias producidas por los adipocitos y/o macrófagos activan quinasas de estrés, proinflamatorias y factores de transcripción que actúan sobre los tejidos periféricos (entre ellos el músculo, así como el propio tejido adiposo) produciendo resistencia a la acción de la insulina, que es un defecto en la señalización a varios niveles. En concreto, el TNF-α activa la quinasa p38MAPK que fosforila en residuos de serina a los IRSs, bloqueando su fosforilación en tirosina en respuesta a la insulina, tanto en adipocitos marrones como en miocitos. Muy recientemente hemos observado que la fosfatasa PTP1B también está implicada en la resistencia a insulina por TNF-α en ambos modelos. En la Clínica se está utilizando actualmente el tratamiento con tiazolidindionas en pacientes con diabetes tipo 2. Otros agonistas de receptores nucleares empiezan a aparecer en la bibliografía como potenciales sensibilizadores a acción de la insulina, entre ellos el LXR, que puede antagonizar la señalización proinflamatoria tanto en los propios adipocitos como en el músculo.

Palabras clave: transporte de glucosa, LXR, PTP1B, p38MAPK, rosiglitazona.

INTRODUCTION

Insulin exerts a dominant role in regulating glucose homeostasis though orchestrated effects on promotion of glucose uptake in peripheral tissues such as muscle and fat, and suppressing hepatic glucose uptake. Insulin initiates the biological effects in target cells by binding to, and activating endogenous tyrosine kinase receptors. Insulin receptors (IR) are believed to transduce signals by phosphorylation on tyrosine residues of several cellular substrates including insulin receptor substrate (IRS) proteins 1,2,3 and 4 (1). A number of signalling pathways can be activated downstream of IRS proteins. Molecules containing Src homology 2 domain, including the regulatory subunits of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Grb-2 and others, are recruited to the tyrosine phosphorylated IRSs and transmit a cascade of signals, which consists in two major elements, i.e., Ras/Raf/ extracelullar-signal regulated kinase (ERK) and PI3K/ AKT/p70S6 kinase pathways. A parallel mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38MAPK, has been shown to be stimulated by insulin in several cell systems including skeletal muscle (2). On the other had, the insulin signaling cascade is negatively regulated by protein phosphatases, including tyrosine-, serine- and lipid-phosphatases. Most notably, protein-tyrosine phosphatase (PTP)1B acts dephosphorylating the phosphotyrosine residues of the IR and IRS-1 (Figure 1).

Both muscle and fat are target tissues for insulin action. In skeletal muscle insulin and insulin-like growth factors (IGF)s control differentiation and regeneration of the tissue. The signaling pathways that accompany the formation of myotubes in C2C12 cells involved sequential activation of PI3K, AKT, P70S6 kinase and p38MAPK cascade in parallel to the induction of muscle-specific proteins, with a concomitant inhibition of ERK (3). Adipose tissues, including the most abundant white adipose tissue (WAT) and the thermogenic one (BAT) are also under insulin control. In fetal brown adipocytes insulin and IGF-I, acting independently and thought the activation of the IRS-PI3K signaling pathway, up-regulated the expression of adipogenic-related genes at the transcriptional level, as reviewed (4). In addition to adipogenesis, insulin/IGF-I are thermogenic factors through the ability to increase the uncoupling-protein (UCP)-1 gene

transcription rate by a mechanism dependent on activation of PI3K and p21ras signalling cascades (4).

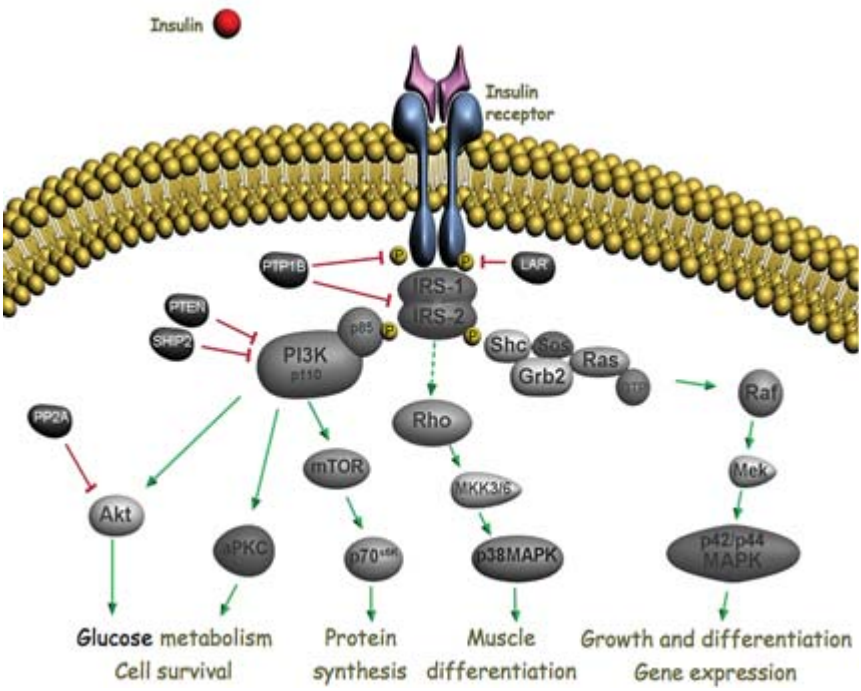


FIGURE 1. ***A complex insulin intracellular signaling cascade controls the pleoitropic effects of this hormone.***

Glucose transport is the main metabolic aspect regulated by insulin in peripheral tissues and is maintained mainly by the activity of the insulin-regulated glucose transporter (GLUT)4, although the ubiquitous GLUT1 glucose transporter is often expressed at appreciable levels. The mechanisms by which insulin could modulate GLUT4 function contributing to increase glucose uptake included translocation of pre-existing intracellular retained populations of GLUT4 proteins to the cell surface and up-regulation of the amount of GLUT4 protein. It is well established the participation of PI3K and its downstream of targets, AKT and the atypical PKC isoforms z and l? in insulin-induced GLUT4 redistribution to the plasma membrane in adipocytes and myocytes (5, 6). The expression of GLUT4 is subjected to tissue-specific, hormonal and metabolic

regulation and, in states of relative insulin deficiency such as streptozotocin-induced diabetes and chronic fasting GLUT4 gene expression is down-regulated, a situation that is reversed by insulin treatment and refeeding (7). However, studies in cells failed to establish a stimulatory role of insulin on GLUT4 expression, suggesting that additional factors could be involved in this tissue. In this regard, dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, has been shown to increase GLUT4 mRNA expression in myocytes, white adipocytes and brown adipocytes, in these cells acting as a co-regulator with insulin (8). This review is focused on examining alterations on insulin action in states of insulin resistance associated with obesity.

OBESITY, INFLAMATION AND INSULIN RESISTANCE

Type 2 diabetes mellitus is a complex metabolic disease with an environmental and genetic component affecting over 5% of the population in Western societies. This disease represents the final stage of long existing metabolic disturbances with deleterious effects on the vascular system, tissues and organs. Insulin resistance, defined as a diminished ability of the cell to respond to the action of insulin, is the most important pathophysiological feature in many prediabetic states and, is the first detectable defect in type 2 diabetes. The pathogenesis of type 2 diabetes involves abnormalities in both insulin action and secretion. Insulin resistance is usually compensated by hyperinsulinemia. Although moderate hyperinsulinemia might be tolerated in the short term, chronic hyperinsulinemia exacerbates insulin resistance and contributes directly to beta-cell failure and diabetes (1). At the molecular level, insulin resistance correlates with impaired insulin signalling in peripheral tissues (Figure 2). Insulin resistance in adipose tissues leads to an increase of lipolysis, with subsequent release of glycerol and free fatty acids (FFA) into the circulation. It is widely accepted that increased availability and utilization of FFA contribute to the development of skeletal muscle insulin resistance, as well as to increased hepatic glucose production (1). Both genetic and environmental factors can contribute to develop insulin resistance and in the second group, obesity has been proposed as an important contributor.

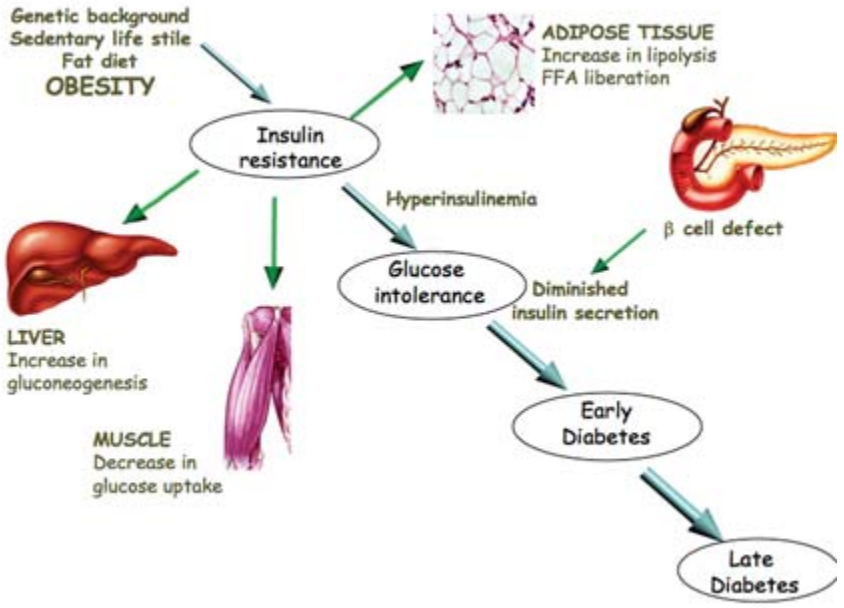


FIGURE 2. ***The different steps in the development of type 2 diabetes.***

Obesity is a risk factor to develop type 2 diabetes, due in part to the fact that adipose tissue secretes proteins named adipokines that may influence insulin sensitivity. Adipose tissue, in particular the visceral compartment, is now recognized as the primary contributor to the insulin resistance syndrome. Several factors secreted from adipose tissue, including cytokines, chemokines and FFA, can impair insulin signaling altering insulin-mediated processes, including glucose homeostasis and lipid metabolism (9). Accordingly, obesity is being considered a chronic state of low intensity inflammation. On the other hand, recent studies reveal that obesity is also associated with an increase in adipose tissue infiltration of macrophages, which contribute to the inflammatory process through the additional secretion of cytokines (10). The mechanisms by which WAT recruits and maintains macrophages could involve expression of monocyte chemoattractan proteins and intercellular adhesion molecule-1, as has been recently described (11). Tumor necrosis factor (TNF)-α. has been proposed as a link between adiposity and

the development of insulin resistance because the majority of type 2 diabetic subjects are obese; TNF-α is highly expressed in adipose tissues from obese subjects and obese mice lacking either TNF-α or its receptors showed protection for developing insulin resistance (12). Rather than systemically, TNF-a seems to acts locally at the site of WAT through autocrine/paracrine mechanisms having effects on insulin resistance and inducing interleukin-6 (9).

On the other hand, TNF-α has lypolitic and anti-adipogenic effects on WAT (9). This paradox could be due to proliferative and anti-apoptotic effects of this cytokine in the obese adipocyte, and could be mediated by the differential expression of its soluble and membrane-anchored receptors. Both ceramides and FFA had been reported to induce insulin resistance in peripheral tissues and the production of these molecules could be consequence of activation of sphingomyelinase or lipolysis by TNF-α (9). Several other mediators that are activated in response to TNF-α such as stress kinases and inflammatory pathways could also contribute to insulin resi. In this regard, an increased phosphorylation of p38MAPK in human adipocytes and muscle from type 2 diabetic subjects has been described (13).

Direct exposure of isolated cells to TNF-α inhibits insulin signalling and induces a state of insulin resistance in several systems including 3T3-L1 cells and human primary adipocytes by affecting IRS proteins (12). The mechanism of IRSs regulation involves proteasome-mediated degradation, phosphatase-mediated dephosphorylation and serine phosphorylation of IRS-1 that converts IRS-1 in an inhibitor of the IR tyrosine kinase activity, as reviewed (1, 14). Both ERK and c-Jun N-terminal kinase (JNK) have been proposed to mediate TNF-α serine/threonine phosphorylation of IRS-1 in white adipocytes, being identified the residue Ser307 as a site for TNF-α phosphorylation of IRS-1. In this regard, ablation of *jnk*1 decreases the development of insulin resistance associated with dietary obesity. Furthermore, ERK and p38MAPKs could also inhibit insulin signaling by TNF-α at the level of IRS-1 and IRS-2 in 3T3-L1 adipocytes, whereas JNK could mediate the feedback inhibitory effect of insulin (1, 14). Others works also implicate inhibitor kB kinases (IKK) activation by TNF-α on serine phosphorylation of IRS-1, meanwhile IKK inhibition with salicylate or targeted disruption of

*ikk*b?? reversed obesity and diet-induced insulin resistance (15). Our group has explored in deep the mechanism by which TNF-α produces insulin resistance on glucose uptake in two physiological models: murine neonatal myocytes and fetal brown adipocytes.

INSULIN RESISTANCE BY TNF-α IN MYOCYTES: AMELIORATION BY TREATMENT WITH SALICYLATE

Skeletal muscle is responsible for 80% of the glucose disposal of the body and is the organ where insulin resistance is first detectable. Acute insulin treatment stimulates glucose transport in myocytes largely by mediating translocation of GLUT4 to the plasma membrane, being accomplished by activation of PI3K, AKT and several PKC isoforms including ζ, λ, α and δ (16, 17). Moreover, skeletal muscle has an insulin-independent mechanism to increase glucose transport that involves the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by stimuli such as exercise, hypoxia or ischemia (18). The AKT substrate of 160 kDa (AS160) has recently emerged as a point of convergence for both effectors of glucose transport and seems to modulate GLUT4 trafficking (18). While GLUT4 protein content is normal in muscle from subjects with type 2 diabetes, the capacity of insulin to stimulate translocation of GLUT4 to plasma membrane is impaired. In contrast to the effect of insulin, contraction-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in diabetic patients is normal, providing evidence that exercise might be able to bypass defects in insulin signaling.

Both genetic and environmental factors have been identified to contribute to insulin resistance in skeletal muscle. The genetic approach shows that targeted disruption of the *igf-1* and *ir,* or of *glut4*, selectively, in murine skeletal muscle causes insulin resistance and insulin intolerance (19-21). Furthermore, IRS-1 is the key mediator of insulin action in muscle since IRS-1-deficient mice show insulin resistance in muscle. In this regard, IRS-1 silencing using small interfering RNA caused a marked reduction in insulin-inducing acting remodeling and GLUT4 translocation, but silencing IRS-2 was without effect (22). Among the environmental factors, adipokines secreted by adipocytes and/or macrophages in the obese state are

main candidates. In this regard, TNF-α blocks skeletal muscle differentiation causes sarcopenia and produces insulin resistance in skeletal muscle of healthy humans and in primary cultures of mouse skeletal muscle (23). Although ceramide and FFA have been reported to produce insulin resistance in skeletal muscle, a direct effect of TNF-α in this tissue has been the matter of controversia. Several reports did not detect TNF-α inhibitory action on insulin-induced glucose uptake, although TNF-α *per se* highly increased basal glucose uptake. However, others observed an inhibitory effect on insulin action without modifying basal glucose uptake in muscle cells. Moreover, in most of these studies insulin stimulation of glucose uptake was very poor because virtually all cultured skeletal muscle cell lines, including L6 and C2C12 myotubes, have been found to be deficient in GLUT4 expression.

Consequently, in our laboratory we developed primary cultures of neonatal rat skeletal muscle that represented a suitable system for investigating the molecular basis of TNF-α-induced insulin resistance. When these cells were differentiated in low serum until the formation of myotubes and maintained in low glucose medium to mimick the physiological environment, responded to acute insulin stimulation by increasing glucose uptake and GLUT4 translocation to plasma membrane (24). Chronic exposure to TNF-α impaired both insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation, without affecting the content of GLUT4 protein or the state of differentiation of the myotubes (24), in agreement with the effect produced in muscle *in vivo*. The molecular mechanism underlying TNF-α-mediated insulin resistance could involve activation of stress kinases and proinflamatory pathways, as was observed in neonatal myotubes (24). Acute insulin stimulation also produced a transient phosphorylation of p38MAPK (3), but insulin activated the isoform a meanwhile TNF-α activates the b. When chemical inhibitors were used to evaluate the contribution of sustained activation of stress kinases by TNF-α to insulin resistance, only the inhibition of p38MAPK completely restores insulin-stimulated glucose uptake and insulin signaling (24). In this regard, adenovirus-mediated transfections of constitutively active MKK6/3 mutants in L6 myotubes have been reported to diminish glucose transport induced by insulin via down-regulation of GLUT4 gene expression (25).

Furthermore, the residue Ser307 of IRS-1 seems to be one of the residues phosphorylated by TNF-α via p38MAPK, although other residues in either IRS-1 or IRS-2 or IR can not be discarding. The role of p38MAPK in inflamatory diseases, including obesity and cardiovascular dysfunction, is well recognized since this kinase regulated the biosynthesis of pro-inflamatory cytokines as well as is involved in the signaling transduction pathways activated by cytokines, as elegantly reviewed (2).

Several reports have also implicated IKK activation by TNF-α on serine phosphorylation of IRS-1, and aspirin rescues insulin-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes treated with TNF-α (15, 26). In this regard, activation of IKK dependent on the functionality of p38MAPK was observed during chronic treatment with TNF-α in neonatal myotubes. Moreover, inhibition of IKK activation with salicylate completely restores insulin signaling to normal levels, despite the presence of TNF-α (24) but salicylate does not affect p38MAPK activation by TNF-α. Then, IKK could act downstream of p38MAPK and could mediate TNF-α-induced insulin resistance on skeletal muscle, as summarized in Figure 3.

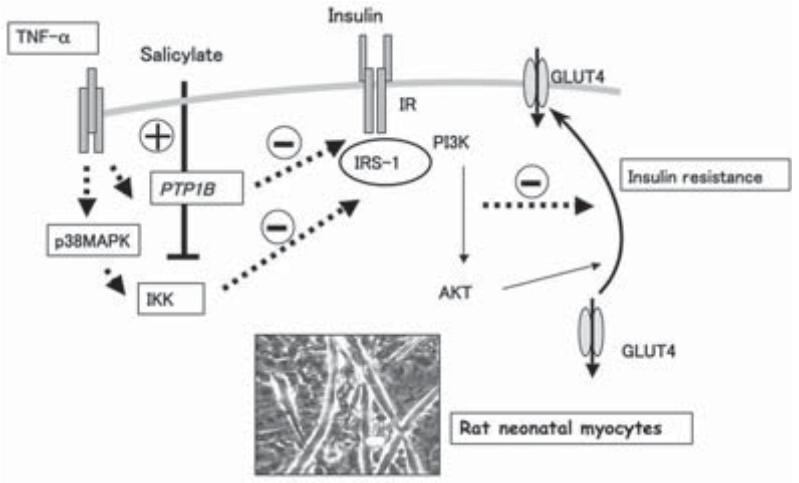


FIGURE 3.- ***Treatment with TNF-α impairs insulin-stimulated glucose uptake in myocytes at the level of the IRS-1 by a double mechanism*** *that involves 1) serine phosphorylation by IKK and p38MAPK and 2) tyrosine dephosphorylation by the phosphatase PTP1B. Inhibition of IKK activation with salicylate, and ablation of PTP1B restores insulin sensitivity in the presence of the cytokine.*

LACK OF PTP1B CONFERS PROTECTION AGAINST TNF-α-INDUCED INSULIN RESISTANCE IN SKELETAL MUSCLE

In pathological insulin-resistant states such as obesity, PTP1B expression and activity are increased in muscle and WAT of humans and rodents (27). Moreover, noncoding polymorphisms in the *PTP1B* gene have been found in different populations, displaying increased phosphatase muscle expression and being associated with insulin resistance (28). In this regard, transgenic overexpression of *ptp1b* in muscle causes insulin resistance, showing impaired insulin signaling and decreased glucose uptake in this tissue (29). By contrast, mice lacking PTP1B exhibit increased insulin sensitivity at 12 wk of age (attributable to enhanced phosphorylation of IR in liver and skeletal muscle), resistance to weight gain on a high-fat diet, and an increased basal metabolic rate (30, 31). The PTP1B-deficient mice had circulating insulin concentrations that were about half those of control animals. Thus, these mice appeared to be more insulin sensitive, because they maintained lower glucose concentration with significantly reduced amounts of insulin. In the fasted state, there were no significant differences in concentrations of glucose or insulin (30). Furthermore, PTP1B-deficiency also reduces the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance (32). Moreover, treatment with PTP1B antisense oligonucleotide improves insulin sensitivity in db/db mice and increases insulin signaling in WAT and liver in *ob*/*ob* mice (33).

The fact that primary neonatal myotubes developed in our laboratory have provided a unique tool for *in vitro* study of insulin sensitivity (24), prompted us to generate immortalized myocytes from wild-type and PTP1B-deficient neonates. Cell lines lacking PTP1B display enhanced insulin sensitivity in IR autophosphorylation and downstream signaling, including IRS-1 and IRS-2 tyrosine phosphorylation, PI3K associated activation and AKT serine/threonine phosphorylation. The phosphorylation was detected at lower insulin doses and at shorter times in PTP1B-deficient cells than in wild-type cells (34). Because activation of PI3K and AKT controls glucose transport, we detect an increased insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation to plasma membrane in $PTP1B^{-/-}$ cells versus wild-type cells (34). This result was not

unexpected since a decreased glucose uptake in skeletal muscle was observed when PTP1B was overexpressed selectively in muscle in transgenic mice (29). Moreover, recent data indicate that muscle-specific PTP1B-/- mice exhibed improved systemic insulin sensitivity and enhanced glucose tolerance under high-fat diet (35).

Given that TNF-α is a strong candidate to produce insulin resistance in skeletal muscle for the reasons mentioned above, the lack of PTP1B might confer protection against TNF-α-induced insulin resistance. In this regard, chronic exposure to TNF-α does not induce insulin resistance either on glucose uptake or on insulin signaling in PTP1B-deficient myocytes (34). Moreover, $PTP1B^{-/-}$ mice showed complete protection against TNF-α-induced insulin resistance during the glucose and insulin tolerance tests (34). Accordingly, the lack of PTP1B expression confers protection against TNF-α-induced insulin resistance in skeletal muscle either *in vitro* or *in vivo*. However, PTP1B ablation in mice not only affects insulin sensitivity in muscle and liver, but also beta cell function, which might be contributing to this protective effect.

We have explored whether this protection against the deleterious effect of TNF-α was the molecular consequence of enhanced insulin signaling provoked by PTP1B deficiency or was produced by direct abolition of some effects of TNF-α. In this regard, treatment with TNF-α significantly enhanced PTP1B protein expression and activity either in neonatal myocytes or in adult mice, meanwhile the expression of other phosphatases such as PTEN, SH-PTP2 and protein-phosphatase (PP)2A were not affected (34). In consequence, the genetic ablation of PTP1B avoids this action of TNF-α and assures complete protection against insulin resistance by this cytokine. Therefore, at least part of the effects elicited by TNF-α on pathways involving reversible tyrosine phosphorylation may be exerted through the dynamic modulation of PTP1B expression.

Accordingly, TNF-α impairs insulin action in myocytes at the level of IRS-1 by a double mechanism that involves 1) serine phosphorylation by IKK and p38MAPK at the residue Ser307 and 2) tyrosine dephosphorylation by PTP1B. Therefore, inhibition of IKK activation with salicylate and ablation of PTP1B restores insulin sensitivity in myocytes in the presence of the cytokine, as

summarized in Figure 3. In this regard, new mono- and disalicylic acid derivates have been very recently used as PTP1B inhibitors and potential anti-obesity drugs (36).

INVOLVEMENT OF MAPK AND PHOSPHATASES IN THE DEVELOPMENT OF INSULIN RESISTANCE BY TNF-α IN BROWN ADIPOCYTES

BAT is present and active in mammal newborns and is responsible for their successful defense of body temperature without shivering. When BAT is not adrenergically stimulated, brown adipocytes suffer apoptosis or transform into white adipocyte-like cells that gradually loose many brown characteristics. This phenomenon is particularly noticeable in adult humans, in which BAT is thought to be rapidly lost postnatally, so that humans later in life do not possess more than vestigial amounts of this tissue, located within the white fat depots (37). However, the use of fluorodeoxyglucose positron emission tomography has revealed the presence of symmetrical areas of increased tracer uptake in the upper parts of the human body, which correspond to brown adipose tissue. The human depots are differently located from those in rodents, mainly in the supraclavicular and the neck regions, but no interscapular (38). These findings point out that BAT is present and active in a substantial fraction of adult humans and that may thus be considered of metabolic significance in human physiology.

Glucose transport in brown adipocytes is maintained mainly by the activity of GLUT4, and insulin treatment stimulates glucose transport by mediating GLUT4 translocation in a PI3K-, AKT- and PKCζ-dependent manner (39, 40). Furthermore, inhibition of phospholipase C (PLC)γ activity precludes insulin stimulation of glucose uptake, GLUT4 translocation and actin reorganization, indicating that PLCγ, through the production of phosphatidic acid, is a link between IR and PKCζ (40). In addition, IRS-2 seems to be crucial in mediating glucose uptake in brown adipocytes (41).

TNF-α acts as a negative regulator of adipogenic and thermogenic differentiation and induces insulin resistance in BAT (4), in a similar fashion as reported in 3T3-L1 cells and in primary human adipocytes.

Moreover, TNF-α-induced insulin resistance on glucose uptake in brown adipocytes seems to be due to the hypophosphorylation of the IR and IRS-2 in response to insulin, resulting in an impairment of IRS-2-associated PI3K activity (41). As a further step, we have identified ceramide production as one of the mediators of insulin-resistance by TNF-α and exogenously added C2-ceramide inhibited AKT activity throughout a ceramide-activated phosphatase (41). Furthermore, *de novo* ceramide generation produced by chronic treatment with TNF-α induces insulin resistance on GLUT4 gene expression in brown adipocytes by interfering C/EBPα acumulation (42). Moreover, stress kinases activated in response to TNF-α, meanly ERK and p38MAPKs also contribute to insulin resistance in brown adipocyte primary cultures (43).

Recently, a significant enhancement of PTP1B mRNA, protein and activity was observed in brown adipocytes treated with TNF-⟨ (44). As expected, the lack of PTP1B these cells confered protection against TNF-α-induced insulin resistance on glucose uptake and insulin signalling (44). Therefore, modulation of genes such as PTP1B might contribute to the pathogenesis of TNF-⟨-induced insulin resistance in murine brown adipocytes.

Accordingly, a complex mechanism impairs the normal response to insulin on GLUT4 translocation in brown adipocytes in the presence of TNF-α including 1) potential serine/treonine phosphorylation of IRS-2 by MAPKs, weakening the tyrosine phosphorylation induced by insulin, 2) generation of ceramide and activation of PP2A maintaining AKT in an inactive dephosphorylated state and 3) modulation of PTP1B protein expression and activity, as summarized in Figure 4.

PPARγ AND LXR AGONISTS AMELIORATE TNF-α-INDUCED INSULIN RESISTANCE IN BROWN ADIPOCYTES

Nuclear receptors, such as retinoic acid receptor, peroxisome proliferator activated receptors (PPAR), and liver X receptor (LXR), comprise a superfamily of related proteins, which act as transcription factors to activate expression of target genes in response to binding of ligands. Thiazolidinediones (TZD), such as pioglitazone and

rosiglitazone, are agonists for PPARγ that display insulin-sensitizing actions across a wide spectrum of insulin-resistant states, and have recently been introduced as therapeutic agents for the treatment of type 2 diabetes (45). Moreover, PPARγ plays a critical role in the adipogenic differentiation process since its deletion in WAT resulted in marked adipocyte hypocellularity and hypertrophy, elevated levels of FFA and decreased levels of plasma leptin (46). These mice showed insulin resistance and were more susceptible to high fat diet-induced liver steatosis. Thus, TZD may exert effects on adipogenesis and gene expression, such as formation of new, small, and insulin sensitive fat cells, reduced production of TNF- and/or increased expression of adiponectin in WAT (45). Moreover, TZD up-regulated lipoprotein lipase (LPL) and hormone sensitive lipase (HSL) gene expression and increased insulin responsiveness on lipolysis and lipogenesis in human subcutaneous adipocytes, consistent with the weight gain observed during the treatment (46). Nevertheless, the

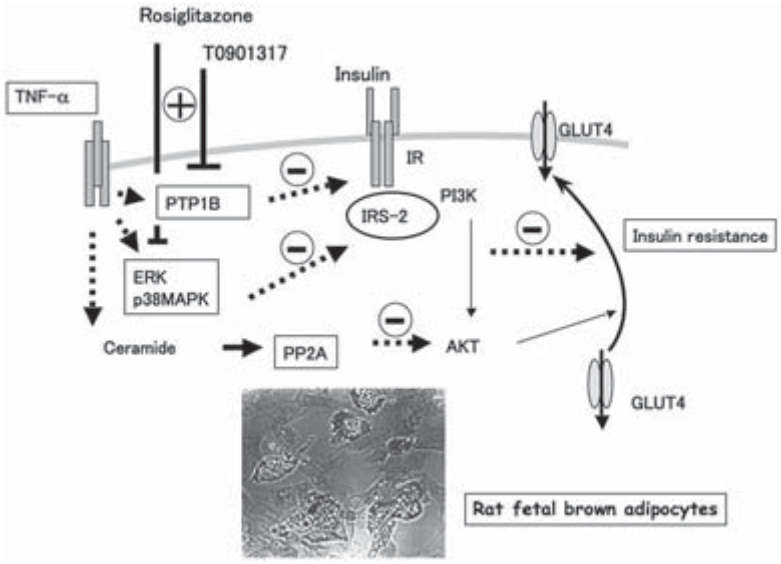


FIGURE 4. ***Insulin resistance by TNF-α in brown adipocytes*** *involves 1) serine/treonine phosphorylation of the IRS-2 by ERK and p38MAPK; 2) generation of ceramide and activation of the phosphatase PP2A, and 3) modulation of PTP1B activity. Inhibition of ERK and p38MAPK activation with rosiglitazone, and down-regulation of PTP1B with either rosiglitazone or T0901317? ameliorates TNF-α-induced insulin resistance.*

mechanisms employed for TZD to increase insulin sensitivity are still unclear. Rosiglitazone reduced FFA circulating levels and potentiated insulin-stimulated AKT phosphorylation in WAT and muscle from Zucker obese rats (46). Moreover, other evidence favors TZD effects on glucose uptake by modulating changes at the level of the expression of IRS-2, p85-PI3K, GLUT4 or GLUT1 either in white adipocyte or muscle cells (46). However, several limitations with this therapy, such as increased adiposity, secondary insulin resistance in WAT, and pro- and anti-atherogenic effects, are currently emerging.

LXRα is expressed predominantly in liver, WAT, and macrophages, and is activated by naturally produced oxysterols, as well as by synthetic compounds such as T0901317 and GW3965 (47). Although LXR function has been elucidated in detail with respect to cholesterol and lipid metabolism, new findings have emerged LXR as important regulators of glucose metabolism (47). Recent studies have reported low plasma glucose, improved glucose tolerance and increased glucose-induced insulin secretion by islets in genetic and dietary models of type 2 diabetes treated with synthetic LXR agonists. Several evidences suggest that LXR activity may be important in WAT because these nuclear receptors are abundant in subcutaneous fat preferentially (47), LXR expression is regulated by the key adipocyte transcription factor PPARγ and many LXR target genes are also highly expressed in adipocytes. Moreover, ligand activation of LXR regulates the expression of GLUT4 either *in vivo* as well as in murine and human adipocytes, through direct interaction with a conserved LXR response element in the GLUT4 promoter. In addition, the ability of LXR ligands to regulate GLUT4 expression was abolished in mice lacking LXRs.

BAT is also a target tissue for nuclear receptors agonists since highly expressed PPARγ, LXRα, and LXRβ (47). In this regard, the PPARγ agonist rosiglitazone up-regulates the expression of LPL, HSL and UCP-1 in brown adipocytes (48) as well as produces insulin sensitization by increasing the expression of IR and its tyrosine kinase activity (49). The effectiveness of rosiglitazone to treat TNF-α-induced insulin resistance in these cells was due to the fact that this TZD impaired the activation of p38MAPK and ERK produced by TNF-α, and restored the insulin signaling cascade leading to normalization of insulin-induced glucose uptake (43). Furthermore,

rosiglitazone decreased the activity of PTP1B (49), and improved insulin sensitivity concomitant with an increase in thermogenic differentiation, contributing globally to an accelerated glucose disposal in BAT. Moreover, recent studies have demonstrated increased levels and activities of PTP1B in skeletal muscle and liver of diabetic rats whereas rosiglitazone treatment decreases this enlargement in muscle but not in liver (50). On the other hand, synthetic LXR agonists ameliorate TNF-α–induced insulin resistance in fetal brown adipocytes restoring completely insulin-stimulated GLUT4 translocation to plasma membrane. This effect was parallel to the recovering of insulin signalling cascade IR/IRS-2/PI3K/AKT, and could be due to the fact that T0901317 precludes the enlargement in PTP1B expression produced by TNF-α (44), supporting the hypothesis of nuclear receptors LXR are interesting targets for drug treatment of insulin-resistant conditions.

Therefore, inhibition of ERK and p38MAPK activation with rosiglitazone and down-regulation of PTP1B with either rosiglitazone or LXR agonists restores insulin sensitivity in brown adipocytes in the presence of TNF-, as summarized in Figure 4.

CONCLUSIONS

The mechanism by which TNF-α produces insulin resistance in murine skeletal muscle and in BAT shows tissue specificity. TNF-α impairs insulin-stimulated glucose uptake in myocytes at the level of IRS-1 by a double machinery that involves serine phosphorylation at the residue Ser307 (by IKK and p38MAPK) and tyrosine dephosphorylation (by PTP1B), weakening the tyrosine phosphorylation induced by insulin. Consequently, pharmacological inhibition of IKK with salicylate and ablation of PTP1B restores insulin sensitivity in the presence of the cytokine.

In brown adipocytes, TNF-α-induced insulin resistance involves serine/threonine phosphorylation of IRS-2 by MAPKs, and activation of the phosphatases PP2A and PTP1B that inactivate AKT and IR/IRS, respectively. Pharmacological inhibition of MAPKs and phosphatases with rosiglitazone and LXR agonists, respectively, recovers insulin sensitivity in the presence of TNF-α.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants: BFU-2005-03054 from Ministerio de Educacion y Ciencia (MEC), Spain; S-SAL-0159-2006 from Comunidad de Madrid; Santander-UCM-06. We also acknowledge the support of European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research (COST) Action BM0602 from the European Commission, RETICS RD06-0015-0009 and CIBERDEM CB07-08-0007 from Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

BIBLIOGRAPHY

(1) WHITE, M. F. (2003) Insulin signaling in health and disease. *Science*. 302: 1710-1711.
(2) CUENDA, A. AND ROUSSEAU, S. (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1773: 1358-1375.
(3) CONEJO, R.; DE ALVARO, C.; BENITO, M.; CUADRADO, A. AND LORENZO, M. (2002) Insulin restores differentiation of Ras-transformed C2C12 myoblasts by inducing NF-kappaB through an AKT/P70S6K/p38-MAPK pathway. *Oncogene*. 21: 3739-3753.
(4) VALVERDE, A. M.; BENITO, M. AND LORENZO, M. (2005) The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta Physiol. Scand*. 183: 59-73.
(5) CHO, H.; MU, J.; KIM, J. K.; THORVALDSEN, J. L.; CHU, Q.; CRENSHAW, E. B.; KAESTNER, K. H.; BARTOLOMEI, M. S.; SHULMAN, G. I. AND BIRNBAUM, M. J. (2001) Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*. 292: 1728-1731.
(6) BANDYOPADHYAY, G.; STANDAERT, M. L.; SAJAN, M. P.; KARNITZ, L. M.; CONG, L.; QUON, M. J. AND FARESE, R. V. (1999) Dependence of insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and its target threonine-410 in the activation loop of protein kinase C-zeta. *Mol. Endocrinol*. 13: 1766-1772.
(7) SIVITZ, W. I.; DESAUTEL, S. L.; KAYANO, T.; BELL, G. I. AND PESSIN, J. E. (1989) Regulation of glucose transporter messenger RNA in insulin-deficient states. *Nature*. 340: 72-74.
(8) HERNANDEZ, R.; TERUEL, T. AND LORENZO, M. (2003) Insulin and dexamethasone induce GLUT4 gene expression in foetal brown adipocytes: synergistic effect through CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *Biochem. J*. 372: 617-624.
(9) ARNER, P. (2003) The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol. Metab* 14: 137-145.
(10) LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L. AND SALTIEL, A. R. (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest* 117: 175-184.

(11) WEISBERG, S. P.; HUNTER, D.; HUBER, R.; LEMIEUX, J.; SLAYMAKER, S.; VADDI, K.; CHARO, I.; LEIBEL, R. L. AND FERRANTE, A. W., JR. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* 116: 115-124.
(12) HOTAMISLIGIL, G. S. (2003) Inflammatory pathways and insulin action. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27 Suppl 3: S53-S55.
(13) CARLSON, C. J.; KOTERSKI, S.; SCIOTTI, R. J.; POCCARD, G. B. AND RONDINONE, C. M. (2003) Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes.* 52. 634-641.
(14) PIROLA, L.; JOHNSTON, A. M. AND VAN OBBERGHEN, E. (2004) Modulation of insulin action. *Diabetologia.* 47: 170-184.
(15) GAO, Z.; ZUBERI, A.; QUON, M. J.; DONG, Z. AND YE, J. (2003) Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J. Biol. Chem.* 278: 24944-24950.
(16) KHAN, A. H. AND PESSIN, J. E. (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia.* 45. 1475-1483.
(17) VOLLENWEIDER, P.; MENARD, B. AND NICOD, P. (2002) Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase activation, and impaired atypical protein kinase C (zeta/lambda) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes.* 51: 1052-1059.
(18) FUJII, N.; JESSEN, N. AND GOODYEAR, L. J. (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291: E867-E877.
(19) BRUNING, J. C.; MICHAEL, M. D.; WINNAY, J. N.; HAYASHI, T.; HORSCH, D.; ACCILI, D.; GOODYEAR, L. J. AND KAHN, C. R. (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell.* 2: 559-569.
(20) FERNANDEZ, A. M.; KIM, J. K.; YAKAR, S.; DUPONT, J.; HERNANDEZ-SANCHEZ, C.; CASTLE, A. L.; FILMORE, J.; SHULMAN, G. I. AND LE ROITH, D. (2001) Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev.* 1926-1934.
(21) ZISMAN, A.; PERONI, O. D.; ABEL, E. D.; MICHAEL, M. D.; MAUVAIS-JARVIS, F.; LOWELL, B. B.; WOJTASZEWSKI, J. F.; HIRSHMAN, M. F.; VIRKAMAKI, A.; GOODYEAR, L. J.; KAHN, C. R. AND KAHN, B. B. (2000) Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat. Med.* 6: 924-928.
(22) HUANG, C.; THIRONE, A. C.; HUANG, X. AND KLIP, A. (2005) Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in l6 myotubes. *J. Biol. Chem.* 280: 19426-19435.
(23) PLOMGAARD, P.; BOUZAKRI, K.; KROGH-MADSEN, R.; MITTENDORFER, B.; ZIERATH, J. R. AND PEDERSEN, B. K. (2005) Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal

muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes*. 54: 2939-2945.

(24) DE ALVARO, C.; TERUEL, T.; HERNANDEZ, R. AND LORENZO, M. (2004) Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 279: 17070-17078.

(25) FUJISHIRO, M.; GOTOH, Y.; KATAGIRI, H.; SAKODA, H.; OGIHARA, T.; ANAI, M.; ONISHI, Y.; ONO, H.; ABE, M.; SHOJIMA, N.; FUKUSHIMA, Y.; KIKUCHI, M.; OKA, Y. AND ASANO, T. (2003) Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 17: 487-497.

(26) YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J.; HANSEN, L.; LI, Z. W.; KARIN, M. AND SHOELSON, S. E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 293: 1673-1677.

(27) AHMAD, F.; AZEVEDO, J. L.; CORTRIGHT, R.; DOHM, G. L. AND GOLDSTEIN, B. J. (1997) Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J. Clin. Invest* 100: 449-45.

(28) BENTO, J. L.; PALMER, N. D.; MYCHALECKYJ, J. C.; LANGE, L. A.; LANGEFELD, C. D.; RICH, S. S.; FREEDMAN, B. I. AND BOWDEN, D. W. (2004) Association of protein tyrosine phosphatase 1B gene polymorphisms with type 2 diabetes. *Diabetes*. 53: 3007-3012.

(29) ZABOLOTNY, J. M.; HAJ, F. G.; KIM, Y. B.; KIM, H. J.; SHULMAN, G. I.; KIM, J. K.; NEEL, B. G. AND KAHN, B. B. (2004) Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J. Biol. Chem.* 279: 24844-24851.

(30) ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A. L.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J.; CHAN, C. C.; RAMACHANDRAN, C.; GRESSER, M. J.; TREMBLAY, M. L. AND KENNEDY, B. P. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. 283: 1544-1548.

(31) KLAMAN, L. D.; BOSS, O.; PERONI, O. D.; KIM, J. K.; MARTINO, J. L.; ZABOLOTNY, J. M.; MOGHAL, N.; LUBKIN, M.; KIM, Y. B.; SHARPE, A. H.; STRICKER-KRONGRAD, A.; SHULMAN, G. I.; NEEL, B. G. AND KAHN, B. B. (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5479-5489.

(32) XUE, B.; KIM, Y. B.; LEE, A.; TOSCHI, E.; BONNER-WEIR, S.; KAHN, C. R.; NEEL, B. G. AND KAHN, B. B. (2007) Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency reduces insulin resistance and the diabetic phenotype in mice with polygenic insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 282: 23829-23840.

(33) GUM, R. J.; GAEDE, L. L.; KOTERSKI, S. L.; HEINDEL, M.; CLAMPIT, J. E.; ZINKER, B. A.; TREVILLYAN, J. M.; ULRICH, R. G.; JIROUSEK, M. R. AND RONDINONE, C. M.

(2003) Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes*. 52: 21-28.
(34) NIETO-VAZQUEZ, I.; FERNANDEZ-VELEDO, S.; DE ALVARO, C.; RONDINONE, C. M.; VALVERDE, A. M. AND LORENZO, M. (2007) Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Myocytes Show Increased Insulin Sensitivity and Protection Against Tumor Necrosis Factor-α-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*. 56: 404-413.
(35) DELIBEGOVIC, M.; BENCE, K. K.; MODY, N.; HONG, E. G.; KO, H. J.; KIM, J. K.; KAHN, B. B. AND NEEL, B. G. (2007) Improved Glucose Homeostasis in Mice with Muscle-Specific Deletion of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B). *Mol. Cell. Biol.* 27: 7727-7734.
(36) SHRESTHA, S.; BHATTARAI, B. R.; LEE, K. H. AND CHO, H. (2007) Mono- and disalicylic acid derivatives: PTP1B inhibitors as potential anti-obesity drugs. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 6535-6548.
(37) CANNON, B. AND NEDERGAARD, J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev*. 84: 277-359.
(38) NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T. AND CANNON, B. (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 293: E444-E452.
(39) HERNANDEZ, R.; TERUEL, T. AND LORENZO, M. (2001) Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett*. 494: 225-231.
(40) LORENZO, M.; TERUEL, T.; HERNANDEZ, R.; KAYALI, A. G. AND WEBSTER, N. J. (2002) PLCgamma participates in insulin stimulation of glucose uptake through activation of PKCzeta in brown adipocytes. *Exp. Cell. Res*. 278: 146-157.
(41) TERUEL, T.; HERNANDEZ, R. AND LORENZO, M. (2001) Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes*. 50: 2563-2571.
(42) FERNANDEZ-VELEDO, S.; HERNANDEZ, R.; TERUEL, T.; MAS, J. A.; ROS, M. AND LORENZO, M. (2006) Ceramide mediates TNF-alpha-induced insulin resistance on GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *Arch. Physiol. Biochem*. 112: 13-22.
(43) HERNANDEZ, R.; TERUEL, T.; DE ALVARO, C. AND LORENZO, M. (2004) Rosiglitazone ameliorates insulin resistance in brown adipocytes of Wistar rats by impairing TNF-alpha induction of p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinases. *Diabetologia*. 47: 1615-1624.
(44) FERNANDEZ-VELEDO, S.; NIETO-VAZQUEZ, I.; RONDINONE, C. M. AND LORENZO, M. (2006) Liver X receptor agonists ameliorate TNFalpha-induced insulin resistance in murine brown adipocytes by downregulating protein tyrosine phosphatase-1B gene expression. *Diabetologia*. 49: 3038-3048.
(45) OLEFSKY, J. M. (2000) Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Clin. Invest*. 106: 467-472.
(46) EVANS, R. M.; BARISH, G. D. AND WANG, Y. X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med*. 10: 355-361.
(47) STEFFENSEN, K. R. AND GUSTAFSSON, J. A. (2004) Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes*. 53 Suppl 1: S36-S42.

(48) TERUEL, T.; HERNANDEZ, R.; RIAL, E.; MARTIN-HIDALGO, A. AND LORENZO, M. (2005) Rosiglitazone up-regulates lipoprotein lipase, hormone-sensitive lipase and uncoupling protein-1, and down-regulates insulin-induced fatty acid synthase gene expression in brown adipocytes of Wistar rats. *Diabetologia*. 48: 1180-1188.

(49) HERNANDEZ, R.; TERUEL, T. AND LORENZO, M. (2003) Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes. *Diabetologia*. 46: 1618-1628.

(50) WU, Y.; OUYANG, J. P.; WU, K.; WANG, S. S.; WEN, C. Y. AND XIA, Z. Y. (2005) Rosiglitazone ameliorates abnormal expression and activity of protein tyrosine phosphatase 1B in the skeletal muscle of fat-fed, streptozotocin-treated diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 146: 234-243.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1009-1029

Revisión

Proyección de las técnicas analíticas espectroscópicas y cromatográficas de aplicación en análisis farmacéutico en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia de Madrid (UCM) en los últimos 25 años

Recibido el 6 de noviembre de 2007

BENITO DEL CASTILLO*, ANA I. OLIVES, M. ANTONIA MARTÍN

Laboratorio de Técnicas Instrumentales. S. D. Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid (SPAIN)

RESUMEN

En este trabajo se realiza un breve repaso de las líneas de investigación y trabajos dirigidos por el Profesor Dr. Benito del Castillo, de su trayectoria investigadora y la de su grupo de investigación, así como de los logros alcanzados a través de distintas colaboraciones a nivel internacional.

Palabras clave: espectroscopia; cromatografía; análisis farmacéutico; análisis medioambiental; análisis toxicológico.

* **Dirección de correspondencia:**
Benito del Castillo García
Laboratorio de Técnicas Instrumentales. S. D. Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid (ESPAÑA)
Tfno: 91-3941702
E-mail: bdc@farm.ucm.es
Dedicado a nuestro maestro D. Manuel Ortega Mata

ABSTRACT

An outline of spectroscopic and chromatographic techniques and their application to pharmaceutical analysis at the Laboratory of Instrumental Techniques of the Faculty of Pharmacy of Madrid (UCM) during the last 25 years

A summary of the research work supervised by Professor Dr. Benito del Castillo is presented. In this research career, the achievements of his group and his international collaborations are briefly reviewed.

Key words: spectroscopy; chromatography; pharmaceutical, environmental and toxicological analysis.

INTRODUCCIÓN

De forma sucinta se van a exponer algunos de los trabajos de investigación analítica más representativos de los miembros del equipo de investigación que firman el presente artículo y que han dado lugar a trabajos y publicaciones de diversa índole.

En el Laboratorio de Técnicas Instrumentales, actualmente adscrito a la Sección Departamental de Química Analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, se han desarrollado otros trabajos y seguido líneas de investigación dirigidas por otros profesores además de los que aquí se citan. En este resumen se recogen diversas publicaciones de autores que también han participado directamente en lo que constituyó el objeto de sus tesis doctorales, bajo la dirección del Prof. Dr. Benito del Castillo, o bien posteriormente, como codirectores de diferentes artículos científicos surgidos en colaboración con el Profesor del Castillo, Catedrático de Química Analítica, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

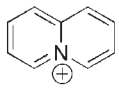
ANÁLISIS DE COMPUESTOS DE INTERÉS BIOLÓGICO, FARMACÉUTICO Y MEDIOAMBIENTAL POR TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y CROMATOGRÁFICAS

A comienzos de la década de los setenta y bajo la dirección del también Académico de Número y Catedrático de Técnicas Instru-

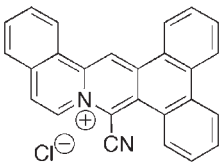
mentales, Prof. Dr. Manuel Ortega Mata, el profesor del Castillo realizó su tesis doctoral centrada en el análisis fluorimétrico de antibióticos, siendo pioneros en España en el análisis de fármacos por espectrofluorimetría (1-4). El análisis de antibióticos ha continuado siendo una constante de interés para este grupo y gracias una Acción Integrada Hispano-Portuguesa (HP-93006/1994), en que los autores realizaron un interesante trabajo científico en colaboración con el Departamento de Bromatología, Toxicología y Análisis Químico de la Universidad de Coimbra, centrado en la determinación de antibióticos, en concreto tetraciclinas, en alimentos por HPLC con detección espectrofluorimétrica (5) mediante reacción de derivatización con calcio, con el fin de lograr la sensibilidad requerida para detectar las tetraciclinas en las concentraciones tan bajas en las que se encuentran en la carne de bovino, ovino o porcino. Asimismo, se emplearon diversos reactivos fluorogénicos para la determinación de tioles de interés biológico, mediante cromatografía en capa delgada de alta eficacia (6, 7). También se continuó trabajando en la determinación de algunos fármacos mediante el empleo de técnicas analíticas de separación, de la más reciente introducción, como fue el caso de la electroforesis capilar (8).

Continuando con el desarrollo de las aplicaciones de la espectrofluorimetría, este grupo de investigación viene efectuando trabajos acerca del desarrollo de nuevos marcadores fluorescentes (9, 10) y reacciones de derivatización fluorimétrica (11, 12) mediante el empleo de sales de quinolizinio de nueva síntesis (Figura 1) para la determinación de compuestos de interés biológico (13, 14) (catecolaminas, fármacos y aminas —VOC—, volatile organic compounds, que presentan notable interés desde el punto de vista medioambiental). Asimismo, se han estudiado las posibilidades analíticas que los medios organizados (micelas y ciclodextrinas) aportan a la mejora en la sensibilidad y selectividad analítica de numerosos compuestos hidrofóbicos, manteniendo en este campo una estrecha colaboración con el Prof. Dr. Dan A. Lerner, catedrático de Química Física de la Escuela Nacional Superior de Química de Montpellier (ENSCM). En esta línea se han establecido las ventajas (mejora en la sensibilidad analítica y mayor resolución espectral) que la solubilización en medios micelares (15, 16) aportan a la determinación de distintos heterociclos nitrogenados; además, se pudo demostrar que el cloruro

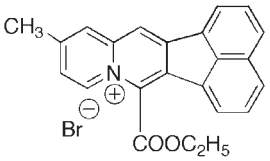
de 9-cianobenzo[*a*]fenantro[*9,10-g*]quinolizinio se comporta como un sensor fluorescente que permite detectar cambios en el entorno hidrofílico/hidrofóbico en el que se encuentre alojado, guardando similitud con los descrito para el pireno y sus derivados. El Profesor Lerner disfrutó de un año sabático en nuestro el Laboratorio de Técnicas Instrumentales, en 1996.



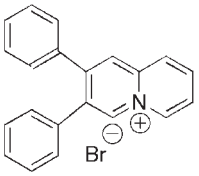
Anillo de quinolizinio



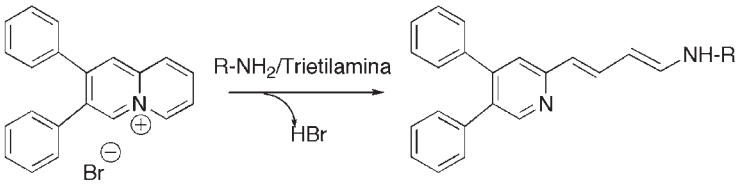
Cloruro de 9-cianobenzo[*a*] fenantro[9,10-g]quinolizinio
Sensor fluorescente



Bromuro de 7-etoxicarbonil-11 metilacenafto[1,2-b] quinolizinio
Agente intercalante de ADN



Bromuro de 2,3-difenil-quinolizinio
Reactivo fluorogénico



Cuantificación de aminas por reacción de derivatización con bromuro de 2,3-difenilquinolizinio

FIGURA 1. ***Estructuras químicas de algunas de las sales de quinolizinio estudiadas de relevancia por su aplicación analítica como sensores, agentes intercalantes o reactivos fluorogénicos.***

Por otra parte en 1991 se inició un ambicioso proyecto de colaboración con el Prof. Dr. Kazuhiro Imai, catedrático de Química

Bioanalítica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Tokio, dada nuestra experiencia en el campo de los reactivos fluorescentes y en el desarrollo de las reacciones de derivatización, se estudiaron las condiciones experimentales para la reacción y detección quimioluminiscente de catecolaminas (17), ya que se hayan implicadas en los complejos mecanismos que contribuyen a la hipertensión, una de las patologías más frecuentes en el mundo desarrollado. Por ello, se puso a punto la metodología para el análisis de catecolaminas en plasma, mediante HPLC con detección postcolumna (Figura 2) por reacción quinmioluminiscente (18) y se aplicó a la determinación de catecolaminas en plasma en modelos experimentales (ratas normotensas e hipertensas) (19).

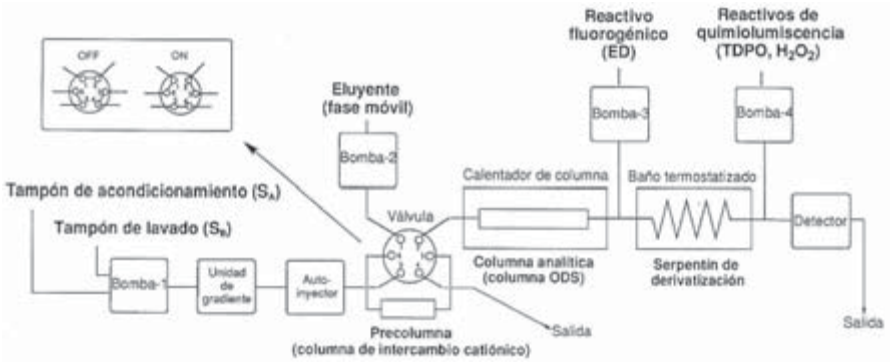


FIGURA 2. ***Esquema de un equipo de HPLC con detección quimioluminiscente totalmente automatizado para la determinación de catecolaminas en plasma de rata.***

Muchos heterociclos nitrogenados muestran actividad antitumoral, por ello también se inició una línea de trabajo centrada en los estudios de interacción de diversos derivados de quinolizinio (20), benzo[*a*]quinolizidina (21) y azaquinolizinio (22) con ADN, pudiendo establecerse una clara correlación entre la estructura química de los derivados estudiados y la magnitud de la interacción con el ADN. Tanto en el caso de los derivados de quinolizinio como de benzo[*a*]quinolizidina, los resultados experimentales evidencian que es la parte aromática plana, aquella que queda atrapada entre los pares de bases del ADN, lo que puede dificultar su replicación y por

tanto, explica su potencial actividad antitumoral (Figura 3). Con la finalidad de determinar si la interacción heterociclo-ADN se produce a través del bolsillo hidrofóbico de la macromolécula, se estudió la influencia de la polaridad de los disolventes sobre estos compuestos mediante técnicas espectroscópicas de absorción y de emisión (23, 24). Esta línea se continua en la actualidad plasmada en la colaboración que mantenemos con el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la UCM, para el estudio de la interacción con ADN de los agentes antitumorales sintetizados por el grupo que dirigen los profesores Avendaño y Menéndez.

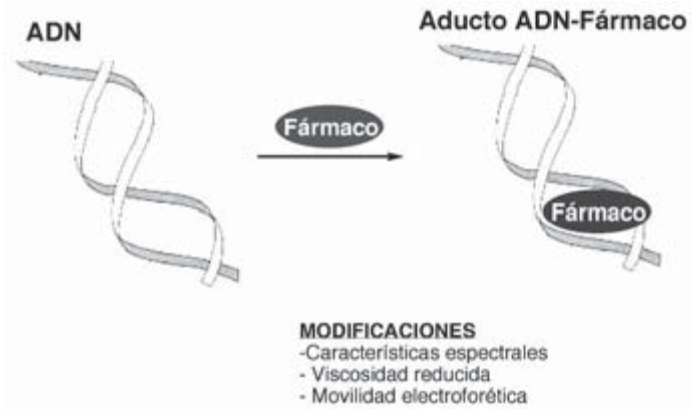


FIGURA 3. ***Esquema del modelo de interacción de algunos fármacos antitumorales con ADN, ilustrando los cambios en parámetros analíticos que permiten establecer dicha interacción.***

La experiencia adquirida en este campo ha hecho posible la participación en la redacción de un capítulo de libro centrado en la importancia de los marcadores fluorescentes en el contexto general de las técnicas de luminiscencia (25) y en la invitación para escribir un artículo de revisión sobre la relevancia de los marcadores fluorescentes en el análisis farmacéutico (26).

Los retinoides, entre los que se encuentran la vitamina A (retinol), el retinal y el ácido retinoico poseen una gran significación biológica (27) por su papel en la fotoquímica de la visión, así como en los procesos de diferenciación celular. Además, debido a su cadena poliéni-

ca son fotolábiles y fácilmente isomerizables, perdiendo parte de su actividad biológica. La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas incrementa su estabilidad (28) frente al oxígeno y las radiaciones visibles, lo cual se demostró por la separación y cuantificación de los isómeros geométricos, mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Asimismo, la inclusión permite la cuantificación de estos compuestos en disolución acuosa, hecho de especial relevancia considerando su elevada hidrofobicidad. Tanto la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (29, 30) como la solubilización de estos retinoides en soluciones micelares (31) permite observar la luminiscencia a temperatura ambiente de estos compuestos, hecho que hasta el momento sólo se había apreciado a bajas temperaturas (77 K). Asimismo, se han aislado y caracterizado por distintas técnicas instrumentales espectroscópicas (difractometría de rayos X, ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN, espectrofotometría UV-VIS, IR y espectrofluorimetría) los complejos retinal/β-ciclodextrina (32), y estos mismos complejos sólidos se han estudiado mediante la moderna técnica de microscopia atómica de fuerzas (AFM) (33).

En 1993, se abrió una línea de colaboración, con la Profra. Dra. Ait-Lyazidi de Facultad de Ciencias de Meknes (Marruecos), que condujo a la presentación de la tesis doctoral en Ciencias de Mohamed Sbai (34). En este campo, se ha logrado la solubilización en soluciones micelares de algunos alcaloides hidrofóbicos, tales como la elipticina, que posee una potente actividad biológica como antitumoral. Su inclusión en ciclodextrinas permite la solubilización de la forma neutra de la elipticina, insoluble en agua. En nuestros experimentos se ha demostrado que el uso de tensioactivos (35) o la inclusión en diversas ciclodextrinas (36) exaltan su hidrosolubilidad, sin pérdida en su actividad biológica. Los complejos de elipticina con diversas ciclodextrinas se han caracterizado por espectrofotometría de absorción UV-Vis y espectrofluorimetría, mediante la determinación de su estequiometría y de sus constantes de asociación (37). En paralelo, y tomando como estructura química modelo el carbazol, se ha verificado su inclusión en ciclodextrinas (Figura 4) y se han caracterizado los citados complejos por su estequiometría y constantes de asociación (38). Análogamente, se ha verificado la sensibilidad para su determinación espectrofluorimétrica mediante el empleo de soluciones micelares y de ciclodextrinas (39).

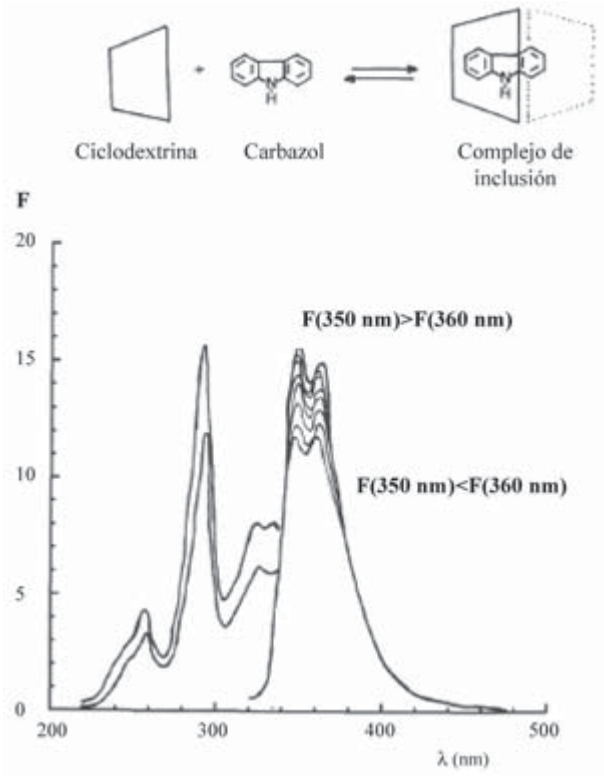


FIGURA 4. ***Modelo de inclusión del carbazol en las cavidades de beta-ciclodextrinas formando complejos de estequiometría 1:1 y 1:2; deducidos a partir de los cambios espectrales.***

Esta línea de investigación ha continuado con posterioridad con el estudio y caracterización de los complejos de inclusión entre los alcaloides derivados de β-carbolina (harmano y harmina) y distintas ciclodextrinas (40). La inclusión en ciclodextrinas (41, 42) o la solubilización mediante el empleo de tensioactivos (43) afecta notablemente a los equilibrios ácido-base de estos alcaloides, produciéndose la emisión del fluoróforo predominante, dependiendo de la carga neta global de la micela en la que se solubilizan. Por otra parte, se ha demostrado que el empleo de medios micelares protege los estados excitados de estas moléculas frente a los agentes amortiguadores externos; sin embargo, el grado de protección depende de la naturaleza de la micela empleada, lo que tiene una gran importancia cuan-

do se emplean tensioactivos como aditivos en las fase móviles de las separaciones cromatográficas (44).

La experiencia adquirida en este campo dio lugar a dos artículos de revisión, solicitados por los editores de la revista *Analusis*, relativo a la importancia de los medios organizados en las técnicas espectroscópicas (45) y de la revista *Ars Pharmaceutica*, centrado en las características químicas de los complejos de inclusión con ciclodextrinas y sus aplicaciones analíticas (46).

Con la incorporación a nuestro grupo del Prof. Andrés León Leal, de la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela), se continuaron los trabajos sobre complejos de inclusión con ciclodextrinas, en este caso centrándose en la caracterización de los complejos de inclusión de los derivados de β-carbolina por técnicas espéctroscópicas (47), así como en la determinación de la estequiometría con la problemática asociada a ella (48) y las constantes de asociación de los complejos (49). Los trabajos experimentales de su tesis doctoral (50) se han centrado en la separación de los alcaloides derivados de β-carbolina por HPLC con detección fluorimétrica, adicionando a las fases móviles ciclodextrinas. Estos macrociclos tienen una elevada capacidad de reconocer molecularmente y distinguir compuestos química y estructuralmente relacionados; con esta finalidad, se han enlazado químicamente a las distintas fases estacionarias y se han empleado con éxito en la separación de analitos quirales por cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos. Una alternativa que permitió una mayor versatilidad en las determinaciones analíticas consistió en la incorporación de ciclodextrinas como modificadores de las fases móviles convencionales. En este campo de trabajo nuestro grupo ha demostrado que se puede mejorar notablemente la eficacia de las separaciones (51, 52) (mejor selectividad y mayor resolución entre los compuestos separados). Asimismo, la adición de ciclodextrinas a las fases móviles conlleva una reducción en la proporción de disolventes orgánicos en esas fases móviles (53), lo que tiene un gran interés desde el punto de vista medioambiental, ámbito conocido como tecnologías limpias y metodologías analíticas respetuosas con el medio ambiente (*química verde*). Asimismo, se han estudiado diversas variables que influyen en la separación, demostrándose la existencia de un equilibrio secundario (54) al proceso de separación, que es el equilibrio de inclusión en las cavidades de las

ciclodextrinas de los alcaloides estudiados. Además, para demostrar este proceso de inclusión los complejos modelo alcaloide/ciclodextrina, se sintetizaron, aislaron y caracterizaron (55) por técnicas de resonancia magnética nuclear de protón y de carbono 13.

Los alcaloides derivados de β-carbolina, al igual que los derivados de carbazol, poseen actividad antitumoral y presentan singulares características espectroscópicas, siendo muy sensibles al microentorno molecular, pudiendo participar en procesos de transferencia de protón en estado excitado (56) inducidos por vía fotoquímica; también se ha demostrado que la solubilización de estos alcaloides en medios micelares mejora la sensibilidad en la cuantificación por espectrofluorimetría, gracias a que se evita la amortiguación de la fluorescencia (44) nativa de estos compuestos. La notable sensibilidad de los complejos de inclusión norharmano/ciclodextrinas a las variaciones de pH permiten utilizarlos como sensores de células tumorales, ya que las zonas circundantes a un tumor presentan un valor de pH inferior a 7.0 y estos complejos son capaces de detectar variaciones de pH de 0.01 unidades de pH (57, 58).

Con la incorporación de Emiliano E. Romero Ale, procedente de la Universidad JFK (Buenos Aires, Argentina), gracias a una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), ampliamos nuestro campo de estudio a los compuestos derivados de carbazol como reactivos fluorogénicos (59, 60) para la detección de aminas de interés biológico, mediante HPLC con detección fluorimétrica. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una notable dependencia de la fluorescencia con la estructura molecular (61) de los distintos derivados de carbazol estudiados, así como de la polaridad de los disolvente o de otras variables experimentales como el pH. Asimismo, la reactividad (62) de estos compuestos se ve seriamente afectada por el microentorno molecular. Teniendo en cuenta las posibilidades analíticas que los heterociclos derivados de carbazol presentan, en la actualidad estamos considerando su utilidad en el reconocimiento molecular de aniones (63) de interés biológico, por lo que se ha propuesto su aplicación para la determinación de cloruros y fluoruros.

No obstante, se han desarrollado otras líneas de trabajo que tienen un marcado aspecto aplicado. Como ya hemos señalado, el es-

tudio de las propiedades fluorescentes de diversos compuestos naturales ha sido una constante en este grupo de trabajo. Así, se puso a punto un método espectrofluorimétrico para la determinación de oenantotoxina (64), aunque tuvo una mayor repercusión el desarrollo de la metodología para la determinación de biocanina A, formononetina y genisteína, un grupo de flavonoides presentes en algunas especies del genero *Trifolium*, muy común en nuestros campos y capaces de provocar abortos en el ganado bovino y ovino cuando ingieren masivamente este tipo de plantas, ocasionando graves pérdidas a los ganaderos. Dada la relevancia del problema se hizo posible la determinación de estos compuestos mediante espectrofluorimetría y HPLC-UV (65). Asimismo, en colaboración con un grupo de investigadores de la Universidad de Córdoba (Argentina) se procedió a la caracterización por espectrofluorimetría de distintos derivados de quercetina, presentes en raíces de *Dalea elegans* (66). Algunos compuestos como el ácido indolacético (IAA) o el ácido abscísico (ABA), compuestos de origen natural presentes en las plantas y conocidos como fitohormonas, debido a que actúan regulando el crecimiento de los vegetales y se sabe que se acumulan en las semillas cuando estas se encuentran en ambientes desfavorables para la geminación. Para tratar de conocer mejor estos procesos, se desarrollaron distintas metodologías para la determinación de ambos ácidos destacando la derivatización química para producir compuestos fluorescentes, determinándose el contenido IAA en diferentes variedades de semillas de *Pinus pinea* (67). En el caso del ácido abscísico se determinó su contenido en las semillas de *Hellianthus annus* (68, 69) y los resultados se compararon con los de la determinación por HPLC-UV. En la Figura 5 se muestran los cromatogramas correspondientes a la separación de los isómeros del ABA en muestras reales y patrones. Otro grupo de compuestos, naturales y modificados por síntesis química, estudiados por espectrofluorimetría son los derivados de benzimidazol (70), los cuales presentan actividad farmacológica como antihelmínticos. También se ha iniciado una línea de investigación encaminada al desarrollo de reacciones de derivatización para la determinación de diarilaminas mediante su transformación en carbazoles altamente fluorescentes (71).

Con la incorporación de la Profra. Dra. Olives, en el año 1989, al grupo de investigación que dirige el Profesor del Castillo, se abrió

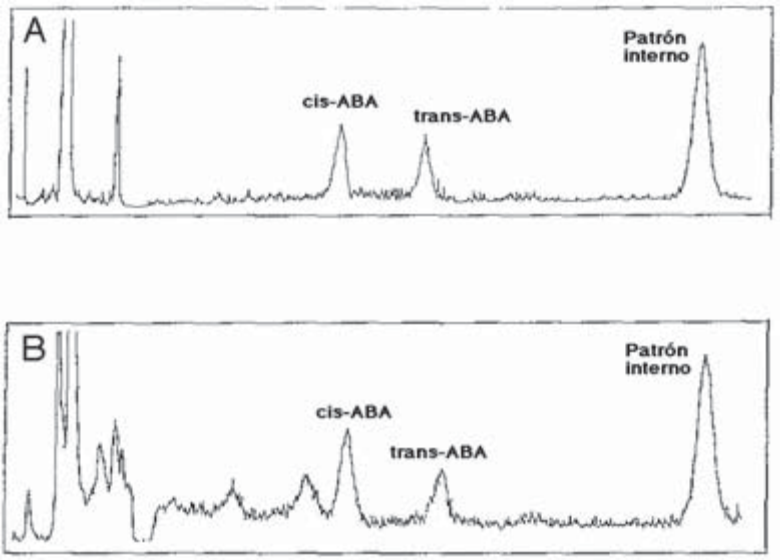


FIGURA 5. ***Cromatogramas obtenidos en la determinación de ácido abscísico en semillas de Helliantus annus por HPLC-UV. (A) Cromatograma obtenido para los patrones de cis- y trans-ABA con el patrón interno adicionado para cuantificar. (B) Cromatograma obtenido en el análisis de muestras reales, mostrando la presencia de cis- y trans-ABA junto con el patrón interno adicionado para cuantificar.***

una nueva línea de trabajo en colaboración con la Profra. Dra. M. Esperanza Torija Isasa del Departamento de Nutrición y Bromatología II, de la Facultad de Farmacia de la UCM. El objetivo de esta colaboración, que se mantiene en la actualidad, se centra en el análisis y calidad de aguas fluviales mediante técnicas espectroscópicas atómicas y moleculares (72). Hay factores naturales (la geología y el clima) y otros artificiales (vertidos y núcleos de población) que afectan a la calidad de las aguas. Se estudió el contenido de diversos metales (cadmio, cobalto, cromo, cobre, hierro, manganeso, níquel, plomo y cinc) (73, 74), así como otros parámetros fisicoquímicos y de contaminación en 21 puntos de muestreo a lo largo del río Arlanzón (Burgos), desde su nacimiento hasta su llegada a la capital. Los resultados obtenidos durante las campañas de los años 1991 y 1992, pusieron de manifiesto que las aguas del río Arlanzón son poco mineralizadas y poco contaminadas, además de poseer un gran poder de autodepuración, en concordancia con sus características de

río de alta montaña; la composición química cambia según la naturaleza geológica del terreno surcado y la densidad de población de los núcleos urbanos que atraviesa o que lo circundan (75). De las conclusiones obtenidas es de reseñar que el manganeso superaba los niveles máximos permitidos para aguas de consumo público en el tramo medio del río (76), el hierro fue el elemento más abundante, superando su concentración media anual en todos de los puntos del muestreo el nivel guía (50 mg/L) (77). Con respecto al plomo (Figura 6) se observó que si bien sus niveles nunca superan los niveles de concentración máxima permitida, estos se incrementan en las zonas próximas a los núcleos de población (78).

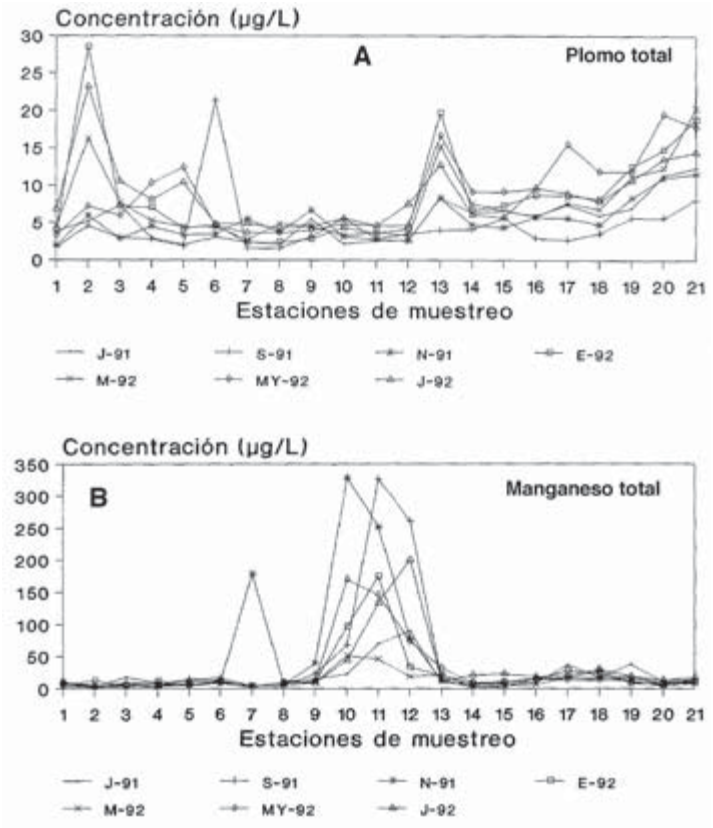


FIGURA 6. ***Evolución anual de los niveles de concentración de metales totales en el agua del río Arlanzón a lo largo de los diferentes puntos de muestreo. (A), Plomo (B) Manganeso.***

En estudios posteriores se ha relacionado la composición química de las aguas del río Arlanzón con la flora acuática y de rivera (comunidades acuáticas, helofíticas e hidrófilas) de las zonas circundantes, como un indicador biológico de calidad de las citadas aguas, obteniendo muy buena correlación entre los bioindicadores y los parámetros químicos de calidad de las aguas (79). Estos trabajos se han realizado gracias a la colaboración con el Prof. Dr. Molina. Dicha colaboración continúa en la actualidad con el Departamento de Biología Vegetal II (Dr. Molina) y con el Departamento de Edafología (Dr. Casermeiro y Dra. de la Cruz), estudiando otros ecosistemas, tales como humedales y charcas estacionales, así como zonas fluviales de otras zonas de la geografía española, como los humedales Ibero-Mediterráneos (80).

OTRAS LÍNEAS DE TRABAJO

Como resultado de la estancia de la Dra. Martín Gómez en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Alcalá (Madrid), con los profesores Ortega Ortiz de Apodaca y Ballesteros, se potenció la colaboración con el laboratorio de Técnicas Instrumentales (Sección Departamental de Química Analítica) de la Facultad de Farmacia de la UCM, en la línea de análisis y control de medicamentos, que cristalizó en diferentes artículos y ponencias recogidas en la bibliografía, y entre ellas destacamos las presentadas en el I Congreso Internacional de Química Analítica celebrado en Lima (Perú) (81, 82).

Además de estas líneas de trabajo, se han desarrollado otros trabajos en colaboración con otros departamentos e instituciones de la UCM, en concreto con la Facultad de Medicina, se realizaron estudios sobre litiasis renal y de la caracterización de cálculos renales, para lo que se emplearon técnicas espectroscópicas (espectrometría IR) y distintas modalidades de microscopia electrónica (83). Por otra parte, en colaboración con el Instituto de Nutrición (C.S.I.C.) se utilizó uno de los métodos oficiales de análisis (I.U.P.A.C.) para la determinación por HPLC con detección fluorimétrica de los niveles de vitamina E en distintos aceites vegetales, y se valoró como el proceso de fritura contribuye al deterioro de los mismos debido a la

desaparición de la vitamina E y sus análogos presentes en los aceites (84). Por otra parte y debido al gran interés que existe en la industria farmacéutica para evidenciar el fenómeno del polimorfismo, gracias a la estancia de C. T. Quirino, de la UAMX (México), se estudiaron las formas polimórficas de la tolbutamida, un hipoglucemiante oral, mediante espectrometría de absorción IR, la modificación de los ensayos de solubilidad (test de disolución) y técnicas de microscopia electrónica de barrido. Además se estudió la influencia que la presencia de metales (calcio, hierro, manganeso, magnesio...) cedidos por los envases pudiera tener sobre la aparición de las formas polimórficas (85, 86). Se puede concluir que cuando se produce esta cesión de calcio, en cantidades traza, contrariamente a lo que podría pensarse se favorece la formación del polimorfo más estable de la tolbutamida.

RESUMEN

No podemos olvidar que en el desarrollo de toda esta labor ha sido posible gracias a las personas que actualmente están presentes y también a todas aquellas que en este periodo han trabajado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales, se han formado en él o han completado su formación y con posterioridad han partido para ocupar puestos de relevancia en la Administración, en la industria farmacéutica, en hospitales de la red sanitaria nacional, o en otras universidades, tal es el caso de Silvia Muñoz Botella (Farmaeuropa, Estrasbugo, U.E.), Mohamed Sbai (Fez, Marruecos), Pablo Prados Ruano (París, Aventis), Carlos Tomás Quirino (UAM-X, Méjico), Andrés G. León Leal (U. de Los Andes, Mérida, Venezuela), Emiliano E. Romero Ale (INTI, Buenos Aires, Argentina).

Asimismo hemos de resaltar la fructífera relación que hemos mantenido y actualmente continúa con distintos grupos de investigación de universidades extranjeras, como los de los profesores Irene Noronha da Silveira (Universidad de Coimbra, Portugal), Willy R. G. Baeyens (Rije Universitat, Gante Bélgica), Lucette Bardet (Universidad de Montpellier, Francia), Dan A. Lerner (ENSCM, Montpellier, Francia), Kazuhiro Imai (Universidad de Tokio, Japón), S. Ait-Lyazidi (Universidad de Meknes, Fez, Marruecos), Alfredo Carabot (Uni-

versidad de Los Andes, Mérida, Venezuela), Rubén Manzo (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Toda esta labor no podría haberse llevado a cabo sin contar con el apoyo y la financiación a través de las diferentes convocatorias destinadas a Proyectos de Investigación, subvencionados por el Ministerio de Educación y Ciencia o anteriormente el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MEC/MCYT), así como diversos Proyectos de Investigación financiados por la propia Universidad Complutense y mas recientemente a través de la UCM-CAM. Asimismo, entidades privadas como los Laboratorios Glaxo (actualmente GSK) han contribuido a la formación de estudiantes predoctorales, a través de la concesión de becas o ayudas. Además, las estancias de investigadores en formación ha sido posible gracias a las Ayudas del MEC a través de los Programas de Formación de Doctores y Tecnólogos y de estancias en Régimen de Sabático para Profesores Extranjeros, becas concedidas por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), o diferentes Programas del Ministerio de Asuntos Exteriores (ALE, Intercampus, etc...).

REFERENCIAS

(1) ORTEGA, M. Y DEL CASTILLO, B. (1973) *Afinidad.* 30: 651- 667.
(2) DEL CASTILLO, B.; ORTEGA, M. AND BALLESTEROS, M. (1978) *Pharmacia Mediterranea*. 12: 161-171.
(3) BALLESTEROS, M.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1988) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6: 191-197.
(4) DEL CASTILLO, B.; BALLESTEROS, M. AND ORTEGA, M. (1979) *Il Farmaco*. 34: 107-113.
(5) PENA, A.; CARMONA, A.; BARBOSA, A.; LINO, C.; SILVEIRA, I. AND DEL CASTILLO, B. (1998) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21: 839-845.
(6) LIN, B.; BAEYENS, W.R.G.; DEL CASTILLO, B.; IMAI, K.; DE MOERLOOSE, P. AND STRAGIER, K. (1989) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7: 1663-1670.
(7) LIN, B.; DEL CASTILLO, B. Y BAEYENS, W.R.G. (1990) *Anal. Real Acad. Farm*. 53: 223-232.
(8) BERZAS, J.J.; DEL CASTILLO, B.; CASTAÑEDA, G. AND PINILLA, M.J. (1999) *Talanta.* 50: 261-268.
(9) MARTÍN CARMONA, M.A. (1989) *Estudio espectrofluorimétrico de sales de quinolizinio y su empleo como marcadores fluorescentes.* Tesis doctoral. Universidad Complutense. Dirección: Benito del Castillo.
(10) MARTÍN CARMONA, M.A.; DEL CASTILLO GARCÍA, B.; EZQUERRA, J. AND ÁLVAREZ-BUILLA, J. (1984) *Anal. Real Acad. Farm*. 50: 417-428.

(11) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; EZQUERRA, J. AND ALVAREZ-BUILLA, J. (1985) *Anal. Chim. Acta.* 170: 89-94.
(12) MARTÍN, M.A.; BALLESTEROS, M. AND DEL CASTILLO, B. (1985) *Anal. Chim. Acta.* 170: 95-100.
(13) MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1991) *Anal. Chim. Acta.* 245: 217-223.
(14) MARTÍN, M.A.; FRUTOS, G.; DEL CASTILLO, B.; ÁLVAREZ-BUILLA, J. AND MARTÍN, P.J. (1992) *J. Chemometrics.* 6: 1-10.
(15) MARTÍN, P.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND CAYRE, I. (1988) *Anal. Chim. Acta.* 205: 129-137.
(16) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LERNER, D.A.; EZQUERRA, J. AND ALVAREZ-BUILLA, J. (1988) *Anal. Chim. Acta.* 205: 117-127.
(17) PRADOS RUANO, P. (1998) *Análisis de catecolaminas por quimioluminiscencia: desarrollo de un método y su aplicación a muestras biológicas*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Codirección: Kazuhiro Imai, Benito del Castillo, M. Antonia Martín.
(18) PRADOS, P.; SANTA, T.; HOMMA, H.; DOI, H.; NARITA, H.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN, M.A. AND IMAI, K. (1997) *Biol. Pharm. Bull.* 20: 341-344.
(19) PRADOS, P.; SANTA, T.; FUKUSHIMA, T.; HOMMA, H.; KASAI, C.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND IMAI, K. (1998) *Hypertens. Res.* 21: 147-153.
(20) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LERNER, D.A.; EZQUERRA, J. AND ALVAREZ-BUILLA, J. (1988) *Anal. Chim. Acta.* 205: 117-127.
(21) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND MENÉNDEZ, J.C. (1991) *Anal. Lett.* 24: 1503-1515.
(22) MARTÍN, M.A.; BOUIN, A.S.; MUÑOZ-BOTELLA, S. AND DEL CASTILLO, B. (2002) *Polycycl. Arom. Comp.* 22: 37-53.
(23) MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND PRADOS, P. (1993) *Talanta.* 40: 1719-1723.
(24) PRADOS, P.; MARTÍN, M.A. Y DEL CASTILLO, B. (1996) *Anal. Real Acad. Farm.* 62: 211-222.
(25) DEL CASTILLO, B.; ALVAREZ-BUILLA, J. AND LERNER, D.A. (1991) *Fluorogenic Reagents and Fluorescent Probes* En W. R. G. BAEYENS, D. DE KEKULEIRE, K. KORKIDIS, (Editores) *Luminiscence Techniques of Chemical and Biochemical Analysis*, Editorial: Marcel Dekker Inc., Nueva York, pags. 73-139.
(26) MARTÍN, M.A.; LIN, B. AND DEL CASTILLO, B. (1988) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6: 573-583.
(27) MUÑOZ BOTELLA, S. (1994) *Formación de complejos de inclusión entre retinoides y ciclodextrinas: Características, propiedades y ventajas analíticas* Tesis Doctoral, Universidad Complutense. Codirección: M. Antonia Martín, Benito del Castillo, Dan A. Lerner.
(28) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LERNER, D.A. AND MENÉNDEZ, J.C. (2002) *Anal. Chim. Acta.* 468: 161-170.
(29) LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MUÑOZ-BOTELLA, S. (1989) *Anal. Chim. Acta.* 227: 297-301.
(30) MUÑOZ-BOTELLA, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1996) *Analyst.* 121: 1557-1560.
(31) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND LERNER, D.A. (1997) *J. Fluoresc.* 7: 243S-246S.

(32) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; MENÉNDEZ, J.C.; VÁZQUEZ, L. AND LERNER, D.A. (1996) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 909-915.
(33) MUÑOZ-BOTELLA, S.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND VÁZQUEZ, L. (1996) *Biophys. J.* 71: 86-90.
(34) SBAI, M. (1996) *Preparation et etude spectrophotometrique UV-VIS et spectrofluorimetrique de complexes d'inclusion d'alcaloides derives du carbazole avec des cyclodextrines*. Universite Moulay Ismail, Meknes (Marruecos). Codirección: M. Antonia Martín, Benito del Castillo, Dan A. Lerner.
(35) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1996) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 959-965.
(36) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1995) *Anal. Chim. Acta.* 303: 47-55.
(37) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, S.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1996) *Analyst.* 121: 1561-1564.
(38) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1997) *J. Fluoresc.* 7: 7S-10S.
(39) SBAI, M.; AIT LYAZIDI, S.; LERNER, D.A.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1997) *Biomed. Chromatogr.* 11: 89-90.
(40) MARTÍN CARBAJO, M.L. (2007) *Determinación analítica de complejos de inclusión entre alcaloides derivados de β-carbolina y ciclodextrinas*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense. Codirección: M. Antonia Martín, Benito del Castillo.
(41) MARTÍN, L.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1997) *Analyst.* 122: 45-49.
(42) MARTÍN, L.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1997) *Biomed. Chromatogr.* 11: 87-88.
(43) MARTÍN, L.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (1997) *J. Fluoresc.* 7: 95S-98S.
(44) MARTÍN, L.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (2005) *Luminescence.* 20: 152-161.
(45) LERNER, D.A. AND MARTÍN, M.A. (2000) *Analysis.* 28: 649-663.
(46) MUÑOZ-BOTELLA, D.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (1995) *Ars Pharmaceutica*. 36: 187-198.
(47) MARTÍN, L.; LEÓN, A.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND MENÉNDEZ, J.C. (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32: 991-1001.
(48) LEÓN LEAL, A.; MARTÍN CARBAJO, L.; OLIVES BARBA, A.I.; MARTÍN CARMONA, M.A. Y DEL CASTILLO GARCÍA, B. (2004) *Anal. Real Acad. Farm.* 70: 681-693.
(49) MARTÍN, L.; LEÓN, A.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (2003) *Talanta.* 60: 493-503.
(50) LEÓN LEAL, A.G. (2005) *Las ciclodextrinas como modificadores de las fases móviles en las separaciones por HPLC de los alcaloides derivados de β-carbolina. Aplicaciones analíticas y de impacto medioambiental.* Tesis doctoral, Universidad Complutense. Codirección: Benito del Castillo, M. Antonia Martín, Ana I. Olives.
(51) LEÓN, A.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A. Y DEL CASTILLO, B. (2003) *Empleo de fases móviles modificadas con ciclodextrinas. Una alternativa para mejorar las separaciones de los alcaloides harmano y harmina por HPLC.* XXIX Reunión Bie-

nal conmemorativa del centenario de la Real Sociedad Española de Química, Madrid, (España). Libro de resúmenes.

(52) LEÓN, A.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (2003) *Enhanced Separation of β-Carboline Alkaloids by RP-HPLC Using Cyclodextrins as Mobile Phase Additives* 3rd Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Aguadulce, Almería (España). Abstract book.

(53) LEÓN, A.G.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (2004) *Molecular Recognition Of β-Carboline Alkaloids By Cyclodextrin Complex Formation Using HPLC With Fluorescence Detection. Evaluation Of The Association Constants*, International Symposium on Luminescence Spectrometry, ISLS 2004, Beijing (China). Abstract book.

(54) LEÓN, A.G.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (2007) *J. Incl. Phenom. Macromol. Chem.* 57: 577-583.

(55) LEÓN, A.G.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; VÁZQUEZ, L. AND MENÉNDEZ, J.C. (2004) *Study of the Inclusion Modes of Harmane and Harmine into Cyclodextrin Cavities*, Euroanalysis XIII, Salamanca (España). Abstract book.

(56) PRADOS, J.L.; LEÓN, A.G.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (2005) *J. Photochem. Photobiol. A.* 173: 287-295.

(57) OLIVES, A.I.; PRADOS, J.L.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (mayo, 2006) *Norharmane Cyclodextrin Inclusion Complexes as Sensitive pH Sensors*. 13th International Cyclodextrin Symposium, Torino (Italia). Abstract book.

(58) PRADOS, J.L.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. AND MARTÍN, M.A. (2006) *Luminescence.* 21: 379-380.

(59) PRADOS RUANO, J.L. (2007) Trabajo de investigación (DEA), *Aplicaciones analíticas de los complejos de inclusión de norharmano y ciclodextrinas. Su utilidad como sensores fluorescentes para la detección de modificaciones en el microentorno celular*. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.

(60) ROMERO ALE, E.E. (2004) Trabajo de investigación (DEA), *Influencia de las ciclodextrinas sobre la reactividad y las propiedades espectroscópicas de los reactivos fluorogénicos derivados de carbazol. Proyección en la determinación de aminas de interés farmacológico*. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.

(61) ROMERO-ALE, E.E.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LÓPEZ-ALVARADO, P. AND MENÉNDEZ, J.C. (2005) *Luminescence.* 20: 162-169.

(62) OLIVES, A.I.; ROMERO-ALE, E.E.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LÓPEZ-ALVARADO, P. AND MENÉNDEZ, J.C. (2007) *J. Incl. Phenom. Macroc. Chem.* 57: 553-559.

(63) GONZÁLEZ-RUIZ, V.; SRIDHARAN, V.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND MENÉNDEZ, J.C. (2006) *Luminescence.* 21: 377-378.

(64) DEL CASTILLO, B.; GARCÍA DE MARINA, A. AND MARTÍNEZ HONDUVILLA, M.P. (1980) *Ital. J. Biochemistry.* 29: 233-237.

(65) GARCÍA DE MARINA, A.; RAMOS, A. Y DEL CASTILLO, B. (1985) *Anal. Inst. Nac. Inv. Agrarias.* (Serie Ganadera). 22: 13-22.

(66) ROMERO-ALE, E.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; AGNESE, A.M.; ORTEGA, M.G.; NÚÑEZ-MONTOYA, S. AND CABRERA, J.L. (2002) *Ars Pharmaceutica.* 43: 57-71.

(67) RECUENCO, I.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. AND DEL CASTILLO, B. (1984) *Pharm. Med.* 2: 353-358.

(68) DARDER, M.; DE PAULA, M.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J.; TORRES, M.; MARTÍN, M.A. AND DEL CASTILLO, B. (mayo de 1993) *A New Spectrofluorimetric Method for the Determination of the Plant Hormone Abscisic Acid*. IV International Symposium On Quantitative Luminescence Spectrometry In Biomedical Sciences. I.U.P.A.C. Conference. Gante (Bélgica). Abstract book.

(69) DARDER, M.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; DE PAULA, M.; MARTÍNEZ-HONDUVILLA, C.J. AND TORRES, M. (mayo de 1993) *Interferences in the Determination of Abscisic Acid in Sunflower Seeds by Spectrofluorimetry*. IV International Symposium On Quantitative Luminescence Spectrometry In Biomedical Sciences. I.U.P.A.C. Conference. Gante (Bélgica). Abstract book.

(70) VERDASCO, G.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B.; LÓPEZ-ALVARADO, P. AND MENÉNDEZ, J.C. (1995) *Analytica Chimica Acta.* 303: 73-78.

(71) SRIDHARAN, V.; MARTÍN, M.A.; MENÉNDEZ, J.C. (2006) *Synlett*. 2375-2378.

(72) OLIVES BARBA, A.I. (1996) *Incidencia de las características geológicas y medioambientales sobre la calidad de las aguas de los tramos superior y medio del río Arlanzón.* Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Codirección: Benito del Castillo, M. Esperanza Torija.

(73) OLIVES BARBA; A.I.; DEL CASTILLO GARCIA, B. Y TORIJA ISASA, M.E. (septiembre 1994) *Determinación por E.A.A. de los niveles de cobre y cinc en las aguas del río Arlanzón (Burgos)*. XIV Reunión Nacional de Espectroscopia, Baeza (España). Libro de resúmenes.

(74) OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. Y TORIJA, M.E. (1995) *Impacto ambiental de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en las aguas del río Arlanzón (Burgos). Determinación por E.A.A*. Reunión Científica Pluridisciplinar 150 Aniversario De La Facultad De Farmacia, Madrid. Libro de resúmenes.

(75) OLIVES BARBA, A.I. Y TORIJA ISASA, M.E. (2002) *¿Por qué el río Arlanzón fluye próximo al ferrocarril minero Villafría-Bezares?* En M. MORENO GALLO (Coordinador): *El ferrocarril minero de Villafría a Monterrubio de la Demanda (Historia y Naturaleza).* Publicaciones de la Excma. Diputación Provincial de Burgos, Salamanca (España). ISBN: 84-95874-07-5.

(76) OLIVES BARBA, A.I.; TORIJA ISASA, M.E. Y DEL CASTILLO GARCÍA, B. (1993) Estudio estacional de los niveles de hierro y manganeso en las aguas del río Arlanzón (Burgos). IX Congreso Nacional De Química, Sevilla (España). Libro de resúmenes.

(77) OLIVES BARBA, A.I.; TORIJA ISASA, M.E. Y DEL CASTILLO GARCÍA, B. (1995) *Evolución estacional del contenido de cobalto, cromo, hierro, manganeso y níquel en las aguas del río Arlanzón (Burgos). Determinación por E.A.A*. 7as Jornadas de Análisis Instrumental, Madrid (España). Libro de resúmenes.

(78) OLIVES BARBA, A.I.; TORIJA ISASA, M.E. Y DEL CASTILLO GARCÍA, B. (1995) *Evolución estacional del contenido de cadmio y plomo en las aguas del río Arlanzón (Burgos)*. 2as Jornadas de Sanidad Ambiental, Granada (España). Libro de resúmenes.

(79) MOLINA, J.A.; OLIVES, A.I.; DEL CASTILLO, B. Y TORIJA, M.E. (2003) *Lazaroa*, 24: 111-112.

(80) MOLINA, J.A.; CASERMEIRO, M.A.; OLIVES BARBA, A.I. Y DE LA CRUZ CARAVACA, M.T. (2002) *Bol. Real Soc. Esp. de Historia Natural (Sección Biológica)*. 97: 19-26.
(81) BALLESTEROS, M.; DEL CASTILLO, B.; MARTÍN M.C. AND ORTEGA, F. (2206) *Schironia*. 5: 23-29.
(82) ORTEGA, F.; BALLESTEROS, M.; MARTÍN M.C. AND DEL CASTILLO, B. (2006) *Educación especializada en análisis de medicamentos*. I Congreso Internacional de Química Analítica Aplicada. Lima (Perú). Libro de resúmenes.
(83) BARBA CARRETERO, S. (1996) *Métodos microscópicos (MEB) y espectroscópicos (IR) en el estudio de la litiasis renal. Valoración clínica y factores pronósticos experimentales*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Codirección: Benito del Castillo, José Luis Resel, Carlos Barba.
(84) MARTÍN, L.; GRANERO, G.; ASENJO, M. J.; MARTÍN, M.A.; RÓDENAS, S. AND CUESTA, C. (mayo, 1998) *Study by HPLC-Fluorescence Detection of the Changes in the Composition of Tocopherol Derivatives Present in Sunflower Oil After Frying Process*, VIII International Symposium on Quantitative Luminescence Spectrometry in Biomedical Analysis. Detection Techniques and Applications in Chromatography and Capillary Electrophoresis, Las Palmas de Gran Canaria (España). Abstract book.
(85) OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.; DEL CASTILLO, B. AND BARBA, C. (1996) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14: 1069-1076.
(86) QUIRINO BARREDA, C.T. (2001) *Estudios de preformulación sobre los efectos del ion Ca^{+2} en la cristalización de la tolbutamida*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Codirección: Benito del Castillo y José Luis Lastres.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1031-1045

Revisión

Early neural cell death: an overlooked process in neural development

Recibido el 6 de noviembre de 2007

ENRIQUE J. DE LA ROSA[1], VIOLETA GÓMEZ-VICENTE[1], ANA I. VALENCIANO[1, 2], PATRICIA BOYA[1] AND FLORA DE PABLO[1]*

[1] *3D Lab (Development, Differentiation & Degeneration), Department of Cellular and Molecular Physiopathology, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Spain.*
[2] *Departamento de Fisiología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain.*

ABSTRACT

During the development of the vertebrate nervous system, multiple physiological processes are involved in the generation of its complex cytoarchitecture and functionality. Among them, programmed cell death has been recognized as a key process that affects connecting neurons. By contrast, there is limited information available regarding the cell death that affects neuroepithelial cells, and recently born neurons and glia, hindering the comprehensive understanding of neural development. We have demonstrated that exquisitely regulated PCD occurs during early stages of neural development such as neurulation and neurogenesis. We have characterized how survival signals from proteins like proinsulin/insulin, c-Raf, and HSC70 counteract caspase-dependent apoptosis, which affects neuroepithelial cells proliferation and the generation of retinal ganglion cells. Furthermore, the

* **Información de Contacto:**
Dra. Flora de Pablo.
Profesora de Investigación. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC.
Ramiro de Maeztu, 9. 28040, Madrid. España.
Tel. y Fax: 34 91 534 92 01
e-mail: fdepablo@cib.csic.es

characterization of these physiological signals during retinal neurogenesis has the potential to provide new therapeutic tools to attenuate retinal neurodegeneration.

Key words: Programmed cell death, apoptosis, neurulation, neurogenesis, proliferation, differentiation, retina, proinsulin, insulin, c-Raf, HSC70, caspases, neuroprotection, neurodegeneration.

RESUMEN

Muerte neural temprana: un proceso inadvertido en el desarrollo del sistema nervioso.

Durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados, múltiples procesos fisiológicos participan en la generación de su compleja arquitectura celular y funcionalidad. Entre ellos, la muerte celular programada que afecta a neuronas de conexión está reconocido como un proceso fundamental. Por otro lado, hay escasa información disponible acerca de la muerte celular que afecta a células neuroepiteliales y a neuronas y glía recién nacidas, lo que impide que tengamos una noción completa sobre el desarrollo neural. Los estudios de nuestro laboratorio han demostrado que la muerte celular programada se encuentra finamente regulada y ocurre en etapas tan tempranas del desarrollo como la neurulación o la neurogénesis. Hemos caracterizado el papel que moléculas de supervivencia, como la proinsulina/insulina, c-Raf o HSC70, desempeñan bloqueando la apoptosis dependiente de caspasas, proceso que afecta a células neuroepiteliales proliferativas, así como a la generación de las células ganglionares de la retina. Es más, la caracterización de estas señales fisiológicas originadas durante la neurogénesis de la retina nos ha proporcionado una nueva herramienta terapéutica potencial para el tratamiento y atenuación de las neurodegeneraciones retinianas.

Palabras clave: Muerte celular programada, apoptosis, neurulación, neurogénesis, proliferación, diferenciación, retina, proinsulina, insulina, c-Raf, HSC70, caspasas, neuroprotección, neurodegeneración.

INTRODUCTION

The nervous system is a sophisticated structure sustained by a complex collection of cell types and stereotypic connections. Through proliferation and differentiation, as well as cell migration, axonogenesis and dendritogenesis, undifferentiated neuroepithelial cells become highly differentiated neurons or glia, and they establish an intricate network of connections. Programmed cell death (PCD) affects both projecting neurons and other types of differentiated

neurons and glia, and it has been clearly recognized as a fundamental element in generating and refining the complexity in the nervous system. For example, differentiated neurons that do not succeed in establishing the appropriate synaptic connections or that show impaired electrical activity are selectively eliminated by PCD in order to yield a highly specialised functional network. At this stage, the death/survival decision in neurons is tightly regulated and depends on the availability of neurotrophic factors as well as on cell-cell interactions (1-6).

In striking contrast to the extensively studied cell death of mature neurons, little attention has been paid to the PCD that affects proliferating neuroepithelial cells and recently born neuroblasts (7-9). For the last 12 years, we have studied this early phase of cell death in the developing nervous system, characterizing the cell populations affected, the regulatory mechanisms involved, its magnitude and the functional implications of this process. In the present review, we shall summarize all these aspects of early neural cell death, emphasizing that our limited knowledge of this process may be hindering the integrated understanding of neural development and vindicating the more extensive study of this process.

CELL DEATH OCCURS DURING EARLY STAGES OF NEURAL DEVELOPMENT

The nervous system mostly derives from the neural tube, a structure generated from the embryonic ectoderm through inductive interactions and morphogenic movements. Since the seminal work of Glücksmann (10; see 7 for additional references), apoptotic cells have been clearly identified during neural induction and neurulation in vertebrates. In the neurulating chick embryo, apoptotic cells can be observed when the neural tube is forming and regional specification is taking place. Indeed, TdT-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) of fragmented DNA, a hallmark of apoptosis, reveals dying cells in precise locations of the embryo, for instance at the anterior neuropore, the dorsal part of some prosomeres and rhombomeres, the presumptive anlage of the otic vesicle (Figure 1, A-D).

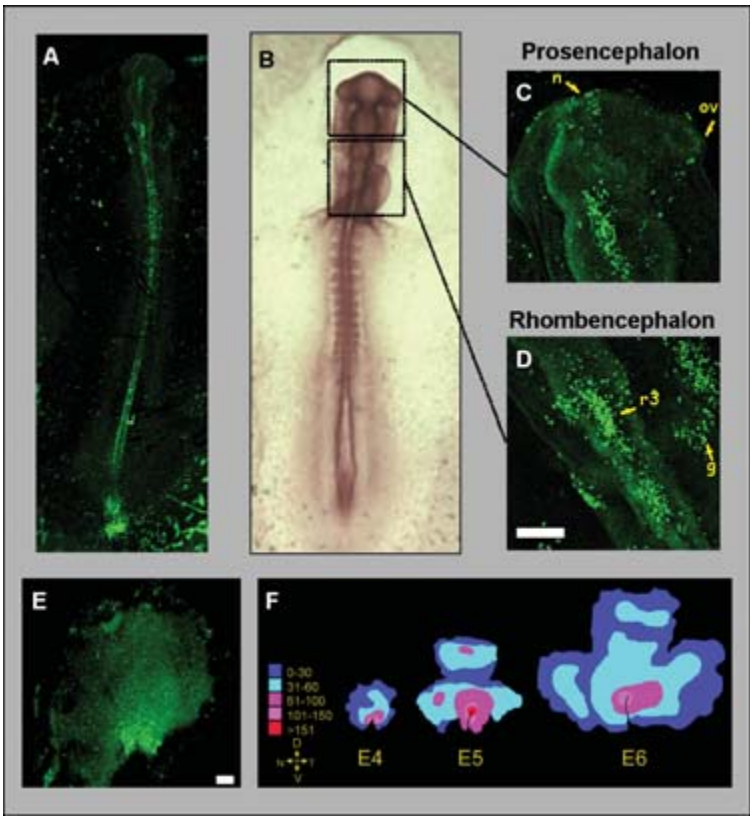


FIGURE 1. ***Distribution of cell death during early neural development in chick embryos***. *Apoptotic cells were identified by TUNEL of freshly dissected neurulating embryos (A, C, and D) or of the embryonic retina (E). The whole embryo image (A) was captured with a 2.5 × objective on a confocal microscope. Serial images (z-axis) were captured every 10 μm with a 10 × objective at the levels indicated by the insets in (B) and compiled (C, D). The main morphological features are labeled: g, presumptive otic vesicle anlage; n, anterior neuropore; ov, optic vesicle; r3, rhombomere 3 [reproduced with permission from (23); © 2002 Federation of European Neuroscience Societies]. Whole-mount E4 retina visualized with a 2.5× objective on a confocal microscope (E). The density and distribution of TUNEL positive nuclei in E4, E5 and E6 retinas is represented as isothanas depicted from labels retinas as that shown in E (F). The arbitrary pseudocolor scale corresponds to TUNEL-stained apoptotic bodies per square millimetre. The color scale represents pyknotic bodies per microscopic field (0.18 mm²). The orientation of the retinas is indicated: N, nasal; T, temporal; D, dorsal; and V, ventral. The black line represents the optic nerve fissure [reproduced with permission from (35); © 1999 Federation of European Neuroscience Societies] Calibration bar, 0.5 μm (A-B), 250 μm (C-D) and 0.4 μm (E).*

We have also characterized the process of cell death in the chick and mouse neuroretina, a classic model system in developmental neurobiology (11-14). Apoptotic cells appear throughout the development of the retina, from the early proliferative to the late synaptogenic stages (15, 16; see 17 for additional references.). Even at early developmental stages when neurogenesis begins, distinctive and prominent patterns of cell death can be seen, following the centro-peripheral gradient that parallels that of differentiation (18) (Figure 1, E-F).

EARLY NEURAL CELL DEATH AFFECTS BOTH PROLIFERATING NEUROEPITHELIAL CELLS AND RECENTLY BORN NEUROBLASTS

The presence of dying cells during early stages of neural development, neurulation and neurogenesis, implies that cells other than connecting neurons are affected since such connections are not yet established. Unfortunately, these dead cells have not been specifically identified in most studies of normal or manipulated embryos (see 7 and 9 for additional references). In the embryonic chick retina, we have identified dead cells as having recently exited S-phase of the cell cycle, since they could incorporate labelled DNA-precursors shortly before displaying apoptotic phenotype. In addition, some apoptotic cells express early neuronal markers (Figure 2).

EARLY NEURAL CELL DEATH IS A PRECISELY REGULATED PROCESS

The physiological relevance of any biological process can be confirmed by determining the mechanisms that regulate it, which also provides useful tools to define the magnitude and function, in our case of early neural cell death. Interfering with cell death at early stages produces abnormal development, as demonstrated by embryonic and genetic manipulation. Knockout-mouse studies have not only provided cues regarding the regulation of cell death but also, dramatic proof that cell death occurs during early neural

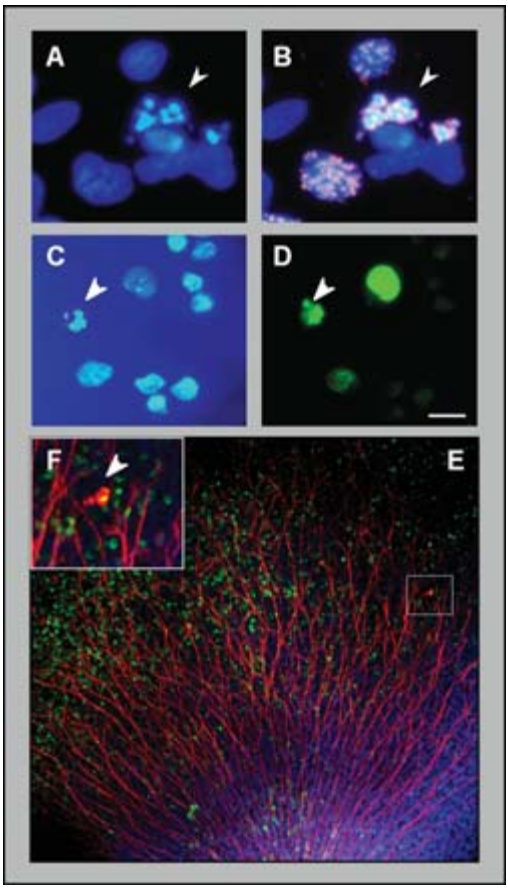


FIGURE 2. ***Characterization of the cells affected by early neural cell death.*** *E5 chick retinas were dissociated and stained with DAPI to visualize the nuclear morphology (blue in A-C). Islet 1/2 immunostaining was performed to identify recently differentiated neurons (green in D, same field as in C). E5 retinas were labeled with [^{3}H]-thymidine, dissociated and processed for autoradiography to detect proliferating cells (grains in B, same field as in A). Arrowheads indicate the pyknotic nuclei of apoptotic cells [reproduced with permission from (35); © 1999 Federation of European Neuroscience Societies and from (20); © 2000 The Company of Biologists Ltd.]. Whole-mount E5 chick retinas were triple-stained with DAPI (blue), for BrdU (green) and for TUJ1 (red). Superimposed confocal microscope images illustrate the distribution of differentiated (TUJ1-positive) and proliferative (BrdU-positive) cells (E). (F) corresponds to higher magnification field of the inset in (E), where an apoptotic, BrdU-positive and TUJ1-positive cell can be observed (arrowhead). Calibration bar, 5 μm (A-D), 50 μm (E) and 10 μm (F).*

vertebrate development. Genetic inactivation of both proapoptotic and prosurvival regulatory molecules, as well as apoptotic executor molecules, causes embryonic or perinatal lethality associated with severe malformations that mostly affects the nervous system (see 9 for a detailed review). Interestingly, morphological defects were already visible at early stages of neural development, concomitant with neurulation and the first waves of neurogenesis.

Embryonic manipulation in the chick is a classic approach that has been employed to characterize how cell death is regulated (19-24). We have focused on survival factors as attenuators of early neural cell death, and in particular proinsulin/insulin (25). *In ovo* treatment of chick embryos with insulin-receptor blocking antibodies (20), or with antisense oligonucleotides (ODNs) (21), augments apoptotic cell death (Figure 3, A-B). In the retina, the increase in apoptosis parallels a decrease in the number of retinal ganglion cells (RGCs) (Figure 3, C-D). Conversely, *in ovo* treatment with proinsulin reduces naturally occurring cell death but induces embryonic malformations, including asymmetric closure of the neuropore, collapse of the optic vesicles, and bending of the neural tube (Figure 4).

We have further characterized the putative signalling pathway downstream of proinsulin/insulin at different levels. Upon binding to its tyrosine-kinase, membrane-bound receptor, proinsulin/insulin activates both the PI3K/Akt and the Ras/Raf/MAP kinase signaling cascades. Significantly, RGC survival is regulated by c-Raf in the embryonic chick neuroretina (26) and retroviral transfection of a dominant negative form of c-Raf increases PCD while reducing the density of RGCs correctly situated in their layer (Figure 5). Furthermore, proinsulin/insulin upregulates the expression of HSC70, a chaperone involved in survival under conditions of cell stress. Blocking proinsulin expression with antisense ODNs in cultured neurulating chick embryos diminishes HSC70 expression and increases cell death (27). Indeed, antisense ODN interference experiments established a correlation between proinsulin-induced cell survival and HSC70 expression, both in cultured chick embryos and *in ovo* (23). Thus, HSC70 silencing increases caspase-3 activation and apoptosis in those embryonic regions where PCD was already naturally ongoing (Figure 6).

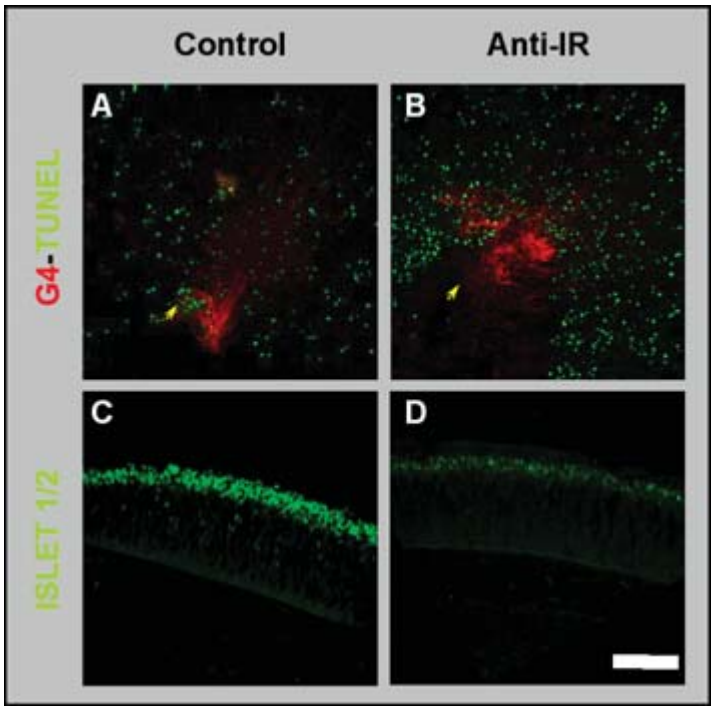


FIGURE 3. ***Interference with proinsulin/insulin signaling causes cell death in the embryonic chick retina.*** *E2 chick embryos were treated in ovo for 2 days (A, B) or for 4 days (C, D) with anti-insulin receptor Igs (Anti-IR) or the corresponding control Igs. The neuroretinas were then processed in whole-mount (A, B) or as cryosections (C, D). TUNEL (green in A and B) was employed to characterize the apoptotic cells. Immunostaining for G4/Ng-CAM (red in A, B) or for Islet 1/2 (green in C, D) was employed to identify differentiated ganglion cells. Superimposed confocal microscope images illustrate the distribution of the dead cells surrounding the optic nerve head and the retinal ganglion cell axons (A, B). Fields adjacent to the optic nerve in retinal sections show the effects of treatments on Islet1/2-positive cells [C, D: reproduced with permission from (20); © 2000 The Company of Biologists Ltd.]. Calibration bar, 50 μm.*

Caspases have traditionally been considered the main executioners in PCD (28) and their involvement in early neural cell death is supported by the phenotypes of caspase knock-out mice (29, 30, see 9 for additional references). Experimental manipulation of the chick embryo has confirmed that caspases are involved in early neural cell death (23, 24). Thus, short-term treatment of chick embryos i*n ovo*

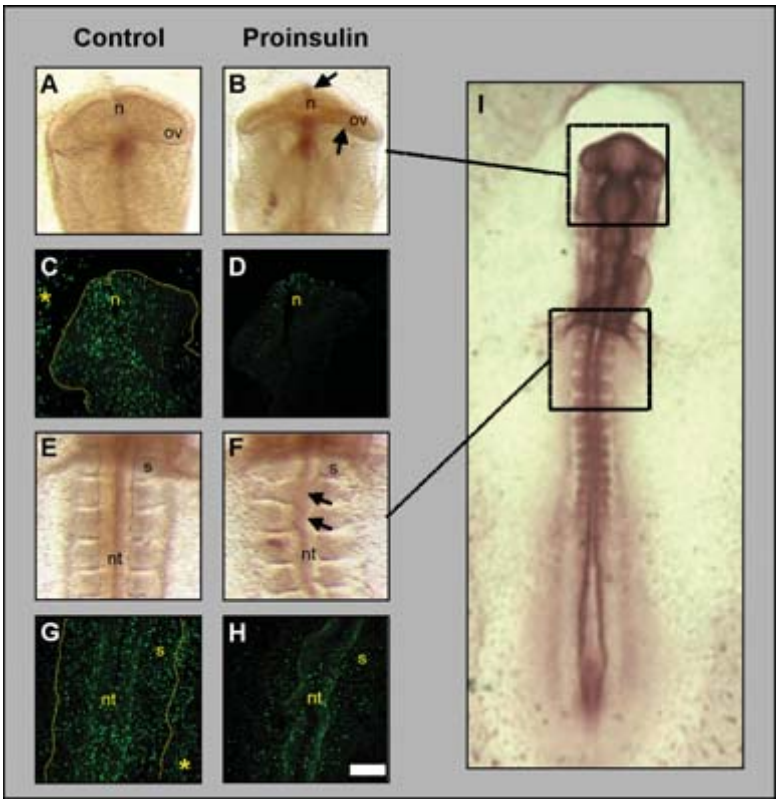


FIGURE 4. ***In ovo treatment with exogenous proinsulin reduces cell death and causes malformations***. *Embryos were treated in ovo with vehicle (A, C, E and G) or proinsulin (B, D, F and H) and after 8 h, the morphology of the embryos was evaluated by counterstaining with neutral red (A, B, E and F). Apoptotic cells were visualized by TUNEL staining of whole embryos (C, D, G and H), and serial images (z-axis) were captured with a confocal microscope every 10 μm and compiled. For orientation, the different regions shown are boxed in a photograph of the whole embryo (I). The upper box corresponds to the prosencephalon (A-D) and the lower box to neural tube and rostral somites (E-H). The main morphological features are labeled: n, anterior neuropore; ov, optic vesicle; nt, neural tube; s, somite. Arrows in (B) and (F) indicate the main morphological abnormalities [reproduced with permission from (22); © 2003 European Molecular Biology Association]. Calibration bar, 120 μm (A-H) and 200 μm (I).*

with caspase inhibitors decreases PCD and interestingly, increases the number of RGCs (Figure 7).

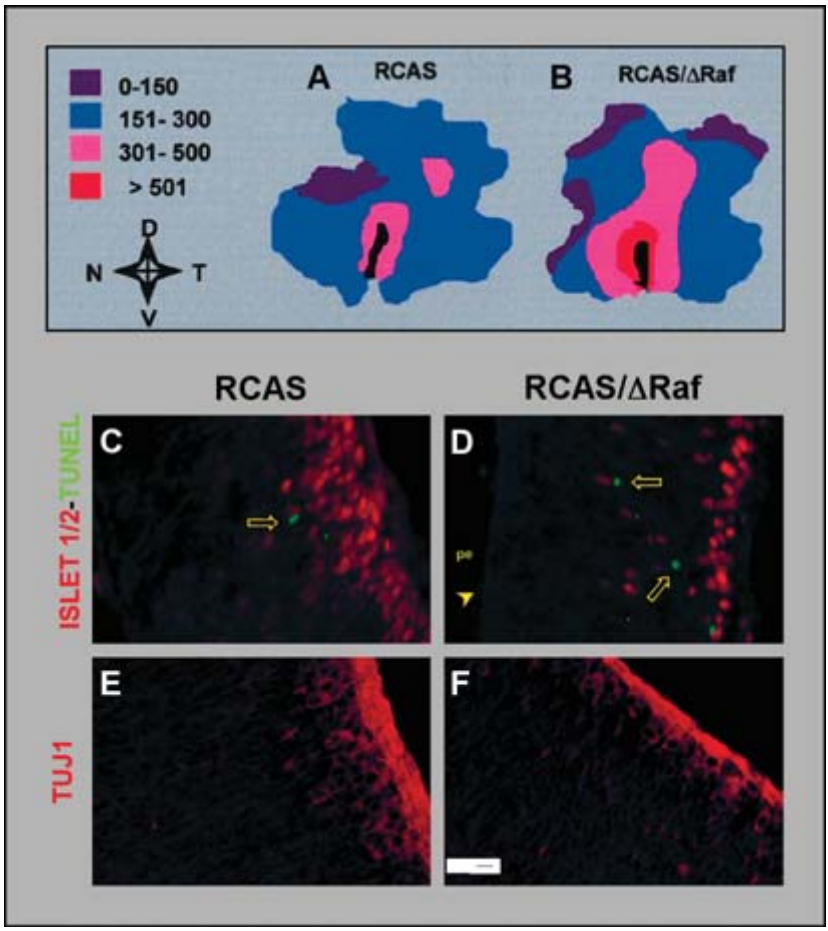


FIGURE 5. ***Interference with c-Raf causes cell death and disturbs RGC morphogenesis.*** *E4.5 chick embryos were injected intravitreally with a retrovirus carrying the indicated viral constructs (RCAS, empty vector; RCAS/ΔRaf, c-Raf dominant negative construct) and their retinas whole-mount TUNEL stained 48 h later (A, B) or immunostained as cryosections 72 h later (C-F). The density of dead cells was represented as isothanas (A, B), the pseudocolor scale indicating TUNEL-stained apoptotic bodies per square millimeter. The orientation of the retinas is indicated: N, nasal; T, temporal; D, dorsal; and V, ventral. Retinal sections were double-stained for TUNEL (green, arrows, in C, D) and the neuronal marker Islet 1/2 (red in C, D). Adjacent sections were stained for the neuronal marker TUJ1, which stains the optic fiber layer (red in E, F). The side of the pigmented epithelium (pe) is indicated (arrowhead) [reproduced with permission from (26); © 2000 Society for Neuroscience]. Calibration bar, 20 μm (C-F).*

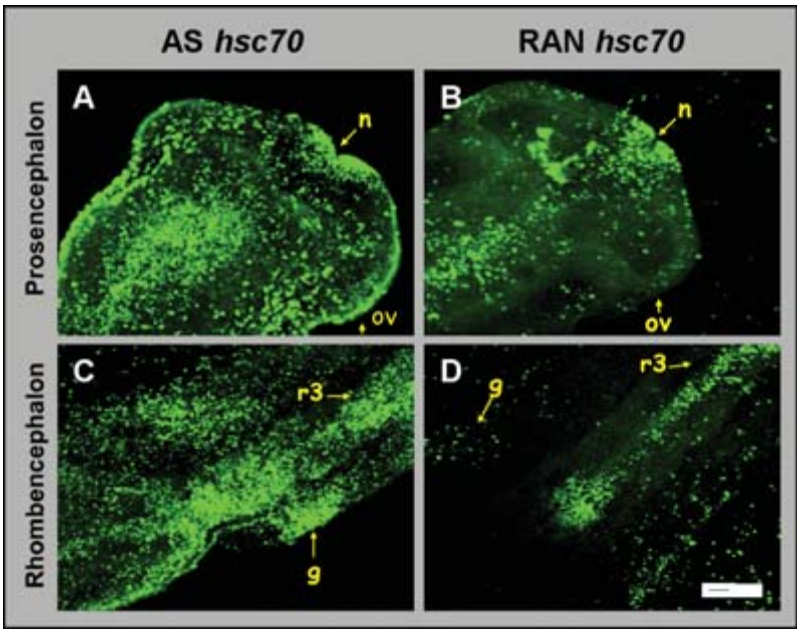


FIGURE 6. ***Interference with hsc70 causes cell death in neurulating chick embryos***. *Apoptotic cells visualized by TUNEL staining of whole HH10 embryos cultured for 8 h in the presence of either antisense ODNs to hsc70 (AS hsc70; A and C) or random control ODNs (RAN hsc70; B and D). Serial images (z-axis) were captured every 10 μm with a 10× objective on a confocal microscope and compiled: prosencephalon (A, B), rhombencephalon (C, D). The main morphological features are labeled: g, presumptive otic vesicle anlage; n, anterior neuropore; ov, optic vesicle; r3, rhombomere 3 [reproduced with permission from (23); © 2002 Federation of European Neuroscience Societies]. Calibration bar, 200 μm.*

FUTURE PERSPECTIVES

Perturbing RGC generation is a common result of our *in ovo* manipulations. Interference with prosurvival signals, such as proinsulina/insulin or c-Raf, reduces the number of RGCs by 50% (see Figures 3 and 5) (20, 26), whereas blocking cell death doubles the number of RGC (see Figure 7) (24). This susceptibility of RGCs to death, together with a detailed analysis of the available knock-out mouse models should provide valuable tools to determine the functional role of early neural cell death (9, 17).

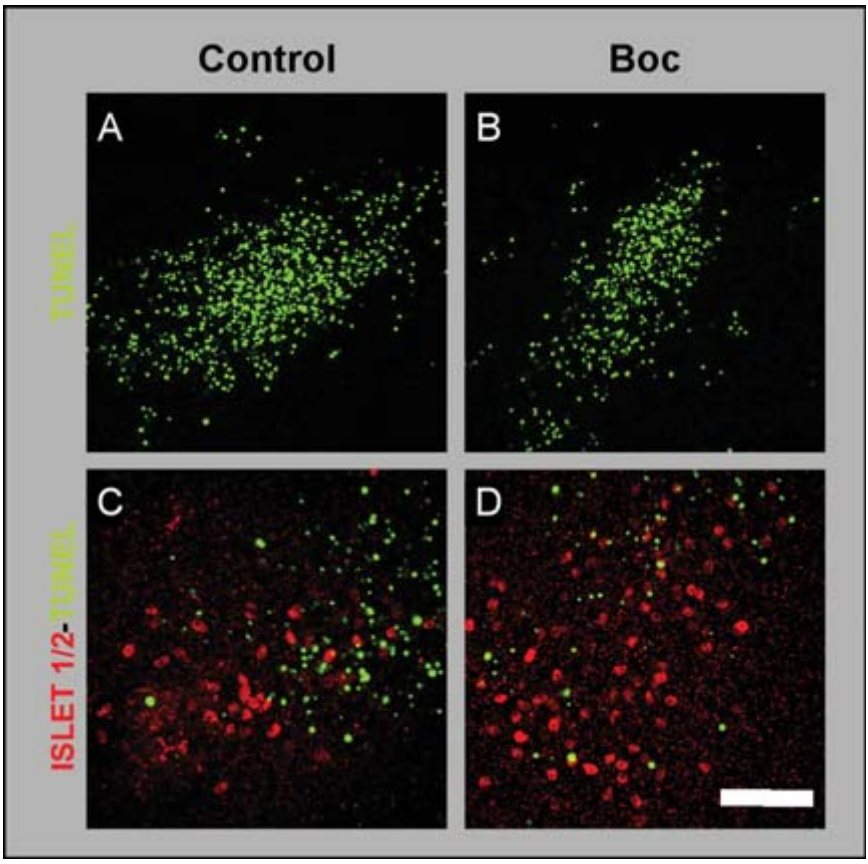


FIGURE 7.- ***Effect of caspase inhibition on the generation of RGCs.*** *HH17 chick embryos were treated in ovo for 6 h with either vehicle (Control; A and C) or with the broad-range caspase inhibitor Boc-D-fmk (Boc; B and D). Following treatment, whole-mount retinas were stained for TUNEL (green in A-D) to visualize apoptotic cells, and Islet 1/2 (red in C, D) to identify RGCs. (C) and (D) correspond to higher magnification fields, where the increase in the number of Islet 1/2 positive cells can be observed [reproduced with permission from (24); © 2003 Federation of European Neuroscience Societies]. Calibration bar, 200 μm (A, B) and 50 μm (C, D).*

In addition, since deregulated cell death seems to be associated with the progress of neurodegenerative disorders, new findings on the regulation of physiological cell death during neural development may be extrapolated to pathological conditions (31-34). Indeed, a

preliminary exploration of the neuroprotective role of proinsulin has rendered promising results in a mouse model of retinitis pigmentosa. Neurodegenerative diseases have a dramatic impact not only the patients and their families but also, on society as a whole. Thus, there is a need for intense basic and oriented research to provide new therapeutic approaches to prevent neurodegeneration.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Teresa Chavarría for contributing Figure 2 E and F, and present and past members of the laboratory for their dedication to the scientific projects. Research in the laboratory is funded by grants-in-aid from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2007-66175-C02-01 to EJdlR, BFU2007-61055/BMC to FdP, and BFU2006-00508 to PB). VGV is supported by a I3P contract from the CSIC, and PB by a Ramón y Cajal contract from the Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCES

(1) OPPENHEIM, R.W. (1985) Naturally ocurring cell death during neural development. *Trends Neurosci.* 8: 487-493.
(2) PURVES, D. (1986) The trophic theory of neural connections. *Trends Neurosci.* 9: 486-489.
(3) KUAN, C.Y.; ROTH, K.A.; FLAVELL, R.A. AND RAKIC, P. (2000) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci.* 23: 291-297.
(4) ROTH, K.A. AND D'SA, C. (2001) Apoptosis and brain development. *Ment. Retard Dev. Disabil. Res. Rev.* 7: 261-266.
(5) DAVIES, A.M. (2003) Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J.* 22: 2537-2545.
(6) BUSS, R.R.; SUN, W. AND OPPENHEIM, R.W. (2006) Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* 29: 1-35.
(7) DE LA ROSA, E.J. AND DE PABLO, F. (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* 23: 454-458.
(8) YEO, W. AND GAUTIER, J. (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev. Biol.* 274: 233-244.
(9) BOYA, P. AND DE LA ROSA, E.J. (2005) Cell death in early neural life. *Birth Defects Res. C. Embryo Today.* 75: 281-293.

(10) GLÜCKSMANN, A. (1951) Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26: 59-86.
(11) CEPKO, C.L.; AUSTIN, C.P.; YANG, X.; ALEXIADES, M. AND EZZEDDINE, D. (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 589-595.
(12) HARRIS, W.A. (1997) Cellular diversification in the vertebrate retina. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 651-658.
(13) MARQUARDT, T. AND GRUSS, P. (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci.* 25: 32-38.
(14) ADLER, R. (2005) Challenges in the study of neuronal differentiation: a view from the embryonic eye. *Dev. Dyn.* 234: 454-463.
(15) PEQUIGNOT, M.O.; PROVOST, A.C.; SALLE, S.; TAUPIN, P.; SAINTON, K.M.; MARCHANT, D.; MARTINOU, J.C.; AMEISEN, J.C.; JAIS, J.P. AND ABITBOL, M. (2003) Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Dev. Dyn.* 228: 231-238.
(16) CHAVARRIA, T.; VALENCIANO, A.I.; MAYORDOMO, R.; EGEA, J.; COMELLA, J.X.; HALLBOOK, F.; DE PABLO, F. AND DE LA ROSA, E.J. (2007) Differential, age-dependent MEK-ERK and PI3K-Akt activation by insulin acting as a survival factor during embryonic retinal development. *Dev. Neurobiol.* 67: 1777-1788.
(17) VALENCIANO, A.I.; BOYA, P. AND DE LA ROSA, E.J. (2008) Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina. *Int. J. Dev. Biol.* (in press).
(18) PRADA, C.; PUGA, J.; PEREZ-MENDEZ, L.; LOPEZ, R. AND RAMIREZ, G. (1991) Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *Eur. J. Neurosci.* 3: 559-569.
(19) WEIL, M.; JACOBSON, M.D. AND RAFF, M.C. (1997) Is programmed cell death required for neural tube closure? *Curr. Biol.* 7: 281-284.
(20) DIAZ, B.; SERNA, J.; DE PABLO, F. AND DE LA ROSA, E.J. (2000) In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development.* 127: 1641-1649.
(21) HERNANDEZ-SANCHEZ, C.; RUBIO, E.; SERNA, J.; DE LA ROSA, E.J. AND DE PABLO, F. (2002) Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes.* 51: 770-777.
(22) HERNANDEZ-SANCHEZ, C.; MANSILLA, A.; DE LA ROSA, E.J.; POLLERBERG, G.E.; MARTINEZ-SALAS, E. AND DE PABLO, F. (2003) Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level. *EMBO J.* 22: 5582-5592.
(23) RUBIO, E.; VALENCIANO, A.I.; SEGUNDO, C.; SANCHEZ, N.; DE PABLO, F. AND DE LA ROSA, E.J. (2002) Programmed cell death in the neurulating embryo is prevented by the chaperone heat shock cognate 70. *Eur. J. Neurosci.* 15: 1646-1654.
(24) MAYORDOMO, R.; VALENCIANO, A.I.; DE LA ROSA, E.J. AND HALLBOOK, F. (2003) Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *Eur. J. Neurosci.* 18: 1744-1750.
(25) DE PABLO, F.; HERNANDEZ-SANCHEZ, C.; VICARIO-ABEJON, C. AND DE LA ROSA, E.J. (2005) Old hormones of the insulin family as new developmental signals. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 71: 765-782.

(26) PIMENTEL, B.; SANZ, C.; VARELA-NIETO, I.; RAPP, U.R.; DE PABLO, F. AND DE LA ROSA, E.J. (2000) c-Raf regulates cell survival and retinal ganglion cell morphogenesis during neurogenesis. *J. Neurosci.* 20: 3254-3262.

(27) DE LA ROSA, E.J.; VEGA-NUNEZ, E.; MORALES, A.V.; SERNA, J.; RUBIO, E. AND DE PABLO. F. (1998) Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 9950-9955.

(28) THORNBERRY, N.A. AND LAZEBNIK, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science.* 281:1312-1316.

(29) KUIDA, K.; ZHENG, T.S.; NA, S.; KUAN, C.; YANG, D.; KARASUYAMA, H.; RAKIC, P. AND FLAVELL, R.A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 384: 368-372.

(30) KUIDA, K.; HAYDAR, T.F.; KUAN, C.Y.; GU, Y.; TAYA, C.; KARASUYAMA, H.; SU, M.S.; RAKIC, P. AND FLAVELL, R.A. (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell.* 94: 325-337.

(31) MATTSON, M.P. (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 120-129.

(32) NICHOLSON, D.W. (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature.* 407: 810-816.

(33) VARELA-NIETO, I.; DE LA ROSA, E.J.; VALENCIANO, A.I. AND LEON, Y. (2003) Cell death in the nervous system: lessons from insulin and insulin-like growth factors. *Mol. Neurobiol.* 28: 23-50.

(34) SCHAFER, Z.T. AND KORNBLUTH, S. (2006) The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev. Cell.* 10: 549-561.

(35) DIAZ, B.; PIMENTEL, B.; DE PABLO, F. AND DE LA ROSA, E.J. (1999) Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur. J. Neurosci.* 11: 1624-1632.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1047-1078

Revisión

Desarrollo de vacunas contra el VIH/SIDA

Recibido el 12 de noviembre de 2007

MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ*
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Profesor de Investigación del CSIC, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid

RESUMEN

La pandemia causada por el virus de la inmunodeficiencia humana HIV-1 continua afectando a la población mundial, unos 40 millones según la OMS, con 14.000 nuevas infecciones diarias y con más de 22 millones de muertes desde su aparición. Aunque los antirretrovirales pueden controlar la infección, la dificultad de aplicar dichas terapias en países pobres y el hecho de que el virus mute con rapidez y se haga resistente, nos obliga a desarrollar una vacuna eficaz contra el VIH-1. Para alcanzar estos objetivos es necesario un esfuerzo global con un mayor incremento en la diversidad de los esfuerzos en I+D de vacunas del SIDA. Aunque ha habido progresos en el desarrollo de candidatos vacunales, sin embargo aun no se ha conseguido una vacuna con probada eficacia clínica. En esta revisión se analizan retos pendientes, potencial para acelerar el desarrollo de vacunas, aspectos relevantes de la biología del VIH y vacunas en ensayos clínicos. Así mismo se valora el potencial de vectores de poxvirus (estirpes atenuadas MVA y NYVAC) como posibles candidatos vacunales contra el VIH, especialmente los subtipos de B y C que son los de mayor prevalencia. Nuestro grupo, que ha participado en los ensayos preclínicos y clínicos (fase I) obtenidos con dichos vectores nos aportan indicadores inmunológicos que son esperanzadores. El reto es conseguir una vacuna capaz de producir niveles altos de anticuerpos neutralizantes contra los distintos subtipos y variantes del VIH, así como ser capaz de activar linfocitos T CD4+

* **Información de Contacto:**
Dr. Mariano Esteban Rodríguez.
Profesor de Investigación del CSIC, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid
www.cnb.uam.es.
e-mail: mesteban@cnb.uam.es

y CD8+ y células memoria específicas, para inactivar al virus circulante y destruir a las células infectadas.

Palabras clave: vacunas VIH/SIDA, progreso, vectores de poxvirus, MVA y NYVAC.

SUMMARY

Development of vaccines against HIV/AIDS

The pandemic caused by the human immunodeficiency virus (HIV-1) continues unabated worldwide, with about 40 million people infected, 14.000 new infections daily and with more than 22 million deaths since it first appeared. While the combined antiretroviral therapy has been shown to control the disease, however, it is difficult to get implemented in the poor countries and, moreover, the high rate of virus mutation dictates that the only way to control and eliminate the disease will be through the use of an effective vaccine. To reach this goal, it requires a global effort to enhance collaborations and increase R&D funding on HIV vaccines. Although there has been progress in the development of new vaccine candidates, however, not a single candidate has shown protective efficacy in clinical trials. In this revision, we analyzed initiatives, potential to accelerate development of new vaccines, relevant aspects on HIV biology, and current HIV vaccines in clinical trials. We will also evaluate the potential of two of the poxvirus vectors (MVA and NYVAC) as vaccine candidates, particularly for subtypes B and C, the most prevalent HIV strains worldwide, and the information we have obtained through preclinical studies and clinical trials with these vectors. The goal is to generate a vaccine capable of triggering high titer of neutralizing antibodies against the different HIV subtypes and variants, as well as to induce specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes and memory cells in order to eliminate the circulating virus and destroy the HIV infected cell populations.

Key words: HIV/AIDS vaccines, progress, poxvirus vectors, MVA and NYVAC.

ANTECEDENTES

En 2006, más de 5 millones de personas contrajeron la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que supone la mayor cifra de nuevas infecciones registrada en un solo año desde el principio de la epidemia hace más de dos décadas. Al menos 40 millones de personas han contraído la infección por VIH hasta la fecha y se calcula que cada día se producen unas 14.000 nuevas infecciones, o lo que es lo mismo unas 600 cada hora. El SIDA ha causado mas de 22 millones de defunciones y la epidemia global no

muestra signo alguno de abatimiento. Su impacto trasciende diferencias de género, de edad, de orientación sexual, de estatus socioeconómico o nacionalidad (1).

Un 95% de las nuevas infecciones por VIH se da en los países en desarrollo y África se lleva una parte completamente desproporcionada de la epidemia, lo que supone casi dos tercios del total global de personas que viven con VIH/SIDA, pero sólo un 10% de la población mundial. Las diferencias geográficas y económicas de esta enfermedad son evidentes, donde mas del 95% de los casos y 95% de las muertes por SIDA ocurren en el tercer mundo (70% en África), sobre todo entre jóvenes adultos, con un incremento progresivo entre las mujeres (OMS, 2005). Es dramático contemplar cómo en África, región sub-sahariana, la epidemia sigue extendiéndose y que en muchos países los porcentajes de personas infectadas y con SIDA son muy elevados, lo que tiene efectos devastadores para las familias y para la economía productiva (2, 3). España continua siendo el país con mayor número de personas infectadas por el VIH de la Unión Europea (UE).

La pandemia del SIDA se ha convertido en una de las grandes crisis no sólo de salud pública, sino también de desarrollo global. En muchos países, el SIDA está destruyendo los avances en desarrollo tan duramente conquistados durante las ultimas décadas: el SIDA lleva a las familias a la pobreza, disminuye la esperanza de vida, incrementa sin descanso el número de huérfanos, infla los gastos sociales y sanitarios y debilita las economías de unos países que se ven incapaces de ser partícipes del desarrollo económico global. Esta erosión constante continuará a menos que consigamos frenar la extensión del SIDA, particularmente en Asia y en África.

Los programas de prevención existentes han ralentizado la extensión de nuevas infecciones en algunos lugares, pero son incapaces de frenar la extensión de la pandemia. Los descubrimientos en tratamientos han producido terapias importantes contra el SIDA, pero estos fármacos no constituyen una cura, y su coste y complejidad de uso los sitúan fuera del alcance de la inmensa mayoría de las personas que los necesitan en el mundo en desarrollo.

La necesidad de asegurar el acceso a tratamientos para los millones de personas que ya sufren de SIDA ha de ser prioridad absoluta

de las actuales políticas del SIDA. Sin embargo, la historia de las enfermedades infecciosas nos enseña con creces que sólo una vacuna preventiva segura y eficaz será capaz de romper el ciclo de nuevas infecciones y de, en ultima instancia, hacer que revierta y acabe la pandemia: la viruela se erradicó en 1980 gracias a una vacuna eficaz; la polio ya ha desaparecido del continente americano y se espera que esté completamente controlada hacia el final de 2007 (si bien se seguirán administrando vacunas inactivadas en áreas endémicas), el sarampión y la fiebre amarilla se han controlado gracias a vacunas. Una vacuna contra el SIDA debe añadirse cuanto antes a esta lista (4-7).

La ciencia actual del VIH nos indica que las perspectivas de éxito nunca han sido mayores: se ha conseguido la protección en primates no humanos con vacunas experimentales contra el SIDA y por inmunización pasiva con anticuerpos neutralizantes frente al VIH; algunas personas repetidamente expuestas al VIH resisten la infección y generan respuestas específicas contra el VIH, ofreciendo así claves importantísimas para el diseño de vacunas eficaces contra la infección; y los avances espectaculares en el conocimiento de la biología molecular y la ciencia básica del VIH han llevado al desarrollo de nuevas estrategias para la construcción de vacunas eficaces contra este virus.

El posible impacto de la aceleración del descubrimiento de una vacuna contra el SIDA, en términos de infecciones evitadas, vidas salvadas y beneficios económicos para los países pobres sería inmenso. Se espera que en los próximos 3 años y con el ritmo actual de transmisiones se produzcan entre 13 y 19 millones de nuevas infecciones por VIH, aunque las predicciones más pesimistas sugieren que esta cifra podría llegar a los 30 millones. Incluso si una vacuna redujera la transmisión en un cuarto o un tercio, sus beneficios económicos y de salud pública serían enormes.

La necesidad de un esfuerzo global

Sin embargo, para desarrollar una vacuna contra el VIH/SIDA, hemos de superar importantes retos científicos y de organización que necesitan de una respuesta integral y de las contribuciones res-

pectivas de la comunidad global, la Unión Europea y sus estados miembros, incluida España.

No existe una organización o gobierno que pueda acabar por sí sólo con la pandemia del SIDA, de la misma forma que no existe un país, región o comunidad inmune al VIH. Todos debemos desempeñar un papel en el esfuerzo para controlar esta pandemia, de forma que con un mayor compromiso por parte de gobiernos, fundaciones, científicos y empresas, el mundo tenga finalmente una oportunidad real de crear una vacuna para acabar con el SIDA para siempre.

El desarrollo de una vacuna contra el SIDA para salvar vidas y economías habrá de ser uno de los grandes logros de nuestro tiempo. No conseguirlo sería uno de sus grandes fracasos.

Progresos hasta la fecha

En los últimos 10 años los progresos realizados en varias áreas han sido considerables. Las contribuciones tanto de la Iniciativa Internacional por una Vacuna contra el SIDA (IAVI), desde un punto de vista global, como de la Fundación Europea para el desarrollo de una vacuna contra el VIH/SIDA (EuroVacc), de la cual soy miembro Fundador, han sido críticas para la consecución de algunos de los siguientes avances en el campo de la investigación y desarrollo de vacunas contra el SIDA:

- Aumento del número de vacunas candidatas en varias fases de desarrollo e investigación;
- Construcción de capacidad de laboratorio y de centros de investigación clínica para la conducción de ensayos de eficacia en países en desarrollo e implicación de estos países en la búsqueda de vacunas seguras y eficaces;
- Aumento del compromiso político y económico global hacia la I+D en vacunas del SIDA.

Estos progresos resultan aún más significativos si tenemos en cuenta los numerosos y costosos estadios de desarrollo que se necesitan para crear construcciones vacunales viables y para llevarlos a la investigación clínica (o sea, con seres humanos).

Retos pendientes

A pesar de los progresos descritos más arriba, lo cierto es que todavía existen obstáculos de envergadura que dificultan el progreso en el campo de la I+D vacunas del SIDA. Al carecer de incentivos, la industria farmacéutica no ha invertido cantidades significativas de capital intelectual y económico en este ámbito de investigación y, por lo demás, la complejidad de los retos científicos no hace sino desincentivar aún más la asunción de riesgos del capital privado. Por otra parte, la escasez de recursos locales que abruma a muchos de los gobiernos de los países más afectados por la epidemia erosiona su capacidad de liderazgo a la hora de establecer programas de desarrollo de vacunas y asumir un papel fuerte en su defensa junto con los países industrializados más comprometidos en esta empresa.

Los científicos que trabajan en centros académicos, que constituyen el principal grupo de investigadores de nuevos conceptos de vacunas, suelen carecer de los recursos económicos y de la experiencia en asuntos reguladores y de fabricación necesaria para sacar las vacunas del laboratorio y moverlas hacia las etapas de testado clínico y producción a mayor escala. Por último, y a pesar de las contribuciones crecientes de algunos países a la investigación nacional e internacional en vacunas del SIDA, el compromiso financiero y político de muchos gobiernos del mundo continúa siendo insuficiente.

En su *Plan Científico 2004 para Acelerar los Esfuerzos Globales en I+D de Vacunas del SIDA*, hecho público durante la Conferencia Internacional del SIDA de Bangkok en 2004, IAVI examinó los progresos realizados hasta la fecha, identificó los retos pendientes e hizo recomendaciones para fortalecer y acelerar los esfuerzos de investigación. Este documento señala varios retos adicionales, como por ejemplo:

- **Incremento de la diversidad de los esfuerzos en I&D de vacunas del SIDA:** A pesar de que aproximadamente 30 candidatos vacunales se encuentran actualmente en ensayos clínicos, la mayor parte de estas vacunas se centra en una sola estrategia de vacunación conocida como de «inmunidad por mediación celular», lo que en última instancia deja al mundo

sin alternativas en el caso de que esta estrategia no de los resultados esperados.

- **Dar prioridad a los mejores candidatos:** No existe un consenso global sobre cómo deben evaluarse y cómo dar prioridad a las vacunas candidatas para moverlas a las fases de investigación clínica. Además, la posible comparación entre los datos de investigación de distintos candidatos vacunales es limitada.
- **Implicación de los países en desarrollo en ensayos de eficacia:** A día de hoy la capacidad de infraestructuras existentes en los países en desarrollo más castigados por la pandemia permitiría la conducción de un ensayo de eficacia a gran escala o como mucho de dos, a pesar de que la urgencia de la crisis del SIDA requeriría el desarrollo y testado clínico simultáneo de múltiples vacunas candidatas.
- **Financiación del esfuerzo necesario:** En general, la financiación del esfuerzo global en I+D de vacunas contra el SIDA sigue siendo seriamente insuficiente, y ello a pesar de las contribuciones de varios gobiernos europeos y norteamericanos, de la Fundación Bill & Melinda Gates o del Banco Mundial, entre otros. La inversión actual resulta simplemente insuficiente para sufragar un esfuerzo acelerado en I+D de vacunas del SIDA.
- **Aumento de la colaboración:** el campo de las vacunas del SIDA dista de estar configurado de forma óptima para facilitar el desarrollo rápido de una vacuna contra el SIDA. Para mejorar en eficacia y rapidez es necesario que los grupos de investigación compartan más información, que se puedan realizar comparaciones directas entre vacunas candidatas y que los investigadores de más talento trabajen juntos para abordar los retos científicos fundamentales.

Recientemente, hemos sido testigos de un progreso sustancial a la hora de desarrollar respuestas adecuadas a varios de estos retos. Durante la cumbre del Grupo de los 8 (G-8) en 2005, los estados miembros se comprometieron a incrementar su apoyo a las vacunas del SIDA y suscribieron el concepto de una *Global AIDS Vaccine Enterprise*, o «Iniciativa Global para las Vacunas del SIDA». En

Europa, el buen momento generado por la conferencia de Presidentes de la UE en Dublín sobre vacunas y microbicidas continúa creciendo, y el anuncio de Gran Bretaña sobre la posible creación de un instrumento financiero internacional, además de la publicación del informe de la comisión sobre África, constituyen avances muy prometedores. En 2006 la Fundación Bill y Melinda Gates anunció la concesión de 16 proyectos de investigación sobre vacunas del VIH/SIDA con un importe cercano a los 300 millones de dólares (en uno de los proyectos concedidos figura mi grupo), lo que supone un avance considerable de financiación en la búsqueda de una vacuna contra el VIH/SIDA.

EL POTENCIAL PARA ACELERAR EL DESARROLLO DE VACUNAS

Hay dos formas principales de acelerar el descubrimiento y el desarrollo de una vacuna del SIDA: **aumentando el número de vacunas candidatas** de alta calidad y viables que entran y avanzan en su desarrollo desde los estudios de seguridad de Fase I hasta los estudios de Fase III y la aprobación del producto; y **aumentando la calidad de tales candidatas** y sus posibilidades de progresar con éxito a través de las distintas fases de desarrollo mediante mejoras en la investigación aplicada y en las técnicas de testado de vacunas, como por ejemplo los estándares de medición de laboratorio.

Para conseguir doblar el número de vacunas candidatas viables construidas —lo que reduciría en varios años la consecución de una vacuna de éxito— y para elevar la calidad general de la cantera de candidatas, la inversión en I+D de vacunas del SIDA debe aumentar desde los niveles actuales de alrededor de **600 millones de euros al año hasta aproximadamente unos 1.200 millones de euros al año.**

Aunque es de vital importancia que las autoridades nacionales de salud e investigación continúen apoyando un amplio rango de actividades de investigación básica que conduzcan a la adquisición de nuevos conocimientos científicos sobre el VIH que pudieran traducirse en diseños de vacunas mejoradas, esta investigación básica debe necesariamente complementarse con esfuerzos y recursos aumentados para

abordar las preguntas críticas de ciencia aplicada (por ejemplo, cómo generar respuestas de anticuerpos neutralizadores de amplio espectro), y para dar prioridad al desarrollo y testado de las vacunas más prometedoras en ensayos clínicos sobre el terreno.

Para generar vacunas candidatas susceptibles de entrar en el proceso de desarrollo de producto y superar con éxito las distintas fases de los ensayos clínicos es necesario realizar mayores esfuerzos de inversión en los estadios de ciencia básica y preclínica. Como ya hemos mencionado anteriormente, aunque es cierto que parte de este gasto debe invertirse en centros donde se conducen trabajos iniciados por investigadores en ciencia básica y apoyados por las agencias nacionales de investigación, una parte significativa de los aumentos en inversión deben dirigirse a la investigación centrada en objetivos y conducida por entidades colaboradoras a gran escala.

La creación de una vacuna frente al VIH/SIDA representa un gran reto científico. Las aproximaciones tradicionales de crear vacunas han fracasado, tanto aquellas basadas en virus atenuado de VIH por su capacidad para mutar y recuperar la patogenicidad, como virus VIH inactivado o basado en proteínas purificadas que inducen anticuerpos neutralizantes pero con especificidad sólo del virus homólogo, y no inducen inmunidad celular. Indudablemente nuevas aproximaciones vacunales son necesarias. Comentaremos a continuación aspectos relevantes en la biología del virus y dificultades para desarrollar una vacuna.

EL VIH Y DIFICULTADES

El VIH se transmite principalmente por contacto sexual, transfusión sanguínea y uso de jeringuillas contaminadas, por lo que el virus puede iniciar la infección atravesando la barrera de mucosas o por infección directa de células T o de monocitos/macrófagos en sangre. Debido a que el virus se puede transmitir como virus libre o asociado a las células, su control requiere de la activación de mecanismos inmunológicos que actúen sobre la partícula viral, como serían los anticuerpos neutralizantes o sobre la célula infectada, en el caso de células T citotóxicas. Ello hace que para que una vacuna

sea eficaz es necesario activar tanto la respuesta humoral como la celular. Una dificultad añadida es la alta tasa mutacional del virus lo que conlleva a crear resistencia frente a drogas antirretrovirales y escapar a la acción de los anticuerpos. Cada célula infectada contiene al menos un genoma viral distinto del que causó la infección inicial, lo que origina el fenómeno de «cuasiespecies» y la dificultad para eliminar a todos los genomas virales que se diferencian entre si por mutaciones en distintas regiones del genoma. Aunque los aislados del VIH son muy diversos en su secuencia, estos virus se agrupan en distintos subtipos, entre los que el subtipo B es el mas prevalente en Europa y América del Norte, mientras que el subtipo C se encuentra mayoritariamente en África e India. Aproximadamente el 80% de todas las infecciones por VIH están causadas por los subtipos B y C, de las que el subtipo C representa actualmente el 50% de las infecciones.

Durante el proceso de infección que ocurre por unión del virus a través de la proteína Env con los linfocitos T CD4+ que contienen el receptor de quimioquinas CCR5 o CXCR4, se producen en las primeras horas abundantes partículas infectivas con la consiguiente muerte y destrucción de las células infectadas. La mayor parte de las células infectadas y partículas virales son eliminadas rápidamente por activación de una respuesta inmune específica, pero sin embargo una pequeña población de células infectadas permanecen y van a ser las responsables del mantenimiento de la infección y cronicidad de la misma. Aunque se produce una respuesta inmune humoral, los niveles de anticuerpos neutralizantes son bajos y aparecen después del control inicial de la infección por la respuesta inmune celular. Sin embargo estos anticuerpos no van a poder controlar la infección posterior debido a la aparición de mutantes virales que escapan dicha acción neutralizante. Los datos experimentales apoyan a que es la respuesta celular la que controla la infección viral, tanto durante la infección primaria como en la cronicidad de la infección. Así pues, células T CD8+ aisladas de individuos HIV+ pueden controlar la infección del VIH-1 cuando se añaden a células autólogas CD4+ del mismo paciente y esta inhibición es mediada por acción directa de la destrucción celular por linfocitos T citotóxicos y por la producción de moléculas mediadoras de la acción antiviral, como son quimioquinas (CCL3, CCL-4, CCL-5) y citoquinas (IL-2,

IL-12, IFN-gamma). Niveles altos de linfocitos T citotóxicos CD8+ se asocian con un mejor estado clínico en pacientes seropositivos y crónicos, por lo que una vacuna debe de inducir una potente respuesta celular específica frente al VIH.

Como se mencionó anteriormente, uno de los grandes problemas en el desarrollo de una vacuna frente al VIH es la diversidad genética de las poblaciones virales que se producen durante la infección. Las mutaciones virales se acumulan rápidamente mientras replica el VIH de tal forma que pueden variar entre si, en un 20% en relación a las proteínas mas conservadas y en un 35% en relación a las menos conservadas como Env Las implicaciones de la diversidad antigénica también puede afectar a la especificidad de la respuesta celular CD8+, por lo que es importante utilizar como inmunógeno varios antígenos virales. Un mutación puntual puede eliminar un epítopo inmunodominante. La presencia de antígenos virales conservados puede favorecer la inducción de una respuesta inmune contra distintos subtipos.

VACUNAS EN ENSAYOS CLÍNICOS

A pesar del esfuerzo considerable que se ha realizado en el desarrollo de una vacuna contra el VIH, hasta hoy solamente la eficacia de un prototipo de vacuna ha sido completada en ensayos en humanos. Se trata de la proteína de la envuelta gp120 administrada junto con el adyuvante alúmina (empresa VaxGen), que aunque había inducido protección en el modelo de chimpancé, sin embargo no demostró eficacia alguna en el ensayo clínico. La vacuna produjo anticuerpos pero no eran capaces de neutralizar aislados del VIH obtenidos de la sangre de personas infectadas. Estos datos supusieron una frustración para la comunidad científica que esperaba mejores indicios de que la inmunización con la proteína gp120 activara alguna respuesta positiva. Uno de los problemas encontrados es que la vacuna se basaba en la forma monomérica de la proteína gp120, mientras que la proteína Env en el virus se encuentra como trímero y asociada al dominio transmembrana gp41, que se separa por acción de proteasas específicas, del tipo furina, cortando el precursor gp160 en gp120 y gp41.

TABLA 1. ***Dificultades en el desarrollo de una vacuna eficaz frente al VIH/SIDA.***

	Dificultades en el desarrollo de una vacuna frente al VIH/SIDA
Virus	Hipervariabilidad del VIH Los antígenos requeridos para conferir protección aún no se han identificado El VIH infecta, suprime y destruye las células clave del sistema inmune Existen limitaciones en los modelos animales para estudiar el VIH/SIDA
Respuesta inmune	La inmunidad natural no erradica al virus Los determinantes inmunológicos de protección aún no se han identificado El papel de la inmunidad natural innata está poco estudiado Es posible la re-ínfección por un segundo aislado del VIH
Transmisión y patogénesis	El VIH se transmite como partícula libre o asociado a las células El VIH se transmite por contacto sexual o por ruta intravenosa El ciclo de replicación del VIH incluye su integración en el genoma del huésped Puede permanecer durante largos períodos de tiempo en estado de latencia Preparación, producción y escalado a fase clásica de los candidatos vacunales.

A pesar del fracaso inicial, se puso en marcha otro ensayo clínico en fase III de eficacia con 16.000 voluntarios en Tailandia utilizando un régimen de administración de dos inmunógenos en combinación (*prime/boost*): una primera inoculación por via intramuscular (i.m) con el vector ALVAC-HIV (Sanofi-Pasteur), un poxvirus de canarios que expresa varios antígenos del VIH-1 (env y gag-pol de los subtipos B, E), seguido al cabo de un mes por una segunda inmunización intramuscular (i.m) con la proteína gp120 (subtipos, B, E, VaxGen). A finales del año 2007 se conocerán los primeros datos sobre la eficacia de dicho proceso de vacunación. Este ensayo ha recibido grandes críticas de la comunidad científica, ya que tanto ALVAC como gp120 administrados de forma independiente no han aportado datos significativos de inmunogenicidad en humanos, mas bien inducen una pobre respuesta. Nuestro grupo demostró hace años en

modelo de ratón que la inmunización con un vector de poxvirus que expresa el antígeno LACK de *Leishmania infantum* era capaz de inducir protección frente al parásito si se administraba una segunda dosis de proteína purificada LACK antes del desafío (8). Nuestros resultados apoyan que la combinación de los dos inmunógenos, ALVAC+gp120 incremente el grado de respuesta inmune frente al antígeno del VIH en el ensayo clínico. Así pues, hay que esperar a los resultados de eficacia, pues es difícil de predecir que los experimentos en humanos reflejen lo que se observa en animales. No obstante se reconoce que el protocolo ALVAC+gp120 no es óptimo para conseguir protección frente a la infección por VIH.

Otra de las vacunas potenciales ensayada en fase II es un adenovirus tipo 5 que expresa los genes Gag-Pol-Nef del VIH subtipo B administrada por via i.m en dos dosis separadas por un mes. Este protocolo conocido como el estudio STEP (referido como HVTN502 o Merk V520-023) se ha realizado con 3000 voluntarios, mayoritariamente población homosexual con alto riesgo, pero no ha dado los resultados esperados de prevenir la infección o reducir la cantidad de virus en las personas que fueron infectadas después de la vacunación, por lo que el estudio se ha interrumpido en el mes de Septiembre de 2007, aunque continúan las visitas programadas de los voluntarios hasta que se completen los datos. También se ha paralizado el estudio HVTN503 (Phambili) en fase IIb iniciado con la misma vacuna de Merk a principios del año 2007 en Sudáfrica con población heterosexual con alto riesgo de infección por VIH. Este estudio tenía como objetivo utilizar tres dosis de Ad5-Gag-Pol-Nef y definir la inmunidad cruzada que puede inducir una vacuna del subtipo B en una población que está infectada con el subtipo C del VIH (denominado «proof-of-concept»). El año pasado se iniciaron 13 nuevos ensayos clínicos en fase I/II en 8 países alrededor del mundo para evaluar la inmunogenicidad y seguridad de las vacunas candidatas (para mas información visitar: www.iavireport.org/trialsdb).

Hasta el momento presente, solamente han dado resultados positivos con inducción de una alta respuesta celular frente a los antígenos del VIH las vacunas basadas en adenovirus, poxvirus y DNA. Estos datos aún no se han publicado. La combinación de DNA con adenovirus o poxvirus expresando antígenos del VIH han sido de momento las que han demostrado en protocolos de inmunización en

humanos activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos en mas del 90% de los voluntarios inmunizados, aunque mayoritariamente frente a la proteína Env. Debido a que mi grupo de investigación participa en el proyecto europeo de desarrollo de una vacuna contra el VIH basada en poxvirus, describiré los pasos que hemos seguido en la generación y caracterización de dos vectores de poxvirus (llamados MVA y NYVAC) a los que hemos incorporado los antígenos Env/Gag-Pol-Nef del VIH subtipos B y C. Este trabajo se inició con ayudas de la Unión Europea (Eurovac I, II, III, 1999-2007) y se continúa con ayudas de la Fundación FIPSE, Fundación Botín y Fundación Bill y Melinda Gates.

Me limitaré a hacer una introducción sobre el uso de poxvirus como vacunas para luego describir aspectos relevantes de la biología de los vectores candidatos vacunales, MVA y NYVAC, generación de recombinantes que expresan cuatro antígenos del VIH y su caracterización preclínica en modelos de ratón y en macacos, así como su valoración en ensayos clínicos en fase I.

POXVIRUS RECOMBINANTES COMO VACUNAS CONTRA DISTINTAS ENFERMEDADES

La demostración en 1982 por los grupos de Bernie Moss y de Enzo Paoletti en EE UU de que en el genoma del virus *vaccinia* se podía incorporar de forma estable una gran variedad de genes procedentes de otras especies y que por inoculación de estos virus recombinantes a animales se les podía conferir protección frente a un patógeno, supuso una revolución en el campo de las vacunas (9). Por primera vez se consideró que un poxvirus se podría utilizar como posible vacuna contra otros patógenos, siempre y cuando no provocara efectos secundarios y dicha vacuna demostrara su eficacia. Además, la experiencia de campo acumulada con la práctica de la vacunación contra viruela hacía posible que vacunas basadas en poxvirus pudieran tener una amplia distribución mundial.

Los fundamentos para producir un poxvirus recombinante se basan sencillamente en generar un plásmido de inserción (vector de transferencia) que contiene el gen de interés flanqueado por regiones codificadoras, a la izquierda y derecha, de un gen no esencial del

poxvirus, como el gen timidina quinasa o hemaglutinina y un gen marcador, como la β-galactosidasa o la proteína verde fluorescente (GFP). El gen de interés tiene su expresión controlada bajo un promotor viral fuerte que se activa a tiempos tempranos y tardíos en la infección. Mediante un proceso de infección de células animales en cultivo con un poxvirus seguido de la introducción del plásmido de inserción por transfección, se produce durante unas 24 h un proceso de recombinación específica de secuencia entre las regiones flanqueantes del plásmido de inserción y el locus homólogo del gen viral. El aislamiento de virus recombinante se realiza por seguimiento del gen marcador que, si es β-galactosidasa, se detecta por la producción de placas de color azul en presencia de su sustrato, o si es GFP, por la fluorescencia verde. Existe una gran variedad de marcadores, tanto enzimáticos como antibióticos para la selección de virus recombinantes (10). Para el uso de estos vectores como vacunas en humanos se requiere que el gen marcador no esté presente en el virus recombinante, por lo que en estos casos se utilizan plásmidos en los que el gen marcador se elimina por recombinación homóloga entre los sitios flanqueantes.

El éxito de la utilización de vacunas basadas en poxvirus se demostró en los estudios de campo llevados a cabo en Europa y EEUU con un virus recombinante de *vaccinia* que expresaba la proteína de la envuelta del virus de la rabia. Se observó que la administración de esta vacuna en cápsulas comestibles inducía una respuesta inmuno-protectora contra la rabia en animales que transmiten la enfermedad, como el zorro (11). De esta forma se ha generado una gran variedad de poxvirus recombinantes contra enfermedades virales (gripe, encefalitis, enteritis, fiebres hemorrágicas, hepatitis, sida), bacterianas (neumonías), parasitarias (malaria, leishmania), tumorales (melanoma, adenocarcinoma, tumor prostático), que se encuentran en fase de experimentación clínica.

Para evitar algunos efectos no deseados que se observaron en las campañas de vacunación contra la viruela, se han generado virus recombinantes altamente atenuados y seguros para la vacunación contra patógenos y tumores (9, 12, 13). Uno de los candidatos que está en experimentación clínica en fase I/II es el virus *vaccinia* modificado de Ankara, (MVA), que fue obtenido después de más de 500 pases seriados en células primarias de embrión de pollo y que

fue administrado a más de 120.000 personas en Alemania durante la campaña de vacunación contra la viruela. Estudios recientes han demostrado que la inoculación de MVA recombinante que expresa antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) confiere protección contra la enfermedad producida en simios por un híbrido (SIVH) del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) conteniendo antígenos del VIH. Actualmente hay una serie de ensayos clínicos en humanos contra malaria, sida y tumores utilizando virus recombinantes de MVA en combinación con otros vectores (13).

Estudios pioneros de vacunación frente a malaria, en los que participó nuestro laboratorio junto con los grupos de Ruth Nussenzweig y Fidel Zavala en New York University Medical Center y de Peter Palese y Adolfo García-Sastre en Mount Sinai de NY, demostramos en una serie de publicaciones que se podía expandir la población de células T CD8+ específicas para el antígeno CS (cincunsporozoito) por administración sucesiva de dos vectores y que el orden de administración era fundamental para obtener protección frente a *Plasmodium yoelii* (14). Establecimos que si se lleva a cabo un protocolo de inmunización con una primera inoculación de un vector del virus de la gripe (influenza) que expresa el epítopo de CS específico para células T CD8+, seguido al cabo de dos semanas por una segunda inoculación con un vector de poxvirus (*vaccinia* o MVA) que expresa la proteína completa CS, se produce al cabo de 10 días una ampliación de la respuesta celular CD8+ específica frente a CS que induce protección (90%) frente a la forma infectiva del parásito, esporozoitos de *Plasmodium yoelii* que producen la malaria murina. La protección se correlacionó con un alto grado de respuesta celular específica contra la proteína del circumsporozoito (CS) de plasmodio. Demostramos que este procedimiento de inmunización combinada de distintos vectores (*prime/boost*) inducía una respuesta inmunológica de tipo Th1 (caracterizada por la producción de las citoquinas IFN-γ y IL-12), manteniendo la presencia de linfocitos citotóxicos CD8+ durante largos períodos de tiempo que aún protegían (en un 60%) contra malaria (15, 16). Este procedimiento de *prime/boost* para expansión de células CD8+ ha sido confirmado por otros grupos utilizando como primera inoculación vectores que pueden ser DNA, proteínas, seudo-partículas, ó virus atenuado expresando el gen de interés, seguido de una segunda inoculación con un

MVA recombinante que expresa el mismo gen. Estos protocolos de *prime/boost* están sido aplicados a otros sistemas de vacunación contra patógenos y ampliamente aceptados como regímenes de inmunización eficaz (17). Estos resultados, han servido para aumentar el interés de los poxvirus como vacunas, ya que el proceso de *prime/boost* con vectores heterólogos ha demostrado su eficacia en distintos modelos animales. Además, hemos demostrado que es posible inducir una fuerte respuesta inmune en mucosas frente a antígenos del VIH mediante la inoculación por vía respiratoria de recombinantes del virus de la gripe y de MVA (18).

¿Que ocurre en el proceso *de prime/boost*? Hemos propuesto que durante la primera inoculación (*priming*) se produce una activación moderada de linfocitos T CD8+ específicos frente a unos pocos epítopos del antígeno, y que después de la segunda inoculación con el poxvirus recombinante (*boost*) expresando el mismo antígeno, se produce una expansión de la población de células T CD8+, además del efecto *priming* en células inmunológicamente vírgenes (17). Las células que fueron activadas en la fase inicial reaccionan más rápidamente y se expanden. Actualmente el grupo que lidera el español Pedro Alonso está llevando a cabo ensayos clínicos de eficacia en Mozambique con una vacuna basada en la proteína CS fusionada al antígeno de la hepatitis B junto con un adyuvante, obteniendo un 50% de protección frente a casos de malaria en la población de niños menores de cinco años. Es predecible que estos porcentajes puedan aumentar por inmunización de distintos vectores expresando el mismo antígeno, como MVA, o con una combinación de otros antígenos de *Plasmodium*.

Lógicamente cuando se utilizan vectores víricos se produce una respuesta inmune frente al vector que reduce su capacidad inmunogénica al utilizar el mismo vector como *boost*. La respuesta inmunológica que se produce frente al vector se puede evitar mediante el uso de vectores basados en estirpes de poxvirus distintos, ya que hay una pobre reactividad cruzada entre ellos. Esta respuesta inmune frente al propio vector está disminuida en mutantes cuya replicación en células humanas se limita a la fase temprana, como avipoxvirus, o que sólo completan un ciclo de replicación sin progenie como MVA. Es predecible que en pocos años se utilicen vacunas basadas en vectores de poxvirus contra una gran variedad de enfermedades.

LOS VECTORES VIRALES MVA Y NYVAC

Dos de los vectores mas prometedores para su uso como vacunas que activan respuesta celular de forma específica son el virus modificado de Ankara (MVA) y el virus vaccinia NYVAC. Se ha demostrado, entre otros por nuestro grupo, que tanto MVA como NYVAC inducen una potente respuesta celular contra antígenos de distintos patógenos, y lo mas importante es que esta respuesta inmune confiere protección después del desafío. El vector MVA fue generado después de mas de 500 pases en células embrionarias de pollo, habiendo perdido unas 30.000 pares de bases de su secuencia, con la eliminación de genes virales que interfieren con el sistema inmune y con el rango de hospedador (13). NYVAC fue generado por ingeniería genética mediante la eliminación selectiva de 18 genes (unos 15.000 pares de bases) implicados en virulencia, rango de hospedador y patogenicidad (19).

La ventaja de ambos vectores es que han demostrado su seguridad tanto en modelos animales como en los ensayos clínicos llevados a cabo en fase I/II en humanos. Además, estos vectores han demostrado su inmunogenicidad y capacidad para conferir protección en distintos modelos animales. Nuestro grupo ha venido trabajando en la biología de ambos vectores en modelos *in vitro* con células en cultivo, y en modelos *in vivo* con ratones.

Describiré a continuación algunas de las características diferenciales entre los dos vectores. Durante la infección de células humanas HeLa en cultivo con MVA se produce un menor efecto citopático que con NYVAC, hay formación de células bipolares, se favorece la acumulación de partículas inmaduras con aumento en los niveles de proteínas al no activarse la fosforilación del factor de iniciación eIF-2 alfa, y se produce una mayor viabilidad de la célula infectada al no inducir apoptosis (20, 21). Cuando se inoculan ambos vectores en ratones por ruta i.m se produce replicación viral entre las 24-48 horas después de la infección, con posterior eliminación del virus, lo que garantiza la seguridad de los dos vectores. Esto se observa con recombinantes que expresan el gen luciferasa.

Sin embargo la infección de células inmaduras dendríticas humanas con MVA y NYVAC provoca un aumento en los niveles de expre-

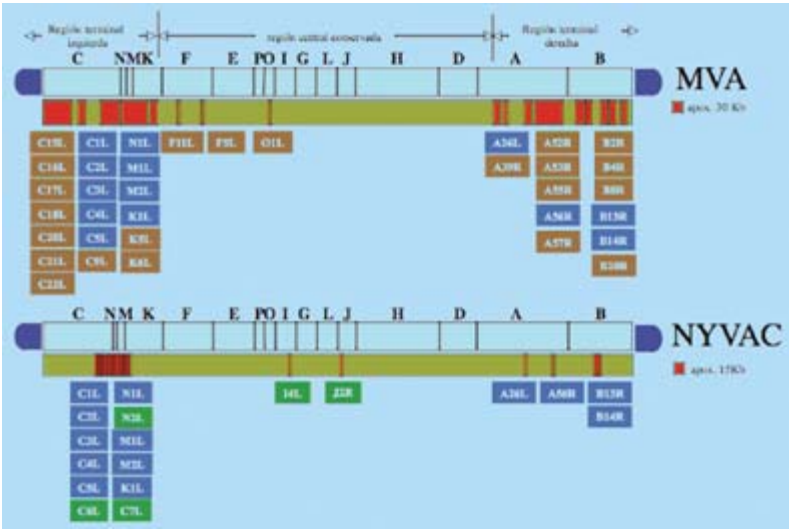


FIGURA 1. ***Análisis comparativo de los genomas de MVA y de NYVAC.*** *En marrón se muestran los genes delecionados en MVA e intactos en el genoma de NYVAC, en azul las deleciones comunes en ambos genomas y en verde los genes inactivados en NYVAC e intactos en MVA. Los genes han sido nombrados según la nomenclatura correspondiente a la cepa Copenhagen.*

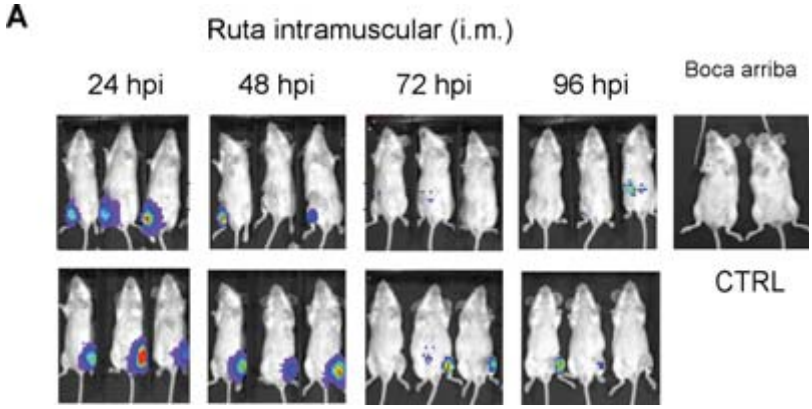


FIGURA 2. ***Distribución de MVAluc y NYVACluc en ratones inoculados por ruta intramuscular. (A)*** *Localización de la señal de luciferasa en ratones BALB/c inoculados por ruta intramuscular con los recombinantes MVAluc o NYVACluc a distintos tiempos postinfección. En la esquina superior derecha se muestra la falta de señal procedente de los ratones inoculados con PBS (CTRL).*

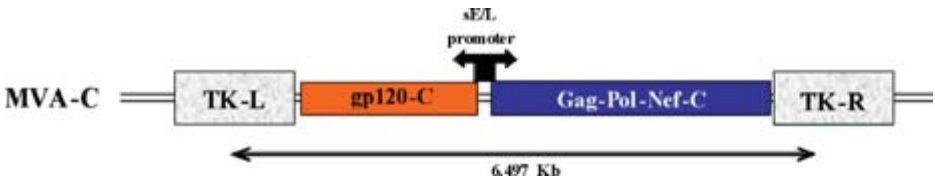
sión de un gran número de moléculas inmunomoduladoras (ej. IFN tipo I, TNF-alfa, IL-12, OASL, MDA5, RIG), aunque MVA induce un mayor número de genes que NYVAC. Estos datos han sido demostrados por microarrays conteniendo unos 20.000 genes humanos. Hemos llevado a cabo una clasificación de los genes humanos, tanto en células HeLa como en células dendríticas, que se activan en respuesta a cada uno de los virus, MVA y NYVAC (22-25). El análisis detallado de la respuesta inmune inducida por MVA frente a los distintos antígenos reveló una activación mayoritaria de células T CD8+ mientras que NYVAC activó preferentemente células T CD4+ (Mooij y cols., manuscrito en prensa). Estos resultados demuestran que tal y como habíamos planteado, MVA y NYVAC inducen respuestas inmunológicas diferentes. Existen varios factores que podrían explicar los diferentes mecanismos de inducción de la respuesta inmune. Evidencias recientes indican que tanto para la expansión clonal de las células T CD8+, como para el desarrollo de sus funciones efectoras o el establecimiento de una población de memoria, es necesario la presencia de una señal de citoquinas, denominada «tercera señal» (26, 27).Esta tercera señal proviene de la secreción por parte de la célula dendrítica madura de citoquinas como IL-12 y/o IFN del tipo I (IFNα/β), cuya activación es mediada por una cascada de señalización distinta a la activada por el TCR y la molécula coestimuladora CD28. Si analizamos el perfil de genes activados tras la infección con MVA de células dendríticas humanas (25) podemos observar que existe un aumento significativo en la expresión a nivel de ARN mensajero de genes como IL-12, IFN-α e IFN-β, así como un incremento del factor regulador del IFN IRF-7 y de proteínas implicadas en la producción de IFN tipo I como RIG-I o MDA5. Consecuentemente, se observa una mayor regulación de genes estimulados por IFN (ISGs) como ISG56, ISG60 o SCYB10. Además, el programa de diferenciación activado por la secreción de IL-12 junto con IFNα/β incrementa la expresión de un gran número de genes implicados en otras funciones como el gen GADD45B (28) o el factor de transcripción NFAT5 (29) que intervienen en la regulación de las células efectoras; o genes implicados en la señal de transducción (MAP2K5) y en la regulación del ciclo celular (Ciclina B1); o miembros de la familia de los TNF (30). Todos ellos, se encuentran consistentemente aumentados durante la infección por MVA. Además, otros genes implicados en la modulación de la respuesta inmune como son las

citoquinas pro-inflamatorias o la producción de β-quimioquinas también se expresaron diferencialmente en MVA y NYVAC. Todos estos datos apoyan la preferencia de MVA en la estimulación de células T CD8+.

Estos resultados y otros obtenidos con anterioridad nos demuestran que vacunas basadas en estos dos vectores pueden inducir de forma diferencial distintos grados de respuesta inmune, lo que puede ser beneficioso en su uso como vacunas. Describiré a continuación cómo hemos aplicado estos dos vectores para generar dos vacunas potenciales frente al VIH y llevado a cabo su caracterización preclínica en ratones.

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRECLÍNICA DE DOS NUEVAS VACUNAS POTENCIALES FRENTE AL VIH, SUBTIPOS B Y C

Nuestro laboratorio participa en el proyecto europeo de desarrollo de una vacuna contra el SIDA (www.eurovacc.org), para lo cual generamos y patentado dos virus recombinantes de MVA que expresan en un mismo locus viral (timidina quinasa) los genes *env/gag-pol-nef* del VIH procedente de aislados europeo (serotipo B, llamado MVA-B) y asiático (serotipo C, llamado MVA-C).



Hemos caracterizado estos virus recombinantes por su capacidad para expresar niveles altos de los cuatro antígenos, conservar intacta la secuencia y mantener durante al menos 10 pases sucesivos los mismos niveles de expresión. Se ha llevado a cabo una serie de experimentos en modelos de ratón (Balb/c y humanizados HHD para HLA-A2) para demostrar la capacidad de estos recombinantes en inducir respuestas inmunes específicas (humoral y celular) después de procedimientos de inmunización combinada de dos vectores. La

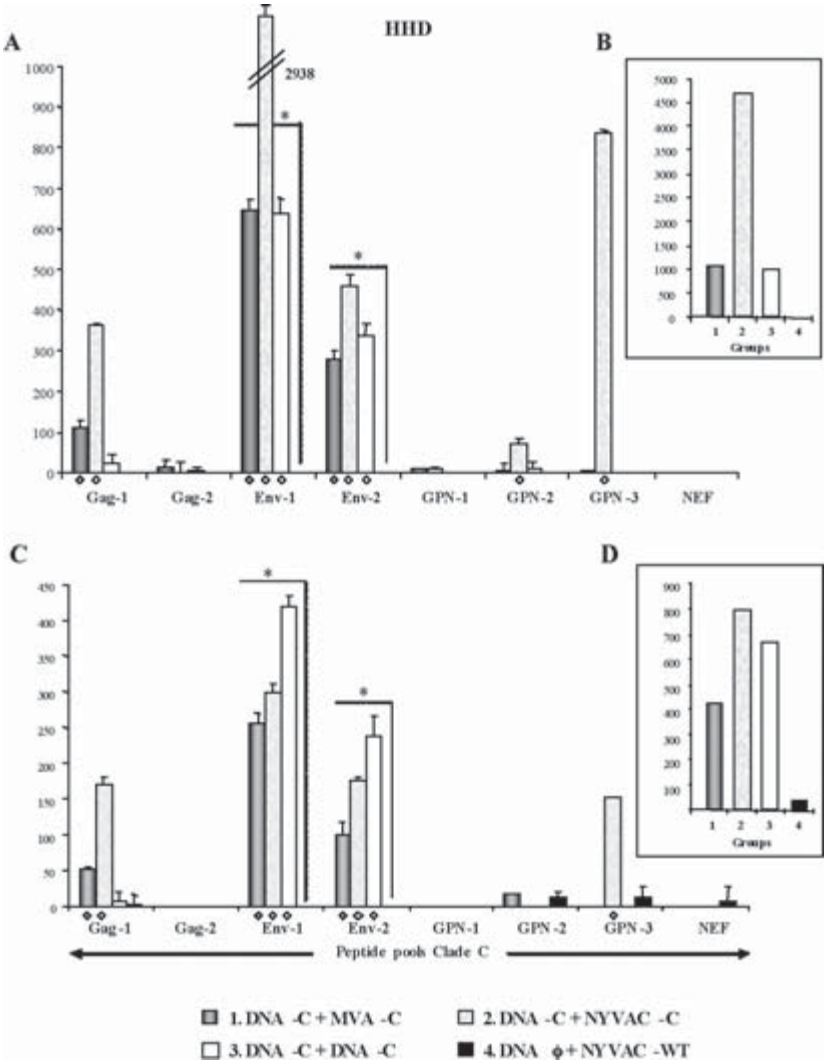


FIGURA 3.- ***Inmunogenicidad de MVA-C y NYVAC-C después del protocolo de inmunización de prime-boost (ADN/Pox) en ratones BALB/c.*** *La respuesta inmune celular específica frente a los antígenos de VIH en los animales inmunizados se determinó mediante la técnica de ELISPOT. En la figura se muestra el número de células secretoras de IFN-γ e IL-2 específicas para cada mezcla de péptidos (A y C) así como la respuesta específica frente a todos los antígenos de VIH-1 incluidos en los vectores (B y D). ? representa diferencias significativas respecto a la mezcla de péptidos control * representa diferencias significativas entre los diferentes grupos (*p<0,05; **p<0.005).*

primera inmunización se realizó con un vector de DNA que expresa los cuatro antígenos (*env/gag-pol-nef*) seguido a las dos semanas por una segunda inmunización con el vector de MVA también expresando los cuatro antígenos. Estos estudios se han realizado en paralelo comparando la inmunogenicidad de MVA frente al vector NYVAC que expresa los mismos antígenos y que fue generado por la empresa Sanofi-Pasteur. Los datos obtenidos nos demuestran que los vectores basados en MVA y NYVAC inducen una amplia respuesta inmune frente a los antígenos Env-Gag-Pol-Nef del VIH, subtipos B y C. Esta respuesta es mayoritaria frente a Env en relación a los otros antígenos, demostrando la inmunodominancia que ejerce Env (31, 32). Como ejemplo se incluye el grado de respuesta inmune inducida por los vectores MVA-B y NYVAC-B después de la inmunización combinada DNA/pox.

Los resultados obtenidos en ratones con los vectores MVA y NYVAC fueron seguidos por experimentos semejantes en monos (macacos). Como el VIH no infecta macacos, la pregunta que nos hicimos fue ver si recombinantes de MVA y NYVAC en construcciones semejantes a las utilizadas en ratones, pero ahora expresando antígenos equivalentes del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIVmac239) eran capaces de inducir protección frente al virus patógeno de monos SHIV89.6p (este es un virus híbrido al que se le ha reemplazado el gen Env del SIV por el equivalente Env del VIH, subtipo B (aislado 89.6p) y que es altamente patogénico en macacos. Con esta finalidad, en mi laboratorio se construyeron por Carmen E. Gómez los vectores de MVA y NYVAC que expresaban en el mismo locus de la timidina quinasa viral, los genes *env* del HIV-89.6p y *gag-pol-nef* del SIVmac239. Estos vectores expresaban correctamente las cuatro proteínas Env-Gag-Pol-Nef. En colaboración con Johnatan Heeney, miembro de EuroVacc, del Centro de Primates de Holanda, llevamos a cabo experimentos semejantes a los realizados en ratones. Asi, grupos de 7 macacos fueron inoculados en procedimientos de DNA *prime*/poxvirus *boost* con los vectores de DNA que expresaban los cuatro antígenos seguido de una segunda inoculación con los vectores MVA y NYVAC expresando los mismos antígenos. Un mes después de la última inoculación, los animales fueron desafiados por vía intravenosa con el virus SHIV89.6p y al cabo del tiempo se examinaron varios parámetros inmunológicos, así como protec-

ción frente al virus híbrido de simio. Los resultados obtenidos demuestran que tanto MVA como NYVAC inducen respuesta celular específica frente a los cuatro antígenos con predominancia de Env, que los niveles de células CD4+ se mantienen durante mas de un año en los grupos inmunizados y no en los grupos control (inoculados con plásmido vacío y poxvirus sin inserto) y, lo mas importante, que se producía protección frente a la infección. Mientras se murieron los animales del grupo control, sin embargo los animales de los dos grupos inmunizados con los vectores recombinantes de MVA y NYVAC resultaron protegidos frente a la infección por SHIV (Mooj et al, manuscrito aceptado en J. Virol). También hemos demostrado en macacos que los vectores recombinantes de MVA y NYVAC pueden ser utilizados (aerosol) para inducir respuestas inmunes específicas frente a distintos antígenos cuando son inoculados por rutas de mucosas (Corbett et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, en prensa).

ENSAYOS CLÍNICOS EN FASE I CON LOS VECTORES NYVAC Y MVA

Para realizar ensayos clínicos lo primero es producir los vectores en condiciones de buenas prácticas de producción (GMP) y demostrar su seguridad en modelos animales. A través del proyecto EuroVacc, el vector NYVAC-C (que expresa Env-Gag-Pol-Nef del VIH subtipo C, CN54) fue producido por Sanofi-Pasteur y ha sido el primero de los vectores contemplados en el programa EuroVacc en ser ensayado en fase I. El vector MVA-B que generamos en mi grupo (expresa Env-Gag-Pol-Nef del VIH, gp120 de BX08 y Gag-Pol-Nef del subtipo IIIB) (31), fue producido por la empresa IDT en Alemania. Tanto el vector NYVAC-C como MVA-B demostraron su bioseguridad en los modelos animales. En el momento presente se han llevado a cabo dos ensayos clínicos con NYVAC-C (denominados EVO1 e EVO2), distribuidos entre los centros clínicos de Lausanne y Londres, con voluntarios sanos para demostrar su seguridad e inmunogenicidad. En el EVO1 con 24 voluntarios que recibieron por vía i.m dos dosis de NYVAC-C espaciadas por un mes, se observó durante 48 semanas que la vacuna era segura, sin efectos secundarios, y que cerca del 40% de los individuos desarrollaban una respuesta celular específica frente a los antígenos del VIH. Esta respuesta inmune era

mayoritaria frente a Env. En EVO2, un segundo ensayo clínico en fase I (iniciado en 2005 y terminado en 2006) se procedió a demostrar si la inoculación i.m, primero con un vector de DNA que expresaba los cuatro antígenos del VIH-1 (Env/Gag-Pol-Nef) seguido un mes después por una segunda inoculación i.m con NYVAC-C era un protocolo mas inmunogénico que cuando se utilizaba solo el vector NYVAC-C. Un número equivalente de voluntarios en Londres y Lausanne (24 voluntarios) como en el primer ensayo clínico, fueron inoculados con la combinación DNA-C/NYVAC-C y a distintos tiempos se siguió la evolución de las inmunizaciones. Se observó que la combinación era segura y que se producía un incremento considerable de la respuesta inmune en los voluntarios inmunizados frente a los antígenos del VIH. Mientras que el grupo control (placebo) no dio respuesta alguna, la mayoría de los voluntarios inmunizados (90%) respondieron al protocolo DNA-C/NYVAC-C de inmunización con inducción de respuesta inmune específica frente a los antígenos del VIH. De nuevo, la respuesta inmune fue dirigida mayoritariamente frente a la proteína Env, aunque la media de respuesta fue dirigida contra cuatro epítopos. La respuesta inmune celular fue polifuncional del tipo Th1, con producción de linfocitos CD4+ y CD8+ específicos frente a VIH (Harai et al., J. Exp. Med., en prensa). Estos datos son muy relevantes ya que con el protocolo DNA/NYVAC se conseguía que prácticamente todos los individuos respondieran a la inmunización, algo que no se había obtenido con otros protocolos de inmunización y que había frustrado la aspiraciones de muchos grupos intentando desarrollar una vacuna frente al VIH/SIDA. Así pues, se había conseguido franquear la barrera de que sí era posible producir un inmunógeno que cumplía con principios básicos en inmunología, es decir, que para poder ser eficaz necesita primero activar una respuesta inmune específica frente a los antígenos del patógeno que se quiere controlar (esto no quiere decir que cualquier respuesta inmune sea efectiva). El siguiente ensayo clínico EVO3 se ha iniciado a finales de verano de 2007 con el protocolo DNA/NYVAC (tres dosis de DNA-C y una de NYVAC-C) pero con mayor número de voluntarios y se está planificando otro ensayo (EVO4) de eficacia en fase IIb en África.

En relación al vector MVA-B que hemos generado en el CNB, en 2007 se ha llevado a cabo en Holanda un ensayo terapéutico con

pacientes seropositivos y con niveles de CD4 por encima de 200/mL en sangre. El vector MVA-B se administró por vía i.m en dos dosis separadas entre si por un mes. El objetivo es demostrar si se puede aumentar la respuesta inmune celular dirigida especialmente a linfocitos CD8+ y mantener la población de linfocitos CD4+ en los individuos infectados (los datos se están procesando). Por otro lado hemos iniciado en España, mediante colaboración entre los hospitales Clinic de Barcelona y Gregorio Marañón de Madrid, los trámites para realizar un ensayo profiláctico en fase I con el vector MVA-B administrado en tres dosis sucesivas, espaciadas entre si. El objetivo es demostrar la inmunogenicidad de MVA-B en voluntarios sanos. Esperamos iniciar el ensayo a principios del año 2008.

HACIA UNA SEGUNDA GENERACIÓN DE VACUNAS BASADAS EN POXVIRUS

Debido a que la familia de poxvirus codifica por una serie de proteínas que interfieren con el sistema inmune y así escapar de las defensas del organismo (33), es importante mejorar la capacidad inmunogénica de estos vectores y producir vectores de nueva generación con mayor capacidad para estimular respuestas inmunes frente al antígeno recombinante. Nuestro grupo ha demostrado que se puede mejorar el comportamiento del vector MVA frente al VIH mediante la incorporación en el genoma viral de genes inmunomoduladores, como las citoquinas IL-12, IFN-γ y el factor GM-CSF (34-36). En un proyecto financiado por el VI Programa de la UE tenemos como objetivo el identificar los genes de MVA que una vez delecionados produzcan en animales un incremento de la respuesta inmune frente a distintos antígenos expresados por recombinantes de MVA. El genoma de éste virus no contiene receptores solubles de citoquinas, como IFN-α/β, IFN-γ, TNF o la proteína que se une a quimioquinas. Hemos propuesto que para una mayor eficacia de *vaccinia* como vacuna es necesario inactivar selectivamente inhibidores virales del sistema inmune o incorporar citoquinas en el genoma del virus (34). De esta forma se podrá modular la respuesta inmune frente a antígenos. Nuestro laboratorio ha demostrado que esta segunda aproximación es eficaz, al observar que la expresión de IL-12 puede modular de forma positiva o negativa (por producción

de óxido nítrico) la expansión de células T CD8+ específicas frente a la proteína Env del VIH (37).Utilizando IL-12, hemos establecido un protocolo de inmunización combinada de *prime/boost* con DNA y un recombinante de *vaccinia* expresando ambos la proteína Env de VIH que aumenta fuertemente la producción de células T CD8+ específicas para VIH. Debido al papel tan importante que tiene IL-12 en la regulación del sistema inmune, polarizando el sistema hacia el subtipo Th1 y a su interés en terapia antiviral, antitumoral e inmunomoduladora, y al efecto sinérgico que IL-18 ejerce sobre IL-12 en protección (36), estamos llevando a cabo un estudio sobre optimización del uso de estas citoquinas en protección frente patógenos en modelos animales. También estamos inactivando de forma selectiva genes de MVA y de NYVAC que codifican por inhibidores de citoquinas, quimioquinas, TLRs, apoptosis y que definen el rango de hospedador, para usarlos como vectores vacunales contra distintas patologías.

Nos hemos propuesto como continuación a nuestras investigaciones llevar a cabo un estudio detallado de optimización y caracterización de la respuesta inmune por vectores de las cepas atenuadas de *vaccinia* MVA y NYVAC que expresan antígenos del VIH. Así pues, en los próximos años generaremos nuevos vectores atenuados de MVA y NYVAC con deleciones e inserciones específicas y se estudiará la respuesta inmune y capacidad de inducir protección en modelos animales (ratón y monos). La finalidad es obtener un vector modelo de MVA/NYVAC que reúna todas las condiciones óptimas de inducción de una fuerte respuesta celular específica frente a las proteínas del VIH, para su ensayo clínico como vacuna de segunda generación frente al VIH/SIDA.

CONSIDERACIONES FINALES

Desde que apareció la epidemia de SIDA y se identificó al VIH como agente causal en la década de los años 80, ha habido un esfuerzo global para desentrañar su estructura, organización genómica, tasa mutacional, mecanismos de replicación, capacidad para infectar células específicas del organismo, destruirlas y seguir su ciclo perverso de multiplicación hasta que termina con la vida de la persona infec-

tada. Estas investigaciones tenían como objetivo el desarrollo de sistemas de control de la infección, como antirretrovirales y vacunas. Estos conocimientos nos han enseñado que el virus es una máquina perfecta que se pone en funcionamiento tan pronto como inicia el proceso de infección y elude, a través de sus múltiples funciones, a la acción de la respuesta inmune innata y adquirida con la finalidad de mantenerse de forma permanente en el organismo. La alta tasa mutacional, su incorporación en el cromosoma celular y la estrategia que el virus utiliza evadiendo la respuesta inmune del huésped al infectar a las células clave en defensa como son los linfocitos T CD4+, todo ello ha dificultado el desarrollo de una vacuna. Organizaciones internacionales, como el G-8, las Naciones Unidas, el Banco Mundial, los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU, la Unión Europea, la Fundación Bill y Melinda Gates y otras, están aportando ayudas económicas en I+D en vacunas del VIH/SIDA. Es indudable, como hemos comentado en este trabajo, que a la vista de los resultados obtenidos hasta el momento hace falta un mayor esfuerzo global para conseguir controlar y erradicar al VIH/SIDA en el mundo.

Recientemente, mediante el desarrollo de nuevos inmunógenos hemos sido capaces de poder activar de forma específica la respuesta inmune celular, especialmente los linfocitos T CD4+ y CD8+, frente a los antígenos del VIH. Estas nuevas vacunas celulares van dirigidas a eliminar del organismo a las células infectadas y así convertir la infección en crónica. Otras estrategias en fase de desarrollo son las que van orientadas a producir anticuerpos neutralizantes frente al VIH, aunque este campo aun no ha dado los resultados esperados. En una reciente publicación en febrero en la revista Nature (33), se ha identificado el sitio de unión de un anticuerpo neutralizante (llamado b12) frente a distintas estirpes del VIH con la proteína gp120, exactamente el mismo sitio de unión de gp120 con el receptor de las células CD4+. Este descubrimiento supone un avance considerable hacia el desarrollo de inmunógenos para que la proteína Env induzca anticuerpos neutralizantes. Este es un área en continua expansión, aunque con muchas dificultades ya que para neutralizar al VIH hace falta conseguir en plasma altos niveles de anticuerpos neutralizantes con amplia especificidad frente a variantes virales.

Es indudable que para conseguir controlar la infección por VIH es necesario que una vacuna sea capaz de producir altos niveles de

anticuerpos neutralizantes contra distintos variantes y estirpes del VIH, así como ser capaz de activar linfocitos T CD4+ y CD8+ y células memoria capaces de reconocer y destruir a las células infectadas. Ese es nuestro reto.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al todo el personal de mi laboratorio por su gran dedicación para que el trabajo de cada día sea sencillo pero en vanguardia de la ciencia y muy especialmente al grupo del VIH, Carmen E. Gómez, José L. Nájera, Beatriz Perdiguero, Paul Heinen, Juan F. García, Jacobo Nieto, Raquel Sánchez y Victoria Jiménez. También quiero agradecer a IAVI por su colaboración en la elaboración de un documento que sobre la situación en I+D de vacunas VIH presentamos a Presidencia de Gobierno, recogiéndose en esta presentación algunos puntos del mismo. El trabajo de mi grupo no hubiera sido posible sin la financiación que nos han concedido distintas instituciones y fundaciones nacionales (Ministerio de Educación y Ciencia, Ministerio de Sanidad y Consumo, Comunidad de Madrid, Fundación Marcelino Botín, FIPSE) e internacionales (Institutos Nacionales de Salud, NIH, de EE.UU, Unión Europea, Fundación Bill y Melinda Gates). Buena parte de este trabajo fue presentado en mi discurso de ingreso en 2007 como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia.

REFERENCIAS

(1) WHO/UNAIDS convene meeting on vaccine clinical trial design. (2006) *IAVI Rep.* 10 (2): 20.

(2) BARTH-JONES, D.C.; CHENG, H.; KANG, L.Y.; KENYA, P.R.; ODERA, D.; MOSQUEIRA, N.R.; ET AL. (2005) Cost effectiveness and delivery study for future HIV vaccines. *Aids*. 19 (13): 1-6.

(3) KAUFMANN, S.H. AND MCMICHAEL, A.J. (2005) Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med.* 11 (4 Suppl): S33-44.

(4) HOKEY, D.A. AND WEINER, D.B. (2006) DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities. *Springer Semin. Immunopathol*. 28 (3): 267-79.

(5) KEGELES, S.M.; JOHNSON, M.O.; STRAUSS, R.P.; RALSTON, B.; HAYS, R.B.; METZGER, D.S.; ET AL. (2006) How should HIV vaccine efficacy trials be conducted? Diverse U.S. communities speak out. *AIDS Educ. Prev*. 18 (6): 560-72.

(6) LETVIN, N.L. (2006) Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (12): 930-9.
(7) ALCAMI, J.; JOSEPH MUNNE, J.; MUNOZ-FERNANDEZ, M.A. Y ESTEBAN, M. (2005) Current situation in the development of a preventive HIV vaccine. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23 (Supl. 2): 15-24.
(8) GONZALO, R.M.; RODRIGUEZ, J.R.; RODRIGUEZ, D.; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; LARRAGA, V. AND ESTEBAN, M. (2001) Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes Infect.* 3 (9): 701-11.
(9) MOSS, B. (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (21): 11341-8.
(10) STAIB, C.; DREXLER, I. AND SUTTER, G. (2004) Construction and isolation of recombinant MVA. *Methods Mol. Biol.* 269: 77-100.
(11) PASTORET, P.P. AND VANDERPLASSCHEN, A. (2003) Poxviruses as vaccine vectors. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26 (5-6): 343-55.
(12) MAYR, A.; STICKL, H.; MULLER, H.K.; DANNER, K. AND SINGER, H. (1978) [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl. Bakteriol. [B].* 167 (5-6): 375-90.
(13) SUTTER, G. AND STAIB, C. (2003) Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 3 (3): 263-71.
(14) LI, S.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; PALESE, P. ET AL. (1994) Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (11): 5214-8.
(15) RODRIGUES, M.; LI, S.; MURATA, K.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; BACIK, I. ET AL. (1994) Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J. Immunol.* 153 (10): 4636-48.
(16) MIYAHIRA, Y.; GARCIA-SASTRE, A.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; MURATA, K.; TSUJI, M. ET AL. (1998) Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8+ responses in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (7): 3954-9.
(17) ZAVALA, F.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; NUSSENZWEIG, R.S. AND ESTEBAN, M. (2001) A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells. *Virology.* 280 (2): 155-9.
(18) GHERARDI, M.M.; PEREZ-JIMENEZ, E.; NAJERA, J.L. AND ESTEBAN M. (2004) Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J. Immunol.* 172 (10): 6209-20.

(19) TARTAGLIA, J.; PERKUS, M.E.; TAYLOR, J.; NORTON, E.K.; AUDONNET, J.C.; COX, W.I. ET AL. (1992) NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*. 188 (1): 217-32.

(20) NAJERA, J.L.; GOMEZ, C.E.; DOMINGO-GIL, E.; GHERARDI, M.M. AND ESTEBAN, M. (2006) Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J. Virol.* 80 (12): 6033-47.

(21) GALLEGO-GOMEZ, J.C.; RISCO, C.; RODRIGUEZ, D.; CABEZAS, P.; GUERRA, S.; CARRASCOSA, J.L. ET AL. (2003) Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J. Virol.* 77 (19): 10606-22.

(22) GUERRA, S.; LOPEZ-FERNANDEZ, L.A.; CONDE, R.; PASCUAL-MONTANO, A.; HARSHMAN, K. AND ESTEBAN, M. (2004) Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J. Virol.* 78 (11): 5820-34.

(23) GUERRA, S.; LOPEZ-FERNANDEZ, L.A.; PASCUAL-MONTANO, A.; MUNOZ, M.; HARSHMAN, K. AND ESTEBAN, M. (2003) Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J. Virol*. 77 (11): 6493-506.

(24) GUERRA, S.; LOPEZ-FERNANDEZ, L.A.; PASCUAL-MONTANO, A.; NAJERA, J.L.; ZABALLOS, A. AND ESTEBAN, M. (2006) Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF-kappaB-responsive genes in infected HeLa cells. *J. Virol*. 80 (2): 985-98.

(25) GUERRA, S.; NAJERA, J.L.; GONZALEZ, J.M.; LOPEZ-FERNANDEZ, L.A.; CLIMENT, N.; GATELL, J.M. ET AL. (2007) Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J. Virol.* 81 (16): 8707-21.

(26) MESCHER, M.F.; AGARWAL, P.; CASEY, K.A.; HAMMERBECK, C.D.; XIAO, Z. AND CURTSINGER, J.M. (2007) Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin. Immunol.* 19 (3): 153-61.

(27) MESCHER, M.F.; CURTSINGER, J.M.; AGARWAL, P.; CASEY, K.A.; GERNER, M.; HAMMERBECK, C.D. ET AL. (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev*. 211: 81-92.

(28) LU, B. (2006) The molecular mechanisms that control function and death of effector CD4+ T cells. *Immunol. Res*. 36 (1-3): 275-82.

(29) SUNDRUD, M.S. AND RAO, A. (2007) New twists of T cell fate: control of T cell activation and tolerance by TGF-beta and NFAT. *Curr. Opin. Immunol*. 19 (3): 287-93.

(30) ANEL, A.; BOSQUE, A.; NAVAL, J.; PINEIRO, A.; LARRAD, L.; ALAVA, M.A. ET AL. (2007) Apo2L/TRAIL and immune regulation. *Front. Biosci.* 12:2074-84.

(31) GOMEZ, C.E.; NAJERA, J.L.; JIMENEZ, E.P.; JIMENEZ, V.; WAGNER, R.; GRAF, M. ET AL. (2006) Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1(BX08) gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine*. 25 (15): 2863-85.

(32) GOMEZ, C.E.; NAJERA, J.L.; JIMENEZ, V.; BIELER, K.; WILD, J.; KOSTIC, L.; ET AL. (2007) Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candida-

tes targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine*. 25 (11): 1969-92.
(33) ZHOU, T.; XU, L.; DEY, B.; HESSELL, A.J.; VAN RYK, D.; XIANG, S.H. ET AL. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature*. 445 (7129): 732-7.
(34) Gherardi, M.M. and Esteban, M. (2005) Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 11): 2925-36.
(35) ABAITUA, F.; RODRIGUEZ, J.R.; GARZON, A.; RODRIGUEZ, D. AND ESTEBAN, M. (2006) Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Res*. 116 (1-2): 11-20.
(36) GHERARDI, M.M.; RAMIREZ, J.C. AND ESTEBAN, M. (2003) IL-12 and IL-18 act in synergy to clear vaccinia virus infection: involvement of innate and adaptive components of the immune system. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt 8): 1961-72.
(37) GHERARDI, M.M.; RAMIREZ, J.C.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; SANO, G.; ZAVALA, F. ET AL. (1999) IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. *J. Immunol*. 162 (11): 6724-33.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1079-1092

Revisión

Síntesis de nuevos antitumorales por manipulación de modelos naturales de origen marino

Recibido el 5 de diciembre de 2007

MARÍA DEL CARMEN AVENDAÑO LÓPEZ*
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

RESUMEN

Se están estudiando diversas series de compuestos con estructura de pirazino[2,1-*b*]isoquinolina y 6,15-iminoisoquino[3,2-*b*]-3-benzazocina tomando como modelos productos naturales de origen marino con actividad antitumoral. Hasta el momento se han desarrollado diversas estrategias de síntesis, y se ha evaluado la citotoxicidad *in vitro* de estos compuestos frente a tres líneas celulares de cáncer humano. El paso clave para su obtención se basa fundamentalmente en la síntesis de pirazinoisoquinolina-1,4-dionas por un procedimiento «one-pot» *N*-alquilación-ciclación de 3-arilmetilpiperazina-2,5-dioxosililactimas con dimetil acetales de diversos aldehídos, utilizándose también otras reacciones de α-amidoalquilación y ciclación intramolecular tipo Pictet-Spengler. Se han obtenido diversas pirazino[2,1-*b*]isoquinolinas, pirazino[2,1,6-*bc*]isoquinolinas, 6,15-iminoisoquino[3,2-*b*]-3-benzazocinas y otros compuestos octacíclicos más complejos, y se están derivando en algunos casos a precursores de especies iminio alquilantes. La actividad citotóxica micromolar y submicromolar que se ha encontrado hasta el momento parece no depender de su capacidad para generar intermedios que permitan el enlace covalente con el ADN.

* Información de contacto:
Dra. Carmen Avendaño.
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
Plaza de Ramón y Cajal, s/n. 28040. Madrid. Spain.
Tf.: +34 913941821. Fax: +34 913941822.
e-mail: avendano@farm.ucm.es

Palabras clave: síntesis, citotoxicidad, productos naturales, pirazinoisoquinolinas.

SUMMARY

Synthesis of new antitumour agents through structure manipulation of natural models of marine origin

Several series of pyrazino[2,1-*b*]isoquinoline and 6,15-iminoisoquino[3,2-*b*]-3-benzazocine compounds related to marine antitumour natural products are being synthesized and their *in vitro* cytotoxic activities are being evaluated against three human cancer cell lines. The key synthetic step is based on the synthesis of pyrazinoisoquinoline-1,4-diones by the one-pot *N*-alkylation-cyclization of 3-arylmethylpiperazine-2,5-dioxosilyllactims with aldehyde dimethyl acetals or through different α-amidoalkylation reactions and intramolecular cyclizations of Pictet-Spengler type. Pyrazino[2,1-*b*]isoquinolines, pyrazino[2,1,6-*bc*]isoquinolines, 6,15-iminoisoquino[3,2-*b*]-3-benzazocines and other more complex octacyclic compounds have been obtained and derived in some cases to precursors of alkylating iminium ion species. The micromolar an submicromolar cytotoxic activity found up to date is apparently uninfluenced by the ability to generate intermediates which would permit covalent bonding to DNA.

Key words: synthesis, cytotoxicity, natural products, pyrazinoisoquinolines.

INTRODUCCIÓN

La química combinatoria ha permitido desde hace unos 25 años la optimización de muchos compuestos activos naturales o de síntesis que finalmente se han introducido en la terapéutica, pero no ha dado lugar hasta el momento a ningún fármaco *de novo*, por lo que las expectativas que había creado esta técnica se han limitado mucho. Por contraposición, la antigua estrategia basada en la utilización de productos naturales como fuente de inspiración para la creación de nuevos fármacos, continúa estando de actualidad. Por ejemplo, en el período de 1981 a 2002, de 74 fármacos sintéticos desarrollados para el tratamiento de la hipertensión, 48 mimetizan de una u otra manera a compuestos naturales, y 7 de cada 10 fármacos antimigraña mimetizan a la serotonina. Las cifras son particularmente relevantes en las enfermedades infecciosas y en el cáncer. En este último caso, aún dejando aparte productos biológicos

como los anticuerpos monoclonales o los interferones que se aíslan de un organismo o línea celular o se producen por biotecnología, el 74% de los nuevos anticancerosos son productos naturales o compuestos basados en ellos, ya que los mimetizan de una u otra forma (1-3).

Los compuestos naturales que demuestran una actividad biológica útil se usan muy pocas veces como fármacos. La digoxina, la morfina y, más recientemente, la trabectedina, son algunos de los pocos ejemplos en los que la estructura del compuesto natural no se ha manipulado, siendo mucho más habitual que ésta se modifique por semisíntesis o por síntesis total. La actividad del producto natural que se mimetiza suele encontrarse por cribado al azar, y la manipulación de su estructura suele perseguir el hallazgo de moléculas más sencillas que contengan el «grupo farmacóforo», principal responsable de la actividad biológica, o la síntesis de análogos con mejores propiedades farmacocinéticas. Esta aproximación permite además desarrollar metodologías sintéticas para lograr un más fácil acceso y fabricación de los compuestos objeto de estudio.

Entre los productos de origen marino es frecuente encontrar compuestos citotóxicos, que aparentemente son utilizados por los organismos que los producen como mecanismos de defensa. El hecho de tener estructuras novedosas garantiza su patentabilidad y los hace más atractivos para ser desarrollados por las industrias farmacéuticas (4, 5).

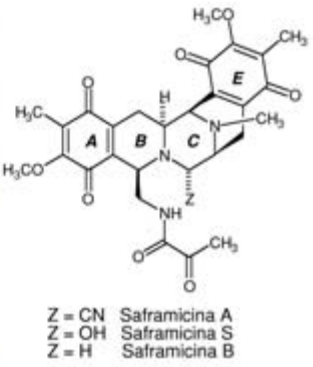
Desde 1990 nuestro grupo de trabajo ha estado implicado en diversos proyectos de investigación dirigidos a la búsqueda de compuestos activos en la quimioterapia del cáncer mediante la síntesis de análogos de compuestos naturales. Hemos estudiado quinonas y quinoniminas heterocíclicas antitumorales utilizando como modelos la diazaquinomicina A y alcaloides marinos que contienen el sistema pirido[2,3,4-*kl*]acridin-4-ona o poseen estructuras relacionadas. También hemos trabajado en la búsqueda de reversores de la multirresistencia a fármacos antitumorales mediante la síntesis de análogos del compuesto natural triptófano-dehidrobutirina-dicetopiperazina (TDD), las triprostatinas A y B, la gliantripina, la fumiquinazolina F, la fiscalina B, la *N*-acetilardeemina y la welwistatina (*N*-metilwetwitindolinona C). Para no hacer demasiado extensa esta revisión,

sólo se han incluido en la bibliografía de entre todas las publicaciones derivadas de estos proyectos algunas revisiones que incluyen nuestros resultados (6-8), así como las patentes a que dieron lugar debido al interés mostrado por las empresas PharmaMar S.A y Laboratorios BioMar S. A. (9-13).

Actualmente, una de nuestras líneas de trabajo se dirige a la síntesis y estudio como antitumorales de análogos de alcaloides tetrahidroisoquinolínicos de origen marino, producidos especialmente por microorganismos o tunicados. Algunos de éstos se representan en las Figuras 1 y 2 (14).



Streptomyces sp.





Jorunna funebris

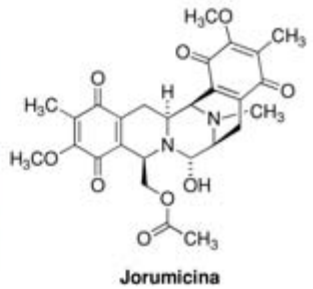
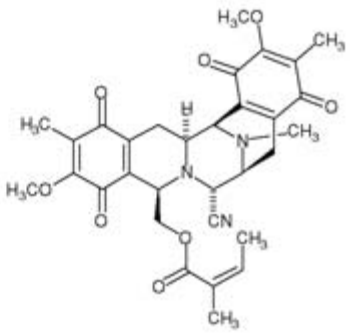


FIGURA 1. ***Microorganismos y organismos productores de saframicinas y jorumicina.***



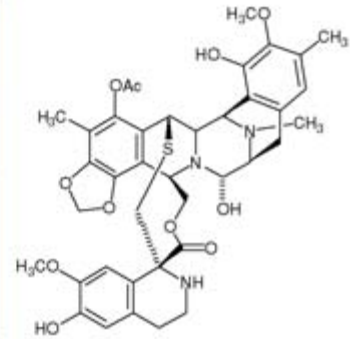
Reniera sp



Renieramicina M



Ecteinascidia



ET 743 (Ectenaiscidina 743,Trabectedina, Yondelis®) PharmaMar

FIGURA 2. ***Organismos productores de renieramicina M y trabectedina.***

Dentro de estos compuestos el más estudiado es la trabectedina (ecteinascidina-743), que se desarrolla por la empresa madrileña PharmaMar en colaboración con Johnson & Johnson y cuya comercialización ha sido aprobada recientemente en Europa para el tratamiento del sarcoma de tejido blando con el nombre Yondelis®. Previamente, recibió la designación de fármaco huérfano para el tratamiento de cáncer de ovario (Europa, 2003; Estados Unidos, 2005) (15). A pesar del éxito de la trabectedina, esta molécula presenta limitaciones ya que, aunque se ha resuelto el acceso a este compuesto por vía semisintética, el proceso químico es muy laborioso debido a la complejidad de su estructura (16). Por ello, sigue

siendo de interés la búsqueda de análogos más sencillos que mantengan la actividad.

Otro producto natural de origen marino que consideramos muy interesante como cabeza de serie es la cribrostatina-4, que a pesar de su potente actividad en células de melanoma y cáncer de pulmón, ha sido mucho menos estudiado y posee un mecanismo de acción desconocido (17). Cabe esperar que, a diferencia de los compuestos que por poseer un grupo ciano e hidroxi en el anillo *C* como ocurre en la trabectedina, son capaces de generar *in vivo* especies de iminio electrófilas, no se comporte como un agente alquilante del surco menor del ADN por no tener la posibilidad de generar cationes iminio, ya que la función que contiene el anillo *C* es una lactama.

También hemos fijado nuestra atención en la quinocarcina, que tiene la particularidad de dañar al ADN por dos mecanismos complementarios: la alquilación a través de la formación de cationes iminio a partir de su fragmento de hemiaminal contenido en el anillo de oxazolidina (*E*),y la generación de radicales superóxido por medio de un proceso de dismutación de dicho anillo (18) (Figura 3).

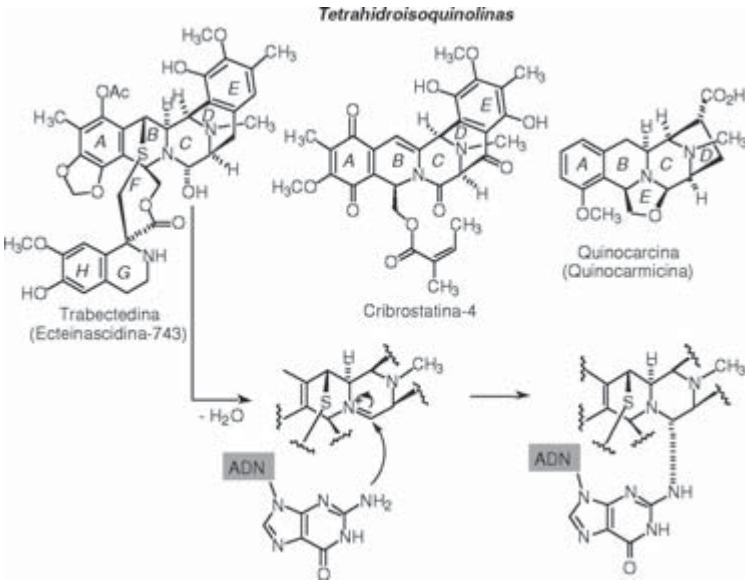


FIGURA 3. ***Algunos de los compuestos naturales de origen marino utilizados como prototipo.*** *Mecanismo propuesto para la alquilación de residuos de guanina que produce la trabectedina en el surco menor de ADN.*

Se están preparando varias familias de análogos simplificados de éstos y otros compuestos cabeza de serie, con objeto de contribuir al establecimiento de relaciones estructura-actividad, siendo otro de los objetivos la simplificación de las moléculas prototipo con la finalidad de encontrar compuestos bioactivos con una mejor accesibilidad sintética que los productos naturales.

La actividad citotóxica *in vitro* de los compuestos sintetizados se estudia en varias líneas de tumores sólidos, en colaboración con los laboratorios PharmaMar y se han iniciado diversos estudios con la ayuda de otros colaboradores externos para esclarecer cuáles son sus dianas y postular sus mecanismos de acción.

RESULTADOS

Iniciamos el proyecto poniendo a punto una nueva estrategia sintética que hasta ahora ha demostrado gran versatilidad y muy buen rendimiento para obtener *trans* y *cis* derivados de tetrahidropirazino[1,2-*b*]isoqinolina-1,4-dionas, que son compuestos tricíclicos que contienen los anillos *A-C* de los antibióticos citotóxicos citados (19-21) y (23). Esta estrategia permite una gran versatilidad de los sustituyentes de anillo *A*, partiendo de aldehídos aromáticos convenientemente sustituidos, y del anillo *B*, utilizando acetales de diferentes aldehídos. También se está desarrollando una metodología sintética que parte del sistema tricíclico constituído por los anillos *C-E* (22) y (24). Según nuestros resultados, los sistemas tricíclicos anteriormente comentados no sólo son precursores de los compuestos modelo, en los que se puede introducir una gran variedad estructural, sino que posibilitan además el hallazgo de estructuras más simples que retengan la actividad citotóxica.

El estudio *in vitro* de los primeros análogos de los antitumorales tetrahidroisoquinolínicos que se obtuvieron, entre los cuales los compuestos **1-8** se mencionan como ejemplos representativos, se realizó frente a las líneas celulares HT-29 (adenocarcinoma colorectal humano- ATCC # HTB-38), MDA-MB 231 (adenocarcinoma de mama humano- ATCC # HTB-26), y A-549 (carcinoma de pulmón humano- ATCC # CCL-185). Muchos de estos compuestos se sintetizaron utilizando el dimetil acetal de *N*-ftalimidoacetaldehído a fin de

mimetizar la cadena de la ftalascidina, un compuesto de síntesis que mantiene prácticamente la citotoxicidad de la trabectedina (25). Este estudio reveló que varios de los compuestos obtenidos poseen valores GI_{50} («Growth Inhibition»: concentración que produce el 50% de inhibición de crecimiento) en el rango μM, siendo el aspecto más interesante el hecho de que sean activos tanto los compuestos capaces de generar especies de alquilantes de ADN por dar lugar fácilmente a especies de iminio (compuestos **1** y **8**), como otros que no tienen esa propiedad (compuestos **2**-**7**) (26) (Figura 4).

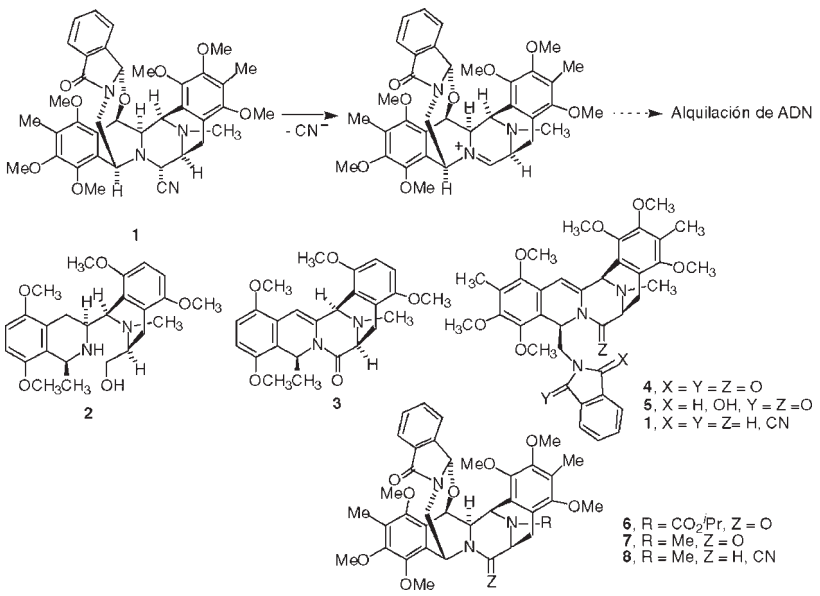


FIGURA 4. ***Compuestos representativos estudiados inicialmente.***

Este descubrimiento es relevante porque indica la posibilidad de lograr actividad antitumoral en análogos de trabectedina a través de mecanismos diferentes de los conocidos hasta la fecha, aspecto que está estudiando actualmente la Dra. Rosario Perona, del Departamento de Biología Molecular y Celular del Cáncer, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas «Alberto Sols».

También se están estudiando derivados simplificados que contienen el fragmento *ABC* y carecen de los anillos *D* y *E*, habiéndose

comprobado que, aparentemente, estos dos anillos no son imprescindibles para la actividad citotóxica. Por ejemplo, el compuesto **9**, también derivado del dimetil acetal del *N*-ftalimidoacetaldehído (Figura 5), ha resultado poseer una citotoxicidad semejante a la de otros análogos previamente estudiados que poseían los anillos *D* y *E*. En la síntesis de esta serie de compuestos se ha pretendido extender el uso de los iones iminio, para lo cual se ha aplicado la reducción iónica a la función lactama en C(1), siendo ésta la primera vez que se utiliza esta reacción en derivados de piperazinadiona.

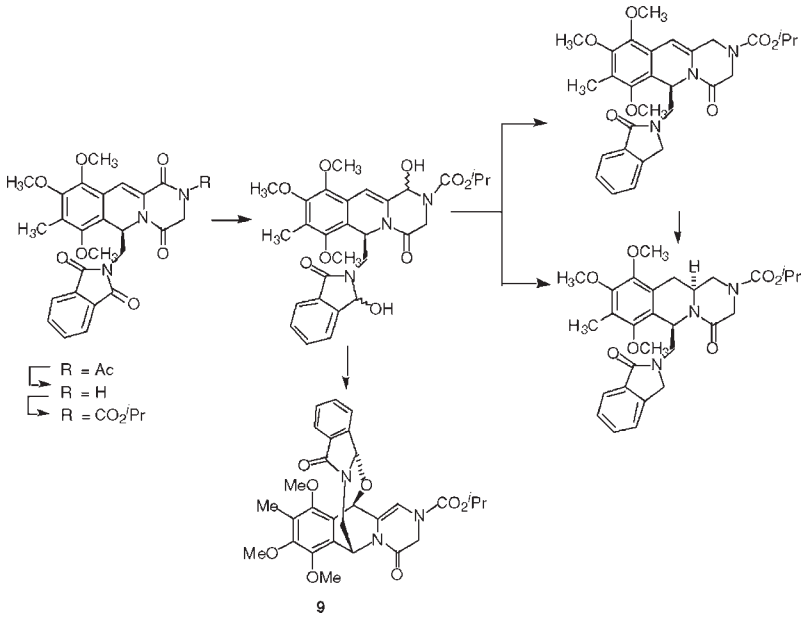


FIGURA 5. ***Ejemplos de compuestos tricíclicos que poseen un sustituyente derivado de ftalimida.***

La transformación de la función carbamato para dar los correspondientes *N*-metilderivados ha dado lugar a varios derivados, entre los que destacamos por su citotoxicidad el compuesto **10** (27) (Figura 6).

También se está estudiando la actividad antitumoral de sistemas tricíclicos con distintos sustituyentes en la posición C-6, especialmente aciloximetilo y acilaminometilo, habiéndose desarrollado la síntesis diastereoselectiva de uno de sus precursores: el benciloxime-

til derivado **11**. A través de la manipulación reductora sistemática de sus dos funciones lactama, este compuesto ha dado lugar a un amplio espectro de estructuras: 1-hidroxy-2-alcoxycarbonil derivados, C(4)-monolactamas, derivados de 4,6-epoximetano y C(4)-carbonitrilos. Los derivados de 4,6-epoximetano son compuestos tetracíclicos que poseeen el esqueleto de quinocarcina. En todos ellos la cadena lateral en C(6) y el sustituyente en N(2) se ha podido modificar con facilidad (28) y (29) (Figura 7).

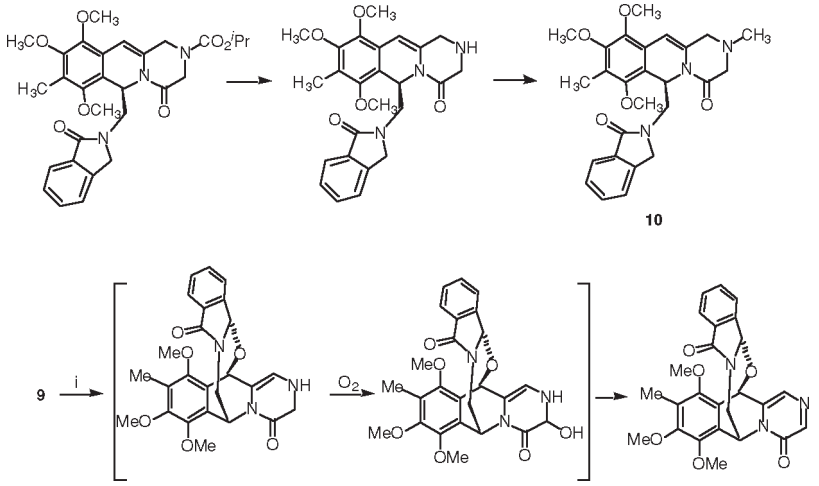


FIGURA 6. ***Otros compuestos tricícliclos que poseen un sustituyente derivado de ftalimida.***

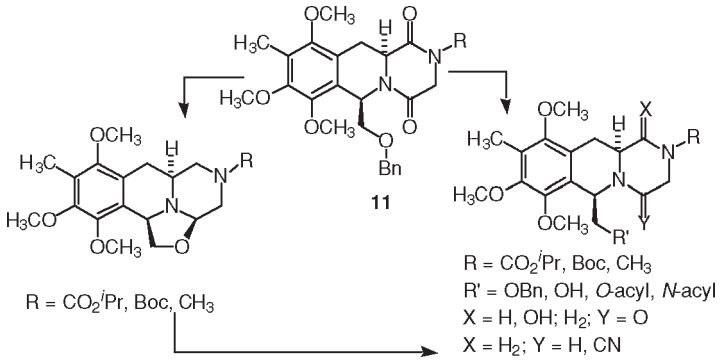


FIGURA 7. ***Compuestos tricícliclos y tetracíclicos obtenidos a partir del benciloximetil derivado 11.***

La actividad citotóxica de alguno de estos compuestos, también carentes de los anillos *D, E* presentes en los compuestos naturales y de síntesis de referencia, es muy interesante, habiéndose encontrado compuestos con valores de GI_{50} del orden submicromolar (10^{-7} M) (29). Esta actividad se intentará optimizar mediante modificaciones estructurales hasta llegar a valores de GI_{50} del orden 10^{-8} ó, si es posible, 10^{-9} M.

Otra aproximación sintética para la obtención de análogos de estos productos naturales se basa en la reducción selectiva de uno de los dobles enlaces de estructuras tipo **12** seguida de activación y ciclación a **13**. Estos compuestos contienen los anillos *C-E* y posteriormente han servido como precursores de los sistemas pentacíclicos (Figura 8). Algunos de ellos han mostrado también valores GI_{50} frente a distintas líneas celulares de tumores sólidos del orden μM (30).

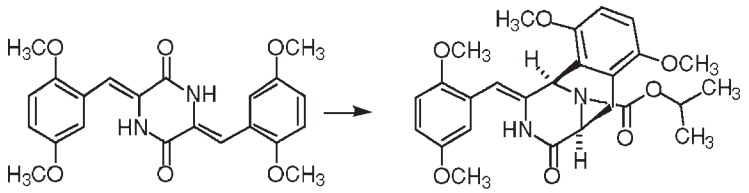


FIGURA 8. ***Compuestos tricíclicos que contienen los anillos C-E.***

Por otra parte, dado el interés de los α-oxopeptidomiméticos, como el compuesto **15** (Figura 9), y en particular de los derivados del ácido indol-2-carboxílico **16**, cuyas estructuras están presentes en compuestos con actividad biológica tales como algunos inhibidores de transcriptasa inversa (31) o agentes antitumorales (32), hemos desarrollado un nuevo método de síntesis a través de la alcoholisis de los compuestos **14**, que son nuestros precursores en la síntesis los sistemas de tetrahidropirazino[1,2-*b*]isoqinolina-1,4-diona anteriormente comentados (33). Actualmente se está realizando su estudio biológico por parte del equipo del Dr. A. V. Ferrer Montiel, en la U. «Miguel Hernández» de Elche.

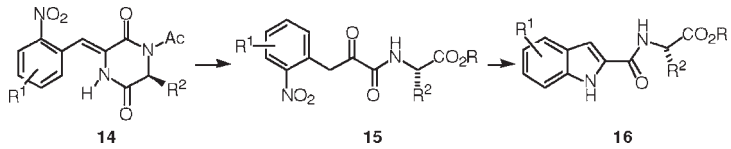


FIGURA 9. ***Ejemplos de α-Oxopeptidomiméticos y derivados del ácido indol-2-carboxílico obtenidos a partir de un precursor análogo al utilizado para los antitumorales derivados de pirazinoisoquinolina.***

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de estas líneas de investigación ha sido posible gracias al esfuerzo de todos los Profesores del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid que forman parte del grupo del que soy Investigador Responsable, y muy especialmente de los doctorandos y de los alumnos postdoctorales que han participado en ellas.

En el proyecto de alcaloides pirazinoisoquinolínicos, que se comenta algo más detalladamente en esta revisión, hay que agradecer la dedicación de los alumnos de Tercer Ciclo que han desarrollado o están desarrollando su Tesis Doctoral en este tema: J. F. González, A. López-Cobeñas e Irene Ortín.

Asimismo, agradezco a la CICYT, a la Comunidad de Madrid y a la Universidad Complutense, la financiación que hemos recibido a través de los proyectos SAF 2000-0130, SAF 2003-03141 y GRUPO 920234, así como la colaboración de las empresas y grupos de investigación que realizan los ensayos de actividad biológica y se han mencionado en este resumen.

A todos ellos, mi más efusivo agradecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

(1) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. (2003) Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod*. 66: 1022-1037.

(2) RAVELO, A. G.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; CHÁVEZ-ORELLANA, H.; PÉREZ-SACAU, E.; MESA-SIVERIO, D. (2004) Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr. Topics Med. Chem.* 4: 241-265.

(3) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70: 461-477.

(4) SCHWARTSMANN, G.; DA ROCHA, A. B.; MATTEI, J.; LOPES, R. (2003) Marine-derived anticancer agents in clinical trials. *Expert Opin. Invest. Drugs* 12: 1367-1383.
(5) PIGGOTT, A. M.; KARUSO, P. (2005) Quality not Quantity. The Role of Marine Natural Products in Drug Discovery and Reverse Chemical Proteomics. *Mar. Drugs*, 3: 36-63.
(6) AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1998) Recent progress in the Synthesis of Antitumour Azaanthraquinones. *Recent Research Developments in Organic Chemistry*, 2: 69-86.
(7) AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2004): Synthetic Studies on *N*-Methylelwitindoolinone C Isothiocyanate (Welwistatin) and Related Substructures. *Curr. Org. Synthesis*, 1: 65-82.
(8) AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2004) Recent Advances in Multidrug Resistance Modulators. *Med. Curr. Rev*. 1: 419-444.
(9) AVENDAÑO, C. ; ALONSO, M. A.; ESPADA, M.; GARCÍA-GRÁVALOS, D.; MENÉNDEZ, J. C.; OCAÑA, B.; PÉREZ, J. M. (1993) New Synthetic Antitumoral Compounds, Patente Europea 0 574 195 15 , Patente USA 08/412,983, Patente en Canadá 2,097,73, Patente en Japón 172011/93, Patente en Australia 40044/93, Patente en Suráfrica 93/04012.
(10) AVENDAÑO, C.; GARCÍA-GRÁVALOS, D. (1995) Nuevos Derivados Antraquinónicos con Actividad Antitumoral y sus Aplicaciones, WO 95/23145, Patente en Canadá 2,161,318, Patente en Japón 522151/1995, Patente USA 08/535,174. Patente Europea 95908946.
(11) AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C.; BLANCO, M. M.; GARCÍA-GRÁVALOS, D.; FERNÁNDEZ-PUENTES, J. L. (1997) New Cytotoxic Compounds Derivatives of the Pyrido[2,3,4-*kl*]acridine ring system, Patente en el Reino Unido 9708751.
(12) AVENDAÑO, C.; PÉREZ, J. M.; BLANCO, M. M.; MENÉNDEZ, J. C.; GARCÍA-GRÁVALOS, D.; DE LA FUENTE, J. A.; MARTÍN, M. J. (1999) Antitumour 1,5-diazaanthraquinones, patente Internacional WO 99/59996.
(13) FERNÁNDEZ-PUENTES, J. L.; GARCÍA-GRÁVALOS, D.; AVENDAÑO, C.; BLANCO, M. M.; MENÉNDEZ, J. C. (2003) Cytotoxic Compounds: Derivatives of the Pyrido[2,3,4-kl]acridine ring system, Patente USA 6,656,948 B2.
(14) SCOTT, J. D.; WILLIAMS, R. M. (2002) Chemistry and Biology of the Tetrahydroisoquinoline Antitumor Antibiotics. *Chem. Rev*. 102: 1669-1730.
(15) D'INCALCI, M.; JIMENO, J. (2003) Preclinical and clinical results with the natural marine product ET-743. *Expert Opin. Invest. Drugs*. 12: 1843-1853.
(16) CUEVAS, C.; PÉREZ, M.; MARTÍN, M. J.; CHICHARRO, J. L.;FERNÁNDEZ-RIVAS, C.; FLORES, M.; FRANCESCH, A.; GALLEGO, P.; ZARZUELO, M.; DE LA CALLE, F.; GARCÍA, J.; POLANCO, C.; RODRÍGUEZ, I.; MANZANARES, I. (2000) Synthesis of Ecteinascidins 743 from Cyanosafracin B. *Org. Lett*. 2: 2545-2548.
(17) KUMAR, R.; ZI-RONG, X. (2004) Biomedical compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs*. 2: 123-146.
(18) FLANAGAN, M. E.; ROLLINS, S. B.; WILLIAMS, R. M. (1995) Oxygen-Dependent Cleavage of DNA by Tetrazomine. *Chem. Biol.* 2: 147-156.
(19) GONZÁLEZ, J. F.; DE LA CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. (2003) Short stereocontrolled synthesis of *trans* and *cis*-tetrahydro-pyrazinoisoquinolinediones. *Tetrahedron Lett*. 44: 4395-4398.

(20) GONZÁLEZ, J. F.; DE LA CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. (2004) Improvements in Aldol Reactions with Diketopiperazines. *Synthetic. Commun*. 34: 1589-1597.
(21) GONZÁLEZ, J. F.; DE LA CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. (2004) Pictet Spengler-type reactions in 3-arylmethylpiperazine-2,5-diones. Synthesis of pyrazinotetrahydroisoquinolines. *Tetrahedron*, 60: 6319-6326.
(22) LÓPEZ-COBEÑAS, A.; CLEDERA, P.; SÁNCHEZ, J. D.; PÉREZ-CONTRERAS, R.; LÓPEZ-ALVARADO, P.; RAMOS, M. T.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2005) Solvent-Free, Efficient Synthesis of 2,5-piperazinediones from Boc-Protected Dipeptide Esters under Microeave Irradiation. *Synlett*, 1158-1160.
(23) GONZÁLEZ, J. F.; SALAZAR, L.; DE LA CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. (2005) Synthesis of Phthalascidin Analogs. *Tetrahedron*, 61: 7447-7455.
(24) LÓPEZ-COBEÑAS, A.; CLEDERA, P.; SÁNCHEZ, J. D.; PÉREZ-CONTRERAS, R.; LÓPEZ-ALVARADO, P.; RAMOS, M. T.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2005) Microwave-Assisted Synthesis of 2,5-piperazinediones under Solvent-Free Conditions. *Synthesis*, 3412-3422.
(25) MARTÍNEZ, E. J.; COREY, E. J.; OWA, T. (2001) Antitumor activity and gene expression-based profiling of ecteinacidin Et 743 and phthalascidin Pt 650. *Chem. Biol*. 8: 1151-1160.
(26) GONZÁLEZ, J. F.; DE LA CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. (2007) Synthesis and cytotoxic activiy of pyrazino[1,2-*b*]-isoquinolines, 1-(3-isoquinolyl)isoquinoline, and 6,15-iminoisoquino[3,2-*b*]-3-benzazocines. *Bioorg. Med. Chem*. 15: 112-118.
(27) GONZÁLEZ, J. F.; ORTÍN, I.; DE LA CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. Synthesis and Cytotoxic Activity of Compounds Related to Phthalascidin and Cribrostatins. (trabajo en preparación).
(28) IRENE ORTÍN. Búsqueda del farmacóforo de antibióticos antitumorales en derivados de pirazino[1,2-*b*]-isoquinolina, Trabajo de Investigación presentado para obtener el Diploma de Estudios Avanzados (DEA) dentro del Doctorado Interuniversitario de «Química Médica» en Julio de 2007.
(29) ORTÍN, I.; GONZÁLEZ, J. F.; DE LA CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. Comunicación al XV Congreso de la Sociedad Española de Química Terapéutica. El Escorial, Septiembre de 2007.
(30) LÓPEZ-COBEÑAS, A.; LÓPEZ-ALVARADO, P.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. Comunicación al XV Congreso de la Sociedad Española de Química Terapéutica. El Escorial, Septiembre de 2007.
(31) CHEN, K. X.; NJOROGE, F. G.; ARASAPPAN, A.; VENKATRAMAN, S.; VIBULBHAN, B.; YANG, W.; PAREKH, T.N.; PICHARDO, J.; PRONGAY, A.; CHENG, K.; BUTKIEWICZ, N.; YAO, N.; MADISON, V.; GIRIJAVALLABHAN, V. (2006) Novel potent hepatitis C virus NS3 serine protease inhibitors derived from proline-based macrocycles. *J. Med. Chem*. 49: 995-1005.
(32) KENDE, A. S.; LIU, K.; KALDOR, I.; DOREY, G.; KOCH, K. (2006) Total Synthesis of the Macrolide Antitumor Antibiotic Lankacidin C. *J. Am. Chem. Soc*. 117: 8258-8270.
(33) GONZÁLEZ, J. F.; DE LA CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. (2006) From cyclic dehydrodipeptides to uncommon acyclic peptide mimetics. *Tetrahedron Lett*. 47: 6711-6714.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1093-1125

Revisión

Papel de la caveolina-1 en la regeneración hepática tras hepatectomía parcial. Mecanismos de señalización y función en la regulación de la proliferación hepática

Recibido el 19 de diciembre de 2007

RAFAEL MAYORAL, AMALIA FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, ROSA ROY, LISARDO BOSCÁ Y PALOMA MARTÍN-SANZ*

Instituto de Investigaciones Biológicas «Alberto Sols» (CSIC-UAM) Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, España.

RESUMEN

Las caveolas participan en múltiples procesos celulares tales como el transporte vesicular, homeostasis del colesterol, regulación de la señalización intracelular, por integrinas y proliferación celular. Sin embargo, su función en el hígado no está bien establecida. La expresión de caveolina 1 (Cav), la proteína más abundante en las caveolas, está bien descrita en el hígado y en varias líneas de hepatocitos y en hígado cirrótico humano y en carcinoma hepatocelular. Sin embargo, el papel de Cav-1 en la fisiopatología hepática es controvertido, ya que se ha propuesto un

* **Correspondencia:**
Dra. Paloma Martín Sanz.
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Arturo Duperier 4.
28029 Madrid, Spain.
Fax: 34915854401; e-mail: pmartins@iib.uam.es

Dr. Lisardo Boscá.
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Arturo Duperier 4.
28029 Madrid, Spain.
Fax: 34915854401; e-mail: lbosca@iib.uam.es

papel crítico en el proceso de regeneración tras hepatectomía parcial (HP). Contrariamente a esta observación, nuestros datos sugieren que Cav-1 aumenta en el hígado regenerante, con una re-distribución de la proteína desde las caveolas hacia dominios no caveolares. Además, la Cav-1 localizada en estas fracciones está fosforilada en la tirosina 14. A pesar de ello, el gen de la Cav-1 es dispensable para la regeneración hepática tras HP, tal como se deduce de animales que carecen de este gen. En conjunto, estos datos muestran un papel dinámico de la Cav-1 en la proliferación hepática tras HP y en líneas hepáticas en cultivo, pero con mínimas implicaciones en el proceso regenerativo.

Palabras clave: caveolina; hepatocito; hepatectomía; regeneración hepática.

SUMMARY

Role of caveolin 1 on liver regeneration after partial hepatectomy. Mechanisms of signalling and effect on the regulation of hepatocyte proliferation.

Although caveolae participate in many cellular processes such as vesicular transport, cholesterol homeostasis, regulation of signal transduction, integrin signaling and cell growth, their role in liver remains elusive. Expression of caveolin 1 (Cav), the most abundant protein of caveolae, has been reported in liver and in different hepatocyte cell lines, in human cirrhotic liver and in hepatocellular carcinomas. However, the role of Cav-1 in liver pathophysiology remains controversial and a critical role in regeneration after partial hepatectomy (PH) has been reported. Opposite to this observation, our data support the view that Cav-1 increases in liver after PH with a redistribution of the protein from the caveolae enriched domain to the noncaveolar fraction. Moreover, the Cav-1 located in the noncaveolar fraction is phosphorylated in tyrosine 14 (Tyr^{14}). Even though, the Cav-1 gene is dispensable for liver regeneration after PH as deduced from data obtained with commercially available animals lacking this gene. Taken together these results support a dynamic role for Cav-1 in liver proliferation both *in vivo* after PH, and *in vitro* in cultured hepatic cell lines, but with minimal implications in the liver regeneration process.

Key words: caveolin, hepatocyte, hepatectomy, liver regeneration.

1. CAVEOLAS Y CAVEOLINA

Las caveolas fueron identificadas en los años 50 por microscopía electrónica como invaginaciones de la membrana en la superficie de células epiteliales y endoteliales. Estas vesículas plasmáticas con un

tamaño de 50 a 100 nm se denominaron «caveolae intracellulare» por su similitud con una cueva, o «plasmalemmal vesicles» (1, 2). Cuarenta años después de su descripción se pudo estudiar la naturaleza molecular de las caveolas identificando a una proteína, la caveolina (Cav), como la proteína mayoritaria de estas estructuras (3), pero además las caveolas están enriquecidas en esfingolípidos y en colesterol. Se han identificado tres tipos de Cav (1, 2, y 3) con diferentes patrones de expresión en células diferenciadas. Cav-1 y Cav-2, ambas con dos isoformas (α y β), se encuentran en adipocitos y células endoteliales (4), mientras que Cav-3 solo se expresa en células de tipo muscular (5). Aunque cada vez hay más procesos en los que las caveolas y la caveolina están implicadas, sus papeles fisiológicos son muy diferentes dependiendo del tipo celular y del órgano examinado. En el tejido vascular predominan las funciones endocíticas y vasorreguladoras, mientras que en la musculatura tienen un papel importante en la integridad estructural. Las caveolas participan en diferentes procesos celulares como el transporte de vesículas independiente de clatrina (transcitosis, endocitosis y pinocitosis) (6), la homeostasis del colesterol (7), la regulación de la transducción de señales (8), la señalización a través de integrinas (9) y la supresión de la proliferación celular (10). El desarrollo de los modelos murinos deficientes en caveolina (11-14) han permitido analizar las funciones fisiológicas de la caveolina y las caveolas en mamíferos a nivel celular y sistémico.

1.1. Definición y morfología

La definición inicial de caveola fue una descripción tomada a partir de las imágenes de microscopía electrónica de unas vesículas «lisas» procedentes de invaginaciones de membrana que eran diferentes de las vesículas «densas», que son las vesículas de clatrina. La definición de las caveolas se ha ampliado y ahora también se denomina caveola a los grupos de pequeñas vesículas que se encuentran próximas a la membrana plasmática y asociadas de manera similar a racimos de uva, rosetas e incluso se fusionan a modo de tubos o canales transcelulares (Figura 1A). Estas formas no tradicionales de las caveolas se encuentran en diferentes tejidos. Los racimos son muy abundantes en las células musculares, las rosetas en adipocitos,

y los túbulos vesiculares en las células endoteliales (15-17). Estas invaginaciones y vesículas no son estáticas y pueden fusionarse con otras estructuras de membrana y otros orgánulos celulares, dejando de ser estrictamente caveolas.

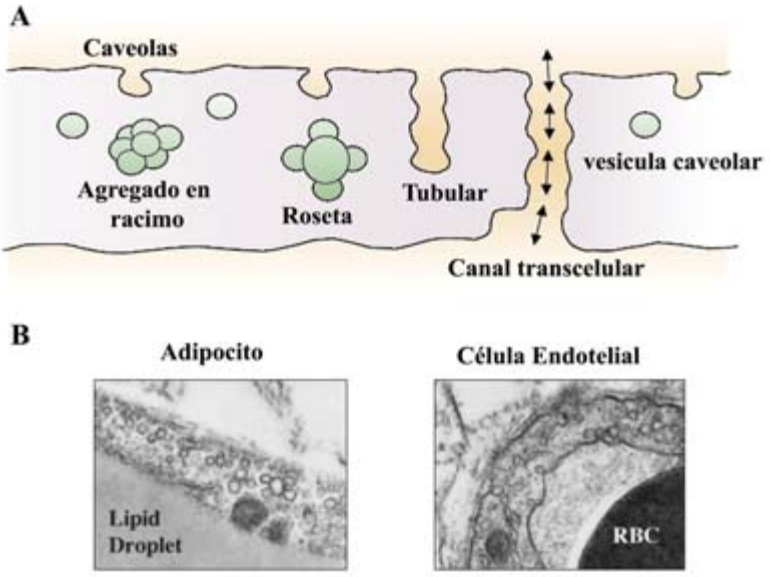


FIGURA 1. ***Caveolas: definición morfológica y plasticidad. A****, Las caveolas tienen diferentes formas que difieren de las tradicionales vesículas, pueden formarse agregados a modo de roseta, o de racimo e incluso formar tubos intracelulares o canales que atraviesan las células, como sucede en el caso de las células endoteliales.* ***B****, Fotos de microscopía electrónica en adipocitos y células endoteliales. Las rosetas caveolares se encuentran en adipocitos y en células endoteliales se pueden observar todos los tipos de morfologías caveolares (37).*

1.2. Composición y propiedades bioquímicas de las caveolas

La membrana plasmática se ha definido por el modelo del «mosaico fluido» (18) como una estructura casi líquida, donde tanto los lípidos como las proteínas integrales, que están dispuestos en una organización de mosaico, pueden realizar movimientos de traslación dentro de la bicapa. Pero en esta definición hay que introducir un estado de «líquido ordenado», donde la bicapa lipídica no está en un continuo recambio de fosfolípidos (19). Los dos estados de la mem-

brana definidos como «líquido ordenado» y como «líquido desordenado» pueden coexistir en la misma membrana plasmática. En las membranas biológicas existen unas ínsulas rígidas, dentro de un mar de fosfolípidos, formadas por colesterol y esfingolípidos (glucoesfingolípidos y esfingomielina) que se denominaron «lipid rafts» o «balsas de lípidos» (20, 21) (Figura 2). Las caveolas han sido consideradas tradicionalmente como una forma invaginada y vesicular específica de las balsas lipídicas (20, 21), y aunque hay proteínas que están en los dos tipos de estructuras, algunas están solo en las balsas lipídicas o solo en las caveolas (22). Las caveolas y las balsas lipídicas comparten muchas funciones, la diferencia de estos microdominios radica en la localización de la caveolina, por lo tanto, la caveolina es un marcador selectivo de las caveolas y permite hacer un análisis específico de la función caveolar. La composición específica de fosfolípidos de estas estructuras de membrana hace que estos microdominios tengan propiedades bioquímicas diferentes y puedan ser resistentes a la solubilización en detergentes no iónicos a 4ºC, como Tritón X-100, o tengan menor densidad que el resto de las membranas. Estas propiedades son la base de la identificación, purificación y caracterización de las balsas lipídicas y de las caveolas (23, 24).

2. LA FAMILIA DE LAS CAVEOLINAS.

2.1. La caveolina es la proteína que recubre las caveolas.

El descubrimiento de la caveolina se produjo de manera indirecta buscando sustratos fosforilables en fibroblastos transformados con el virus del sarcoma de Rous. De las cuatro proteínas fosforiladas en tirosina que se purificaron, una de 22 kd se la relacionó con la elevada capacidad de transformación del virus y se propuso un papel celular en oncogénesis (25). Los anticuerpos generados frente a esta proteína de 22 kd producían una tinción similar a la de los filamentos que recubren las caveolas y que se habían descrito con anterioridad en estudios estructurales. Estos datos sugerían que esta molécula era la proteína que recubría las caveolas y por eso se la denominó *caveolina*, como el primer marcador de microdominios caveolares (26).

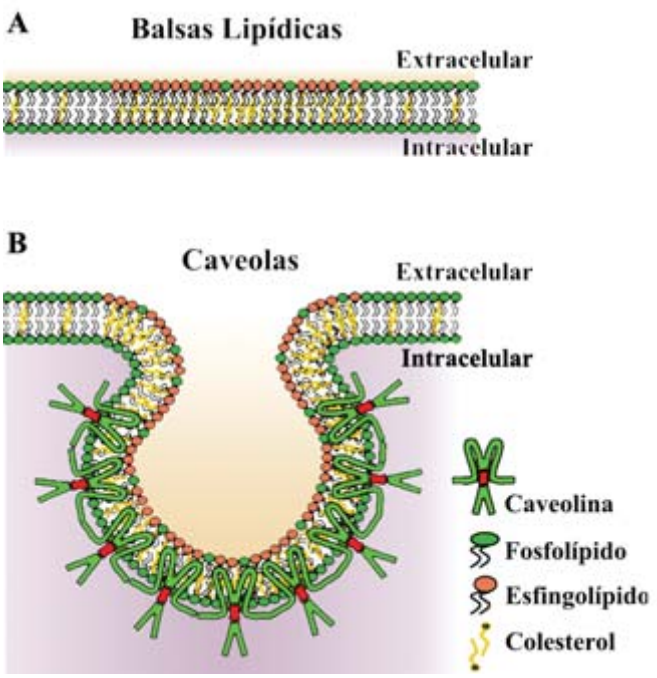


FIGURA 2. ***Organización de las balsas lipídicas y caveolas. A****, Balsas lipídicas, la «fase ordenada» contiene colesterol y están orientadas al exterior celular. La «fase desordenada» se compone básicamente de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina).* ***B****, Caveolas. Cuando la Cav se inserta en las balsas lipídicas se forman invaginaciones a modo de cueva. La Cav forma homo-oligómeros (simplificados en dímeros y en color verde) que proveen la estructura tridimensional necesaria para formar las caveolas. El dominio de oligomerización de Cav-1 se muestra en rojo (37).*

2.2. Tres caveolinas diferentes, Cav-1, Cav-2 y Cav-3.

Se han identificado tres miembros de la familia génica de la caveolina (Figura 3). El gen de CAV-1 se compone de tres exones que se encuentran muy conservados en todas las especies y se han descrito dos isoformas, la predominante o Cav-1α, de 178 residuos, y una isoforma derivada de una iniciación de la traducción interna (met 32) (27) denominada Cav-1β, de 147 residuos. CAV-2 fue clonado en adipocitos y se compone de tres exones que codifican para una proteína de 162 residuos cuya secuencia es muy similar a la de Cav-1. Cav-2α representa la secuencia completa de la proteína. Se han

descrito dos isoformas truncadas, Cav-2β y Cav-2γ, que no se han caracterizado (28). El gen CAV-3 fue identificado a través de una base de datos que buscaba y analizaba librerías de ADNc para genes homólogos a CAV-1, y está compuesto por dos exones que codifican una proteína de 151 residuos (29). Los tres genes están localizados en el cromosoma 6 murino. Cav-1 comparte con Cav-3 una elevada similitud en la secuencia aminoacídica. Los genes homólogos humanos de CAV-1 y CAV-2 se localizan en el cromosoma 7q31.1 cerca del marcador genético D7S522, que es conocido como un sitio frágil o FRAG7G (30). Muchos cánceres epiteliales (mama, próstata, ovarios y renal) tienen delecciones alrededor de este marcador (31-33),

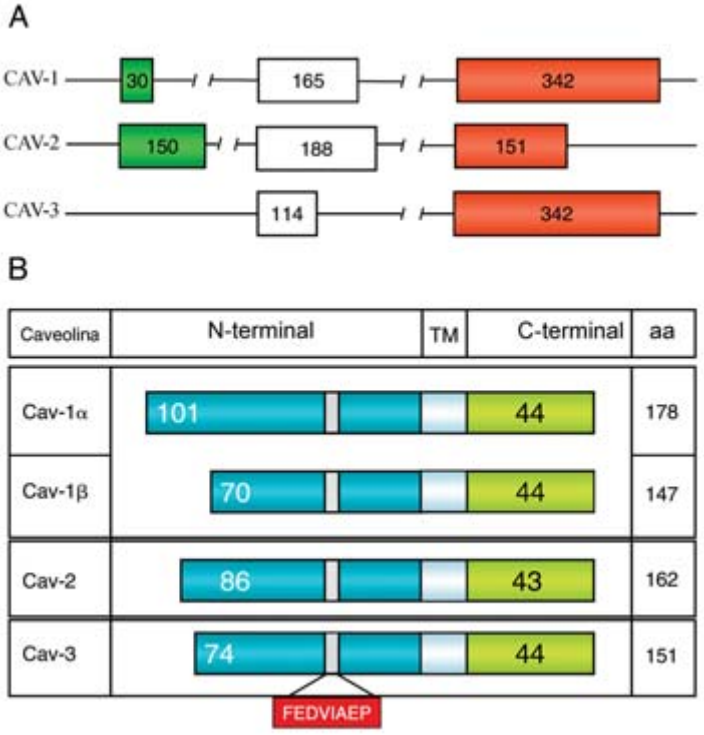


FIGURA 3. ***La familia de las caveolinas***. ***A***, *Secuencia génica de CAV-1, CAV-2 y CAV-3. Los exones se muestran en recuadros y en cada uno está indicado el número de nucleótidos que lo componen.* ***B***, *Estructura de las 3 proteínas (Cav-1, Cav-2 y Cav-3) incluidas las 2 isoformas de Cav-1, tomando como eje central el dominio TM o transmembrana. El motivo firma o «caveolin signature motif» (FEDVIAEP) mediante el cual se caracterizan las caveolinas aparece en el recuadro inferior de color rojo (130).*

lo que sugiere que en esa zona existe un gen supresor de tumores. CAV-2 se encuentra localizado a 67 kb por debajo de D7S522 y CAV-1 está 19 kb más abajo que CAV-2 (34). El gen humano de CAV-3 se localiza en 3p25 (35, 36), a unas 7-10 kb del gen del receptor de la oxitocina y cerca del marcador genético D3S18. Las tres proteínas tienen un motivo común llamado «motivo firma» o «caveolin signatura motive» (FEDVIAEP) que está muy conservado en mamíferos (Figura 3B) (37).

2.3. Especificidad de tejido

A nivel estructural, las caveolas pueden ser identificadas en la membrana plasmática de muchos tejidos y tipos celulares. La mayoría de las células tienen caveolas, algunas en cantidad elevada, como ocurre en adipocitos, células endoteliales, neumocitos de tipo I, fibroblastos, células de tejido liso muscular y células de músculo estriado (1, 38-41). Pero hay ciertos tipos celulares, como las neuronas y los linfocitos del sistema nervioso central, que no forman este tipo de invaginaciones de membrana (42, 43).

La expresión de Cav-1 y Cav-2 es diferente a la de Cav-3. Los adipocitos, células endoteliales, neumocitos y fibroblastos tienen niveles elevados de Cav-1 y -2, mientras que Cav-3 se expresa en células de tipo muscular como tejido cardíaco, esquelético y células de músculo liso (16, 28, 29). A pesar de las diferencias de secuencia entre Cav-1 y Cav-2, en los tejidos en los que se expresa Cav-1 se puede detectar Cav-2; pero en aquellos tejidos en los cuales se expresa Cav-3 no se detecta Cav-1, lo que indica que aunque Cav-1 y Cav-3 tienen un alto grado de homología, poseen diferentes funciones *in vivo*.

3. SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS CAVEOLAS/ CAVEOLINAS

Desde su descubrimiento es los años 50, se ha especulado mucho sobre la función de las caveolas y se han atribuido muchos papeles a las caveolas y a su principal proteína, la caveolina. La relevancia

fisiológica de las caveolas se puede resumir en varios aspectos, como son: el transporte vesicular, la homeostasis del colesterol celular, mecanismos de transducción de señales y su capacidad como proteína supresora de tumores. Debido a la amplia literatura existente en la que se describen las diferentes funciones de la caveolina solo se van a desarrollar en profundidad aquellas implicaciones de la Cav-1 en las que se ha centrado esta revisión y que incluyen la transducción de señales y la supresión tumoral.

3.1. Mecanismos de transducción de señales.

3.1.1. La caveolina como «señalosoma»: señalización compartimentalizada

Las caveolas pueden servir como plataforma para la agregación y/o concentración de otras proteínas. Usando la propiedad de insolubilidad de las caveolas en detergentes suaves y su capacidad de flotar en un gradiente discontinuo de sacarosa Lisanti y colaboradores (24) fueron capaces de obtener una fracción caveolar y determinar las diferentes proteínas que se concentran en ella. La mayoría de las proteínas que se identificaron de esta manera fueron moléculas de transducción de señales que se encontraban a concentraciones mayores que en la membrana plasmática (24, 44). Esta observación permitió formular la hipótesis de la «señalización a través de caveolinas y de balsas lipídicas» (45). Actualmente, con la ayuda de la proteómica, se han identificado numerosas proteínas que se localizan preferentemente en las caveolas, como receptores tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G, canales iónicos, proteínas adaptadoras y proteínas estructurales. Las proteínas que se asocian a caveolina mejor descritas son H-Ras, la familia de tirosinas quinasas Src, la subunidad α de proteínas G heterotriméricas, y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), todas tienen una o varias miristilaciones, palmitoilaciones o grupos prenilo (46-51). Dado que las caveolas están implicadas en la compartimentalización de varias vías de señalización, pueden ser consideradas como organelas especializadas en señalización, o más apropiadamente «señalosomas».

3.1.2. Las caveolinas como moduladores de la señalización

Una de las cuestiones que no hay que descuidar es el significado funcional de la caveolina; son solamente proteínas estructurales que forman las caveolas, o pueden tener un papel activo en la retención o modulación de la actividad de proteínas de transducción de señales.

El concepto de «proteína andamio» o «proteína de anclaje» (scaffolding proteins) no es nuevo y la literatura está llena de descripciones de este tipo de proteínas que actúan restringiendo, organizando y/o regulando la distribución subcelular de otras moléculas de señalización (52). La Cav-1 tiene una región de 20 aminoácidos (82-101) denominada «dominio de anclaje de la caveolina» o «caveolin scaffolding domain» (CSD) (Figura 4) que es capaz de inhibir la hidrólisis de GTP por proteínas G heterotriméricas (49) y regula a otras proteínas como la familia de tirosinas quinasas Src, isoformas de

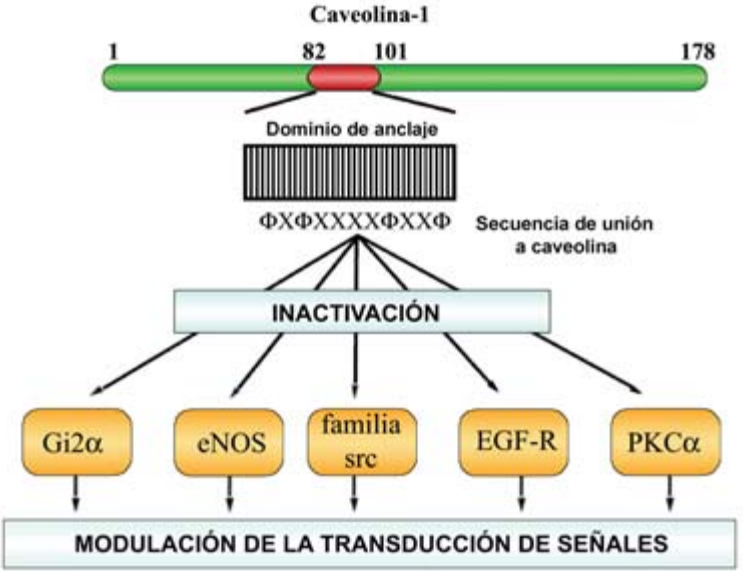


FIGURA 4. ***Interacciones de los dominios de anclaje (CSD) y de unión a caveolina (CBD).*** *Secuencia del dominio de anclaje y de unión a caveolina con varias moléculas de señalización, entre las que destacan: la subunidad Gi2α de proteínas G heterotriméricas, eNOS, la familia Src quinasas en tirosina, EGF-R, e isoformas de PKC (PKCα). En la mayoría de los casos la interacción de las diferentes proteínas de señalización con la caveolina produce un efecto de inhibición y modulación negativa de las vías de transducción de señales (37).*

PKC, y H-Ras (8, 53, 54). Además, con excepción de algunas moléculas de señalización, la interacción con el CSD conduce directamente a la inhibición de la señalización como ocurre con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (55), con c-*neu* (56) y con eNOS (37), que ha sido una de las interacciones con caveolina más estudiada (57-60).

Los motivos encontrados en las moléculas que interaccionan con la caveolina se denominan «dominio de unión a caveolina» o «caveolin binding domain» (CBD) (Figura 4), aunque la presencia de este motivo no implica la interacción directa de la proteína que lo posea con la caveolina. Debido a que las secuencias de CSD y CBD están enriquecidas en aminoácidos aromáticos (61), se ha sugerido que estas interacciones se pueden producir por yuxtaposición de interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas.

De manera adicional, Cav-1 es un potente inhibidor de las vías de proliferación como las mediadas por EGFR y varios miembros de las cascadas de quinasas MAP, Ras-p42/p44 (62). La progresión del ciclo celular a través de una vía dependiente de p53/p21 (63) y la expresión de varias oncoproteínas están reguladas negativamente por Cav-1 (10). Las caveolas concentran diferentes proteínas que tienen un papel en adhesión, migración e invasión celular, como las integrinas αVβ3 y β1 (64) y algunas metaloproteasas como MMP-2 (65) y MT1-MMP (64). Existe una relación dinámica entre los receptores acoplados a proteínas G y las caveolas, se ha demostrado que hay receptores β-adrenérgicos que colocalizan con caveolas (66-68).

La Cav-1 fue identificada como sustrato de la quinasa Src, que la fosforila en la tirosina 14 (Y^{14}) (Figura 5). Cav-1 puede ser fosforilada en respuesta a la estimulación por EGF o insulina; sin embargo, no está claro el significado funcional de la fosforilación en Y^{14}. Se ha propuesto que esta fosforilación puede servir como sitio de anclaje de proteínas con dominios SH2/PTB, como Grb7, para activar cascadas de señalización (69, 70). Trabajos recientes han descrito que la internalización de las caveolas está regulada por la fosforilación en la Y^{14} de Cav-1, y que dicha internalización podría regular de manera negativa diferentes vías de proliferación como Rac, Erk y PI3K en células no adherentes (71). También se ha descrito que la fosforilación en Y^{14} regula la apoptosis mediada por drogas anti-

tumorales, como el paclitaxel (Taxano) en células de cáncer de mama MCF-7 (72). Además, el estrés celular induce la fosforilación de la Y^{14} a través de la activación de p38MAPK y c-Src (73). En este sentido, Cav-1 tendría diferentes dominios con funciones opuestas.

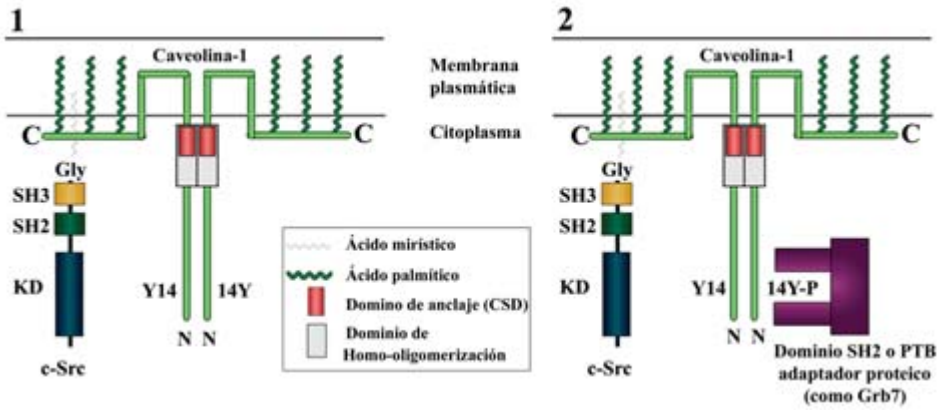


FIGURA 5. ***Diagrama esquemático de la fosforilación de la tirosina 14 de la Cav-1 por parte de la quinasa Src.*** *En el primer paso, es necesaria una modificación post-traduccional tanto de c-Src como de Cav-1 para mantener la proximidad. En el segundo paso, c-Src fosforila a la Cav-1 en la tirosina 14. Cav-1 forma una masa de homo-oligómeros de aproximadamente 350 kDa que contiene 14-16 monómeros de caveolina. La fosforilación en la tirosina 14 podría funcionar como un sitio de anclaje para proteínas con dominios SH2 o PTB (phosphotyrosine binding), como Grb7 (69).*

3.2. Oncogénesis y tumorogénesis

3.2.1. Las caveolas/caveolinas como diana de los oncogenes

La transformación celular es un proceso en el que se produce la activación de proto-oncogenes y en el que están implicadas funciones de crecimiento y supervivencia. La hipótesis que refiere a Cav-1 como una diana de los oncogenes fue demostrada cuando se transformaron células NIH 3T3 con una forma activa de H-Ras y se observó a una regulación negativa a nivel transcripcional de Cav-1, mientras que el tratamiento de estas células con un inhibidor de la cascada de la quinasa Ras-p42/44 MAPK restituyó la expresión de Cav-1 hasta alcanzar los niveles normales (74).

Hay más oncogenes implicados en la regulación negativa de Cav-1 a nivel transcripcional como v-abl, mTAg, bcr-abl, crk1, c-src, c-neu, HPV E6. En casi todos los casos, el mecanismo de esta inhibición no se ha descrito, las excepciones incluyen la represión por c-Myc y por la oncoproteína E6 del virus del papiloma humano. La activación de c-Myc reprime la expresión de Cav-1 a nivel transcripcional (75), y la oncoproteína E6 disminuye la expresión de Cav-1 a través de la inhibición de p53, porque en la secuencia del promotor de Cav-1 hay elementos de respuesta a p53 (76, 77).

3.2.2. Las caveolinas como supresoras de tumores

La decisión de sobrevivir y proliferar o ir a la muerte celular programada, o apoptosis, es esencial para el desarrollo, para mantener la homeostasis tisular y para proteger de un daño celular o genómico. Las caveolas/caveolinas pueden estar implicadas en la modificación del balance entre señales anti-apoptóticas y pro-apoptóticas. Debido a la capacidad de unión y modulación de la caveolina a diferentes proteínas de vías de señalización, también podría regular, de manera similar, la acción de ciertos proto-oncogenes u oncogenes activados.

Basándose en la capacidad de la Cav-1 de inhibir la actividad de varios proto-oncogenes, se la ha propuesto como una proteína supresora de tumores (9, 78-81). Se ha descrito una regulación negativa de la transcripción de Cav-1 en células derivadas de tumores y carcinomas primarios (56, 77, 82).

Los experimentos de sobreexpresión de Cav-1 indican que es un potente inhibidor de vías proliferativas. Cav-1 puede interaccionar e inhibir moléculas implicadas en supervivencia y proliferación, puede suprimir la función del receptor de EGF (55), de varios miembros de la cascada de quinasas Ras-p42/MAPK (83), del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) y de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (84-86). Además Cav-1 es capaz de sensibilizar a las células hacia estímulos apoptóticos y muerte celular inducida por acumulación de ceramida, a través de un mecanismo dependiente de PI3K (86), debido a que en las caveolas se acumula esfingomielina y la enzima que transforma la esfingomielina en ceramida, la esfingomielinasa (87).

También se ha descrito que el silenciamiento de Cav-1 por ARN de interferencia en *Caenorhabditis elegans* conduce a la hiperactivación del ciclo meiótico, que es un fenotipo similar a la señalización descontrolada de Ras (88).

El 60% de los cánceres humanos de mama examinados (carcinomas invasivos) tienen mutaciones en CAV-1 (89). La mutación específica P132L produce una proteína que actúa a modo de dominante negativo y es suficiente para transformar fibroblastos murinos (NIH 3T3) *in vitro* (32, 89). Además las regiones del promotor de CAV-1 enriquecidas en GC están hipermetiladas en las líneas de cáncer de mama y muestras de tumores de próstata, lo que sugiere un silenciamiento transcripcional (30, 90); aunque hay casos en los que no hay cambios en los estados de metilación del promotor de CAV-1 en células tumorales humanas (91).

El marcador genético D3S18 (cerca del que se encuentra CAV-3) es conocido por dos enfermedades, el síndrome de von Hippel-Lindau y el síndrome 3p; en este último se produce una delección hemicigótica de 3pter-p25, que se caracteriza por un retraso en el crecimiento con deformaciones craneofaciales, retraso mental y defectos en el septo cardíaco (92). Muchas de las mutaciones que se han identificado en el gen de CAV-3 conducen a una distrofia muscular.

3.2.3. La caveolina en progresión tumoral.

En muchos artículos científicos se ha descrito una regulación negativa de Cav-1 en diferentes tipos de cánceres y por ello se ha propuesto a Cav-1 como un gen supresor de tumores, pero existen evidencias en las cuales la expresión de Cav-1 está incrementada en diferentes tipos de cáncer. La sobreexpresión de Cav-1 ha sido descrita en las formas más agresivas de cáncer de vejiga, en adenocarcinomas de colon generados experimentalmente en ratones y en células de cáncer de colon humanas, en modelos murinos de cáncer de próstata y en tumores de la familia del Sarcoma de Ewing's (ESFT) (93-96). Además la progestina y su análogo químico MPA, inducen la expresión de Cav-1 en cáncer de mama y en proliferación celular (97). La expresión combinada de c-Myc y Cav-1 se ha propuesto como un marcador de carcinoma de próstata en humanos (98).

4. MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LAS CAVEOLAS Y LA CAVEOLINA

Aunque el interés por las caveolas y las caveolinas ha crecido fuertemente en los últimos 10 años, la mayoría de las investigaciones han estado limitadas a los experimentos en líneas celulares o a análisis bioquímicos. A pesar de el éxito de estas aproximaciones en las funciones de las caveolas/caveolinas en endocitosis, trafico de colesterol, transducción de señales, tumorogénesis y otros procesos, era necesario un modelo *in vivo* para esclarecer las relevancias fisiológicas de las funciones de las caveolas/caveolinas. La caracterización inicial de ratones deficientes en Cav-1 se produjo en 2001 por dos grupos a la vez (11, 13). La mayor sorpresa apareció cuando no se encontraron anormalidades fenotípicas, aunque un análisis funcional e histológico detallado puso de manifiesto una serie de anormalidades interesantes resumidas en la Tabla 1.

Existen ratones deficientes en Cav-1, Cav-2 y Cav-3 (11-14), pero solo en los ratones doble deficientes en Cav-1 y Cav-3, y no para Cav-2, se produce la pérdida de las estructuras caveolares en los tejidos que expresan los diferentes tipos de caveolinas.

A pesar de que las caveolas participan en las numerosas funciones descritas anteriormente, es sorprendente que los distintos modelos murinos que no expresan alguna de las caveolinas sean viables y fértiles. Sin embargo, la pérdida combinada de Cav-1 y Cav-3 produce efectos perjudiciales en la función y la estructura cardiaca (99). Los ratones deficientes en Cav-1 desarrollan lesiones tumorales mamarias (100), y están sensibilizados frente a tumores epiteliales de piel inducidos por carcinógenos (78).

TABLA I. *Análisis fenotípico de los ratones deficientes en caveolina.*

Cav-1 -/-	Cav-2 -/-	Cav-3 -/-
Ausencia de caveolas fibroblastos, endotelio y adipocitos	Presencia de caveolas	Ausencia de caveolas
Reducida expresión de Cav-2 recuperada con la expresión de Cav-1	Reducción parcial de expresión de Cav-1 en ciertos tejidos	Cambios miopáticos Variabilidad en el tamaño de la fibra muscular
MEFs Defectuosa endocitosis caveolar Fenotipo hiperproliferativo Disminuciónen la fase G0/G1		Complejas distrofina-glicoproteína Deslocalizados No colocalización con balsas lipídicas
Anormalidades pulmonares Hipercelularidad Septo alveolar reducido Intolerancia al ejercicio Defectuosa endocitosis caveolar	Anormalidades pulmonares (idénticas a Cav-1 -/-) Sepro alveolar reducido Intolerencia al ejercicio	Anormalidades del Túbulo-T Deslocalización de marcadores Receptor de Rianodina DHPR-1α Túbulos-T (tinción de ferrocianato) dilatado/hinchado orientado longitudinalmente funcionan en direcciones irregulares
Disminución del tono vasculante Posterior a la activación de eNOS		
Anormalidades en adipocitos/lípidos Resistencia a la dicta inducida Obesidad Acúmulos grasos atróficos Reducción del diámetro de células adiposas Hipercelularidaddes diferenciada Hipertrigleceridemia		
Relevancia clínica Enfermedades pulmonares Cáncer Mutación negativa dominante en cáncer de mama (P132L) en humanos (esporádica) Obesidad, hiperlipidemia diabetes	Relevancia clínica Enfermedades pulmonares Importante modelo de estudi Cav-1 -/- y Vav-2 -/-	Relevancia clínica Distrofia muscular Mutación negativa dominnte LGMD-1C en humanos Cav-3 (P104L) y otras (autosómica dpminante)

5. CAVEOLINA E HÍGADO

La distribución subcelular de la caveolina y los mecanismos que regulan su expresión en el hígado no se conocen en profundidad. La presencia de las caveolas/caveolina ha sido descrita en el hígado por Northern y Western blot (101-103), microscopía electrónica (104, 105) y experimentos de internalización de la toxina colérica o de la proteína de unión a retinol (RBP) (103, 106). El hígado está formado por células parenquimales, hepatocitos (80% de la masa hepática), y células no parenquimales (20%), que incluyen principalmente endotelio, células de Kuppfer y células de Ito. Aunque varios estudios han

descrito que la caveolina, en condiciones normales, tiene bajos niveles de expresión en el hígado (107, 108), no queda claro cual es su distribución celular en el tejido. Varios estudios han sugerido la presencia de la caveolina en las células endoteliales hepáticas (108, 109), sin embargo, otros trabajos describen que la caveolina se encuentra en los hepatocitos y no en las células endoteliales hepáticas que están enriquecidas en vesículas recubiertas de clatrina (110). También se ha descrito que las células de Ito y las células de Kuppfer tienen caveolas (111, 112). El estudio de Ogi (113) caracterizó la localización ultraestructural de la caveolina en células endoteliales sinusoidales y células de Ito. Mediante microscopía electrónica e inmunotinción con oro describió que la Cav-1 estaba presente en ambos tipos celulares tanto en el aparato de Golgi, como en la membrana plasmática.

Las caveolas/caveolina están implicadas en potocitosis, endocitosis, transcitosis, tráfico de membrana y transducción de señales (114), pero en el hígado, las funciones en las que la caveolina está implicada no están bien definidas. En líneas celulares hepáticas, se ha descrito que la Cav-1 participa en la absorción de ácidos grasos de cadena larga (115) y en modelos *in vivo* se ha descrito que Cav-1 regula la secreción de sales biliares (116), el transporte reverso de colesterol (7), la internalización de ligandos específicos a través de caveolas (104), así como la actividad de eNOS inhibiéndola (117). Diversos trabajos sugieren un papel para Cav-1 como reguladora de señales mitogénicas en el hígado (37, 118).

Nuestros resultados en las líneas celulares hepáticas demuestran claramente que las células no tumorales y el cultivo primario de hepatocitos expresan una cantidad significativa de Cav-1 en concordancia con su estado de diferenciación, mientras que la Cav-1 no se detectó en las líneas celulares de hepatoma HepG2 y HuH-7. Demostramos que en células hepáticas no tumorales los estímulos pro-inflamatorios inducen la fosforilación de Cav-1 y la translocación de la proteína fosforilada a la fracción no caveolar. Además, la tirosina quinasa c-Src, que fosforila a Cav-1 en la Y^{14}, se activó por factores de crecimiento y por estímulos pro-inflamatorios.

Diversos trabajos muestran que la Y^{14} de la Cav-1 puede ser rápidamente fosforilada en respuesta a estrés oxidativo (73, 119) y a

factores de crecimiento (120, 121). Estudios recientes sugieren que la fosforilación de Cav-1 sirve de anclaje para factores de crecimiento celular. Se ha propuesto que esta fosforilación permite la interacción con proteínas con dominios SH2/PTB, como Grb7, para activar vías de señalización (69, 70). En sentido opuesto, otros trabajos han descrito que la internalización de las caveolas está regulada por la fosforilación en la Y^{14} de Cav-1, y que dicha internalización podría regular de manera negativa diferentes vías de proliferación como Rac, Erk y PI3K en células no adherentes (71). También se ha descrito que la fosforilación en Y^{14} regula la apoptosis mediada por fármacos anti-tumorales, como el paclitaxel (Taxano) en células de cáncer de mama MCF-7 (72). Además, el estrés celular induce la fosforilación de la Y^{14} a través de la activación de p38MAPK y c-Src (73). En este sentido, Cav-1 tendría diferentes dominios con funciones opuestas, uno de ellos es el «dominio de anclaje a caveolina» (CSD) por el que ejerce sus efectos inhibitorios y el otro sería la región N-terminal, donde se encuentra la Y^{14}, que estaría promoviendo señales de proliferación (Figura 6).

Sin embargo, la localización precisa de Y^{14}-P-Cav-1 es controvertida. Se ha propuesto que la Y^{14}-P-Cav-1 se localiza en adhesiones focales, colocalizando con paxilina, en vesículas de fusión derivadas de caveolas, etc. (122) y también que Y^{14}-P-Cav-1 se internaliza hacia la zona perinuclear después de estrés oxidativo (123). Los estudios en fibroblastos, líneas celulares endoteliales y de riñón han descrito que la fosforilación de la Cav-1 es necesaria para su internalización (9, 122, 124). Nuestros resultados con la línea celular CHL demuestran que los estímulos pro-inflamatorios inducen la translocación e internalización de la Cav-1 a la fracción no caveolar, estando implicada en este dinamismo la quinasa c-Src. Cuando se trató a las células con un inhibidor farmacológico de c-Src (PP2) se impidió la translocación mediada por estímulos pro-inflamatorios de la Cav-1 desde la FEC a la FNC. Estos resultados se confirmaron por microscopía confocal cuando las células CHL se transfectaron con un vector de expresión de la proteína de fusión Cav-1-GFP, donde se pudo observar que después del tratamiento de las células con estímulos pro-inflamatorios, tanto la Cav-1 endógena, como la Cav-1-GFP se encontraban en dominios citosólicos y que el tratamiento de las células con PP2 inhibía este movimiento. Además, mediante la utili-

zación de un mutante no fosforilable en la Y^{14} (Y14F-Cav-1) demostramos que la fosforilación de la Y^{14} de Cav-1 es necesaria para su internalización en células hepáticas, debido a que después del tratamiento con estímulos pro-inflamatorios solo la Cav-1 endógena aparecía en los dominios citosólicos, mientras que Y14F-Cav-1, en las diferentes condiciones experimentales, siempre se detectó en la membrana plasmática.

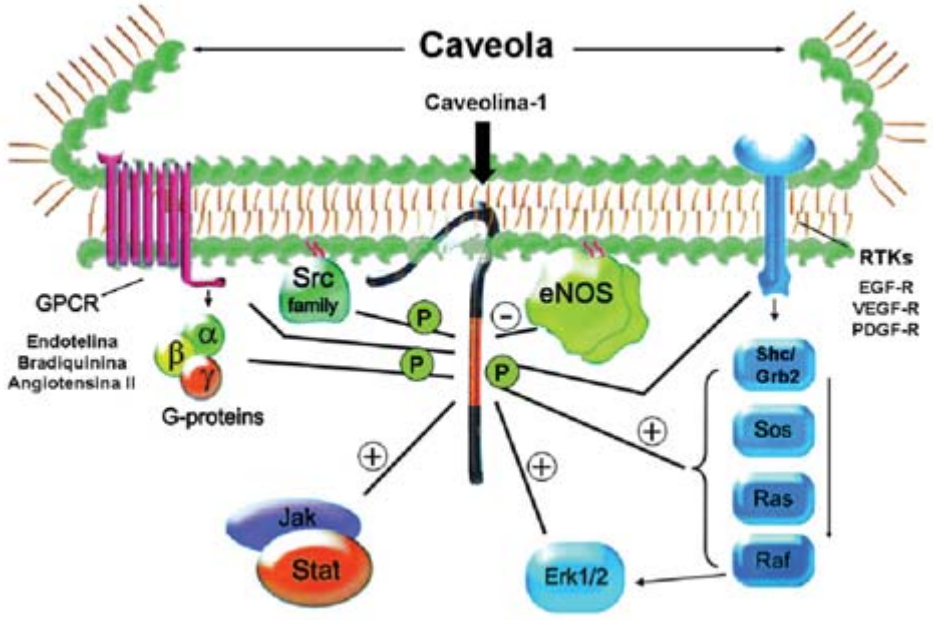


FIGURA 6. ***Señalización a través de caveolas.*** *Las caveolas concentran gran cantidad de receptores de membrana y de proteínas transductoras de señales. Esta figura es una simplificación de la denominación de «señalosoma» que reciben las caveolas. Cav-1 puede interaccionar con diferentes proteínas a través de su dominio CSD e inhibir su señalización, como en el caso de eNOS. Pero además, Cav-1 puede ser fosforilada por quinasas de la familia de Src, en respuesta a la activación de receptores tirosina quinasa (RTKs) o receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs) y transducir diferentes vías de proliferación (131).*

En relación con la patología hepática, la sobre-expresión de Cav-1 ha sido descrita en cirrosis y carcinoma hepatocelular. Mediante análisis por microarrays de nódulos macro-regenerativos y displásicos (MDNS), que son lesiones precursoras de carcinoma hepatoce-

lular, se identificó una expresión anormal de Cav-1 y tromboespondina-1; sin embargo, los análisis histológicos revelaron una función para la caveolina a través de un incremento en las células endoteliales sinusoidales. Esta expresión alterada de Cav-1 probablemente no esté relacionada directamente con la transformación maligna de los hepatocitos y más bien esté implicada en el aporte vascular que llega a la lesión hepática (125). En hígado cirrótico humano se ha establecido una relación entre la sobre-expresión de Cav-1 y la reducción significativa de la actividad catalítica del óxido nítrico. El incremento de Cav-1 en las células perisinusoidales promueve su unión con la óxido nítrico endotelial, lo que conduce a su inhibición, reducción en la producción de óxido nítrico e incremento en el tono microvascular hepático (126, 127).

Debido a que a Cav-1 se le ha atribuido una función como una proteína supresora de tumores (9, 78-81), y que los fenómenos que hemos descrito hasta ahora indicaban que la Cav-1 y la fosforilación de su Y^{14} podían tener un papel importante en vías de proliferación, decidimos analizar cual era la expresión y distribución celular de la Cav-1 en un modelo *in vivo* de proliferación hepática como es el modelo de la regeneración que ocurre después de una hepatectomía parcial (128).

Pol y colaboradores (129) describieron un incremento y redistribución importante de Cav-1, en regeneración hepática después de HP, desde la superficie celular a los cuerpos lipídicos de nueva generación. Los autores sugieren que la asociación de Cav-1 con cuerpos lipídicos se produce junto con la movilización de los lípidos y la parada de la endocitosis y el tráfico de membrana que ocurre en el hígado regenerante. Nuestros resultados demuestran que después de una HP del 70% se produce un aumento significativo de la Cav-1, tanto de ARNm como de proteína, en el hígado regenerante y además se produce una translocación de la proteína desde la fracción enriquecida en caveolas a la fracción no caveolar formada principalmente por retículo endoplásmico y membrana plasmática, según indicaron los marcadores específicos. Al mismo tiempo, parte de la Cav-1 que es internalizada se encuentra fosforilada en Y^{14} (Figura 7), y conjuntamente los niveles de la quinasa c-Src activa se encontraron aumentados de manera significativa durante los primeros días de regeneración.

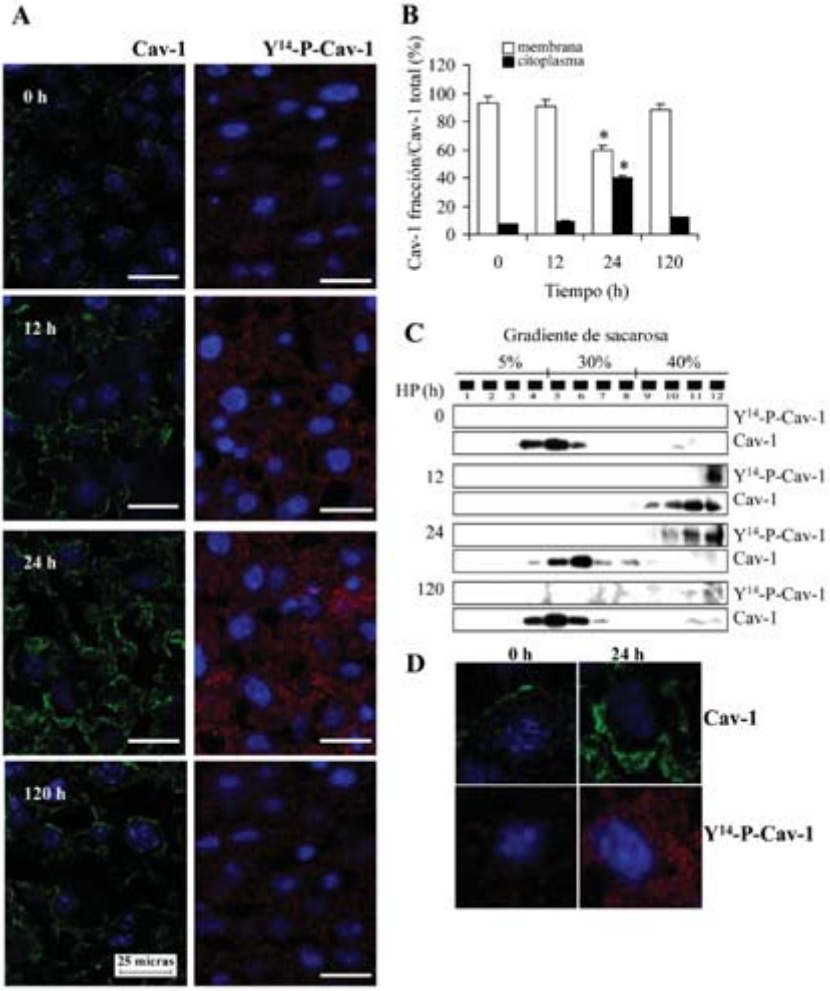


FIGURA 7. ***Cav-1 se fosforila e internaliza en el hígado regenerante después de HP.*** ***(A)*** *Inmunohistoquímica representativa realizada sobre 7 secciones fijadas del hígado regenerante a 0, 12, 24, y 120 horas después de HP. Cav-1 fue marcada en verde, Y14-P-Cav-1 fue marcada en rojo y los núcleos fueron marcados en azul con Hoechst 33258.* ***(B)*** *Cuantificación de la Cav-1 de la Fig. 7A. Los resultados son expresados como el porcentaje de la fluorescencia de cada fracción vs. la fluorescencia total.* ***(C)*** *Análisis por Western blot de la distribución de Cav-1 y de Y14-P-Cav-1 en gradientes discontinuos de sacarosa. Los resultados muestran un Western blot representativo del gradiente de sacarosa para cada tiempo de regeneración.* ***(C)*** *Ampliación de las fotos de 7A a 0 y 24 horas. Los datos representan la media ± D.E. de cuatro experimentos independientes. *P<0,01 vs. el valor correspondiente a tiempo 0.*

Como se ha descrito previamente, Cav-1 es considerada como una proteína supresora de tumores, sobretodo por su acción inhibitoria sobre vías pro-proliferativas y anti-apoptóticas. Cuando se analizó el crecimiento de fibroblastos embrionarios (MEFs) del ratón deficiente en Cav-1 (MEFs Cav-1-/-) (13), se observó un incremento en la fase S del ciclo celular del 30% en comparación con su correspondiente control y además sobre un periodo de crecimiento en cultivo de 10 días, los MEFs de Cav-1-/- crecen 3 veces más rápido que los Cav-1+/+. Pero el ratón deficiente en Cav-1 no manifiesta ningún desarrollo acelerado de tumores en comparación con el ratón Cav-1+/+. Es posible que la perdida conjunta de Cav-1 y de otro gen supresor de tumores tenga un efecto sinérgico. Aún así, el ratón Cav-1-/- es viable y fértil, pero tiene problemas de hiperproliferación celular y anormalidades vasculares.

Con estos datos precedentes, con nuestros resultados *in vitro,* con las líneas celulares, y los resultados *in vivo,* con el modelo de regeneración hepática después de HP, supusimos que la Cav-1 debería tener un papel importante en las primeras etapas de la regeneración hepática, por ello analizamos en los ratones deficientes para Cav-1 el proceso de la regeneración hepática. Los resultados obtenidos en el ratón KO de Cav-1 demuestran que el proceso de regeneración después de HP no se afectó por la ausencia del gen de Cav-1 (Figura 8), por lo tanto, Cav-1 no es un gen esencial para la regeneración hepática.

Nuestros resultados demuestran que la Cav-1 en el curso de la regeneración hepática y en líneas celulares bajo estímulos pro-inflamatorios, incrementa su expresión, se transloca a las fracciones no caveolares (FNC) y en dichas fracciones se encuentra fosforilada en la Y^{14}. Sin embargo, en el ratón Cav^{tm1Mls}/J la Cav-1 no es esencial para el proceso de regeneración hepática, ya que los ratones deficientes para Cav-1 sobreviven a la HP y la función y el tamaño del hígado se recuperan totalmente después de HP.

Por lo tanto la funcionalidad de Cav-1 consistiría en un mecanismo complementario a las diferentes señales de inhibición que se producen durante la regeneración hepática. Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo y los que describen la relación de Cav-1 con el receptor de IL-6 y con los receptores del TGF-β, trabajos futuros

permitirán profundizar en la implicación de Cav-1 en estas dos vías de señalización durante los procesos proliferativos que tienen lugar en la regeneración hepática después de hepatectomía parcial.

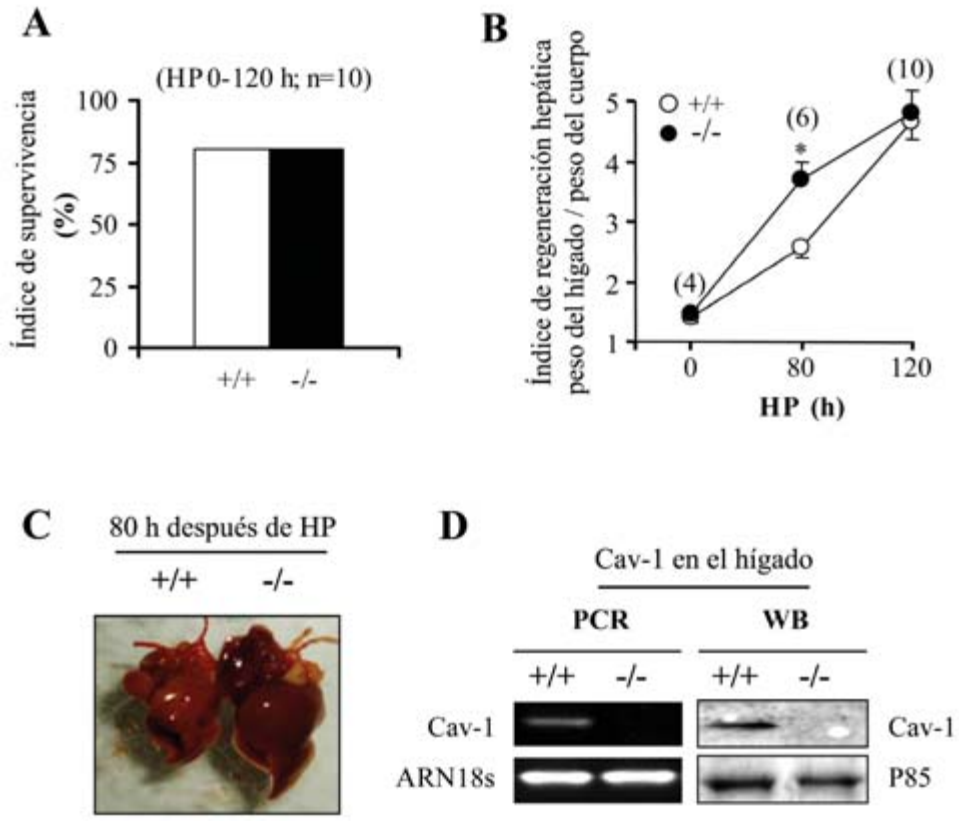


FIGURA 8. ***Regeneración hepática después de HP en ratones Cav-1-/- y Cav-1+/+.*** ***(A)*** *Índice de supervivencia en ratones Cav-1+/+ y Cav-1-/- después de 120 horas de la HP.* ***(B)*** *Índice de recuperación de la masa hepática a los tiempos indicados en la gráfica. El número de animales para cada tiempo se muestra entre paréntesis.* ***(C)*** *Foto representativa en la que se muestra la recuperación hepática a las 80 horas después de la HP.* ***(D)*** *Determinación de los niveles de ARNm, por PCR y de proteína por Western blot de Cav-1 en ratones Cav-1+/+ y Cav-1-/-. La normalización del ARNm se realizó con 18S ARN para la PCR y con la subunidad p85 de la PI3K para el Western blot. Los resultados muestran un Western blot representativo de tres experimentos independientes. Los resultados son las medias ± D.E. del número de ratones indicado. *P <0.01 vs. el correspondiente valor del ratón Cav-1+/+.*

REFERENCIAS

(1) PALADE, G. E. (1953) Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Physics*. 24: 368–384.

(2) YAMADA, E. (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 445-458.

(3) KURZCHALIA, T. V. AND PARTON, R. G. (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11: 424-431.

(4) SCHERER, P. E., LEWIS, R. Y., VOLONTE, D., ENGELMAN, J. A., GALBIATI, F., COUET, J., KOHTZ, D. S., VAN DONSELAAR, E., PETERS, P. AND LISANTI, M. P. (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem*. 272: 29337-29346.

(5) SONG, K. S., SCHERER, P. E., TANG, Z., OKAMOTO, T., LI, S., CHAFEL, M., CHU, C., KOHTZ, D. S. AND LISANTI, M. P. (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271: 15160-15165.

(6) SCHNITZER, J. E. (2001) Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 49: 265-280.

(7) FU, Y., HOANG, A., ESCHER, G., PARTON, R. G., KROZOWSKI, Z. AND SVIRIDOV, D. (2004) Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *J. Biol. Chem*. 279: 14140-14146.

(8) OKAMOTO, T., SCHLEGEL, A., SCHERER, P. E. AND LISANTI, M. P. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing «preassembled signaling complexes» at the plasma membrane. *J. Biol. Chem*. 273: 5419-5422.

(9) DEL POZO, M. A., BALASUBRAMANIAN, N., ALDERSON, N. B., KIOSSES, W. B., GRANDE-GARCIA, A., ANDERSON, R. G. AND SCHWARTZ, M. A. (2005) Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat. Cell Biol*. 7: 901-908.

(10) WILLIAMS, T. M. AND LISANTI, M. P. (2005) Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288: C494-506.

(11) DRAB, M., VERKADE, P., ELGER, M., KASPER, M., LOHN, M., LAUTERBACH, B., MENNE, J., LINDSCHAU, C., MENDE, F., LUFT, F. C., *ET AL.* (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452.

(12) GALBIATI, F., ENGELMAN, J. A., VOLONTE, D., ZHANG, X. L., MINETTI, C., LI, M., HOU, H., JR., KNEITZ, B., EDELMANN, W. AND LISANTI, M. P. (2001) Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem*. 276: 21425-21433.

(13) RAZANI, B., ENGELMAN, J. A., WANG, X. B., SCHUBERT, W., ZHANG, X. L., MARKS, C. B., MACALUSO, F., RUSSELL, R. G., LI, M., PESTELL, R. G., *ET AL.* (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276: 38121-38138.

(14) RAZANI, B., WANG, X. B., ENGELMAN, J. A., BATTISTA, M., LAGAUD, G., ZHANG, X. L., KNEITZ, B., HOU, H., JR., CHRIST, G. J., EDELMANN, W. AND LISANTI, M. P. (2002) Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2329-2344.

(15) PARTON, R. G., WAY, M., ZORZI, N. AND STANG, E. (1997) Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J. Cell. Biol*. 136: 137-154.

(16) SCHERER, P. E., LISANTI, M. P., BALDINI, G., SARGIACOMO, M., MASTICK, C. C. AND LODISH, H. F. (1994) Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J. Cell. Biol*. 127: 1233-1243.

(17) SIMIONESCU, N., SIMINOESCU, M. AND PALADE, G. E. (1975) Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J. Cell. Biol*. 64: 586-607.

(18) SINGER, S. J. AND NICOLSON, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175: 720-731.

(19) VEREB, G., SZOLLOSI, J., MATKO, J., NAGY, P., FARKAS, T., VIGH, L., MATYUS, L., WALDMANN, T. A. AND DAMJANOVICH, S. (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 100: 8053-8058.

(20) BROWN, D. A. AND LONDON, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 14: 111-136.

(21) SIMONS, K. AND TOOMRE, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1: 31-39.

(22) LIU, J., OH, P., HORNER, T., ROGERS, R. A. AND SCHNITZER, J. E. (1997) Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J. Biol. Chem.* 272: 7211-7222.

(23) BROWN, D. A. AND ROSE, J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 68: 533-544.

(24) LISANTI, M. P., SCHERER, P. E., VIDUGIRIENE, J., TANG, Z., HERMANOWSKI-VOSATKA, A., TU, Y. H., COOK, R. F. AND SARGIACOMO, M. (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell. Biol.* 126: 111-126.

(25) GLENNEY, J. R. J. AND ZOKAS, L. (1989) Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell. Biol.* 108: 2401–2408.

(26) ROTHBERG, K. G., HEUSER, J. E., DONZELL, W. C., YING, Y. S., GLENNEY, J. R. AND ANDERSON, R. G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 68: 673–682.

(27) SCHERER, P. E., TANG, Z., CHUN, M., SARGIACOMO, M., LODISH, H. F. AND LISANTI, M. P. (1995) Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem*. 270: 16395-16401.

(28) SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., CHUN, M., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. AND LISANTI, M. P. (1996) Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 93: 131–135.

(29) TANG, Z., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., SONG, K., CHU, C., KOHTZ, D. S., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. AND LISANTI, M. P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem*. 271: 2255-2261.

(30) ENGELMAN, J. A., ZHANG, X. L. AND LISANTI, M. P. (1998) Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett*. 436: 403-410.

(31) Jenkins, R. B., Qian, J., Lee, H. K., Huang, H., Hirasawa, K., Bostwick, D. G., Proffitt, J., Wilber, K., Lieber, M. M., Liu, W., and Smith, D. I. (1998). A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer. Cancer Res *58*, 759-766.

(32) LEE, H., PARK, D. S., RAZANI, B., RUSSELL, R. G., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (2002) Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am. J. Pathol*. 161: 1357-1369.

(33) SHRIDHAR, V., SUN, Q. C., MILLER, O. J., KALEMKERIAN, G. P., PETROS, J. AND SMITH, D. I. (1997) Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene*. 15: 2727-2733.

(34) ENGELMAN, J. A., ZHANG, X. L. AND LISANTI, M. P. (1999) Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett*. 448: 221-230.

(35) MCNALLY, E. M., DE SA MOREIRA, E., DUGGAN, D. J., BONNEMANN, C. G., LISANTI, M. P., LIDOV, H. G., VAINZOF, M., PASSOS-BUENO, M. R., HOFFMAN, E. P., ZATZ, M. AND KUNKEL, L. M. (1998) Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet*. 7: 871-877.

(36) MINETTI, C., SOTGIA, F., BRUNO, C., SCARTEZZINI, P., BRODA, P., BADO, M., MASETTI, E., MAZZOCCO, M., EGEO, A., DONATI, M. A., *ET AL.* (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 18: 365-368.

(37) RAZANI, B., WOODMAN, S. E. AND LISANTI, M. P. (2002). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev*. 54: 431-467.

(38) GABELLA, G. (1976). Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Cell. Tissue Res*. 170: 161-186.

(39) GIL, J. (1983) Number and distribution of plasmalemmal vesicles in the lung. *Fed. Proc*. 42: 2414-2418.

(40) MOBLEY, B. A. AND EISENBERG, B. R. (1975) Sizes of components in frog skeletal muscle measured by methods of stereology. *J. Gen. Physiol.* 66: 31-45.

(41) NAPOLITANO, L. (1963) The Differentiation of White Adipose Cells. An Electron Microscope Study. *J. Cell. Biol*. 18: 663-679.

(42) CAMERON, P. L., RUFFIN, J. W., BOLLAG, R., RASMUSSEN, H. AND CAMERON, R. S. (1997). Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J. Neurosci*. 17: 9520-9535.

(43) FRA, A. M., WILLIAMSON, E., SIMONS, K. AND PARTON, R. G. (1994) Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J. Biol. Chem*. 269: 30745-30748.
(44) SARGIACOMO, M., SUDOL, M., TANG, Z.-L. AND LISANTI, M. P. (1993) Signal transducing molecules and GPI-linked proteins form a caveolin- rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell. Biol*. 122: 789–807.
(45) LISANTI, M. P., SCHERER, P., TANG, Z.-L. AND SARGIACOMO, M. (1994) Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: A signalling hypothesis. *Trends Cell. Biol*. 4: 231–235.
(46) FERON, O., BELHHASSEN, L., KOBZIK, L., SMITH, T. W., KELLY, R. A. AND MICHEL, T. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem*. 271: 22810–22814.
(47) GARCIA-CARDENA, G., OH, P., LIU, J., SCHNITZER, J. E. AND SESSA, W. C. (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelilal cell caveolae via palmitoylation: implications for caveolae localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 6448–6453.
(48) LI, S., COUET, J. AND LISANTI, M. P. (1996) Src tyrosine kinases, G alpha subunits and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem*. 271: 29182–29190.
(49) LI, S., OKAMOTO, T., CHUN, M., SARGIACOMO, M., CASANOVA, J. E., HANSEN, S. H., NISHIMOTO, I. AND LISANTI, M. P. (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270: 15693-15701.
(50) SONG, K. S., LI, S., OKAMOTO, T., QUILLIAM, L., SARGIACOMO, M. AND LISANTI, M. P. (1996) Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent free purification of caveolae membranes. *J. Biol. Chem*. 271: 9690–9697.
(51) SONG, K. S., SARGIACOMO, M., GALBIATI, F., PARENTI, M. AND LISANTI, M. P. (1997) Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* 43: 293–303.
(52) PAWSON, T. AND SCOTT, J. D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science*. 278: 2075–2080.
(53) ENGELMAN, J. A., ZHANG, X. L., GALBIATI, F., VOLONTE, D., SOTGIA, F., PESTELL, R. G., MINETTI, C., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T. AND LISANTI, M. P. (1998) Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer's disease and muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genetics*. 63: 1578–1587.
(54) SMART, E. J., GRAF, G. A., MCNIVEN, M. A., SESSA, W. C., ENGELMAN, J. A., SCHERER, P. E., OKAMOTO, T. AND P., L. M. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains and signal transduction. *Mol. Cell. Biol*. 19: 7289–7304.
(55) COUET, J., SARGIACOMO, M. AND LISANTI, M. P. (1997) Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J. Biol. Chem.* 30429-30438.

(56) ENGELMAN, J. A., LEE, R. J., KARNEZIS, A., BEARSS, D. J., WEBSTER, M., SIEGEL, P., MULLER, W. J., WINDLE, J. J., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (1998) Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer. *J. Biol. Chem.* 20448-20455.

(57) GARCIA-CARDENA, G., FAN, R., STERN, D., LIU, J. AND SESSA, W. C. (1996) Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrsosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J. Biol. Chem*. 271: 27237–27240.

(58) LIU, J., GARCIA, G. AND SESSA, W. C. (1996) Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry*. 35: 13277–13281.

(59) MICHEL, J. B., FERON, O., SACKS, D. AND MICHEL, T. (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca2+-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem*. 272: 15583–15586.

(60) SOWA, G., PYPAERT, M. AND SESSA, W. C. (2001) Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 98: 14072–14077.

(61) COUET, J., LI, S., OKAMOTO, T., IKEZU, T. AND LISANTI, M. P. (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem*. 272. 6525–6533.

(62) ENGELMAN, J. A., ZHANG, X. L., RAZANI, B., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (1999) p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J. Biol. Chem*. 32333-32341.

(63) GALBIATI, F., VOLONTE, D., LIU, J., CAPOZZA, F., FRANK, P. G., ZHU, L., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (2001) Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mo.l Biol. Cell.* 2229-2244.

(64) GALVEZ, B. G., MATIAS-ROMAN, S., YANEZ-MO, M., VICENTE-MANZANARES, M., SANCHEZ-MADRID, F. AND ARROYO, A. G. (2004) Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. *Mol. Biol. Cell*. 678-687.

(65) PUYRAIMOND, A., FRIDMAN, R., LEMESLE, M., ARBEILLE, B. AND MENASHI, S. (2001) MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells. *Exp. Cell. Res*. 28-36.

(66) OSTROM, R. S., VIOLIN, J. D., COLEMAN, S. AND INSEL, P. A. (2000) Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol. Rev*. 57: 1075–1079.

(67) RYBIN, V. O., XU, X., LISANTI, M. P. AND STEINBERG, S. F. (2000) Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J. Biol. Chem*. 275: 41447–41457.

(68) SCHWENCKE, C., OKUMURA, S., YAMAMOTO, M., GENG, Y. J. AND ISHIKAWA, Y. (1999) Colocalization of beta-adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane. *J. Cell. Biochem*. 75: 64–72.

(69) LEE, H., VOLONTE, D., GALBIATI, F., IYENGAR, P., LUBLIN, D. M., BREGMAN, D. B., WILSON, M. T., CAMPOS-GONZALEZ, R., BOUZAHZAH, B., PESTELL, R. G., *ET AL.* (2000) Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol. Endocrinol*. 14: 1750-1775.

(70) ORLICHENKO, L., HUANG, B., KRUEGER, E. AND MCNIVEN, M. A. (2006) Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J. Biol. Chem*. 281: 4570-4579.

(71) DEL POZO, M. A. AND SCHWARTZ, M. A. (2007) Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell. Biol*. 17 : 246-250.

(72) SHAJAHAN, A. N., WANG, A., DECKER, M., MINSHALL, R. D., LIU, M. C. AND CLARKE, R. (2007) Caveolin-1 tyrosine phosphorylation enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem*. 282: 5934-5943.

(73) VOLONTE, D., GALBIATI, F., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (2001) Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J. Biol. Chem*. 276: 8094-8103.

(74) ENGELMAN, J. A., WYCOFF, C. C., YASUHARA, S., SONG, K. S., OKAMOTO, T. AND LISANTI, M. P. (1997) Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem*. 272: 16374–16381.

(75) PARK, D. S., RAZANI, B., LASORELLA, A., SCHREIBER-AGUS, N., PESTELL, R. G., IAVARONE, A. AND LISANTI, M. P. (2001) Evidence that Myc isoforms transcriptionally repress caveolin-1 gene expression via an INR-dependent mechanism. *Biochemistry*. 40: 3354–3362.

(76) BIST, A., FIELDING, P. E. AND FIELDING, C. J. (1997) Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 10693–10698.

(77) RAZANI, B., ALTSCHULER, Y., ZHU, L., PESTELL, R. G., MOSTOV, K. E. AND LISANTI, M. P. (2000) Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. *Biochemistry*. 39: 13916-13924.

(78) CAPOZZA, F., WILLIAMS, T. M., SCHUBERT, W., MCCLAIN, S., BOUZAHZAH, B., SOTGIA, F. AND LISANTI, M. P. (2003) Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *Am. J. Pathol*. 162: 2029-2039.

(79) FIUCCI, G., RAVID, D., REICH, R. AND LISCOVITCH, M. (2002) Caveolin-1 inhibits anchorageindependent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene*. 21: 2365-2375.

(80) WIECHEN, K. (2001). Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am. J. Pathol*. 159: 1635-1643.
(81) WILLIAMS, T. M. (2004) Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J. Biol. Chem*. 279: 51630-51646.
(82) LEE, S. W., REIMER, C. L., OH, P., CAMPBELL, D. B. AND SCHNITZER, J. E. (1998) Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene*. 16: 1391-1397.
(83) ENGELMAN, J. A., CHU, C., LIN, A., JO, H., IKEZU, T., OKAMOTO, T., KOHTZ, D. S. AND LISANTI, M. P. (1998) Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett*. 428: 205-211.
(84) LIU, P., YING, Y., KO, Y. G., AND ANDERSON, R. G. (1996) Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J. Biol. Chem.* 271: 10299-10303.
(85) YAMAMOTO, M., TOYA, Y., JENSEN, R. A. AND ISHIKAWA, Y. (1999) Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp. Cell. Res*. 247: 380-388.
(86) ZUNDEL, W., SWIERSZ, L. M. AND GIACCIA, A. (2000) Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1507-1514.
(87) LIU, P. AND ANDERSON, R. G. (1995) Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem*. 270: 27179-27185.
(88) SCHEEL, J., SRINIVASAN, J., HONNERT, U., HENSKE, A. AND KURZCHALIA, T. V. (1999) Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol*. 1: 127-129.
(89) HAYASHI, K., MATSUDA, S., MACHIDA, K., YAMAMOTO, T., FUKUDA, Y., NIMURA, Y., HAYAKAWA, T. AND HAMAGUCHI, M. (2001) Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res*. 61: 2361-2364.
(90) CUI, J., ROHR, L. R., SWANSON, G., SPEIGHTS, V. O., MAXWELL, T. AND BROTHMAN, A. R. (2001) Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *Prostate*. 46: 249-256.
(91) HURLSTONE, A. F., REID, G., REEVES, J. R., FRASER, J., STRATHDEE, G., RAHILLY, M., PARKINSON, E. K. AND BLACK, D. M. (1999) Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene*. 18: 1881-1890.
(92) DRUMHELLER, T., MCGILLIVRAY, B. C., BEHRNER, D., MACLEOD, P., MCFADDEN, D. E., ROBERSON, J., VENDITTI, C., CHORNEY, K., CHORNEY, M. AND SMITH, D. I. (1996) Precise localisation of 3p25 breakpoints in four patients with the 3p- syndrome. *J. Med. Genet*. 33: 842-847.
(93) PATLOLLA, J. M., SWAMY, M. V., RAJU, J. AND RAO, C. V. (2004). Overexpression of caveolin-1 in experimental colon adenocarcinomas and human colon cancer cell lines. *Oncol. Rep*. 11: 957-963.

(94) RAJJAYABUN, P. H., GARG, S., DURKAN, G. C., CHARLTON, R., ROBINSON, M. C. AND MELLON, J. K. (2001) Caveolin-1 expression is associated with high-grade bladder cancer. *Urology*. 58: 811-814.

(95) TIRADO, O. M., MATEO-LOZANO, S., VILLAR, J., DETTIN, L. E., LLORT, A., GALLEGO, S., BAN, J., KOVAR, H. AND NOTARIO, V. (2006) Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res*. 66: 9937-9947.

(96) WILLIAMS, T. M., HASSAN, G. S., LI, J., COHEN, A. W., MEDINA, F., FRANK, P. G., PESTELL, R. G., DI VIZIO, D., LODA, M. AND LISANTI, M. P. (2005) Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J. Biol. Chem*. 280: 25134-25145.

(97) SALATINO, M., BEGUELIN, W., PETERS, M. G., CARNEVALE, R., PROIETTI, C. J., GALIGNIANA, M. D., VEDOY, C. G., SCHILLACI, R., CHARREAU, E. H., SOGAYAR, M. C. AND ELIZALDE, P. V. (2006) Progestin-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation. *Oncogene*. 25: 7723-7739.

(98) YANG, G., TIMME, T. L., FROLOV, A., WHEELER, T. M. AND THOMPSON, T. C. (2005) Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. *Cancer*. 103: 1186-1194.

(99) RAZANI, B. AND LISANTI, M. P. (2001) Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J. Clin. Invest*. 108: 1553-1561.

(100) WILLIAMS, T. M., CHEUNG, M. W., PARK, D. S., RAZANI, B., COHEN, A. W., MULLER, W. J., DI VIZIO, D., CHOPRA, N. G., PESTELL, R. G. AND LISANTI, M. P. (2003) Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Mol. Biol. Cell*. 14. 1027-1042.

(101) GLENNEY, J. R., JR. (1992) The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett*. 314: 45-48.

(102) HENLEY, J. R., KRUEGER, E. W., OSWALD, B. J. AND MCNIVEN, M. A. (1998) Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell. Biol*. 141: 85–99.

(103) MALABA, L., SMELAND, S., SENOO, H., NORUM, K. R., BERG, T., BLOMHOFF, R. AND KINDBERG, G. M. (1995) Retinol-binding protein and asialo-orosomucoid are taken up by different pathways in liver cells. *J. Biol. Chem*. 15686-15692.

(104) JANICOT, M., FOUQUE, F. AND DESBUQUOIS, B. (1991) Activation of rat liver adenylate cyclase by cholera toxin requires toxin internalization and processing in endosomes. *J. Biol. Chem*. 266: 12858-12865.

(105) MONTESANO, R., ROTH, J., ROBERT, A. AND ORCI, L. (1982) Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature (Lond)*. 296: 651–653.

(106) JANICOT, M., CLOT, J. P. AND DESBUQUOIS, B. (1988) Interactions of cholera toxin with isolated hepatocytes. Effects of low pH, chloroquine and monensin on toxin internalization, processing and action. *Biochem. J*. 253: 735-743.

(107) OH, P., MCINTOSH, D. P. AND SCHNITZER, J. E. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven

fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell.* Biol. 141: 101-114.

(108) SHAH, V., TORUNER, M., HADDAD, F., CADELINA, G., PAPAPETROPOULOS, A., CHOO, K., SESSA, W. C. AND GROSZMANN, R. J. (1999) Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology.* 117: 1222-1228.

(109) GARVER, W. S., ERICKSON, R. P., WILSON, J. M., COLTON, T. L., HOSSAIN, G. S., KOZLOSKI, M. A. AND HEIDENREICH, R. A. (1997) Altered expression of caveolin-1 and increased cholesterol in detergent insoluble membrane fractions from liver in mice with Niemann-Pick disease type C. *Biochim. Biophys. Acta*. 1361: 272-280.

(110) CALVO, M., TEBAR, F., LOPEZ-IGLESIAS, C. AND ENRICH, C. (2001). Morphologic and functional characterization of caveolae in rat liver hepatocytes. *Hepatology*. 33: 1259–1269.

(111) OHATA, M. AND ITO, T. (1986) Experimental study on the fine structure of chicken liver parenchyme with special references to extrasinusoidal macrophages and sinusoidal blood cells. Part 1. Sinusoidal cells and macrophages in the normal and India ink-perfused livers. *Arch. Histol. Jpn.* 49: 83-103.

(112) TANUMA, Y., OHATA, M. AND ITO, T. (1983). Electron microscopic studies on the sinusoidal cells in the monkey liver. *Arch. Histol. Jpn.* 46: 401-426.

(113) OGI, M., YOKOMORI, H., ODA, M., YOSHIMURA, K., NOMURA, M., OHSHIMA, S., AKITA, M., TODA, K. AND ISHII, H. (2003) Distribution and localization of caveolin-1 in sinusoidal cells in rat liver. *Med. Electron. Microsc*. 36: 33-40.

(114) PARTON, R. G. AND SIMONS, K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 8: 185-194.

(115) POHL, J., RING, A. AND STREMMEL, W. (2002) Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway. *J. Lipid Res*. 43: 1390-1399.

(116) MORENO, M., MOLINA, H., AMIGO, L., ZANLUNGO, S., ARRESE, M., RIGOTTI, A. AND MIQUEL, J. F. (2003) Hepatic overexpression of caveolins increases bile salt secretion in mice. *Hepatology*. 38: 1477-1488.

(117) SHAH, V., CAO, S., HENDRICKSON, H., YAO, J. AND KATUSIC, Z. S. (2001) Regulation of hepatic eNOS by caveolin and calmodulin after bile duct ligation in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 280: G1209-1216.

(118) MORA, R. C., BONILHA, V. L., SHIN, B. C., HU, J., COHEN-GOULD, L., BOK, D. AND RODRIGUEZ-BOULAN, E. (2006) Bipolar assembly of caveolae in retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. 290: C832-843.

(119) SANGUINETTI, A. R. AND MASTICK, C. C. (2003) c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell. Signal.* 15: 289-298.

(120) FIELDING, P. E., CHAU, P., LIU, D., SPENCER, T. A. AND FIELDING, C. J. (2004) Mechanism of platelet-derived growth factor-dependent caveolin-1 phosphorylation: relationship to sterol binding and the role of serine-80. *Biochemistry*. 43: 2578-2586.

(121) KIM, Y. N., WIEPZ, G. J., GUADARRAMA, A. G. AND BERTICS, P. J. (2000) Epidermal growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin-1. En-

hanced caveolin-1 tyrosine phosphorylation following aberrant epidermal growth factor receptor status. *J. Biol. Chem*. 275: 7481-7491.

(122) AOKI, T., NOMURA, R. AND FUJIMOTO, T. (1999) Tyrosine phosphorylation of caveolin-1 in the endothelium. *Exp. Cell Res*. 253: 629-636.

(123) CHEN, D. B., LI, S. M., QIAN, X. X., MOON, C. AND ZHENG, J. (2005) Tyrosine phosphorylation of caveolin 1 by oxidative stress is reversible and dependent on the c-src tyrosine kinase but not mitogen-activated protein kinase pathways in placental artery endothelial cells. *Biol. Reprod.* 73: 761-772.

(124) PARTON, R. G., JOGGERST, B. AND SIMONS, K. (1994) Regulated internalization of caveolae. *J. Cell. Biol*. 127: 1199-1215.

(125) YERIAN, L. M., ANDERS, R. A., TRETIAKOVA, M. AND HART, J. (2004) Caveolin and thrombospondin expression during hepatocellular carcinogenesis. *Am. J. Surg. Pathol*. 28: 357-364.

(126) YOKOMORI, H., ODA, M., OGI, M., SAKAI, K. AND ISHII, H. (2002) Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. *Liver*. 22: 150-158.

(127) YOKOMORI, H., ODA, M., YOSHIMURA, K., NOMURA, M., WAKABAYASHI, G., KITAJIMA, M. AND ISHII, H. (2003) Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide. J. *Gastroenterol.* 38: 854-860.

(128) FAUSTO, N., CAMPBELL, J. S. AND RIEHLE, K. J. (2006) Liver regeneration. *Hepatology*. 43: S45-53.

(129) POL, A., MARTIN, S., FERNANDEZ, M. A., FERGUSON, C., CAROZZI, A., LUETTERFORST, R., ENRICH, C. AND PARTON, R. G. (2004) Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol. Biol. Cell.* 15: 99-110.

(130) HNASKO, R. AND LISANTI, M. P. (2003) The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol. Interv*. 3: 445-464.

(131) GRATTON, J. P.; BERNATCHEZ, P. AND SESSA, W. C. (2004) Caveolae and Caveolins in the cardiovascular system. *Circ. Res*. 94: 1408-1417.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1127-1157

Revisión

Physiological role of extracellular nucleotides at the central nervous system: signalling through P2X and P2Y receptors

Recibido el 18 de octubre de 2007

MARÍA TERESA MIRAS-PORTUGAL*, PATRICIA MARÍN-GARCÍA, LUZ MARÍA G. CARRASQUERO, ESMERILDA G. DELICADO, MIGUEL DÍAZ-HERNÁNDEZ, JUAN IGNACIO DÍAZ-HERNÁNDEZ, MARÍA DIEZ-ZAERA, M.ª DOLORES FIDEU, M.ª ROSA GÓMEZ-VILLAFUERTES, JAVIER GUALIX, DAVID LEÓN, MÍRIAM LEÓN-OTEGUI, FELIPE ORTEGA, RAQUEL PÉREZ-SEN, ELVIRA SALAS, JESÚS SÁNCHEZ-NOGUEIRO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

ABSTRACT

In the last few years nucleotide receptors, the ionotropic $P2X_{1\text{-}7}$ subunits and the metabotropic $P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}$, have acquired an excepcional importance due to their strategic location in organs and tissues, their great variety along with the complexity of the associated signalling pathways and the first evidence of the serious alterations entailed in their dysfunctions. Our group has been pioneer in the characterization of these receptors in the nervous system, where we defined their location and functionality. The abundant presence, at a presynaptic level, of $P2X_3$ and $P2X_7$ should be emphasized, where by means of calcium intake they induce neurotransmitter exocytosis, such as glutamate, GABA, catecholamines and acetylcholine among others, as described in previous works by our group. In addi-

* Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular IV. Facultad de Veterinaria.
Universidad Complutense de Madrid.
Av. Puerta de Hierro, s/n. 28040. Madrid.
Tf.: 91 394 38 94
Fax: 91 394 39 09
e-mail: mtmiras@vet.ucm.es

tion, they induce an extensive remodeling of the terminal's cytoskeleton and exocytotic mechanisms through CaMKII and they can interact widely with other ionotropic and metabotropic receptors co-existing in nearby areas. Neural cells also exhibit the presence of most P2Y receptors signalling through a large variety of intracellular cascades. Recently we have demostrated that P2Y metabotropic receptors of the sub-family activated by ADP, especially $P2Y_{13}$, are connected with the signalling towards GSK3 and β-catenin, opening new ways of understading the nucleotide function in survival and maintenance of neural cells. In addition both P2X and P2Y receptors play a role in early developmental stages and neural maturation where their function has to be fully understanded. Nucleotide receptors are also very abundant in glial cells, and our group has shown that most P2Y receptors are present and fully functional in cultured astrocytes, where, depending on the subtype receptor they activate a large variety of signalling cascades.

Key words: ionotropic P2X receptors, metabotropic P2Y receptors, central nervous system, ATP, synaptic terminals, neurotransmitters release.

RESUMEN

Papel fisiológico de los nucleótidos extracelulares en el sistema nervioso central: señalización vía receptores P2X y P2Y.

En los últimos años los receptores de nucleótidos, receptores ionotrópicos $P2X_{1\text{-}7}$ y metabotrópicos $P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14}$, han adquirido una importancia excepcional debido a su localización estratégica en órganos y tejidos, a su gran variedad junto con la complejidad de vías de señalización a las que están asociados y a las primeras evidencias de importantes alteraciones debidas a su mal funcionamiento. Nuestro grupo ha sido pionero en la caracterización estos receptores en el sistema nervioso, donde definimos su localización y su funcionalidad. La abundante presencia, a nivel presináptico, de las subunidades $P2X_3$ y $P2X_7$ debe ser resaltada, donde gracias a la entrada de calcio inducen la exocitosis de varios neurotransmisores, como glutamato, GABA, catecolaminas y acetilcolina entre otros, como ha sido descrito por nuestro grupo en trabajos previos. Además, estos receptores inducen una profunda remodelación del citoesqueleto de las terminales nerviosas y de los mecanismos exocitóticos a través de la CaMKII y pueden interactuar con otros receptores ionotrópicos y metabotrópicos co-existentes en sus cercanías. La mayoría de los receptores P2Y también están presentes en las células nerviosas, activando vías de señalización a través de una gran variedad de cascadas intracelulares. Recientemente hemos demostrado que los receptores metabotrópicos P2Y pertenecientes a la sub-familia de receptores activados por ADP, especialmente el $P2Y_{13}$, están conectados con la señalización hacia GSK3 y β-catenina, lo que abre nuevas vías para la comprensión de la función de los nucleótidos en la supervivencia y el mantenimiento de las células nerviosas. Además, tanto los receptores P2X como los P2Y juegan un papel en los estadíos iniciales del desarrollo y en la maduración neuronal donde su función aún ha de ser plenamente comprendida. Los receptores de nucleótidos son también muy abundantes en las células gliales,

y nuestro grupo ha demostrado que la mayoría de los receptores P2Y están presentes y son plenamente funcionales en astrocitos en cultivo, donde, dependiendo del subtipo de receptor, activan una gran variedad de cascadas de señalización.

Palabras clave: receptores ionotrópicos P2X, receptores metabotrópicos P2Y, sistema nervioso central, ATP, terminales sinápticas, liberación de neurotransmisores.

INTRODUCTION

The wide distribution and the discovery of new and multiple actions of nucleotides in organs and tissues, through membrane receptors named P2 purinergic receptors, have aroused a lot of interest in investigating their cellular biology, the type of dysfunctions associated with the excess or defect of nucleotide signalling, and the search and design for reliable agonists and antagonists that can be used in pharmacology. In the last two years we have assisted to the growing progress in the number of publications related to nucleotide signalling and its physiopathological implications, which gives evidence of its therapeutic potential in a near future. Between the increasing numbers of revisions, we have selected those written by Professor G. Burnstock, by their historical meaning and seminal contributions (1-3). The prestigious journal Trends in Pharmacological Sciences, commemorated the 75th anniversary of the British Pharmacological Society foundation with the publication of a special volume, in which the revision of Burnstock entitled «ATP as a neurotransmitter» (4), is included as one of the 6 most relevant and historical revisions. 36 years ago, Pharmacological Reviews published an article entitled «Purinergic Nerves» (5) that first laid the foundations of purinergic neurotransmission, but that finding was scarcely attractive to the scientific community at that time.

The extracellular role of ATP, or any other nucleotide, requires the presence of this compound outside the cell. In this way, the presence of ATP and other nucleotides and dinucleotides in a large variety of storage and secretory vesicles, such as the cholinergic and aminergic ones, from neural or neuro-endocrine tissues, or the ones from platelets and mastocytes, suggested an extracellular role, as co-transmitter, or extracellular functions for nucleotides (6). The

vesicular storage and exocytotic release of nucleotides with other neurotransmitters is now well established, and the kinetic properties of the granular and vesicular nucleotide transporter, exhibiting a characteristic mnemonic regulation, have been studied by our group (7, 8). However, the extracellular signalling mediated by ATP and nucleotides is so broadly extended, that other mechanisms for nucleotide release should exist. For a non-quantal, or non Ca^{2+} dependent exocytotic release, numerous membrane proteins have been postulated such as some members of the ABC transporter family, members of the ecto-ATPase family known as CD-39, or connexins hemichannels, and constitutes a fertile area of debate and research (9).

The physiological effects of extracellular nucleotides conclude by the action of ectonucleotidases, rendering phosphate and the nucleosides. The broad variety and abundance of these enzymes in all studied cells have made difficult the study of nucleotide receptors responses (10).

NUCLEOTIDE RECEPTOR FAMILIES

The nucleotide receptors are grouped in two big families, the ionotropic, known as P2X, and metabotropic, called P2Y.

Metabotropic P2Y family

The metabotropic P2Y family contains 8 members, $P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}$ receptors. Due to their variety they are trying to divide them in three families, essentially depending on the G protein with which they couple preferentially, and the nature of the nucleotide agonist. This way we have the P2YA group coupled to Gq and Gs and which prefer adenine nucleotides ($P2Y_1$ and $P2Y_{11}$). The next group is P2YB, coupled to Gq and Gi/o, which can recognize both uridine and adenosine nucleotides ($P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$). The P2YC group, couple essentially to Gi and recognize with great efficiency ADP ($P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$), while $P2Y_{14}$ is activated by UDP-glucose. Attempts to assign other members to the P2Y family have been rejected (11). The effects

of P2Y receptors in different signalling pathways are interconnected and it requires to be analyzed from an integrated point of view (12). It should be emphasized the great contributions by the group of K. Harden, E. Barnard, J.M. Boeynaems, J.T. Neary, M.P. Abbracchio and more recently J.P. Gachet among others (13-16). Recent evidences of homo- and heterodimerization of nucleotide receptors have been reported. This fact provides new possibilities of signalling and new pharmacological approaches (17). The family of metabotropic P2Y receptors exhibits a very abundant presence in all neural and glial cells, where more than one subtype co-exists. The physiological nucleotide agonists of P2Y receptors are very diverse, some of them such as $P2Y_{1,12,13}$ are specific for ADP, $P2Y_{11}$ is the only one specific for ATP, others as $P2Y_2$, $P2Y_4$, and $P2Y_6$ are activated mainly by the pyrimidine nucleotides UTP and UDP. These metabotropic receptors are coupled to G proteins and activate a large variety of downstream cascades, such as PI3K, AKT, MAP kinases, and recently it has been reported the glycogen synthase kinase-3, GSK3, regulation. Glial cells, exhibit a broad diversity of functional P2Y receptors, coupled to Gq or Gi proteins and signalling to intracellular cascades related to survival and proliferation. Figure 1 shows the main signalling cascades described for the P2Y subtypes and Table 1 summarises the agonists, antagonists and G proteins coupling of the P2Y receptors subtypes.

As described for other seven helix G protein coupled receptors, the possibility of P2Y metabotropic receptors forming homodimers or heterodimers increases the signalling and modulation posibilities and should be considered in the future (18).

Ionotropic P2X family

P2X ionotropic receptor family contains a total of seven subunits, $P2X_{1,2,3,4,5,6,7}$. They present simple structures, with only two transmembrane helixes, internal amine and carboxy terminals and a large extracellular domain where the nucleotide binding site is located. It is widely accepted, although not completely demonstrated, that a minimum of three subunits are required to obtain a functional ionotropic receptor. As in most of the studied tissues more than one

subunit is expressed, it is probably that the majority of P2X receptors are heteromeric in nature (18). Unlike P2Y, these P2X receptors only recognize adenine nucleotides, in concentrations able to be reached in physiological conditions.

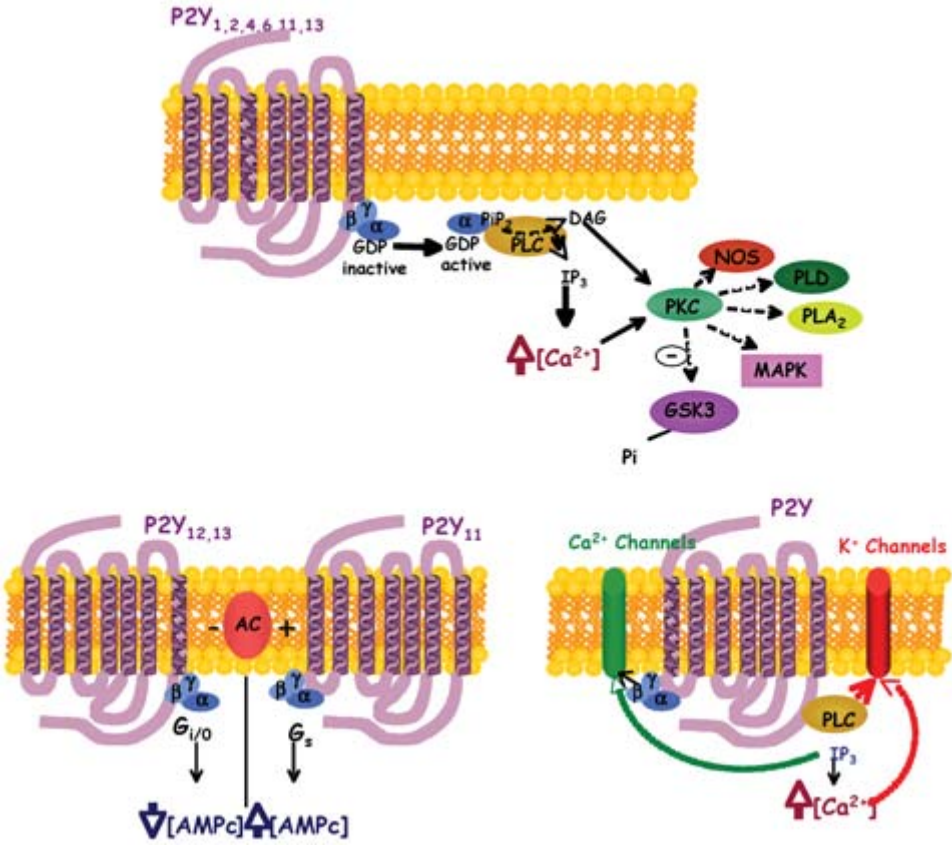


FIGURE 1. ***Signal transduction mechanisms of P2Y receptors.*** *In general, P2Y receptors are coupled, through G protein, to PLC, and induce intracellular calcium mobilization, and finally, PKC activation. In addition, P2Y activation can induce other signalling mechanisms such as PLD, PLA2, MAPK and NOS activation. Moreover, P2Y receptors can be coupled to AC through Gi proteins and to potassium and calcium channels.*

Table 1. *Characteristics of P2Y purinoceptors*

Receptor	Agonist	Antagonist	Signal transduction mechanisms	Major distribution
$P2Y_1$	2MeSADP>ADPβS >MeSATP=ADP>ATP UTP, UDP inactives AP_3A>Ap_2A	MRS 2279>MRS 2179> Suramin>PPADS	$G_q/_{11}$ PLCβ/IP_3/Ca^{2+}	Platelets, brain, placenta, prostate, endothelial cells, heart, skeletal muscle, glial cells, digestive tract, osteoclasts
$P2Y_2$	ATP≈UTP>Ap_4A ADP, UDP y 2MeSATP inactives	Suramin> RB 2, ARC126313	G_q/G_{11};G_i? PLCβ/IP_3/Ca^{2+}	Skeletal muscle, respiratory epithelium, bone, lung, pituitary gland, spleen, lymphocytes, osteoblasts, kidney
$P2Y_4$	UTP>UTPγS >>ATP, UDP (partial agonists) UTP=ATP=Ap_4A (rat)	PPADS RB 2 (rat)>Suramin	G_q/G_{11};G_i? PLCβ/IP_3/Ca^{2+}	Gut, brain, pituitary gland, placenta, heart, lung, vascular smooth muscle, endothelial cells
$P2Y_6$	UDPβS>UDP>UTP>ADP >2MeSATP	RB 2>PPADS>Suramin, MRS2578	G_q/G_{11} PLCβ/IP_3/Ca^{2+}	Placenta, spleen, kidney, heart, aorta, gut, brain, timus, lung.
$P2Y_{11}$	ATPγS≈BzATP>ATP >2MeSATP	Suramin>RB 2, NF157, 5´-AMPs	G_q/G_{11} y G_s PLCβ/IP_3/Ca^{2+} AC Activation	Brain, placenta, pituitary gland, gut, immune system, granulocytes

Table 1. ***Characteristics of P2Y purinoceptors*** *(cont.)*

Receptor	Agonist	Antagonist	Signal transduction mechanisms	Major distribution
$P2Y_{12}$	2MeSADP=2MeSATP >>ADP>>ATP UTP, UDP inactives	AR-C69931,AR-C66096, Clopidogrel, Tioclopidine, RB 2, Suramin, 2MeSAMP, CT50547, AZD6140, INS49266, PSB0413, PPADS inactive, BzATP (rat)	Gi AC Inhibition	Human platelets, brain
$P2Y_{13}$	2MeSADP≥2MeSATP>ADP >>ATP UTP, UDP inactives	AR-C69931 >PPADS>Suramin 2MeSAMP MRS2211	G_q/G_{11}/Gi $PLC\beta/IP_3/Ca^{2+}$ AC Inhibition	Spleen, brain, glial cells, spinal cord, linfatic ganglia endothelial cells
$P2Y_{14}$	UDP-glucose>UDP-galactose>UDP-Glucuronic >UDP-N-acetilglucosamine ATP, ADP, UTP, UDP inactives	¿?	G_q/G_{11}/Gi	Placenta, stomach, gut, brain, spleen, heart, lung

The properties and functional characterization of homomeric and heteromeric receptors built with the P2X subunits was carried out by a broad number of scientific groups, and will still require extensive experimental work (19-25). Recently the $P2X_7$ receptor has deserved a special attention, not only due to the existence of polymorphisms and the pronostic of chronic myeloid leukaemia (CML) in humans and immune system functions, but also due to recent data of a possible role in other aspects of neuronal functioning (26-28). For this reason, $P2X_7$ has become a preferential target for pharmaceutical enterprises (29).

From an electrophysiological point of view, all P2X receptors are cation selective ligand gated ion channels, with permeability similar for Na^+ and K^+, but very high for Ca^{2+}, depending on the implicated subunits. It is probable that an excess intake of calcium through these receptors could contribute in vivo to pathologies associated with P2X receptors (25, 30-36). P2X subunits are formed by two transmembrane domains with intracellular N and C termini and a large extracellular ligand binding loop connecting them (Figure 2). Functional receptors require the assembling of at least three subunits to form homomeric or heteromeric receptors. It was generally accepted that $P2X_7$ exclusively formed homomeric receptors, although recent data points to a coasembling almost with PX_4 (37). The main physiological agonist of functional P2X receptors is ATP, and for the moment there is a limited battery of nucleotide synthetic agonists to pharmacologically identify each one of the homomeric or heteromeric P2X combinations. The same situation occurs with the antagonist's disponibility, as it can be seen in Table 2. In spite of this situation, combination of diverse nucleotide agonists and antagonists, together with the kinetic behaviour exhibiting or not desensitization allows the identification of different P2X functional receptors. Molecular biology and immunohistochemical techniques are relevant tools to confirm the tissular and cellular location of the P2X receptor subunits.

TABLE 2. *Characteristics of P2X homomeric purinoceptors*

Receptor	Agonists	Antagonists	Ion modulation	Desensitization	Major distribution
$P2X_1$	ATP=2MeSATP≥Ap_6A ≥α, β-meATP >BzATP>ADP	NF449>TNP-ATP>Ip_5I >MRS2257>PPADS (nM) Suramin>RB 2 (μM)	$H^+\downarrow$ $Zn^{2+}\downarrow$	Fast	Brain, spinal cord, smooth muscle, platelets, sympathetic ganglia
$P2X_2$	ATP≥ATPγS≥MeATP >Ap_4A α, β-meATP y ADP inactives	RB 2=NF279, NF770 >PPADS=TNP-ATP =BBG≥Suramin (μM)	$H^+\uparrow$ $Zn^{2+}\uparrow$ $Cu^{2+}\uparrow$ $Ca^{2+}\uparrow$	Slow	Brain, spinal cord, smooth muscle, sympathetic ganglia, chromafin cells, retina
$P2X_3$	2MeSATP≥ATP= α,β-meATP>Ap_5A >ADP	TNP-ATP>MRS2257= A317491>MRS2159= PPADS (nM)NF279= NF449>Ip_5I≥Suramin> NF023>RB 2 (μM) A317491, NF110, phenol red	$Zn^{2+}\uparrow$ $H^+\downarrow$ $Ca^{2+}\uparrow$	Fast	Brain, spinal cord, smooth muscle, sympathetic ganglia, sensory neurons
$P2X_4$	ATP>2MeSATP α, β-meATP y ADP inactives Potentiation by Ivermectin, Propofol and Cibacron blue	TNP-ATP>BBG (μM) phenolphthalein	$H^+\downarrow$ $Zn^{2+}\uparrow$ $Cd^{2+}\uparrow$	Slow	Brain, spinal cord, smooth muscle, sympathetic ganglia, testis, colon

Table 2. ***Characteristics of P2X homomeric purinoceptors****(cont.)*

Receptor	Agonists	Antagonists	Desensitization	Major distribution
$P2X_5$	ATP=2MeSATP=Ap_4A> α, β-meATP>BzATP ADP inactive	PPADS>TNP-ATP> Suramin>RB 2 (μM)	Slow	Trigeminus ganglia, spinal cord, proliferative skin cells, thymus, bladder
$P2X_6$	2MeSATP≥ATP= α,β-meATP>Ap_5A >ADP	TNP-ATP>PPADS Suramin insensitive	Slow	Brain, spinal cord, sympathetic ganglia
$P2X_7$	BzATP>2MeSATP >>ATP α,β-meATP and ADP inactive	A-74003=A-438079 (rat, human) BBG (nM) (rat) PPADS=TNP-ATP (nM) KN-62 (nM) (human, mouse) Suramin (mM) (rat, human)	Fast	Retinal ganglia, immune cells, brain, spinal cord, skin, pancreas.

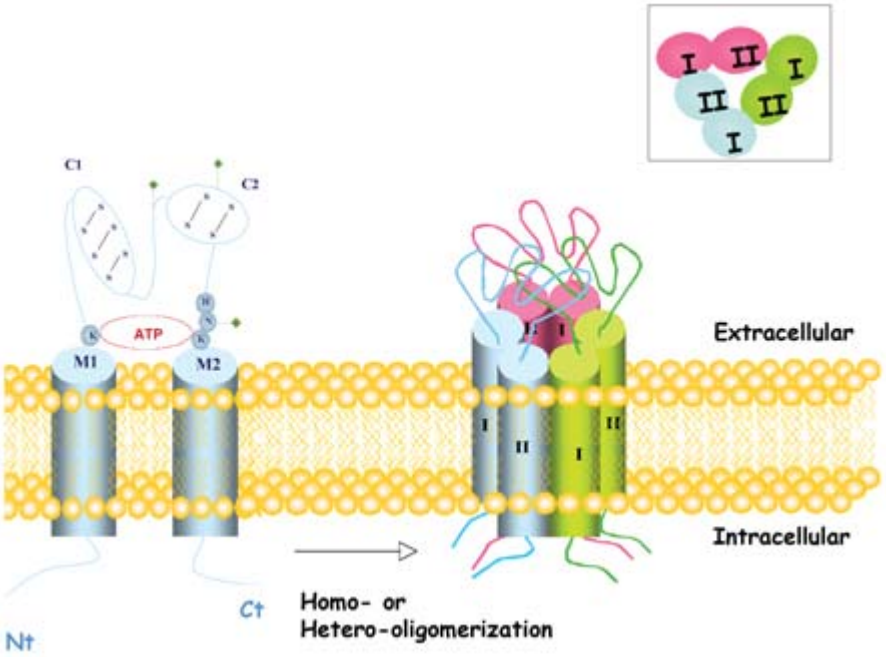


FIGURE 2. ***Transmembrane topology and oligomeric structure of P2X receptors.*** *The intracellular N- and C-termini, two transmebrane domains (M1 and M2) and the extracellular ligand-binding loop are shown. Conservatives cysteines residues, organized in two domains (C1 and C2), and the glycosilation sites are indicated. Moreover, in the extracellular loop is shown the conserved positively charged residues (K68 and K309) involved in the ATP binding. In addition, the model of oligomerization proposed for P2X receptors is shown. Transmembrane helixes II are participating mainly in the channel formation.*

PRESENCE AND FUNCTION OF P2X RECEPTORS IN SYNAPTIC TERMINALS

Synaptic terminal studies allowed us to identify the presynaptic ionotropic receptors that responded specifically to ATP and some more specific agonists and antagonists, and even link them with the presence of P2X subunits through immunohistochemistry. The results obtained point to a coexistence in a single synaptic terminal of different types of P2X and dinucleotide receptors (38-42).

Considering the great variety of synaptic terminals it is important to characterize in what types P2X receptors are preferentially found.

Currently we can characterize the responses in specific terminals after functional studies, using immunohistochemical techniques. The presynaptic ionotropic nucleotide receptors are functional and very abundant in cholinergic terminals, identified with double dye with the vesicle acetylcholine transporter (VAT) (43), also in GABAergic terminals characterized by the presence of the inhibitor aminoacids transporter (VIAAT) or of the neural isoform of glutamate descarboxylase (GAD65) (44, 45). Similar abundance of ionotropic nucleotide receptors is observed in aminergic terminals in striatum, characterized by the presence of monoamine vesicular transporter (VMAT-2). We should emphasize its equally abundant presence in glutamatergic terminals, detected by immunohistochemistry of the vesicular glutamate transporter, both the types 1 and 2 (46, 47).

It could be thought that in an analogous way we could characterize the terminals that store ATP and dinucleotides in their vesicles but for the moment the nucleotide vesicular transporter has not been cloned and only kinetically characterized (8, 48).

Immunocytochemical studies have proven that P2X subunit distribution in synaptic terminals is notoriously different than those present in neural soma, but for the moment it is not known how a preferential location and distribution is accomplished, and expression tests have not been yet made in polarized cells that can serve as a model. In previous work from our group it has been reported that $P2X_3$ subunit is very abundant in CNS terminals and that all of the synaptic terminals responding to α–β-methylen-ATP and ATP where afterwards immunolabeled with anti-$P2X_3$ antibodies (49). Besides, there are terminals that respond to nucleotides and do not present staining for this subunit. Recently we have reported that $P2X_7$ subunit is also present in great abundance in CNS terminals, other authors have also found this location in peripheral nerves (42, 50-53). More than 50% of isolated synaptic terminals from diverse areas of central nervous system exhibit $P2X_7$ receptors both by immunostaining and microfluorimetric techniques. Thus, all the signalling mediated by this receptor acquires a special relevance in the synaptic degenerative processes (54) and should deserve special attencion in the future. Figure 3 shows the preferential distribution of some P2X at the synaptic terminals.

P2X receptors from the presynaptic area are able to induce calcium dependent exocytotic release upon stimulation. The nucleotide effect is dose dependent and the induced release of classical neurotransmitters such as: acetylcholine, glutamate, GABA

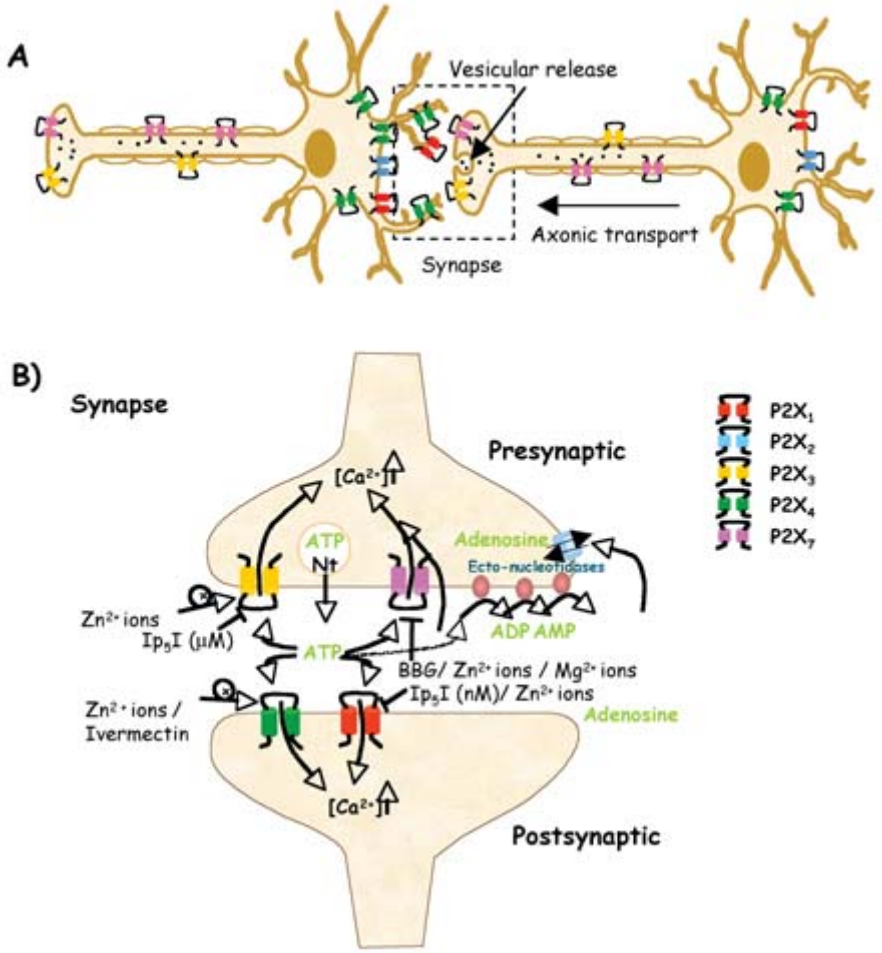


FIGURE 3. ***Experimental based distribution of P2X receptors in CNS.*** *P2X receptors exhibit a specific distribution along the axodendritic fibres (A). $P2X_1$ (red) and $P2X_4$ (green) are preferently located at the dendrites and somas. $P2X_3$ (yellow) and $P2X_7$ (pink) are mainly at the axons. $P2X_2$ subunit expression (blue) is restricted to the somas. The activation of the different P2X receptors produces an increase in intracellular calcium levels and activates different signalling mechanisms.*

or catecholamines has been reported (55-61). Figure 4 shows the exocytotic release from rat midbrain synaptic terminals, after stimulation. It can be observed that the quantity of neurotransmitter released by mg of protein from synaptosomal preparation mirrors the relative abundance of eah specific type of terminal, being glutamatergic the most abundant. The dose response curves reported in Figure 4 have been obtained with ATP in the presence of Mg^{2+} ion and correspond in a great extent to secretion mediated by $P2X_3$ presynaptic receptors. Later the secretory responses mediated by $P2X_3$ compared to $P2X_7$ will be reported in cultured granule neurons.

Presynaptic ionotropic receptors functionality is something that has recently appeared and very insistently, as the mean to regulate in a drastic way the secretory capacity of terminals and essentially all ionotropic receptors described in neural soma have been now characterized in the neural secreting area (55-63). This could be the case for NMDA, AMPA, $GABA_A$ and especially nicotinic and, nucleotidic neural receptors wich role on the control of synaptic terminals secretion, synaptic plasticity, recovery and stability, or long term depression or potentiation, has to be settled (57, 58, 60, 61, 64-

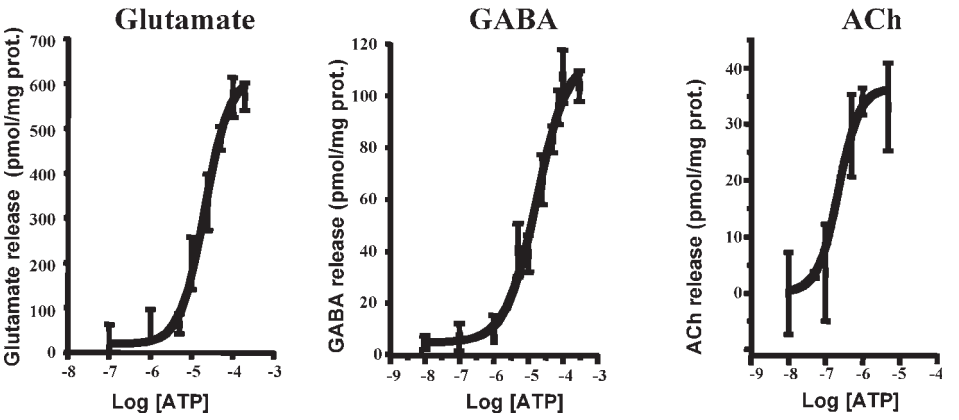


FIGURE 4. ***P2X receptor activation induces glutamate, GABA and acetylcholine release from presynaptic terminals.*** *Synaptic terminals isolated from rat midbrain were stimulated with increasing ATP concentrations. The amount of glutamate and GABA in the extrasynaptosomal media were measured by HPLC. Extrasynaptosomal acetylcholine was quantified by the luminometric protocol described by Israel and Lesbats (85).*

66). The presence at the presynaptic level of a large variety of ionotropic and metabotropic receptors suggests the possibility of multiple interactions and cross-talk, an attempt to understand some of them is described in next paragraph.

INTERACTION OF P2X AND OTHER IONOTROPIC AND METABOTROPIC RECEPTORS AT THE PRESYNAPTIC LEVEL

Ionotropic receptors interaction

Previous publications from our group reported the coexistence of ionotropic ATP and dinucleotide receptors with neuronal nicotinic receptors (41, 60), both being functional when are separatedly stimulated. This fact posses a series of questions: 1) whether a synergism between them exists, maybe leading to an exhaustion of the terminals, 2) whether they exclude each other and to what extent, and 3) whether their own subunits interacts with each other. This last possibility has been outlined in an interesting work by Khakh et al. (67), in which they show that the coexpression of ATP homomeric $P2X_2$ and acetylcholine receptors, nicotinic α3-β4 in oocytes, interfere mutually in the ion intake responses. If this happens in particular terminals it is something important, since α3, α4 and α7 nicotinic subunits have been involved, when they are located at a presynaptic level, in Alzheimer's disease, and constitute nowadays a preferential target in the new pharmacology to alleviate said disease. This is only an example of how complex are the interactions between different ionotropic receptors, in which nucleotide receptors widely participate, and that beyond this complexity it is necessary to undertake, if we pretend to understand how is actually functioning the presynaptic area.

The specific situation of nicotinic and nucleotidic ionotropic receptors colocalizing at the same terminal exhibits relevant functional characteristics, because the activation of nicotinic receptors inhibits in a high extent the ionotropic P2X, and dinucleotide receptors calcium responses. This reduction in the calcium entrance also results in a decrease in the acetylcholine

release induced by nucleotides. What is the mechanism responsible for the effect? This is a question with relevant physiological implications. In our experimental model of cholinergic synaptic terminals the inhibitory effect of nicotinic receptors on P2X receptors appears to be mediated by the activation of Calcium calmoduline kinase II, CaMKII, as this enzyme becomes activated by the intrasynaptosomal calcium increase upon receptor activation. The key role played by this enzyme in nerve terminals is confirmed by using the enzyme inhibitor KN62 wich completely prevents the inhibitory effect induced through nicotinic receptors agonists. This undoubtedly will allow us to take another step in the synaptic knowledge and avoid over-stimulation (60, 68). Figure 5 sumarises the modulation of P2X receptors by ionotropic (nicotinic) and metabotropic ($GABA_B$) receptors.

Ionotropic nucleotide receptors modulation by metabotropic receptors

Presynaptic ionotropic nucleotide receptors are also under the influence of a large variety of metabotropic receptors located in the presynaptic area. To this respect we have described dramatic effects caused by protein kinase and phosphatase action, when they are directly activated or inhibited, or through a more physiological way of presynaptic receptors stimulation. The receptor's affinity for their nucleotide agonists can be decreased in situations where kinase activity is increased, both by cAMP dependent kinases, PKA, or members of the PKC family (69). The oposite situation also occurs and an inhibition of protein kinases, or agonistic action on Gi coupled metabotropic receptors, results in a bigger affinity of P2X receptors, and also an increase in calcium maximal response. There are remarkable examples such as those reported for A1 adenosine receptors, and also $GABA_B$ receptors, both coupled to Gi. In the presence of these receptors agonists, the affinity values of nucleotides for P2X are increased in 3-5 orders of magnitude, going from mM to nM or pM (70). An especial mention should be given to $GABA_B$ receptors, since they are ubiquitous in CNS and especially at a presynaptic level, given the abundance of nucleotide signalling and presence of $P2X_3$ subunits in GABAergic terminals, the study of the

modulation of P2X receptors by GABA metabotropic receptors can give a clue to understand neuropathic pain, in which insufficient $GABA_B$ signalling has been involved (55, 57, 59). Although the A1 adenosine and $GABA_B$ receptors are among the most abundant located at a presynaptic level, the presence and effect of other Gi coupled receptors among the dopamine family (D2, D3, D4) and glutamatergic metabotropic family (group II and group III) should be explored in specific brain areas.

PRESENCE AND FUNCTION OF P2 RECEPTORS IN CULTURED NEURONS

In previous works by our group we proved that P2Y metabotropic receptors can coexist with P2X ionotropic receptors in neurons, like Purkinje, neurochromaffin cells from adrenal medulla and in cerebellar granule neurons (52, 71-74). In endothelial cells and

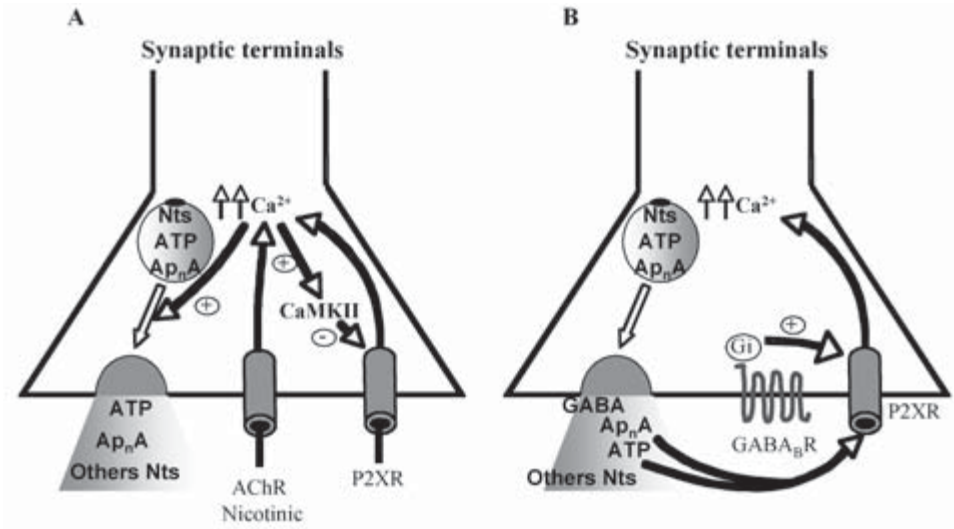


FIGURE 5. ***P2X receptor modulation by ionotropic and metabotropic receptors. A)*** *Co-existence of nicotinic and P2X receptors. Agonistic effect on acetylcholine nicotinic receptors induces intracellular calcium increase, activation of CaMKII and as a result inhibition of P2X responses in calcium entrance.* ***B)*** *Co-existence of metabotropic $GABA_B$ and P2X receptors. Agonistic effect on $GABA_B$ receptors coupled to Gi results in an affinity and calcium increase mediated by P2X receptors agonists.*

astrocytes multiple subtypes of P2Y receptors coexist. One of the first references about this coexistence is our group's work in vascular endothelial cells (75). One data of extreme complexity that can reach the nucleotide signalling system in neuronal cells is proved by the presence in cerebellar granular neurons in culture, of most of the P2Y and P2X receptors cloned so far, furthermore, with preferentially somatic or axonic/dendritic distribution depending on the receptor subtype (51, 52). The presence of P2 receptors and their function has also been studied in neuroblastoma and other tumoral cell lines from neural origin, where the expression of diverse members of P2Y and P2X family has also been shown. The complex neural architecture is also an element to keep in mind concerning the toxicity, stress and neurodegeneration aspects, since the topographic distribution of P2X and P2Y receptors is extremely complex and could generate different responses in neural maintenance and recuperation. Cerebellar granule neurons have been extensively studied by our group and a brief summary concerning the presence and signalling of P2X and P2Y is reported below.

Presence and function of P2X receptors from cultured cerebellar granule neurons

The presence, distribution and function of P2X receptors have been extensively studied in the experimental model of cultured granule neurons obtained from young mice cerebellum. The relative expression levels of P2X receptors have been analysed by real time PCR, at 9 div, the most abundant are: $P2X_4$, $P2X_7$, $P2X_3$, $P2X_2$, and $P2X_1$, and by that order. The mRNA levels correlate well with the Western blot protein levels, detected with specific antibodies (76). Microfluorimetric techniques to study the calcium responses with specific P2X agonists and antagonists show the presence of functional receptors, being $P2X_7$ and $P2X_3$ the ones most relevant at the axodendritic fibers, in agreement with their immunocytochemical localization. Both receptors are able to induce calcium entrance and calcium dependent exocytotic release, in this case due to the glutamatergic nature of granule cells, the released neurotransmitter is glutamate. The intracellular calcium increase also results in cytoskeletal reorganization mediated by activation of the calcium

calmoduline kinase II, CaMKII. This enzyme phosphorylates synapsin allowing the approaching of neurosecretory vesicles to the docking secretory areas of the presynaptic plasma membrane (61, 77). Figure 6 shows cultured granule neurons loaded with Fura-2 responding to the $P2X_7$ agonist, and to a massive depolarization induced by K^+ ion, to compare the magnitude of both events.

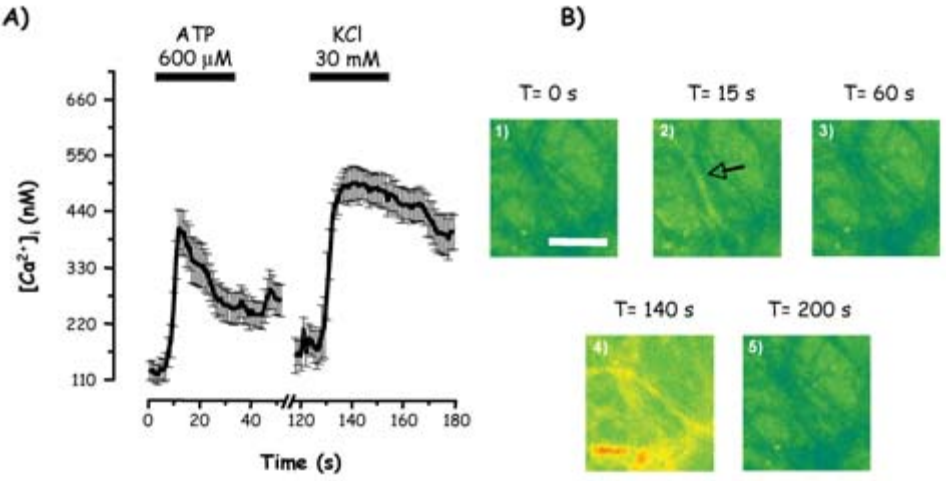


FIGURE 6. ***ATP effect on cultured granule neurons from mouse cerebellum.*** ***A)*** *Cultured neurons (9 days in vitro) were stimulated with ATP 600 µM for 30 seconds. At the end of the experiment cells were stimulated with KCl to asses its neuronal nature.* ***B)*** *Microphotographs of the granule neurons at t = 0 s (1); t = 15 s, during ATP stimulation (2); t = 60 s, before ATP stimulation (3); t = 140 s, during the masive depolarization induced by KCl (4); t = 200 s, in the presence of the perfussion medium. The axodendritic fibres that respond to ATP and to KCl are shown in yellow. The arrow point a responding fibre to ATP. Scale bar = 5 µm.*

Presence and function of P2Y receptors from cultured cerebellar granule neurons

Cerebellar granule neurons exhibit a great heterogeneity in nucleotide responses when studies in single cell are carried out. These responses concern both the ionotropic and metabotropic responses of P2X and P2Y receptors. These responses all became modified during the course of granule cells differentiation, not only

at the level of the number of responding cells but also in the magnitude of the response to nucleotides (51). These *in vitro* developmental changes were more significant in metabotropic responses to pyrimidine nucleotides, UTP and UDP, which were down and up regulated respectively, during the time in culture. These changes correlated with changes in the mRNA expression levels for $P2Y_4$ and $P2Y_6$ receptors.

$P2Y_1$ receptor is present in almost all, if not all, granule neurons when single cell microfluorimetric experiments are carried out, and cells challenged with 2MeSATP, that is a full synthetic agonist of this receptor. In most cells the calcium responses are completely inhibited, or significantly reduced, in the presence of MRS2179, that is the best antagonist of $P2Y_1$ available. The mRNA expression and the presence of the protein measured by western blot, for $P2Y_1$ receptor, increases with time in culture, but in a more moderate way compared with the $P2Y_4$ and $P2Y_6$ receptors.

In addition to $P2Y_1$, the presence of $P2Y_{12}$ and $P2Y_{13}$ has been recently reported in granule neurons, all of them being members of the ADP responding nucleotide receptors. Thus the metabotropic cascades activated by ADP require to be carefully studied to properly asignate the function to one of the receptors families. Recently our group has found that Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) a multifaceted enzyme involved in development, neurogenesis, and survival at the CNS was induced to phosphorylation and subsequent inhibition of its catalytic activity by 2-methyl-thio-ADP (2MeSADP). This compound could be acting through several P2Y-ADP receptors expressed in granule neurons, as RT-PCR expression was found for $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ and $P2Y_{13}$ receptors. As the effect on GSK-3 phosphorylation was sensitive to pertussis toxin and was unaffected by specific antagonists of $P2Y_1$ and $P2Y_{12}$ receptors, such as MRS2179 and 2-methyl-thio-AMP, respectively, the pharmacological data fitted well with a Gi-coupled $P2Y_{13}$ receptor. The signalling cascade from $P2Y_{13}$ after activation through 2MeSADP is relatively complex as it was able to phosphorylate and activate extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1,2 and Akt proteins, but its effect on GSK-3 phosphorylation was primarily dependent on the phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3-K)/Akt pathway, as it was abolished by the PI3-K inhibitor wortmannin. GSK-3 inactivation by 2MeSADP in granule

neurons resulted in nuclear translocation of its substrate β-catenin, which functions as a transcriptional regulator, this effect being lost with wortmaninn (78). Figure 7 summarises the signalling cascade from $P2Y_{13}$ to GSK-3 and nuclear β-catenin. Now, further work is necessary to understand the physiological meaning of this signalling pathway in CNS development, maintenance and senescence.

PRESENCE AND FUNCTION OF P2 RECEPTORS IN CULTURED ASTROCYTES

Cultured astrocytes from rat cerebellum express almost all the P2Y receptors described so far, and there are also evidence for the presence and peculiar functionality of some P2X receptors.

The mRNA expression was studied by PCR and presence of $P2Y_{1,2,4,6,11,12,13}$ metabotropic nucleotide receptors was detected. At the same time and if specific antibodies were available, studies of immunocytochemistry or western blot were accomplished. Not always the presence of mRNA corresponded with protein detection by western blot or immunocytochemistry, or later on with functional responses from astrocytes. For example, $P2Y_1$ receptor correlates well the mRNA expression, protein detection and cellular responses, but that is not the case for $P2Y_{12}$ receptor that in spite of mRNA presence, there was no specific labelling of astrocytes with anti-$P2Y_{12}$ receptor antibody, whereas a specific staining was observed, as positive control in platelets.

Studies of the P2X subunits expression was carried out by RT-PCR techniques. In these assays high levels of mRNA codifying for $P2X_1$, $P2X_3$, $P2X_4$ and $P2X_7$ subunits were detected. In contrast, $P2X_2$, $P2X_5$ and $P2X_6$ subunits appeared to be nearly absent in astrocytes cultures. In most cases the mRNA detection does not correlate with the presence of the protein. In fact, by immunocytochemistry using specific antibodies only $P2X_4$ and $P2X_7$ subunits were detected. These data are relevant because it is possible that $P2X_7$ and $P2X_4$ form functional hetero-oligomers (37) in cerebellar astrocytes.

P2Y functional responses in astrocytes

Calcium responses measured using fura-2 microfluorimetric techniques suggest that different P2Y subtypes could be responsible

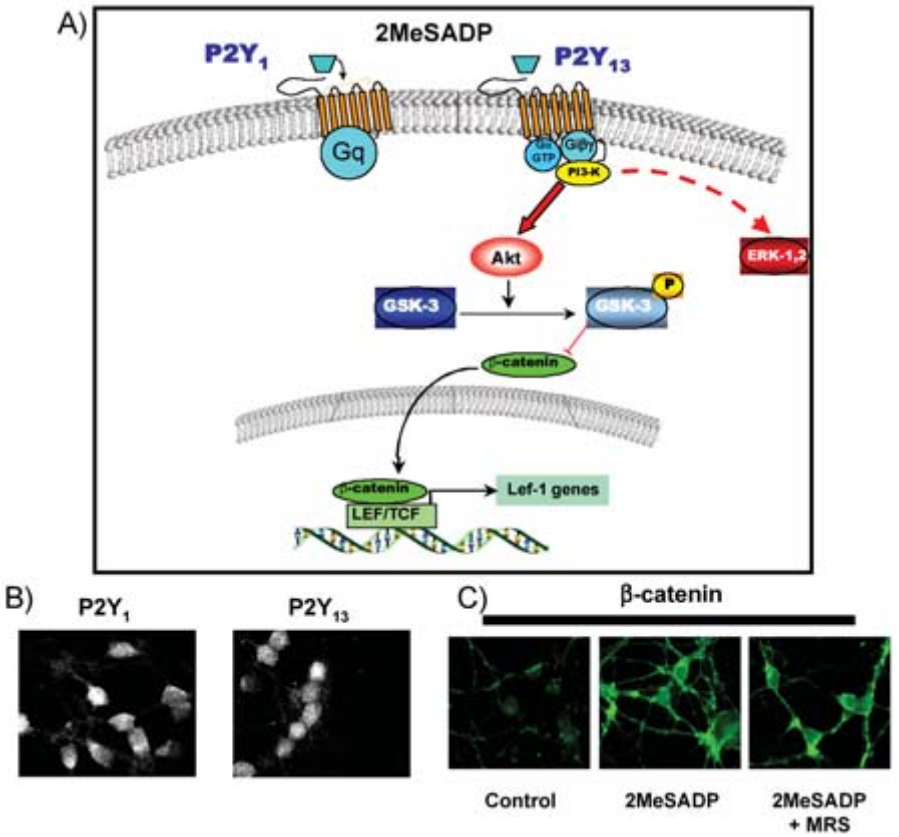


FIGURE 7. ***A)*** *Signalling pathways activated by 2MeSADP in cerebellar granule neurons. 2MeSADP, activating a $P2Y_{13}$ receptor, induces an increase in GSK-3 phosphorylation and inhibition of its catalytic activity. This phosphorylation occurs through a PI3K/Akt-dependent pathway. The lack of activity of GSK-3 towards its substrate β-catenin avoids its phosphorylation and degradation, and allows its translocation to the nucleus, where it functions as a transcriptional regulator.* ***B)*** *Immunostainnig of the main P2Y-ADP receptors expressed in cerebellar granule neurons, $P2Y_1$ and $P2Y_{13}$ receptors.* ***C)*** *Fluorescence images of β-catenin immunostaining in cerebellar granule neurons that were stimulated for 10 minutes with 1 μM 2MeSADP. The increase in β-catenin levels induced by 2MeSADP treatment was maintained in presence of the specific antagonist of $P2Y_1$ receptor, MRS-2179.*

for ATP metabotropic calcium responses in single type 1 astrocytes. All tested astrocytes responded to ATP and UTP stimulations evoking similar calcium transients. Most astrocytes also responded to 2-MeSADP and ADP challenges. The agonist potency and cross-desensitization experiments demonstrated the presence of functional $P2Y_1$ and $P2Y_2$ or $P2Y_4$ receptors. In addition, the existence of an astrocyte subpopulation that express functional $P2Y_6$ was demonstrated, this accounting for 30-40% of the total.

In addition to phospholiphase C activation, PLC, and subsequent calcium increase from internal stores, $P2Y_{1,2,4,6}$ receptors, can also activate the ERKs signalling cascade as they increase in western blot the phosphorylated forms of ERK1 and ERK2 (79).

P2X functional responses in astrocytes

Recent data from our group support the presence of functional ionotropic $P2X_7$ nucleotide receptors in cerebellar astrocytes. Although both $P2X_4$ and $P2X_7$ receptors were expressed at the protein level, the responses found with the specific agonist BzATP are in agreement with the activation of a $P2X_7$ type, which exhibits a distinctive behaviour in astrocytes. BzATP-induced calcium increases are sustained, and not transient, as those obtained with the metabotropic agonists 2MeSADP or UTP and far from inducing cell lysis as described for $P2X_7$ receptors from macrophages. Moreover, stimulation of $P2X_7$-like receptor induces significant morphological changes in astrocytes and leads to differentiation (84).

CONCLUSIONS

Nucleotide receptors are very abundant at the central nervous system, in all types of neural cells. Their physiological roles are far from being elucidated and only fragmentary data are available. However, there are increasing evidence concerning their involvement in neuropathogenesis due to aging and neurotrauma. The specific distribution and signalling cascades asociated with their neuronal location, as soma, dendritic or axonal subcellular distribution, should

be considered to analyse in depth their physiological function, the possible diseases asociated to their disfuction and the pharmacological perspectives for their specific agonists and antagonists.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the Spanish Ministry of Education and Science BFU2005-02079, the Fundación La Caixa nº BM05-114-0, the Fundación Marcelino Botín and from the Comunidad Autónoma de Madrid (SAL/0551/2004).

REFERENCES

(1) BURNSTOCK, G. (2006) Pathophysiology and therapeutic potencial of purinergic signaling. *Pharmacol. Rev*. 58, 58-86.
(2) BURNSTOCK, G. (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659-797.
(3) BURNSTOCK, G. (2005) Purinergic signalling: therapeutic potential. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2: 283-319.
(4) BURNSTOCK, G. (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27: 166-176.
(5) BURNSTOCK, G. (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24: 509-581.
(6) RODRÍGUEZ DEL CASTILLO, A.; TORRES, M.; DELICADO, E.G. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates -Ap4A and Ap5A- in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J. Neurochem*. 51: 1696-1703.
(7) GUALIX, J.; ABAL, M.; PINTOR, J.; GARCÍA-CARMONA, F. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1996) Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J. Biol. Chem*. 271: 1957-65.
(8) GUALIX, J.; FIDEU, M.D.; PINTOR, J.; ROTLLÁN, P.; GARCÍA-CARMONA, F. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1997) Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules frm adrenal medulla. *FASEB J.* 11: 981-990.
(9) BAHIMA, L.; ALEU, J.; ELIAS, M.; MARTÍN-SATUÉ, M.; MUHAISEN, A.; BLASI, J.; MARSAL, J. AND SOLSONA, C. (2006) Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus laevis*. *J. Cell. Physiol.* 206: 95-102.
(10) ZIMMERMANN, H. (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 362: 299-309.
(11) ABBRACCHIO, M.P.; BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J.M.; BARNARD, E.A.; BOYER, J.L.; KENNEDY, C.; MIRAS-PORTUGAL, M.T.; KING, B.F.; GACHET, C.; JACOBSON, K.A. AND WEISMAN, G.A. (2005) The recently deorphanized GPR80 (GPR99) proposed to be the $P2Y_{15}$ receptor is not a genuine P2Y receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 26: 8-9.

(12) VAN KOLEN, K. AND SLEGERS, H. (2006) Integration of P2Y receptor-activated signal transduction pathways in G protein-dependent signaling networks. *Purinergic Signalling*. 2: 451-469.
(13) HARDEN, T.K.; BOYER, J.L. AND NICHOLAS, R.A. (1995) P2-purinergic receptors: subtype-associated signalling responses and structure. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 35: 541-549.
(14) COMMUNI, D.; GOVAERTS, C.; PARMENTIER, M. AND BOEYNAEMS, J.M. (1997) Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenyly cyclase. *J. Biol. Chem*. 272: 31969-31973.
(15) COMMUNI, D.; ROBAYE, B.M. AND BOEYNAEMS, J.M. (1999). Pharmacological characterization of the human $P2Y_{11}$ receptor. *Br. J. Pharmacol*. 128: 1199-1206.
(16) VON KÜGELGEN, I. AND WETTER, A. (2000) Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedeberg´s Arch. Pharmacol*. 362: 310-323.
(17) KOTEVIC, I.; KIRSCHNER, K.M.; PORZIG, H. AND BALTENSPERGER, K. (2005). Constitutive interaction of the P2Y2 receptor with the hematopoietic cell-specific G protein G(a16) and evidence for receptor oligomers. *Cell Signall.* 17: 869-880.
(18) ROBERTS, J.A.; VIAL, V.C.; DIGBY, H.R.; AGBOH, K.C.; WEN, H.; ATTERBURY-THOMAS, A. AND EVANS, R.J. (2006) Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452: 486-500.
(19) COLLO, G.; NORTH, R.A.; KAWASHIMA, E.; MERLO-PICH, E.; NEIDHART, S.; SURPRENANT, A. AND BUELL, G. (1996) Cloning of $P2X_5$ and $P2X_6$ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci*. 16: 2495-2507.
(20) SOTO, F.; GARCÍA-GUZMÁN, M.; KARSCHIN, C. AND STUHMER, W. (1996) Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 223: 456-460.
(21) VULCHANOVA, L.; RIEDL, M.; SHUSTER, S. J.; BUELL, G.; SURPRENANT, A.; NORTH, R. A. AND ELDE, R. (1997) Immunohistochemical study of the $P2X_2$ and $P2X_3$ receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology*. 36: 1229-1242.
(22) VULCHANOVA, L.; RIEDL, M.; SHUSTER, S.J.; STONE L.S.; HARGREAVES, K.M.; BUELL, G.; SURPPRENANT, A.; NORTH, R.A. AND ELDE, R. (1998) $P2X_3$ is expressed by DGR neurons that terminate in inner lamina II. *Eur. J. Neurosci*. 10: 3470-3478.
(23) NORTH, R.A. AND SURPRENANT, A. (2000) Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 40: 563-80.
(24) NÖRENBERG, W. AND ILLES, P. (2000) Neuronal P2X receptors: localization and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362: 324-339.
(25) KHAKH, B.S.; BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C.; KING, B.F.; NORTH, R.A.; SÉGUÉLA, P.; VOIGT, M. AND HUMPHREY, P.P. (2001). International Union of Pharmacology, XXIV, current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol. Rev.* 53: 107-118.
(26) WILEY, J.S.; DAO-UNG, L.P.; CHANGPING, L.; SHEMON, A.N.; GU, B.J.; SMART, M.L.; FULLER, S-J.; BARDEN, J.A.; PETROU, S. AND. SLUYTER, R. (2003) An Ileu-568 to Asn polymorfism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor. *J. Biol. Chem.* 278: 17180-17113.

(27) GU, B.J.; SLUYTER, R.; SKARRATT, K.K.; SHEMON, A.N.; DAO-UNG, L.P.; FULLER, S-J.; BARDEN, J.A.; CLARKE, A.L.; PETROU, S. AND WILEY, J.S. (2004) An Arg-307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes Loss-of-function of the human P2X7 receptor. *J. Biol. Chem.* 279: 31287-31295.

(28) ANDERSON, C.M. AND NEDERGAARD, M. (2006) Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci*. 29: 257-262.

(29) DONNELLY-ROBERTS, D.L. AND JARVIS, M. F. (2007). Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br. J. Pharmacol.* 151: 571-579.

(30) BENHAM, C.D. AND TSIEN, R.W. (1987) A novel receptor-operated Ca^{2+}-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature.* 328: 275-278.

(31) EDWARDS, F.A.; GIBB, A.J. AND COLQUHOUN, D. (1992) ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359: 144-147.

(32) EVANS, R.J.; LEWIS, C.; VIRGINIO, C.; LUNDSTROM, K.; BUELL, G.; SURPRENANT, A. AND NORTH, R.A. (1996) Ionic permeability and divalent cations effect on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 497: 413-422.

(33) KHAKH, B.S.; PROCTOR, W.R.; DUNWIDDIE, T.V.; LABARCA, C. AND LESTER, H.A. (1999). Allosteric control of gating and kinetics al $P2X_4$ receptor-channels. *J. Neurosci*. 19: 7289-7299.

(34) NICKE, A.; BÄUMERT, H. G.; RETTINGER, J.; EICHELE, A.; LAMBRECHT, G.; MUTSCHLER, E. AND SCHMALZING, G. (1998) $P2X_1$ and $P2X_3$ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17: 3016-3028.

(35) TORRES, G.E.; EGAN, T.M. AND VOIGT, M.M. (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 274: 6653-6659.

(36) VIRGINIO, C.; NORTH, R.A. AND SURPRENANT, A. (1998) Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric $P2X_2$ and $P2X_3$ receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *J. Physiol*. 510: 27-35.

(37) GUO, C.; MASIN, M.; QURESHI, O.S.; MURRELL-LAGNADO, R.D. (2007) Evidence ofor functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol*. 72: 1447-1456.

(38) PINTOR, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1995) A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* 115: 895-902.

(39) PINTOR, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2000) Receptors for diadenosine polyphosphates P2D, $P2Y_{ApnA}$, P4 and dinucleotide receptors: are there too many? *TIPS.* 21: 135.

(40) PINTOR, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001) Pharmacological profile of the dinucleotide receptor present in rat brain isolated synaptic terminals. *Anal. Pharmacol*. 2: 85-92.

(41) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001) Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP at single synaptic terminals in rat midbrain. *Eur. J. Neurosci.* 14: 1-10.

(42) Miras-Portugal, M.T.; Díaz-Hernández, M.; Giráldez, L.; Hervás, C.; Gómez-Villafuertes, R.; Sen, R.P.; Gualix, J. and Pintor, J. (2003) $P2X_7$ receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochemical Research*. 28: 1597-1605.

(43) Bejanin, S.; Cervini, R.; Mallet, J. and Berrard S. (1994) A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J. Biol. Chem.* 269: 21944-21947.

(44) Dumoulin, A.; Rostaing, P.; Bedet, C.; Lévi, S.; Isambert, M.F.; Henry, J.P.P.; Triller, A. and Gasnier, B. (1999) Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic terminal boutons. *J. Cell. Sci.* 112: 811-823.

(45) Hiscock, J.J.; Murphy, S. and Willoughby, J.O. (2000) Confocal microscopic estimation of GABAergic nerve terminals in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods*. 95: 1-11.

(46) Takamori, S.; Rhee, J.S.; Rosenmund, C. and Jahn, R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*. 407: 189-193.

(47) Varoqui, H.; Schäefer, M.; Zhu, H.; Weihe, E. and Erickson, J. (2002) Identification of the Differentiation-associated Na^+/ Pi transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J. Neurosci*. 22: 142-155.

(48) Gualix, J.; Pintor, J. and Miras-Portugal, M.T. (1999) Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J. Neurochem*. 73: 1098-1104.

(49) Díaz-Hernández, M.; Gómez-Villafuertes, R.; Hernando, F.; Pintor, J. y Miras-Portugal, M.T. (2001) Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X3 subunits. *Neurosci. Lett*. 301: 159-162.

(50) Deuchars, S.A.; Atkinson, L.; Brooke, R.E.; Musa, H.; Miligan, C. J.; Batten, T.F.C.; Buckley, N.J.; Parson, S.H. y Deuchars, J. (2001) Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci*. 21: 7143-7152.

(51) Hervás, C.; Pérez-Sen, R. and Miras-Portugal, M.T. (2003) Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Res*. 73: 384-399.

(52) Hervás, C.; Pérez-Sen, R.P. and Miras-Portugal, M.T. (2005) Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochem. Pharmacol*. 70: 770-785.

(53) Sánchez-Nogueiro, J.; Marín-García, P. and Miras-Portugal, M.T. (2005) Characterization of a functional $P2X_7$-like receptor in cerebellar granule neurons from $P2X_7$ knockout mice. *FEBS Lett*. 579: 3783-3788.

(54) Marín-García, P.; Sánchez-Nogueiro, J.; Gómez-Villafuertes, R.; León, D. and Miras-Portugal, M.T. (2008) Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional $P2X_7$ receptor. *Neuroscience*. 1551: 361-373.

(55) GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; GUALIX, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2001) Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion. *J. Neurochem*. 77: 84-93.

(56) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J.; CASTRO, E. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2002) Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*. 42: 20-33.

(57) GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; PINTOR, J.; GUALIX, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2003) $GABA_B$ receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes. *Neuropharmacology*. 44: 311-323.

(58) GUALIX, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2003) Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain. *J. Neurochem*. 87: 160-171.

(59) GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; PINTOR, J.; GUALIX, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2004) GABA modulates presynaptic signaling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308: 1148-1157.

(60) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; PINTRO, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2004) Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 954-967.

(61) LEÓN, D.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; MARÍN-GARCÍA, P. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2008) Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by $P2X_7$ receptors activation in cerebellar granule neurons. *Neurochem. Int*. In press.

(62) MACDERMOT, A.M.; ROLE, L.W. AND SIEGELBAUM, S.A. (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu. Rev. Neurosci.* 22: 443-85.

(63) WONNACOTT, S. (1997) Presynaptic nicotinic Ach receptors. *TINS*. 20: 92-98.

(64) BOEHM, S. (1999) ATP stimulates sympathetic transmitter release via presynaptic P2X purinoceptors. *J. Neurosci.* 19: 737-746.

(65) JO, Y.H. AND SCHLICHTER, R. (1999) Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nature Neuroscience.* 2: 241-245.

(66) HUGEL, S. AND SCHLICHTER, R. (2000) Presynaptic P2X receptors facilitate inhibitory GABAergic transmission between cultured rat spinal cord dorsal horn neurons. *J. Neurosci*. 20: 2121-2130.

(67) KHAKH, B.S.; ZHOU, X.P.; SYDES, J.; GALLIGAN, J.J. AND LESTER, H.A. (2000) State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature.* 406: 405-410.

(68) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2006) Role of CaCMKII in the Cross Talk Between Ionotroipic Nucleotide and Nicotinic Receptors in Individual Cholinergic Terminals. *J. Mol. Neurosci*. 30: 177-180.

(69) PINTOR, J.; GUALIX, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (1997) Dinucleotide receptor modulation by protein kinases (protein kinases A and C) and protein phosphatases in rat brain synaptic terminals. *J. Neurochem*. 68: 2552-2557.

(70) DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; PINTOR, J. AND MIRAS-PORTUGAL, M.T. (2000) Modulation of the dinucleotide receptor present in rat midbrain synaptosomes by adenosine and ATP. *Br. J. Pharmacol*. 130: 434-440.

(71) Castro, E.; Tomé, A.R.; Miras-Portugal, M.T. and Rosário, L.M. (1994) Single-cell FURA-2 microfluorimetry reveals different purinoceptor subtypes coupled to Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in bovine adrenal chromaffin and endothelial cells. *Pflügers Archives*. 426: 524-533.

(72) Castro, E.; Mateo, J.; Tomé, A.R.; Barbosa, R.M.; Miras-Portugal, M.T. and Rosário, L.M. (1995) Cell-specific purinergic receptors coupled to Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release from internal stores in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem*. 270: 5098-5106.

(73) Mateo, J.; Martínez de Lecea, M.; Miras-Portugal, M.T. and Castro, E. (1998) Ca^{2+} signals mediated by P2X-type purinoceptors in cultured cerebelar Purkinje cells. *J. Neurosci*. 18: 1704-1712.

(74) García-Lecea, M.; Delicado, E.G.; Miras-Portugal, M.T. and Castro, E. (1999) $P2X_2$ characteristics of the ATP receptor coupled to Ca^{2+} increase in cultured Purkinje neurons from neonatal rat cerebellum. *Neuropharmacol.* 38: 699-706.

(75) Mateo, J.; Miras-Portugal, M.T. and Castro, E. (1996) Co-existence of P2Y- and PPADS-insensitive P2U-purinoceptors in endothelial cells from adrenal medulla. *Br. J. Pharmacol.* 119: 1223-1232.

(76) Marín-García, P. (2007) Receptores de nucleótidos P2X presentes en sistema nervioso central de ratón: caracterización y función. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

(77) León, D.; Hervás, C. and Miras-Portugal, M.T. (2006) Activation of P2Y1 and P2X7 induce CaMKII phosphorylation in cerebelar granule neurons. *Eur. J. Neurosci.* 23: 2999-3013.

(78) Ortega de la O, F.; Pérez-Sen, R. and Miras-Portugal, M.T. (2008) Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and b-catenin nuclear translocation in granule neurons. *J. Neurochem.* 104: 62-73.

(79) Jiménez, A.I.; Castro, E.; Delicado, E.G. and Miras-Portugal, M.T. (2002) Specific diadenosine pentaphosphate receptor coupled to extracellular regulated kinases in cerebellar astrocytes. *J. Neurochem*. 83: 299-308.

(80) Hollopeter, G.; Jantzen, H.M.; Vincent, D.; Li, G.; England, L.; Ramakrishnan, V.; Yang, R.B.; Nurden, P.; Nurden, A.; Julius, D. and Conley, P.B. (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 409: 145-147.

(81) Communi, D.; González, N.S.; Detheux, M.; Brézillon, S.; Lannoy, V.; Parmentier, M.; Boeynaems, J.M. (2001) Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J. Biol. Chem*. 276: 41479-41485.

(82) D´Ambrosi, N.; Iafrate, M.; Saba, E.; Rosa, P. and Volonté, C. (2007) Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 architecture in native and transfected neuronal systmes. *Biochim. Biophys Acta*. 1768: 1592-1599.

(83) Carrasquero, L.M.G.; Delicado, E.G.; Jiménez, A.I.; Pérez-Sen, R. and Miras-Portugal, M.T. (2005) Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional $P2Y_{13}$-like receptors. *Purinergic Sign*. 2: 1153-1159.

(84) Delicado, E.G.; Carrasquero, L.M.G.; Pérez-Sen, R. and Miras-Portugal, M.T. (2005) Identification of functional P2X7 receptors in rat cerebellar astro-

cytes. In *Proceeding of the VII European Meeting on Glial Cell Functions in Health and Disease*: 71-78.

(85) ISRAEL, M. AND LESBATS, B. (1981) Chemiluminescent determination of acetylcholine, and continuos detection of its release from Torpedo electric organ synapses and synaptosomes. *Neurochem. Int*. 3: 81-90.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1159-1174

Artículo original

Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta

Recibido el 20 de septiembre de 2007

ASTIASARÁN, ICÍAR* ; ANSORENA, DIANA; ECHARTE, MAIDER; CONCHILLO, ANA; MENÉNDEZ-CARREÑO, MARÍA
Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. Irunlarrea s.n., 31008 Pamplona

RESUMEN

Los productos de oxidación del colesterol (COPs) poseen demostrados efectos tóxicos y están implicados en el desarrollo de aterosclerosis. Pueden estar presentes en organismos animales y por ende, en alimentos de origen animal, siendo susceptibles de ser absorbidos a través de la dieta. Su formación en los alimentos se favorecería, al tratarse de un proceso de oxidación química, por la elevación de la temperatura y la presencia de oxígeno. En este trabajo se presenta una estimación de la presencia de COPs en diferentes tipos de alimentos cocinados mediante diferentes tecnologías culinarias y almacenados mediante distintas modalidades de conservación. El análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Tanto pescados (salmón y langostinos) como carnes (hamburguesas, pechugas de pollo, lomo y salchichas tipo frankfurt) mostraron valores bajos de COPs en crudo (0.003-0.552 mg/100 g alimento), incrementándose significativamente tras el cocinado (hasta 0.7 mg/100 g alimento). El cocinado con microondas supuso el mayor incremento de COPs en comparación con la fritura, plancha y asado. El almacenamiento a vacío disminuyó drásticamente la formación de COPs

* **Información de contacto:**
Dra. Icíar Astiasarán.
Departamento de Ciencias de la Alimentación, Fisiología y Toxicología. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. Irunlarrea s.n., 31008 Pamplona.
Tel: 948425600- Ext. 6405. Fax: 948425649
e-mail : iastiasa@unav.es

respecto al almacenamiento en aerobiosis. La congelación ralentizó más eficazmente la formación de COPs que la refrigeración.

Palabras clave: COPs, oxidación, aterosclerosis, tecnologías culinarias, microondas.

ABSTRACT

Cholesterol oxidation products in common cooked foods.

Cholesterol oxidation products (COPs) have shown different toxic effects and are involved in the development of atherosclerosis. These compounds can be found in animal organisms, and inconsequence in animal origin foods, and they are susceptible to be absorbed from the diet. Their formation in foods would be increased by high temperatures and the presence of oxygen, as it is a chemical oxidation process. In this paper, an estimation of the presence of COPs in different types of foods treated by different cooking technologies are shown. Also different storage conditions are studied. The analysis was carried out by gas chromatography-mass spectrometry. Both fish (salmon and shrimps) and meat (hamburgers, breast chicken, pork loin and frankfurters) showed low COPs values in raw products (0.003-0.552 mg/100 g food), increasing significantly after the application of cooking technologies (up to 0.7 mg/100 g food). Microwave treatment leaded to the highest increase of COPs in comparison to frying, grilling and roasting. Vacuum storage dramatically decreased COPs formation with regard to aerobic storage. Freezing minimized COPs formation more efficiently than refrigeration.

Key words: oxidation, atherosclerosis, cooking technologies, microwaves.

INTRODUCCIÓN

Las primeras citas acerca de la existencia de óxidos de colesterol, también denominados COPs (colesterol oxidation products) en productos animales data de 1940. En la década de los 80 gracias a los avances de la técnicas cromatográficas se comienza a cuantificar e identificar este tipo de compuestos en diversos alimentos. Fue Smith en 1981 (1) quien llegó a sugerir que los hidroperóxidos formados durante la oxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados podrían iniciar la oxidación del colesterol. En 1995, Paniagvait et al. (2) publicaron una revisión en la que se recogen todos los trabajos realizados hasta la fecha sobre presencia de óxidos de colesterol en diversos tipos de alimentos. Paralelamente fueron apareciendo evi-

dencias científicas que demuestran que los óxidos de colesterol constituyen un potencial riesgo para la salud, ya que la mayoría tienen efectos biológicos adversos. En 1999, Tai et al. (3) publicaron una nueva revisión sobre análisis, formación e inhibición de los productos de oxidación del colesterol en alimentos, en la que se afirma que estos productos están adquiriendo cada vez más relieve en relación con la seguridad del consumidor.

Desde entonces se han identificado más de 70 óxidos de colesterol pero son 8 a los que más atención se les ha prestado: 7α-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol 7-cetocolesterol, 20 y 25-hidroxicolesterol, 5, 6α-epoxicolesterol, 5, 6β-epoxicolesterol y colestanetriol ya que son los que más comúnmente se encuentran en los alimentos.

En los últimos 30 años a los COPs se les ha atribuido diversos efectos tóxicos. Se han establecido efectos citotóxicos en diversas líneas celulares: tejido muscular, fibroblastos y células endoteliales de vasos sanguíneos (4-7). Hay varias investigaciones que muestran la inducción de apoptosis celular por parte de estos compuestos (8). Se han comprobado efectos mutagénicos para varios de ellos (9, 10) y se han establecido correlaciones entre diversos óxidos de colesterol y cáncer de colon, mama y próstata (11-13). Asimismo, pueden interferir en la regulación del metabolismo de otros compuestos esteroideos y en concreto producen la inhibición de la actividad 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) que regula la síntesis de colesterol (14). Pero quizá, el efecto más conocido y por el que se les ha dado más importancia, es su implicación en los procesos de aterosclerosis (15-16).

Larsson et al. (8) en un estudio *in vitro* sobre el efecto de una mezcla de oxiesteroles (24-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol, 7β-hidroxicolesterol y 7-cetocolesterol) establecieron que los 4 COPs más abundantes en las lesiones de ateroma humano son proapoptóticos y podrían contribuir al desarrollo de la lesión aterosclerótica. En concreto, se podría pensar, según señala Lizard (17) en un reciente artículo sobre el interés clínico de los resultados obtenidos en dicho trabajo, que el riesgo de aterosclerosis depende probablemente de la relación entre los diferentes oxiesteroles, especialmente 7β-hidroxicolesterol/7-cetocolesterol/27-hidroxicolesterol/25-hidroxicolesterol lo que, según este investigador, conduce a la suposición de

que la simultánea identificación y cuantificación de estos compuestos puede contribuir a definir la relación entre los COPs y los acontecimientos que se producen durante el proceso de aterosclerosis, tales como la ausencia o presencia de marcadores fenotípicos de oxidación y de apoptosis en las lesiones ateroscleróticas.

La posibilidad de absorción a partir de la dieta se ha puesto en evidencia, aunque existe controversia acerca de los porcentajes de absorción para los diferentes compuestos (18, 19).

En este trabajo se trata de ofrecer una estimación, basada en los diversos trabajos de nuestro grupo de investigación, de la presencia de COPs en diferentes tipos de alimentos cocinados mediante diferentes tecnologías culinarias y modalidades de conservación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las distintas muestras objeto de estudio (pechugas de pollo, salmón (*Salmo salar*), hamburguesas de ternera, hamburguesas de pollo, salchichas y langostinos frescos y congelados (*Penaeus vannamei)*) fueron adquiridas en el mercado. Cada muestra se analizó por cuadruplicado en crudo y tras ser sometida a distintas tecnologías culinarias habituales para cada uno de los alimentos (20-30). La tecnología de fritura se aplicó con aceite de oliva (180ºC) en las muestras de salmón y hamburguesas, y con aceite de girasol (160-180ºC) en las muestras de lomo, alcanzando temperaturas en el interior del alimento del orden de 85-90ºC. El asado se aplicó en muestras de salmón y pechuga de pollo, alcanzando temperaturas entre 95-100ºC. El microondas se aplicó en salmón, hamburguesas, pechuga de pollo y salchichas, a una potencia de 650W, alcanzando temperaturas entre 82-88ºC en el interior de los alimentos. La plancha se utilizó en el caso de los langostinos y pechugas de pollo, a una temperatura de 180ºC, durante 1.5 min por cada lado, alcanzando temperaturas en el interior de los alimentos del orden de 85-90ºC. En todos los casos las temperaturas internas se midieron con un termómetro digital (51 J/K RS 614-299, Fluke, USA).

Para el estudio de las condiciones de almacenamiento de pechugas de pollo se introdujeron las muestras cocinadas en bolsas de

plástico de poliamida/polietileno 90 µm (Corsan, Pamplona, España) y se cerraron en condiciones de aerobiosis o a vacío (selladora Modelo VP-1000, Ramon, Barcelona, España). Se mantuvieron durante 6 días en condiciones de refrigeración (4ºC) o durante 3 meses en congelación (–18ºC).

Tanto en las muestras crudas como cocinadas se analizaron los siguientes parámetros de composición general: grasa mediante la Norma internacional AOAC 960.39 (31), colesterol por el método descrito por Kovacs et al. (32). La extracción lipídica con cloroformo/metanol (2/1) se realizó mediante el método de Folch et al. (33).

Determinación de Óxidos de colesterol: la saponificación en frío, purificación en cartuchos de sílice y derivatización se llevaron a cabo según el método descrito por Guardiola et al. (34). La posterior separación, identificación y cuantificación de los trimetilsililéteres de los óxidos de colesterol se llevó a cabo según el protocolo descrito en Echarte et al. (20). Se empleó un Cromatógrafo de gases HP 6890 GC System (Hewlett-Packard) acoplado a un detector de masas 5973 Mass Selective Detector (Hewlett-Packard). Las condiciones cromatográficas fueron: Columna: HP-5MS (30m 250 µm diámetro interno × 0.25 µm espesor fase); Gas portador: Helio (1 ml/min); Temperatura del inyector: 250ºC; Temperatura del horno: 80ºC, mantenida durante 1 min y rampa hasta 250ºC ascendiendo a 10ºC/min, seguida de una segunda rampa hasta 280ºC a 4ºC/min manteniéndose esa temperatura durante 20 min. En la Figura 1 se muestra un cromatograma que muestra el orden de elución y los tiempos de retención de los ocho compuestos analizados.

Para la estimación de la ingesta de óxidos de colesterol de distintos alimentos cocinados se estableció la ración de carnes en 125 g y la de pescados y mariscos en 150 g, de acuerdo con los criterios expuestos en Muñoz et al. (35).

Tratamiento estadístico: Las tablas y gráficos muestran los valores medios obtenidos para cada uno de los parámetros en estudio. Se determinó la t de Student para establecer diferencias significativas entre las muestras crudas y cocinadas. Se consideraron diferencias significativas con un valor de $p \geq 0.05$. El programa estadístico aplicado fue SPSS (SPSS 9.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, Ill.)

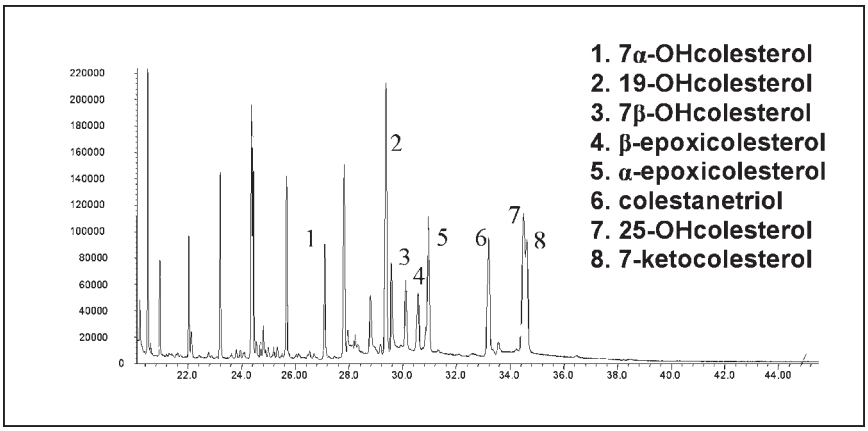


FIGURA 1. ***Cromatograma correspondiente al análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de una mezcla de patrones de óxidos de colesterol.***

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede afirmar que son 3 los factores que influyen en la formación de óxidos de colesterol en los alimentos: la naturaleza del producto alimenticio, el tipo de procesado industrial o culinario aplicado y las condiciones de almacenamiento. Los óxidos de colesterol se forman en la mayoría de los productos procesados que contienen colesterol, siendo difícil prevenir su formación (36).

Los resultados de los trabajos realizados por nuestro grupo pusieron de manifiesto que todos los alimentos analizados, tanto pescados (salmón, langostinos) como carnes (hamburguesas, pechugas de pollo, lomo y salchichas tipo frankfurt) presentaron bajos valores de óxidos de colesterol en crudo (Figuras 2-5). En el caso de los pescados el contenido total de COPs fue inferior a 0.01 mg/100 g alimento, para salmón y langostinos congelados, no así en los langostinos refrigerados en los que se elevó a 0.03 mg/100 g. En este caso existe una clara influencia del método de conservación aplicado, tal y como se comentará posteriormente.

En las muestras de carnes los resultados fueron más variables, así las hamburguesas mostraron valores de 0.02 a 0.04 mg/100 g. La diferente especie, ternera y pollo, de las hamburguesas podría expli-

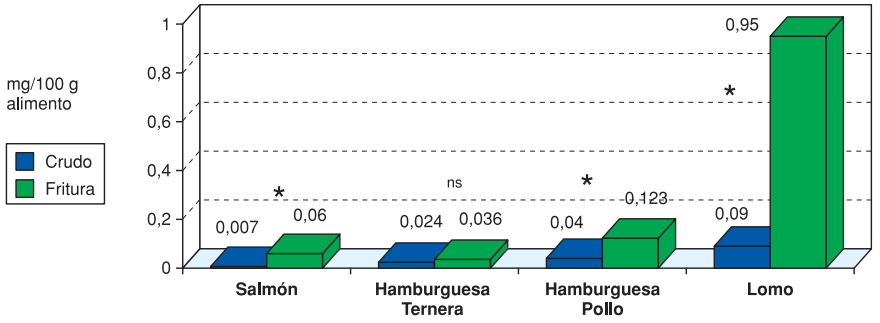


FIGURA 2. ***Resultados del total de COPs en los diversos alimentos en crudo y tras su cocinado mediante fritura.*** ** p < 0.05; ns p > 0.05.*

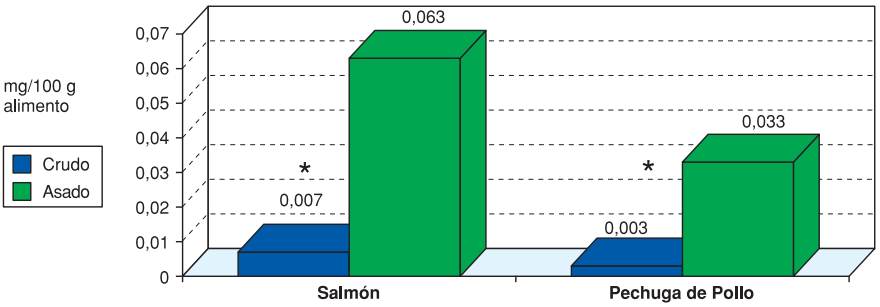


FIGURA 3. ***Resultados del total de COPs en los diversos alimentos en crudo y tras su cocinado mediante asado.*** ** p < 0.05.*

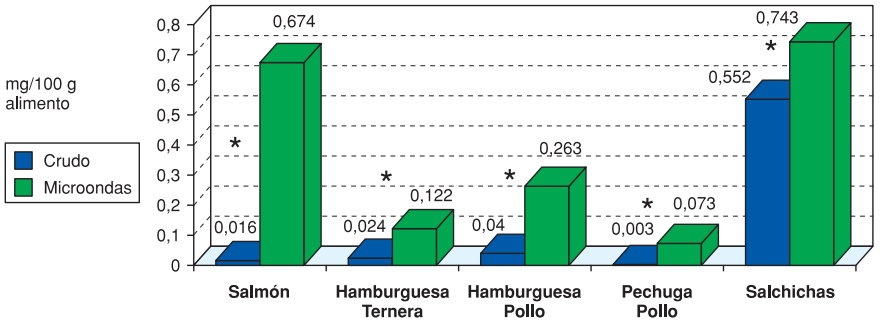


FIGURA 4. ***Resultados del total de COPs en los diversos alimentos en crudo y tras su cocinado mediante microondas.*** ** p < 0.05.*

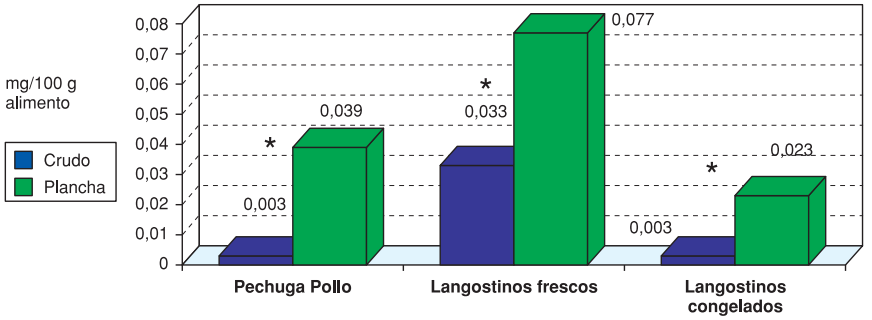


FIGURA 5. ***Resultados del total de COPs en los diversos alimentos en crudo y tras su cocinado mediante fritura.*** ** p < 0.05.*

car la diferencia encontrada entre ambas muestras. Parece demostrado que la mayor presencia de insaturaciones, es decir, alimentos ricos en ácidos grasos insaturados, especialmente poliinsaturados, favorece la formación de óxidos a partir del colesterol presente. Las pechugas de pollo mostraron valores muy bajos (0.003 mg/100 g) que estarían acordes con los bajos porcentajes de grasa de estas muestras. Por el contrario, el lomo y las salchichas mostraron los valores mas altos (0.09 y 0.552 mg/100 g alimento, respectivamente).

Hay que tener en cuenta que productos como hamburguesas y especialmente las salchichas están condicionados no sólo por la naturaleza de la especie animal utilizada como ingrediente, sino también por las operaciones de procesado utilizadas en su elaboración. Ambos alimentos han sufrido una operación de picado que favorece los procesos oxidativos. Además, en el caso de las salchichas se ha producido también un calentamiento por el tratamiento de pasterización, lo que explicaría el máximo valor obtenido en estos alimentos en crudo.

El tratamiento culinario supuso un incremento en el contenido de COPs de todos los alimentos analizados. Las figuras muestran que, efectivamente, salvo en el caso de las hamburguesas de ternera cocinadas mediante la aplicación de fritura, se produjo un incremento significativo del total de COPs en el producto cocinado frente al alimento crudo. Diversos trabajos en la bibliografía muestran incrementos en la concentración de óxidos en alimentos cocinados a temperaturas de 85ºC (37-40). Sarantinos et al. (41) señalaron que tiempos prolongados de cocinado incrementaban el contenido de

COPs en huevos fritos y cocidos. Estos mismos autores mostraron que mientras que en huevos o leche calentados menos del 5% del colesterol se transformaba en COPs, en productos elaborados con huevos y/o leche el porcentaje de transformación era del 20-45.7% en galletas, 16-29% en pasteles y 37.2% en mayonesa.

La Figura 6 representa el incremento en COPs de las muestras que fueron sometidas a diferentes tecnologías culinarias. En todos los trabajos realizados se pudo observar que la aplicación del cocinado con microondas supuso el mayor incremento de COPs, frente al resto de tecnologías aplicadas (fritura, asado y plancha). Aunque no se ahondó en estos resultados, probablemente los diferentes mecanismos de transmisión de calor tengan una influencia determinante en los procesos de oxidación del calor, independientemente de la temperatura aplicada. Tal y como se recoge en el apartado de material y métodos, la temperatura interna alcanzada en el calentamiento por microondas fue del mismo orden que las alcanzadas con el resto de tecnologías. El salmón cocinado con microondas presentó el mayor incremento respecto al alimento en crudo (un contenido en COPs 42 veces superior al contenido en crudo). Le siguió la pechuga de pollo cocinada también con microondas (24 veces superior a la pechuga cruda).

También fue objeto de uno de nuestros trabajos el observar la influencia de las diferentes condiciones de almacenamiento de alimentos ya cocinados en el contenido en COPs de los mismos. La Figura 7 muestra los resultados obtenidos para pechugas de pollo cocinadas con diferentes tecnologías y conservadas en condiciones de refrigeración y congelación tanto en condiciones de aerobiosis como a vacío (29).

Puesto que la formación de óxidos de colesterol en los alimentos se produce fundamentalmente vía formación de radicales libres a través de mecanismos de oxidación, cabría esperar que la ausencia de oxígeno pueda reducir su formación durante el almacenamiento. Finocchiaro et al. (37) observaron que la mantequilla envasada en atmósfera de aire presentaba un contenido de 7α y 7β-hidroxicolesterol entre 1.5 y 3 veces mayor que cuando se almacenaba en atmósfera de nitrógeno. Además, almacenando dichas muestras a –20ºC durante un año se encontraron con cantidades significativas de epoxicolesterol y colestanetriol. Monahan et al. (42) demostraron que la velocidad de

oxidación del colesterol en carne de cerdo se aceleró durante el almacenamiento en refrigeración posterior al cocinado, especialmente durante las primeras 48 horas, siguiendo la misma tendencia que la oxidación lipídica general. Zanardi et al. (43) estudiando la eficacia de diversas condiciones de envasado sobre la formación de óxidos de colesterol en embutidos tipo Milano concluyeron que las atmósferas modificadas (100% N_2) parecían ser más eficaces que el vacío en la protección de la oxidación del colesterol.

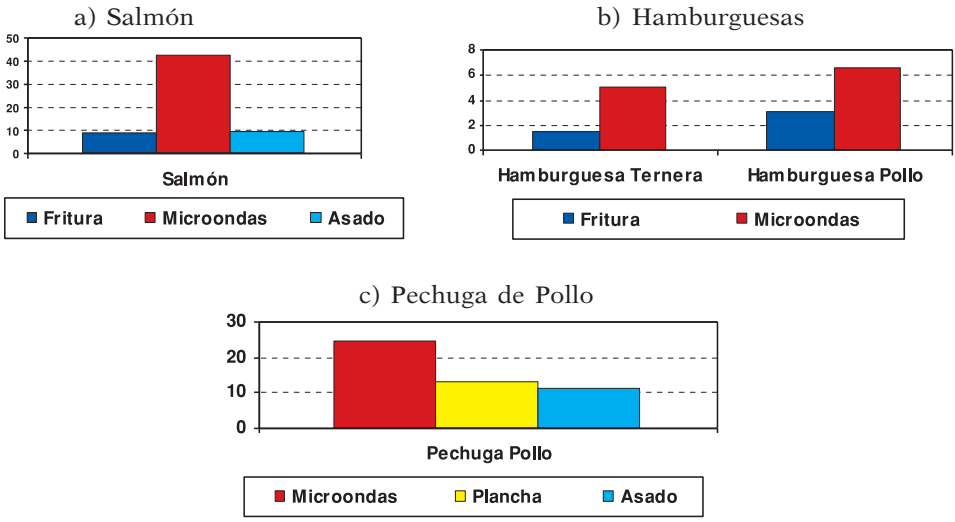


FIGURA 6. ***Incremento (n veces) en el contenido en COPs para cada tipo de alimento con diferentes tecnologías culinarias.***

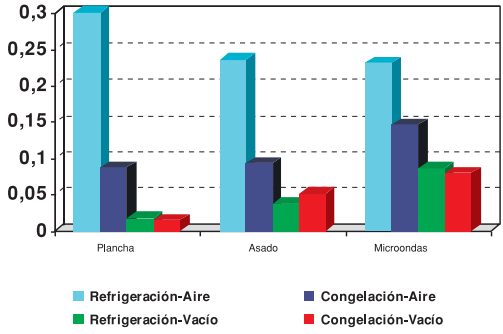


FIGURA 7. ***Efecto del almacenamiento en distintas condiciones sobre la formación de óxidos de colesterol en pechugas de pollo (mg/100 g alimento).***

En nuestros trabajos se observó que el almacenamiento en condiciones de vacío de alimentos cocinados disminuye de forma drástica la formación de óxidos de colesterol. Asimismo, se ha podido observar que en condiciones normales de presencia de oxígeno la congelación resulta más eficaz que la refrigeración para inhibir la oxidación del colesterol. Efectivamente en la Figura 7 se puede observar que tanto en condiciones de aerobiosis como en condiciones de vacío el contenido de COPs es mayor en los alimentos mantenidos en refrigeración (4ºC durante 4 días) que en los alimentos mantenidos en congelación (–18ºC durante 3 meses). Estos resultados avalan la idoneidad de la congelación como método de conservación de alimentos cocinados, añadiendo a su estabilidad microbiológica una mayor seguridad por la ralentización de los procesos oxidativos que afectan al colesterol.

Estos resultados del almacenamiento se confirman con los encontrados cuando se analizaron langostinos refrigerados frente a langostinos congelados a nivel comercial. La congelación de estos últimos suele realizarse de forma inmediata a su captura por lo que se produce una eficaz inhibición de los procesos de deterioro microbiológico y químico-enzimático. De ahí que resulta razonable que los langostinos congelados presentasen menores concentraciones de óxidos de colesterol que los refrigerados, esos últimos comercializados como «frescos».

Diversos autores apuntan la necesidad de estimar las ingestas diarias de COPs, para lo que conviene tener en cuenta que los COPs no se ingieren independientemente a otros compuestos de oxidación lipídica que también se han relacionado con el desarrollo de aterosclerosis, y que hace falta disponer de la metodología apropiada para ello.

En la Tabla 1 se presentan las estimaciones de ingesta de óxidos de colesterol procedentes de raciones habituales aplicadas a los diferentes alimentos objeto de nuestros estudios. Obviamente no se han tenido en cuenta los alimentos en crudo ya que el consumo de todos ellos se realiza una vez cocinados.

TABLA 1. ***Estimación de la ingesta de óxidos de colesterol por ración (mg COPs/ración).***

		mg COP/ración
Fritura	Salmón	0.090
	Hamburguesa Ternera	0.045
	Hamburguesa Pollo	0.154
	Lomo de cerdo	1.187
Asado	Salmón	0.094
	Pechuga Pollo	0.041
Microondas	Salmón	1.011
	Hamburguesa Ternera	0.152
	Hamburguesa Pollo	0.328
	Pechuga Pollo	0.091
	Salchichas	0.743
Plancha	Pechuga Pollo	0.049
	Langostinos frescos	0.115
	Langostinos congelados	0.034

Ración de carnes: 125 g; Ración de pescados: 150 g. (Muñoz et al., 2004).

Los alimentos que aportan mayores cantidades de COPs son el salmón cocinado a microondas (>1 mg/ración), seguido de las hamburguesas de pollo cocinadas al microondas (0.33 mg/ración), el salmón asado almacenado en condiciones de congelación (0.27 mg/ración), las hamburguesas de pollo cocinadas por fritura y las de ternera al microondas (0.15 mg/ración). La interpretación de estos resultados resulta difícil al no existir estudios que indiquen cuales pueden ser las cantidades de COPs ingeridas que puedan suponer un riesgo para la salud. Hay algún trabajo que señala como límite seguro < 0.1 mg/día, aunque esta referencia no está avalada por evidencias científicas. Otros autores señalan como peligrosos porcentajes de oxidación referidos al colesterol superiores al 0.5% (44). Esta cifra es solo superada por el salmón cocinado al microondas, con un valor de 0.80%.

CONCLUSIÓN

En general, se puede considerar que los contenidos de COPs en los alimentos objeto de este trabajo se encuentran en valores que no suponen riesgo para la salud. Sin embargo, los demostrados efectos negativos de los óxidos de colesterol, junto con la evidencia científica de su formación en los alimentos y de su absorción a partir de los mismos, hace que sea necesario conocer y controlar la ingesta de este tipo de compuestos en la dieta habitual.

REFERENCIAS

(1) SMITH, L.L. (1981). Cholesterol autoxidation. Plenum Press, New York.
(2) PANIANGVAIT, P.; KING, A.J.; JONES, A.D. Y GERMAN, B.G. (1995) Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* 60(6): 1159-1174.
(3) TAI, C.Y.; CHEN Y.C. Y CHEN B.H. (1999) Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (part I). *J. Food Drug Analys,* 7(4): 243-257.
(4) ZHOU, Q.; WASOWICZ, E.; HANDLER, B.; FLEISHER, L. Y KUMMEROV, F.A. (2000) An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 149: 191-197.
(5) SCHROEPFER, G.J., JR. (2000) Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and others processes. *Physiol. Rev*. 80: 361-554.
(6) GARCÍA-CRUSET, S.; CARPENTER, K.L.; GUARDIOLA, F.; STEIN, B.K. Y MITCHINSON, M.J. (2001) Oxysterols profiles of normal human arteries, fatty streaks and advanced lessions. *Free Radical Res*. 53(1): 31-41.
(7) MEYNIER, A.; ANDRE, A.; LHERMINIER, J.; GRANDGIRARD, A. Y DEMAISON L. (2005) Dietary oxysterols induce in vivo toxicity of coronary endothelial and smooth muscle cells. *Eur. J. Nutr.* 44: 393-405.
(8) LARSSON, D.A.; BAIRD, S.; DIINGA INHALAM, J.; YUAN, X.M. Y LI, W. (2006) Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Rad. Biol. Med*. 41(6): 902-910.
(9) ANSARI, G.A.S.; WALKER, R.D.; SMART, V.B. Y SMITH, L.L. (1982) Further investigations of mutagenic cholesterol preparations. *Food Chem. Toxicol.* 20: 35-41.
(10) SMITH, L.L.; SMART, V.B. Y MADE-GOWDA, N.M. (1986) Mutagenic sterol hydroperoxides. *Mutat. Res.* 161: 39-48.
(11) LEONARDUZZI, G.; SEVANIAN, A. Y POLI, G. (2001) Cholesterol oxidation products and fibrogenesis. *Biofactors* 15: 117-119.
(12) LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Y MILLER, A.B. (2002) Plasma 7β-hydroxycholesterol as a possible predictor of lung cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11: 1630-1637.

(13) Sevanian, A. y Peterson, A.R. (2002) The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem. Toxicol*. 24(10-11): 1103-1110.
(14) Guardiola, F.; Codony, R.; Addis, P. B.; Rafecas, M. y Boatella, J. (1996) Biological effects of oxysterols: Current status. *Food Chem. Toxicol.* 34(2): 193-211.
(15) Brown, A.J. y Jessup, W. (1999) Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 142(1): 1-28.
(16) Diczfalusy, U. (2004) Analysis of cholesterol oxidation products in biological samples. *J. AOAC Int*. 87: 467-473.
(17) Lizard, G. (2006) Oxysterols mixtures, a promising approach to investigate the biological effects of oxysterols: a commentary on «Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects.» *Free Rad. Biol. Med*. 41: 872-873.
(18) Osada, K.; Sasaki, E. y Sugano, M. (1994) Limphatic absorption of oxidized cholesterol in rats. *Lipids*. 29: 555-559.
(19) Staprans, I.; Pan, X.M.; Rapp, J.H.; Grunfeld, C. y Feingold, K.R. (2000) Oxidized cholesterol in the diet accelerates the development of atherosclerosis in LDL receptor and apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio*l. 20: 708-714.
(20) Echarte, M.; Ansorena, D. y Astiasaran, I. (2001a) Fatty acid modifications and cholesterol oxidation in pork loin during frying at different temperatures. *J. Food Prot*. 64(7): 1062-1066.
(21) Echarte, M.; Zulet, M. y Astiasarán, I. (2001b) Oxidation process affecting fatty acids and cholesterol in fried and roasted salmon. *J. Agric. Food. Chem.* 49(11): 5662-5667.
(22) Echarte, M.; Conchillo, A.; Ansorena, D. y Astiasarán, I. (2003a) Cholesterol oxidation products in fresh and frozen shrimps, raw and grilled. En: IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición. Puerto de la Cruz, Tenerife (Spain).
(23) Echarte, M.; Ansorena, D. y Astiasaran, I. (2003b) Consequences of microwave heating and frying on the lipid fraction of chicken and beef patties. *J. Agric. Food Chem*. 51(20): 5941-5945.
(24) Conchillo, A.; Ansorena, D. y Astiasaran, I. (2003) The combined effect of cooking (grilling and roasting) and chilling storage (with and without air) on the lipid and cholesterol oxidation in chicken breast. *J. Food Prot.* 66(5): 840-846.
(25) Conchillo, A.; Ansorena, D. y Astiasaran, I. (2005a) Intensity of lipid oxidation and COP formation during frozen storage of raw and cooked chicken. *J. Sci. Food Agric*. 85(1): 141-146.
(26) Conchillo, A.; Ansorena, D. y Astiasaran, I. (2005b) Use of microwave in chicken breast and application of different storage conditions: consequences on oxidation. *Eur. Food Res. Technol.* 221(5): 592-596.
(27) Conchillo, A.; Hostalier, N.; Ansorena, D. y Astiasarán, I. (2002) Formación de óxidos de colesterol en pechugas de pollo durante el almacenamiento en refrigeración con o sin vacío. En: V Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Madrid (Spain).

(28) CONCHILLO, A.; ANSORENA, D. Y ASTIASARÁN, I. (2003) Efecto del envasado en atmósferas modificadas sobre la formación de óxidos de colesterol en pechugas de pollo asadas almacenadas en refrigeración y congelación. En: I Congreso Internacional de Ciencia, Tecnología y Seguridad Alimentaria. Pamplona (Spain).

(29) ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D., ZULET, M.A.; ECHARTE, M. Y CONCHILLO, A. (2006) Óxidos de colesterol en alimentos cocinados y conservados en diferentes condiciones. En: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Huelva (Spain).

(30) ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D.; RUIZ, N.; MENÉNDEZ, M. Y VALENCIA, I. (2006) Formación de óxidos de colesterol en salchichas cocinadas a microondas. En: CIBSA. Sevilla (Spain).

(31) Fat (crude) or ether extract in meat. 960.39. AOAC. (2002b). En: Official methods of analysis (17th ed.). Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemists.

(32) KOVACS, M.I.P.; ANDERSON, W.E. Y ACKMAN, R.G. (1979) A simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food products. *J. Food Sci.* 44: 1299-1301, 1305.

(33) FOLCH, J.; LEES, M. Y STANLEY, G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.

(34) GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P.B.; RAFECAS, M. Y BOATELLA, J. (1995) Comparison of three methods for the determination of oxysterols in spray-dried egg. *J. Chromatogr. A.* 705: 289-304.

(35) MUÑOZ, M.; ARANCETA, J. Y GARCÍA-JALÓN I. (2004) Peso por unidad y raciones habituales de algunos alimentos. En: Nutrición Aplicada y Dietoterapia. Ed. Eunsa, 2ª Ed., Pamplona (Spain).

(36) TAI, C.Y.; CHEN Y.C. Y CHEN B.H. (2000) Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (part II). *J. Food Drug Analys.* 8(1): 1-15.

(37) FINOCCHIARO, E.T.; LEE, K. Y RICHARDSON, T. (1984) Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butter oil. *JAOCS* 61: 877-883.

(38) HUBBARD, R.; ONO, Y. Y SÁNCHEZ, A. (1989) Atherogenic effect of oxidized products of cholesterol. *Prog. Food Nutr. Sci.* 13: 17-44.

(39) KUMAR, N. Y SINGHAL, O.P. (1991) Cholesterol oxides and atherosclerosis. *J. Sci. Food Agric.* 55: 497-510.

(40) MORGAN, J.N. Y ARMSTRONG, D.J. (1992) Quantification of cholesterol oxidation products in egg yolk powder spray- dried with direct heating. *J. Food Sci.* 57: 43-45, 107.

(41) SARANTINOS, J.; O´DEA, K. Y SINDAIR, A.J. (1993). Cholesterol oxides in Australian foods: Identification and quantification. *Food Australia,* 45: 485-490.

(42) MONAHAN, F.J.; BUCKLEY, D.J.; MORRISSEY, P.A.; LYNCH, P.B. Y GRAY, J.I. (1992) Influence of dietary fat and α-tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. *Meat Sci* 31: 229-241.

(43) Zanardi, E.; Dorigoni, V.; Badiani, A. y Chizzolini, R. (2002) Lipid and colour stability of Milano-type sausages:effect of packing conditions. *Meat Sci.* 61: 7-14.
(44) Lercker, G. y Rodriguez-Estrada, M. T. (2000) Cholesterol Oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in Different Food Products. *J. Food Comp. Anal.* 13(4): 625-631.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1175-1197

Artículo original

La terapéutica farmacológica en España y Europa durante la Edad Moderna

Recibido el 18 de septiembre de 2007

JAVIER PUERTO*
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

RESUMEN

El proyecto de investigación hace referencia a los medicamentos relacionados con el escolasticismo galenista y con la influencia astrológica, alquímica y mágica, parte fundamental del paradigma científico de la Edad Moderna.

A través de los fármacos, se estudian los avances científicos, el pensamiento no sólo científico, las ideas sanitarias y los anhelos de la época referentes a la salud.

Se acabará redactando un repertorio de la relación entre plantas y la astrología, un lapidario, un bestiario; los medicamentos contra la peste; la sífilis y las perspectivas de los nuevos medicamentos americanos, el mesmerismo y la homeopatía.

Palabras clave: Historia, medicamentos, siglos XV-XVIII.

ABSTRACT

The pharmacological therapy in Spain and Europe during the Modern Age

The investigation project makes reference to the medicines related with the galenic-scholastic style and with the astrological, alchemical and magical influence, it leaves fundamental of the scientific paradigm of the Modern Age.

* Javier Puerto
Catedrático de Farmacia y Tecnología Farmacéutica (Historia de la Farmacia).
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
e- mail: jpuerto@farm.ucm.es

Through the medicines we study scientific advances, the thought not only scientific, the sanitary ideas and the yearnings of the time referents to the health

At the end we will edit a repertoire of the relationship between plants and the astrology; also a lapidary, a bestiarium (repertoire of animals); the medications against the pest; the syphilis and the perspectives of the American new medicines, the mesmerism and the homeopathy.

Key words: History, medicines, XV-XVIII centuries.

INTRODUCCIÓN

Cuando se tiene el honor de participar en la celebración de los setenta y cinco años de los *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, no basta —a mi parecer— con cumplir el encargo de exponer el trabajo de investigación en el cual anda uno inmerso. Se ha de intentar explicar el principal entramado de investigaciones personales, desarrolladas a lo largo de los años, con las cuales mantiene íntimas conexiones; no como si se tratara de la exposición de méritos de una prueba académica, sino para demostrar la relevancia del compromiso contraído y el agradecimiento a la institución que lo realiza, encarnada en su Presidenta, la Excelentísima Señora Doña María Teresa Miras Portugal, y en su Académico Secretario, el Excelentísimo Señor Don Antonio Doadrio.

La Farmacia es una profesión con una vertiente sanitario-asistencial, otra económico-social y una tercera científico-tecnológica. Lo particular de la misma se centra en la atención a los seres vivos, fundamentalmente humanos y animales, para preservar o restaurar su salud, a través de la especialización en la preparación, conservación, distribución y dispensación de medicamentos.

Para efectuar esas misiones el farmacéutico tiene, desde sus inicios profesionales diferenciados, una fuerte formación científica y tecnológica; a partir de su entrada en la universidad, también humanística.

Como es lógico, inicié mi actividad investigadora desde esas premisas conceptuales, muy similares a las cultivadas por los diversos catedráticos que, desde 1915, ejercen su magisterio en la Universidad Complutense de Madrid y de la mayoría de las escasas cátedras que hacen lo propio en el resto del mundo.

Con una nueva metodología, propia de la Historia Social, profundicé en una de las vertientes tradicionales de la Historia de la Farmacia: la manera de agruparse los profesionales entre sí y de relacionarse con la sociedad.

Lo hice en la amable y protectora compañía de mi maestro, Guillermo Foch Jou, y con un cierto éxito, pues el concepto «modelo de administración farmacéutica», creado para emular a las estructuras de Fernand Braudel (1902-1985), ha tenido amplio seguimiento en la literatura, especializada o no (esta línea de investigación puede concretarse en las tres publicaciones más originales (1-3)).

Desde la institucionalización de la Historia de la Farmacia en la cátedra de Madrid se ha buscado el análisis de la relación profesional con la Historia de la Medicina y de la Ciencia (4 y 5). Mi segunda línea de investigación fue por ese camino y cristalizó en una buena cantidad de trabajos y libros (6 y 7).

En un camino intermedio entre ambas líneas, efectué un estudio sobre los aspectos sanitarios, nutricionales y medio ambientales en que se desarrolló la vida de Felipe II (1527-1598) (8). Allí empecé a investigar la terapéutica farmacológica de la Edad Moderna, ámbito de investigación en el cual me encuentro en la actualidad.

LA TERAPÉUTICA FARMACOLÓGICA EN LA EDAD MODERNA

Como es lógico, la Historia de la Farmacia más tradicional se ha ocupado mucho de los medicamentos. Pese a ello, o los ha estudiado desde el punto de vista de la evolución en su preparación, o los ha tratado como antigüedades curiosas, o se ha presupuesto un proceso creciente e imparable de evolución en la racionalidad de su uso a partir de la figura de Galeno (ca.130-200), el creador de la terapéutica científico-racional.

Se ha dado demasiada importancia a tres de sus aforismos sobre los cuales descansa el inicio de la racionalidad sanitaria primero, y la formulación científica después, de nuestra actividad profesional. Son los siguientes: *los dioses nunca son causa de enfermedad*, que desliga el hecho de enfermar de premisas mítico-mágico-religiosas;

lo contrario cura a los contrarios y *lo similar cura a lo similar*, principios de la alopatía y la homeopatía; lo cual, unido a la hipótesis de la composición elemental de los fármacos y a la teoría de los grados, más tarde dotada incluso de un soporte matemático por Al Kindi (ca. 801-873), parecía proveer a la farmacia, desde el mismo momento de su nacimiento —en el Bagdag del siglo IX— de unas solidísimas raíces científicas.

Eso, que es una parte de la verdad, no es toda la verdad; de lo contrario no resultarían tan extraños a los propios principios expuestos la mayoría de los medicamentos empleados a lo largo de la Edad Moderna, que denomino mágicos.

LOS MEDICAMENTOS MÁGICOS

Hay una serie de remedios farmacológicos, desarrollados a lo largo de la Historia de la Humanidad, cuya esencia terapéutica y la explicación de su empleo, han de buscarse en el mundo de la magia, las ilusiones, los anhelos secretos o inconscientes, antes que en el de la racionalidad científica.

No tendrían importancia alguna, distinta de la anécdota, si su uso se hubiera circunscrito a una determinada época histórica. Lo curioso y sorprendente es que no ha sido así.

Medicamentos sumidos en coartadas mágicas, legendarias, supersticiosas, increíbles, folklóricas... se han utilizado a lo largo de los tiempos. En ocasiones con planteamientos aparentemente racionales y científicos.

En la actualidad también se usan, a partir de muy diferentes coartadas intelectuales.

En primer lugar estarían las inmersas en las oscuridades de la superstición, en los horrores de la explotación económica del dolor ajeno, o en la falta de asunción de los límites de lo racional: de la implacable caducidad de la condición humana.

Pueden producirse en todo tipo de civilizaciones. No depende directamente de su grado de bienestar material. En las opulentas conviven con sistemas de salud eficaces, de manera no siempre clan-

destina. En ocasiones, azuzadas por comerciantes poco escrupulosos o con pocas luces. Su uso no siempre está ligado a condiciones de pobreza o de imposibilidad de acceso a la educación.

En segundo lugar, en este mundo globalizado convivimos con algunas civilizaciones en donde se dan unas circunstancias económicas, sociales y culturales, muy parecidas a las que configuraron la terapéutica de lo que Laín (9) denominaba culturas arcaicas, dado el pequeño desarrollo de sus comunidades científicas y el nulo de sus sistemas asistenciales de salud.

El estudio de lo que, con criterio muy amplio, denomino medicamentos mágicos, nos puede poner en contacto con tradiciones curiosas, elementos del pensamiento anclados en los albores de los tiempos, creencias poéticas, aunque poco prácticas y, sobre todo, con el peso de la tradición humanística y literaria sobre la ciencia, en su más estrecha relación con los seres humanos.

CIENCIA Y LITERATURA

Siempre se atribuye una gran influencia a los conocimientos racionales y científicos sobre los humanísticos. A la ciencia se la tiene por algo estrechamente relacionado con la exactitud y la verdad, la visión objetiva de la naturaleza y su interpretación matemática: suele ser así, pero en sus orígenes todo, hasta el lenguaje, fue común y de muy complicado deslinde entre lo científico y lo humanístico; lo irracional o lo mágico (10, 11).

En su desarrollo histórico, las ciencias y las humanidades confluyen siempre en su destinatario: el ser humano y la comprensión, sentimental o racional, de cuanto le rodea.

En la actualidad se analiza la influencia de la literatura y de las fábulas, contemporáneas o preexistentes al descubrimiento, sobre los viajeros orientales o americanos (12). Lo mismo debería hacerse con respecto a las ciencias de la naturaleza y, desde luego, con las del hombre.

Existe un gran desfase histórico entre el conocimiento racional de lo que Hipócrates llamó la *Physis* universal o naturaleza y el de

las *Physis* particulares de cada individuo. Entre lo externo a los humanos y lo interno, no sólo fisiológico, también psicológico y sobre la interacción entre el plano somático, el psíquico y el social, sobre todo si se aborda desde un planteamiento evolutivo de la cultura.

Esa disparidad se hace presente en la obra del propio Galeno quien, pese a establecer las bases sobre las cuales pudo desarrollarse una farmacología científica, basó sus conocimientos terapéuticos en la *Materia medicinal* de Pedacio Dioscórides Anazarbeo (s. I) en donde se recoge, aunque depurada, la tradición creencial anterior a él y, por si fuera poco, escribió un tratado sobre la Triaca Magna, el alexifármaco con mayor prestigio a lo largo de la historia que permaneció vigente desde el s. II a.C. hasta 1950, tuvo un papel fundamental en la institucionalización del Real Colegio de Boticarios de Madrid, (Figura 1) a raíz de conseguir el privilegio de su preparación (1732). Su desaparición, muy probablemente, se debió a los acuerdos internacionales contra el empleo del opio y, sin embargo, pese a su longevidad, es el medicamento mágico por excelencia. Para explicar su actividad no importa el qué —su naturaleza dirían los griegos clásicos, su composición química diríamos ahora—, sino el cómo se fabrica: con exposición pública de los componentes, en ceremonias muy solemnes, verificadas por las autoridades civiles y eclesiásticas —durante el Renacimiento hicieron intervenir al mismísimo Papa de Roma—. Y con qué se fabrica: fundamentalmente plantas; consideradas alexifármacas las muy olorosas y a ser posible exóticas; minerales como la tierra sellada, (Figura 2 y 2 bis) en donde era fundamental el lugar en que se recogía la arcilla y el rito de ejecutar la recolección; carne de víbora (Figura 3) considerado un poco venenosa y adsorbente simpático-mágico de los venenos, más opio al que no se daba mucha importancia; vino, remedio más salutífero cuanto más exótico fuera —los italianos aconsejaban vino español; los españoles italiano— y miel, el más sorprendente de los medicamentos antiguos, pues hasta el siglo XVII no se consideraba un producto de las abejas, sino polvo de estrellas depositado en la Tierra por el rocío de la mañana y, por tanto, constituido por el quinto elemento, el éter que teóricamente las hacía incorruptibles (Figura 4).



FIGURA 1. ***La Triaca Magna del Colegio de Boticarios de Madrid*** *(s. XVIII-XIX). Museo de la Farmacia.*





FIGURA 2. ***Tierra sellada (M. F. H.).*** *Facultad de Farmacia de la UCM.*
FIGURA 2 BIS. ***Tierra sellada (M. F. H.).***



FIGURA 3. ***Víboras para preparar la Triaca Magna (M. F. H.).***



FIGURA 4. ***Gran orza procedente de un convento de franciscanos (s. XVIII) (M. F. H.).***

Con ser grande la importancia de las ideas hasta aquí enumeradas, lo decisivo en la vocación de uno hacia lo misterioso y lo fantástico, procede de la literatura; sin ese impulso nunca hubiese emprendido una singladura de tan errática arribada. No me interesan tanto las novelas y dramas del Siglo de Oro o del Barroco, en donde la mentalidad mágica forma parte del paisaje cotidiano, cuanto la literatura contemporánea, en la cual lo fantástico y lo real se aúnan en un todo indisoluble. Además de las novelas de Juan Rulfo o García Márquez, influyeron en mis inquietudes la poesía surrealista de André Bretón (13) o de Antonin Artaud (14) y los textos del gallego Alvaro Cunqueiro, de manera sustancial su *Tertulia de boticas prodigiosas*, dedicada a su señor padre,»*boticario en la antigua y episcopal ciudad de Mondoñedo*» (15) y las del catalán Juan Perucho (16), empeñado en confeccionar un bestiario, un herbario y un lapidario de plantas, animales y piedras fantásticas. Recientemente Ferrer Lerín ha abordado una aventura semejante desde los conocimientos filológicos (17).

Es sorprendente observar la seducción de lo mágico en alguno de los más instruidos escritores contemporáneos y lo es más aún, cuando se observa la concomitancia de sus fantasías con muchas fuentes clásicas de lo que, durante muchos siglos y desde luego durante la Edad Moderna, se consideró ciencia (Figura 5, 5 bis, 5 tris).



FIGURA 5. ***Bote de Farmacia (s. XVIII) con polvo de sangre de Dragón.***
FIGURA 5 BIS. ***Vaso brocal con sangre de Dragón****. Gomorresina del Draco, Dracoena draco, L.*
FIGURA 5 TRIS.- ***Carne de Momia (M. F. H.).***

CIENCIA Y SALUD

La falta de sintonía entre estos conceptos se hace evidente cuando se analiza la aplicación de los conocimientos científicos a la mejora de la salud humana.

Durante el Renacimiento comienza el despliegue de la Ciencia moderna. Nicolás Copérnico (1473-1543) establece el sistema heliocéntrico y en los albores del siguiente siglo su seguidor, Galileo Galilei (1564-1642), instaura el método científico junto con otros contemporáneos. La anatomía moderna la da a conocer Andrea Vesalio (1514-1564) y nuestro Miguel Servet (1511-1553) describe, en un libro de Teología, la circulación menor de la sangre; el conocimiento de la circulación mayor ha de esperar hasta el Barroco, cuando la expone William Harvey (1578-1657).

En la Ilustración, Carlos Linneo (1707-1778) establece la nomenclatura botánica moderna; Antoine Laurent Lavoisier (1743-1794) el paradigma químico, a partir del cual se desarrolla ese aspecto de la ciencia durante la contemporaneidad.

Sin embargo, pese al avance de la clínica médica, al torbellino de nuevas ideas en ese campo, a la asimilación de la ciencia por médicos como Hermann Boerhaave (1668-1783) o el mismo George Ernest Sthal (1660-1734), ha de esperarse hasta el siglo XIX para asistir a una auténtica revolución farmacológica. Será la obra de Robert Koch (1843-1910) y Louis Pasteur (1822-1895) en Microbiología, la que hará posible la detección de las enfermedades infecciosas. Con ello se podrá buscar una «bala mágica» —la magia de nuevo, empleada en un contesto muy diferente por Paul Ehrlich (1845-1915)— capaz de acabar con el parásito sin hacer daño, o limitando los problemas, en el cuerpo humano. Se tendrán elementos para desinfectar los lugares de microbios; se luchará contra los vectores de transmisión y se seguirá con la asepsia, impuesta por Joseph Lister (1827-1912), en las operaciones quirúrgicas. Claude Bernard (1813-1878) convertirá la antigua Materia Médica en auténtica Farmacología experimental, y una pléyade de farmacéuticos investigadores descubrirán los auténticos principios activos de las plantas, empleadas secularmente como fármacos: los alcaloides y los glucósidos (18-20).

Un proceso de cambio en el paradigma científico tan prolongado, no nos permite seguir, ahora con la idea de las revoluciones científicas, propugnada por Thomas S. Kuhn (21) (1922-1966) y sus seguidores, máxime cuando durante el Renacimiento se produjo un profundo meandro mediante la obra de Marsilio Ficino (1433-1499), que reverdecía un pensamiento simbólico-mágico intemporal, muy influyente en la terapéutica a través, entre otros, de Cornelio Agripa (1486-1535) y Paracelso (1493-1541).

Pese a los descubrimientos someramente enunciados, algunos de los medicamentos tradicionales, los llamados por mí mágicos en sentido amplio, seguirán en los libros oficiales de prescripción y dispensación, en los anaqueles de las boticas y a la cabecera de los enfermos; incluso aparecerán nuevos sistemas, como la homeopatía o el mesmerismo, más relacionados con los criterios simpático-mágicos propios de la ciencia antigua que con la moderna terapéutica.

Este panorama, someramente descrito, ofrece diversas sugerencias a la meditación: en primer lugar, las dificultades para investigar en el cuerpo humano. Tabúes de todo tipo lo han impedido a lo largo de los tiempos y lo siguen dificultando en la actualidad: sociales, legales religiosos, éticos…

La visión aristotélica de los humanos como monarcas absolutos de lo creado no se ha superado del todo, pese a la teoría darvinista o a la asunción de la necesidad de equilibrios en la diversidad biológica.

Las diferentes religiones lo contemplan, además, como portador de valores eternos y receptáculo de la divinidad y, por si fuera poco, algunos déspotas han efectuado auténticas barbaridades sobre grupos étnicos enteros y siguen intentándolo: no es rara, ni difícil de comprender, la reticencia de los vivientes a sentirse objeto del escudriñamiento de los científicos. No extrañan las trabas legales o bioéticas impuestas a la investigación: si en el más laico de los casos, el hombre es un lobo para el hombre, cualquier tipo de exigencia a la manipulación u observación de sus semejantes, por dura que parezca, resulta imprescindible a ojos de quienes somos posibles objetos de la misma; los antecedentes históricos, en éste ámbito, no dan demasiado margen al optimismo.

Para el científico puede que el ser humano sea sólo el elemento anónimo de una estadística. Para el sujeto de la misma, todo el universo se contempla por sus ojos. Para quienes tienen creencias religiosas, en ellos ven un pálido reflejo de la divinidad; para todos, los miedos ancestrales, los prejuicios sociales, los tabúes éticos o creenciales, los más oscuros atavismos, se despiertan ante la posibilidad de aplicar el método científico al estudio de los humanos.

Esa realidad, no suficientemente explicitada en el pensamiento occidental, contrasta con el mayoritario e irreprimible deseo de tener una vida plácida y, a ser posible, longeva. Medicamentos que adquirieron fama de panaceas universales en tiempos lejanísimos, casi prehistóricos, se han mantenido durante siglos, contra viento y marea, en el inconsciente individual y colectivo, contra cualquier experiencia objetiva y ante las más evidentes certezas. El deseo de supervivencia, consciente e inconsciente, de los seres humanos les ha permitido una vigencia muy superior a la que sugiere su eficacia. No sólo eso, en sus orígenes, muchos de estos remedios se enraízan en argumentos mitológicos y en fábulas relacionadas con su dificultad de obtenerlos a consecuencia de su exotismo. Más adelante es la sociedad, los poderosos o los estados, quienes implantan sus estampillas de prestigio sobre ellos, mediante ritos burocráticos de preparación y exigencias legales, con evidentes aristas económicas, pues muchos sirven para enriquecer a sanitarios, instituciones y estados y, de esta manera, resultan prácticamente inexpugnables ante el ataque de la racionalidad científica.

Al hilo del estudio de una serie de medicamentos, pueden observarse elementos constitutivos de los humanos relacionados con el mito, con la magia, con la superstición, con el inconsciente o con lo que Paracelso llamaba el *gemelo de sombras*, (22) no sólo personal, también colectivo, si aceptamos la existencia de un determinado imaginario común, transmitido de generación en generación.

LAS ETAPAS DE UNA INVESTIGACIÓN

¿Tiene la Astrología, la alquimia o la magia algo que ver con la terapéutica farmacológica de la Edad Moderna?

Leamos a uno de los nuestros más doctos boticarios, Fray Esteban Villa (ca. + 1660), regente de la botica del hospital burgalés de San Juan de Dios (23).

Dirá alguno que para toda esta filosofía, que el médico docto no ignora, y el boticario no ha menester para ejercer su farmacopea, que (como quiere cierto autor moderno de estos tiempos) no es Arte liberal, sino mecánica…

Pese a ello continúa:

No se pueden negar particulares influxos en los Astros, con que de la luz, y movimientos que tienen, influyen en los inferiores, y por consecuencia se deben observar sus influencias, como lo dirán los marineros, (…) y los médicos lo mal que hacen con las purgas dadas en su conjunción de Luna, en cuya compañía (dicen) no es benévolo Júpiter, y según Marsilio {Ficino} *en de Vita comparanda, que lo experimentó.*

Por tanto:

Así también se han de mirar a las influencias de los Signos y Planetas, pues con ellas ayudan, o desayudan, con tal, que aquí no haya recitación de palabras, y otros modos de superstición, que los magos suelen observar.

Para finalizar con evidente gracejo popular:

En grande laberinto nos habemos metido y en muchas dificultades al boticario, pues para ejercer su arte con más eminencia, queda empeñado a ser estrellero, y yo a decirle de que manera, sin entrar en lo profundo de la astrología.

A pesar de ser un proyecto, no me he podido resistir a demostrar lo aparentemente insólito, aunque no seguiré por ese camino.

He estudiado ya la influencia de la astrología en las diversas plantas, en la recolección y en la preparación de los fármacos, en las piedras preciosas agrupadas en un capítulo de lapidario, absolutamente poético antes que terapéutico, aunque con ese fin se emplease, y otro sobre los animales o bestiario. He estudiado, también y publicado (24) un estudio sobre los purgantes, junto a la sangría, la práctica terapéutica más empleada durante la Edad Moderna; las

dos estaban relacionadas con la Astrología y sólo debían practicarse en condiciones astrológicamente favorables. Los autores de Farmacia, además, cuando quieren explicar la acción de los purgantes las atribuyen a «causas ocultas», directamente relacionadas con su relación astral.

De la alquimia me he ocupado en diversos escritos a lo largo de mi vida académica (25) y la magia es necesario estudiarla desde la perspectiva de la terapéutica mágico religiosa cristianizada, heredera de la profetisa teutona Santa Hildegarga de Bingen (1098-1179), la ilusión y la realidad de la brujería, explicada por Andrés Laguna cuando habla del Solanum y del teórico vuelo de brujas (26), los libros del propio Fray Esteban, en donde se relacionan diversas plantas con santos y hechos histórico-religiosos y, entre otros asuntos, las prácticas de hechicería tan bien narradas en *La Celestina*, analizadas ya hace tiempo (27).

He debido estudiar, con cierto detenimiento, dos enfermedades: la peste negra y la sífilis; la primera por considerarse, durante toda la Edad Media y Moderna, como un castigo de Dios, causado por la mirada maligna de un planeta y contarse entre sus fármacos preventivos y curativos, con algunos de los más extraordinarios «fortificadores del corazón». El corazón se creía que no enfermaba, pero debía preservarse de los «venenos» inhalados por la mal aria o aire pestilente y putrefacto, que se consideraba causante de la peste. Ahí tenemos, desde la Triaca Magna, hasta las piedras preciosas, empleadas como amuletos o ingeridas en delicadas, peligrosas y carísimas confecciones minerales, hasta el resto de los alexifármacos empleados en las cortes reales y en el entorno de los poderosos: la piedra bezoar, (Figura 6) el unicornio —una creación medieval— (Figura 7, 7 bis ,7 tris y 7.4) la piedra del corazón de ciervo y tantos otros.

La sífilis por que al ser considerada enfermedad americana se indagó entre los productos importados de América —con un evidente criterio mágico— para tratar de curarla y se organizaron unas interesantísimas polémicas entre los «médicos de palo» partidarios del guayaco (Figura 8) y los iatroquímicos, seguidores de Paracelso, como luego se originarían en torno a la quina, en donde los intereses económicos, religiosos y políticos, por encima incluso de los científí-

ficos, se ponen de manifiesto. Es necesario para ver la relevancia de los medicamentos americanos y su posición, como fármacos exóticos y por tanto con un mágico halo de misterio, frente a los fármacos orientales, tan reputados en la farmacia europea mediante el monopolio económico del estado veneciano, al que el imperio español no logró hacer una buena competencia, como tampoco, más tarde, pudo hacerlo con el imperio inglés.

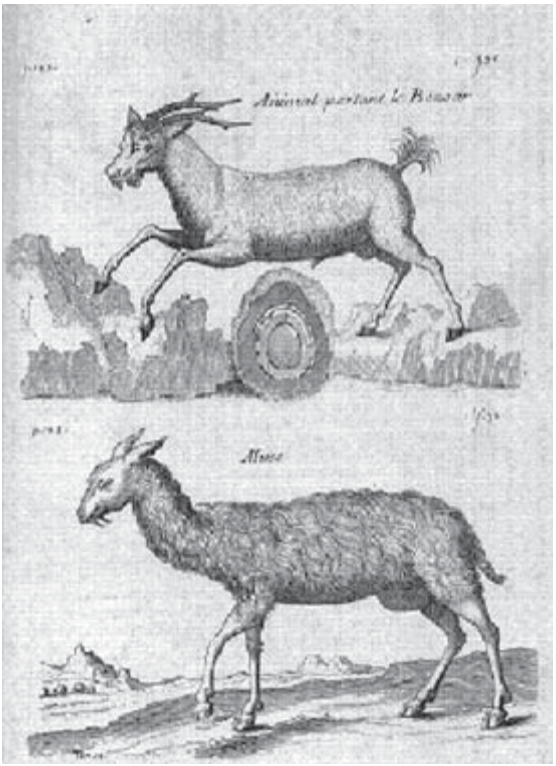


FIGURA 6. ***La piedra bezoar y los animales capaces de producirla****, según POMET, P. (1735) Historie Generale des Drogues simples et composees, Paris, Etienne Ganeau & Louis-Etienne Ganeau, Tomo II, pág. 105.*

Estudiaré también el mesmerismo. Aunque no es una práctica en donde se empleen fármacos, guarda relación con las propiedades de la piedra imán y por su popularidad en su momento y sus implicaciones actuales precisa atención, lo mismo que la homeopatía.



FIGURA 7. ***Caja de simples medicinales (s. XVIII),*** *M.F.H., con la ilustración de un unicornio.*

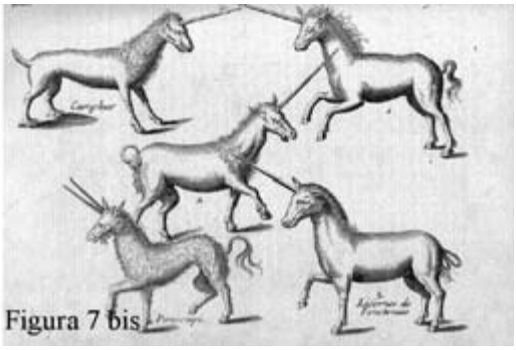


FIGURA 7 BIS. ***Figuras de unicornios,*** *según Pomet, P. (1735) Historie Generale des Drogues simples et composees, Paris, Etienne Ganeau & Louis-Etienne Ganeau, Tomo II, pág. 103.*

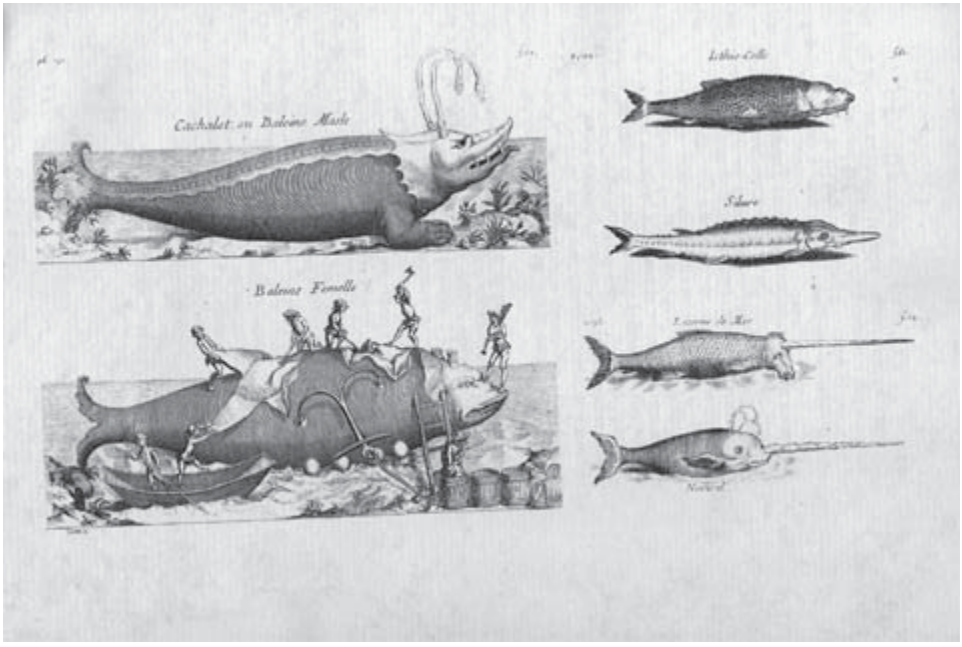


FIGURA 7 TRIS. ***Figura de Pomet, P., op., Tomo II, pág. 191*** *en donde se observa además de las tareas propias de la pesca del cachalote, el supuesto unicornio marino y debajo de él el narval, de donde se obtenía el cuerno de unicornio de las boticas.*



FIGURA 7.4. ***Defensa de narval.*** *M.F.H.*



FIGURA 8. ***Cerámica aragonesa de Muel (s. XVIII)*** *M.F.H. Albarelo para guayaco en donde se observa la planta y los soldados responsables de la transmisión de la enfermedad tras el cerco a Nápoles en el s. XVI.*

Acabaré con el concepto de bala mágica, ya mencionado, en donde la Farmacia deja de ser empírica y avanza un grado más en su camino hacia la precisión científica, sin olvidar, claro está, la Coca-Cola, un medicamento auténticamente mágico.

El farmacéutico norteamericano John Stith Pemberton (1831-1888) preparó un medicamento vigorizante. Se basó en la moda decimonónica europea de compuestos a base de nuez de cola y, probablemente, en el vino medicinal preparado por Angelo Mariani (1838-1914), en el cual mezclaba el vino de Burdeos y hojas de coca, aunque la coca, e incluso la cocaína, (Figura 9) se utilizaron en terapéutica con muchísima abundancia a finales del siglo XIX y principios del XX.



FIGURA 9. ***Cajas de pastillas para la tos a base de cocaína.*** *(Principios del s. XX). Colección particular.*

El mejunje carbonatado gustó mucho y pronto pasó, en las singulares farmacias americanas, de la zona de dispensación de medicamentos a la de helados y refrescos. De esa manera inició una carrera comercial imparable, hasta convertirse en uno de los símbolos del imperio americano, no tanto por la bondad del producto, cuanto por la fortaleza de su economía y de su capacidad propagan-

dística. Los fármacos de cola han desaparecido hace más de un siglo de las farmacias por su ineficacia. La Coca-Cola, supongo que ya sin coca, dejó pronto las farmacias americanas pero está presente hasta en el último recoveco del planeta Tierra y ha conseguido el milagro alquímico de convertir en oro un poco de agua carbonatada y con un cierto sabor dulzón.

Una vez realizada la investigación, se procederá a la publicación de los trabajos. Aparte de los textos citados, sobre Felipe II y acerca de la historia de los purgantes, en breve aparecerá un libro sobre el corazón (contratado por la editorial Just in Time, S. L.), en donde se exponen y analizan algunos de los fármacos empleados para fortalecer de manera simpático-mágica la víscera.

El año 2006 presenté el trabajo sobre la Triaca en la Universidad de Verano de Santander (28) y en el otoño del 2007 presento una ponencia sobre medicamentos mágicos en el Congreso Internacional de Historia de la Farmacia de Sevilla. Sin embargo, el grueso de la investigación se publicará, una vez finalizada, en un solo libro aunque tal vez con más de un tomo.

LAS FUENTES Y LAS INTENCIONES

Un trabajo de este tipo pretende reivindicar la originalidad en la mirada del autor. Por tanto no conozco ningún ensayo sometido, por entero, a las premisas expuestas. Sin embargo hay una larga tradición investigadora mediante la cual se posibilita una tarea así. Un intento similar al propuesto por mí, lo efectuó desde una metodología positivista, lógica dada la época en que se publicó y la profesión del autor, Alberico Benedicenti (29).

Son clásicos los estudios de F. Sherwood Taylor o E. J. Holmyard, sobre Alquimia (30), los de Mircea Eliade, sobre la misma materia y el estudio comparado de las religiones (31) y los de J. G. Frazier, sobre magia y religión (32). También los de C. G. Jung acerca de las relaciones entre la alquimia y diversos aspectos de la psicología profunda (33).

El estudio de la magia puede encontrarse en la historia dirigida por Paolo Rossi (34) o en el libro de Ioan P. Culianu (35). Para la com-

prensión de las raíces clásicas del fenómeno, son muy necesarios los libros de Guy Ducourthial (36), y el ya clásico de Luís Gil (37).

Un estudio de este tipo, como todos los de Historia de la Farmacia, pretende un aumento de la libertad intelectual, la opción a la originalidad y la dignidad intelectual de quien lo realiza y de quienes lo leen. Cada día, lamentablemente y de forma artificial, son más grandes las distancias entre las mal llamadas dos culturas: la científica y la humanística; no sucede así entre las grandes figuras, entre los profesionales maduros, pero sí en los más jóvenes, por la gran exigencia planteada en quienes quieren colocarse en puestos de frontera. A los de un lado y a los del otro, en mi caso, claro está más a los científicos, la lectura de una investigación como la propuesta puede evitarles desviaciones del pensamiento por caminos ya circulados por otros; les facilita la comprensión del desarrollo de la ciencia y de la terapéutica a lo largo de la historia; les pone en contacto con circunstancias sociales, políticas, económicas y personales no obvias en su preparación curricular y les permite asumir sus propias decisiones: les da libertad intelectual y con ella aumenta su dignidad e incrementa sus posibilidades de ser intelectualmente originales.

Somos enanos —se escribía en la medieval escuela Capitular de Chartres— *pero caminamos a hombros de gigantes*. Aunque la ciencia contemporánea ha supuesto una enorme ruptura con la antigua y moderna, la tradición tiene un peso fundamental, entre otras razones porque la ruptura ha sido mucho menor en el ámbito de las humanidades y, por qué no decirlo, las humanidades reflejan muy bien a los seres humanos, los auténticos objetivos de cualquier investigación científico-sanitaria. Debe conocerse la ciencia, pero también a sus protagonistas y a quienes van dirigidas las supuestas mejoras, más cuando se es sanitario y como a Terencio *nada de lo humano debe sernos ajeno*.

Además de estos nobles fines, compartidos con todas las investigaciones histórico-científicas que merezcan el nombre de tales, este trabajo, en particular, pretende ser curioso, entretenido y hasta divertido en ocasiones, pues se relaciona con una parte de la actividad literaria que, consciente o inconscientemente, han copiado de los científicos los literatos interesados en una determinada vertiente de la literatura supuestamente fantástica. Como salta a la vista, lo que

ahora puede considerarse fantástico —desde los dragones al unicornio; desde la piedra bezoar a la mandrágora— fue tenido por cierto y científico por autores tan serios como el mencionado Laguna o nuestro gran enciclopedista medieval San Isidoro de Sevilla (560-636).

Cuando un historiador alcanza un determinado grado de madurez trata de enseñar, de provocar la reflexión y también, por qué no, de divertir y divertirse.

REFERENCIAS

(1) FOLCH JOU, G. Y PUERTO, J. (1984) Origen y evolución de las corporaciones farmacéuticas españolas. *Atti e memorie della Academia Italiana di Storia della Farmacia* 2: 1-19.
(2) PUERTO, J. (1985) La profesión farmacéutica del gremialismo al corporativismo. En: La Ciencia Moderna y el Nuevo Mundo (Peset, José Luis., ed.) Ed. CSIC/SLHCT. Madrid, p. 395-423.
(3) PUERTO, J. (1997) El Mito de Panacea. Compendio de Historia de la Terapéutica y de la Farmacia. Doce Calles, Aranjuez.
(4) RODRÍGUEZ CARRACIDO, J. (1897) Estudios histórico-críticos de la ciencia española. Estudios tipográficos de Fontanet, Madrid. Reeditado (1988) Alta Fulla, Barcelona.
(5) FOLCH ANDREU, R. (1935) La química en España durante el siglo XVII. En Estudios sobre la ciencia española del siglo XVII (Alcalá Zamora, Niceto prologista) Asociación Nacional de Historiadores de la Ciencia Española, Madrid.
(6) PUERTO, J. (1988) La Ilusión Quebrada. Botánica, sanidad y política científica en la España ilustrada. Serbal/CSIC, Barcelona.
(7) PUERTO, J. (1992) Ciencia de Cámara. Casimiro Gómez Ortega (1741-1818) el científico cortesano, CSIC, Madrid.
(8) PUERTO, J. (2003) La Leyenda Verde. Naturaleza, sanidad y ciencia en la Corte de Felipe II (1527-1598), Junta de Castilla y León, Salamanca.
(9) LAÍN, P. (1977) Historia de la Medicina, Salvat, Barcelona.
(10) PUERTO, J. Y PACHECO, D. (1997) Sobre Ciencia y Literatura. *El Ateneo. Revista científica, literaria y artística*. 1997: (VIII cuarta época) 19-36.
(11) PUERTO, J. (2004), Palabras como espadas: los nombres de la ciencia. En Sequena Reyes (ed.) Ciencia, tecnología y lengua española: la terminología científica del español, FECYT, Madrid, pp. 57-62.
(12) PIMENTEL, J. (2003), Testigos del mundo. Ciencia, literatura y viajes en la Ilustración, Marcial Pons, Madrid
(13) BRETÓN, A. (1969) Manifiestos del surrealismo, Guadarrama, Madrid.
(14) ARTAUD, A. (1974) Los Tarahumara, Barral, Barcelona. Sobre este poeta surrealista francés y su relación con la alquimia, redacté mi Tesis de Licencia-

tura y la leí, gracias a la comprensión y el afecto de Guillermo Folch Jou, en la entonces cátedra de Historia de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.
(15) CUNQUEIRO, A. (1976) Tertulia de boticas prodigiosas, Destino, Barcelona.
(16) PERUCHO, J. (2004) Trilogía mágica, Edhasa, Barcelona.
(17) LERÍN, F. (2007) El Bestiario, Galaxia Gutember, Barcelona.
(18) KEARNEY, H. (1970), Orígenes de la ciencia moderna, Guadarrama, Madrid.
(19) TATON, R. (1988) Historia general de las ciencias, Orbis, Madrid.
(20) LÓPEZ PIÑERO, J. M. (2002) La Medicina en la Historia, La Esfera de los Libros, Madrid.
(21) KUHN, T. S. (1970), The structure of scientific revolutions, University of Chicago Press, Chicago.
(22) PUERTO, J. (2001) El hombre en llamas. Paracelso, Nivola, Madrid.
(23) VILLA, FRAY ESTEBAN (1646) Ramillete de plantas compuesto por el monje de San Benito en el Real Monasterio de San Juan, y administrador de su Hospital y Botica, Pedro Gómez de Valdivieso, Burgos.
(24) PUERTO, J. Y DÍAZ RUBIO, M. (1999-2000) Estreñimiento o constipación. Una mirada a través del tiempo, Arán, Madrid.
(25) PUERTO, J.; ALEGRE PÉREZ, M. E.; REY BUENO, M. Y LÓPEZ PÉREZ, M. (2001) Los Hijos de Hermes. Alquimia y espagiria en la terapéutica española moderna, Corona Borealis, Madrid.
(26) LAGUNA, A. (1566) Pedacio Dioscórides Anazarbeo, Acerca de la Materia Medicinal y de los venenos mortíferos, Mathias Gast, Salamanca, Libro IV, cap. LXXV.
(27) LAZA PALACIOS, M. (1958) El laboratorio de Celestina, Antonio Gutiérrez, Málaga.
(28) PUERTO, J. (2006) La pervivencia de la terapéutica clásica: medicamentos de leyenda. Ponencia en el curso: «La presencia de las lenguas clásicas en nuestra cultura» dirigido por Juan Lorenzo. U.I.M.P. La Magdalena, Santander, 5 septiembre de 2006.
(29) BENEDICENTI, A. (1925) Malati-Medici e Farmacisti. Storia dei remedi traversa i secoli e delle teorie che ne spiegano l'azione sull'organismo, Ulrico Hoepli, Milano.
(30) SHERWOOD TAYLOR, F. (1957) Los Alquimistas, Fondo de Cultura Económica, México; HOLMYARD, E.J. (1970), La prodigiosa historia de la alquimia, Guadiana, Madrid.
(31) ELIADE, M. (1974), Herreros y alquimistas, Taurus y Alianza, Madrid. (1969), Mefistófeles y el andrógino, Guadarrama, Madrid. (1964), Tratado de historia de las religiones, Era, México.
(32) FRAZIER, J. G. (1995) La rama dorada, Fondo de Cultura Económica, México, (8ª reimpresión).
(33) JUNG, C.G.; WILHELM, R. (s.f.) El secreto de la flor de oro, Paidos, Buenos Aires; JUNG, C.G. (1966), Paracélsica, Editorial Sur, Buenos Aires; (1972), Psicología y Alquimia, Plaza & Janes, Barcelona.
(34) ROSSI, P. (2000) Storia della Scienza Moderna e Contemporanea, TEA, Milano.

(35) CULIANU, I. P. (1999) Eros y magia en el Renacimiento, Siruela, Madrid.
(36) DUCOURTHIAL, G. (2003) Flore magique et astrologique de l'Antiquité, Berlin, Paris.
(37) GIL, L. (2004) Therapeia, Triacastela, Madrid.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1199-1236

Artículo original

Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica

Recibido el 24 de septiembre de 2007

JOSÉ MARÍA SÁNCHEZ-MONTERO* Y JOSÉ VICENTE SINISTERRA GAGO

Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid 28040

RESUMEN

La Industria Farmacéutica se enfrenta en la actualidad, forzada por la normativa de la UE a reducir la producción de residuos (200 Kg) por kilogramo de producto. Ello implica el desarrollo de procesos de síntesis más eficaces y selectivos, utilizando mejores catalizadores. Por ello la Biocatálisis y las Biotransformaciones, como aplicación de la misma a la Síntesis Orgánica, están adquiriendo un papel importante en el diseño de las nuevas síntesis de fármacos. En la presente revisión se comentan algunas de las metodologías desarrolladas por el Grupo de Biotransformaciones de la UCM en este campo. Se abordan las metodologías desarrolladas para la mejora de los biocatalizadores: nuevas técnicas de inmoviliza-

* Información de contacto:

Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria. 28040. Madrid.

Dr. José María Sánchez-Montero. e-mail: jsanchez@farm.ucm.es

Dr. José Vicente Sinisterra Gago. e- mail: jvsgago@farm.ucm.es

La actividad investigadora del grupo se inicia en 1988 cuando el Prof. Sinisterra se traslada a Madrid creando grupo de investigación con los Prof. Alcántara y Sánchez Montero, incorporándose posteriormente la Prof. Hernaiz y la Prof. Fernández constituyendo el núcleo principal del grupo. Actualmente el Grupo de Biotransformaciones de la Universidad Complutense es un grupo interuniversitario e interdepartamental que fue reconocido como primer grupo de calidad de la CAM en el campo de la Biocatálisis en 2004/2005, siendo además un grupo de referencia a nivel europeo en el campo de las Biotransformaciones.

www.biotransformaciones.com.

ción o de modificación química, control de la actividad de agua etc. Se describen algunos procesos de interés desarrollados en el grupo como la resolución de racémicos y su aplicación a la obtención de ácidos *S*-2-arilpropiónicos o de β-bloqueantes adrenérgicos; la reducción estereoselectiva de cetonas proquirales, la síntesis en un paso de nucleósidos con actividad farmacológica etc. En todos los casos se comentan las ventajas de las nuevas metodologías de síntesis en sintonía con la nueva normativa de obligado cumplimiento de la UE sobre eliminación de disolventes contaminantes (CH_2Cl_2, TCE), inflamables (hexano, isooctano), compuestos orgánicos volátiles (COV) etc, y de reactivos contaminantes v.g.: catalizadores órgano metálicos.

Palabras clave: Biocatálisis, Biotransformaciones, fármacos racémicos, química verde.

ABSTRACT

Enzymes and microorganisms as catalysts in the synthesis of products of pharmaceutical interest.

Pharmaceutical industries are nowadays facing the challenge of lowering the ratio (kg of residues/kg of product) to levels below 200, as required by the European legislation. This fact is demanding the implementation of more selective and efficient synthetic procedures, so that new and better catalysts are needed. For this purpose, Applied Biocatalysis, and more specifically Biotransformation (the use of the former in Organic Synthesis), are becoming more prominent in the design of new strategies for drugs synthesis. In this review, some of the methodologies applied inside the Biotransformations Group of the Complutense University are presented; thus, the employ of different methodologies (such as immobilization and/or modification of biocatalysts, or the control of water activity of the reaction media) for improving the biocatalyst performance are described. The biocatalyzed resolution of racemates for obtaining enantiopure *S*-2-aryl propionic acids (profens) or cardiotonic β-blockers, the estereoselective carbonyl reduction of prochiral ketones, or the one-step semi-synthesis of therapeutically significant nucleosides will be discussed. In all cases, a special emphasis is set on the environmental advantages of the biocatalyzed processes, as demanded by EU legislation on substitution of contaminant solvents (CH_2Cl_2, TCE) or reagents (organo metallic catalysts), as well as highly flammable compounds (*n*-hexane, *iso*octane), or promoting VOCs release.

Key words: Biocatalysis, Biotransformations, racemics drugs, green chemistry.

1. INTRODUCCIÓN

La Industria Farmacéutica se enfrenta en la actualidad a dos retos fundamentales. Por un lado debe reducir al menos en un orden de magnitud la producción de residuos por kilogramo de producto y por otro desarrollar terapias donde las dosis sean menores pasando de las dosis actuales de miligramos al nivel de μg (1) y que éstas sean cada vez más selectivas y menos tóxicas. Ello implica el desarrollo de procesos de síntesis más eficaces y selectivos utilizando mejores catalizadores y/o biocatalizadores disminuyendo la generación de subproductos, el desarrollo de todas las terapias basadas en las células equipotentes y en el desarrollo de nuevos productos bioterapéuticos como vacunas u hormonas. Todo ello nos lleva a plantearnos el papel preponderante que tendrá en un futuro a medio y largo plazo la Biotecnología en la Terapéutica sustituyendo en gran medida a la Química en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

El interés práctico del empleo de biocatalizadores en uno o varios pasos de la síntesis de un fármaco reside en que dada su especificidad, no es necesaria la utilización de grupos protectores, disminuyendo así los pasos de la síntesis, aumentando el rendimiento y reduciendo la producción de residuos contaminantes. Como ejemplo citaremos la producción de Ribavirina desarrollada en un proceso *one-pot* usando células enteras (2). La síntesis se hace empleando células enteras productoras de nucleósido fosforilasas que permiten el cambio de uracilo por el triazol del antiviral.

Otro aspecto interesante a considerar y de gran importancia en la Industria Farmacéutica es la capacidad que tienen las enzimas para resolver mezclas racémicas. Gran parte de los principios activos farmacéuticos son moléculas que poseen uno o varios centros estereogénicos, de cuya correcta configuración depende su bioactividad. Los procesos de síntesis química se caracterizan en general por la obtención de mezclas de isómeros, que son además difíciles de purificar. En este sentido, los procesos biocatalíticos presentan una gran ventaja, ya que las enzimas producen de un modo específico y selectivo únicamente uno de los isómeros posibles. No obstante, las enzimas son catalizadores solubles en agua, sensibles a los cambios del medio y que sufren inhibiciones por sustratos y productos. Además, las enzimas muchas veces no poseen

todas las propiedades ideales (actividad, selectividad, etc.) cuando queremos que catalicen procesos distintos de los naturales (*v.g.* síntesis en lugar de hidrólisis), sobre substratos no naturales, en condiciones experimentales no convencionales (*v.g.* en disolventes orgánicos no tóxicos).

No obstante dado el elevado coste de las enzimas y en algunos casos de la dificultad de llevar a cabo un proceso fermentativo cuando se utilizan células enteras es conveniente establecer una estrategia para abordar todos los inconvenientes que se pueden presentar en un proceso. Estas estrategias se pueden afrontar desde tres perspectivas distintas:

1. Mejoras basadas en aspectos fundamentales de la Biocatálisis.
2. Biotransformaciones catalizadas por enzimas.
3. Biotransformaciones catalizadas por células enteras.

2. MEJORAS BASADAS EN ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA BIOCATÁLISIS

Este punto requiere conocimientos específicos de los procesos fisicoquímicos en los que están implicadas las enzimas o células y en este sentido existen diferentes metodologías para aumentar el rendimiento y la pureza enantiomérica. Dentro de estas metodologías es muy importante definir con precisión los siguientes aspectos:

2.1. Control de las variables técnicas.

2.2. Control de la pureza de la enzima.

2.3. Selección adecuada de microorganismos para llevar a cabo un proceso.

2.4. Selección del disolvente de la biotransformación.

2.5. Control de la cantidad de agua en aquellos procesos en los que ésta participe en la reacción.

2.6. Efecto de los aditivos como agentes estabilizantes de enzimas.

2.1. Control de las variables Técnicas

Respecto al control de las variables técnicas, pH, temperatura, cantidad de catalizador, tiempo, concentración de sustrato, etc., la cantidad de catalizador tiene un efecto notable sobre la reproducibilidad del proceso teniendo en cuenta que en la mayoría de las ocasiones se utilizan preparaciones comerciales. Domínguez de María *y col.* (3) desarrollaron un método con el objeto de conocer la cantidad real de enzima en la muestra definiendo el «*Factor Lipásico*» basado en la velocidad inicial de diferentes reacciones de esterificación.

La temperatura está considerada como una variable importante pero sujeta a las limitaciones impuestas por la mayoría de las enzimas y células de trabajar en condiciones suaves. Cuando las reacciones han de desarrollarse a temperaturas superiores a los 50º C las enzimas procedentes de organismos termófilos constituyen una herramienta esencial en Biocatálisis y especialmente a escala industrial ya que pueden trabajar a altas temperaturas en los casos en el que el proceso así lo demande y donde no se pueden usar las enzimas convencionales. Así este tipo de enzimas son interesantes en las industrias de alimentos, del papel, de los detergentes, farmacéutica, en la eliminación de desechos tóxicos, etc (4). No obstante el uso de estas enzimas a altas temperaturas requiere la utilización de disolventes de elevado punto de ebullición lo que conlleva la evaporación de estos con los consiguientes problemas medioambientales. La utilización de líquidos iónicos puede resolver este inconveniente ya que estos permanecen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas (5). En la Figura 1 se muestra un ejemplo de utilización de la lipasa termófila de *Bacillus thermocatenulatus* catalizando la reaccion de esterificación del ácido mandélico con etanol a 90º C de temperatura y donde se consiguen tasas de esterificación muy elevadas a cortos tiempos de reacción en relación a la misma reacción llevada a cabo en Isooctano.

2.2. Control de la pureza de la enzima.

Otra estrategia posible para resolver mezclas racémicas es abordando el problema desde el punto de vista de la pureza de la prepa-

ración enzimática. En ocasiones la purificación de una proteína mejora la enantioselectividad de un proceso químico Así por ejemplo en la esterificación del ácido (*R,S*) 2-(4-isobutilfenil) propiónico con 1-propanol utilizando isooctano como disolvente, puede observarse como la purificación de la enzima —lipasa de *Candida rugosa*— mejora la conversión y enantioselectividad. De las dos isoformas —Lipasas A y B— (6) la B conduce a los mejores resultados (Tabla 1) (7).

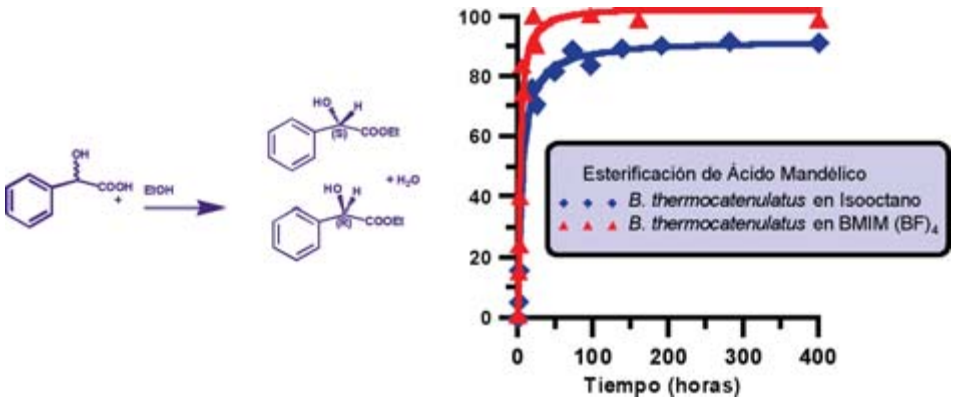


FIGURA 1. ***Reacción de esterificación del ácido mandélico*** *con etanol a 90º C utilizando lipasa de Bacillus thermocatenulatus.*

TABLA 1. ***Efecto del grado de purificación sobre la enantioselectividad del proceso.***

Enzima	a_w[a]	*C(%)*[b]	*t(h)*	*e(%)*[c]
Lipasa Comercial *C. rugosa*	≈1	37	24	43
Lipasa Semipurificada *C. rugosa*	≈1	50	24	60
Lipasa A *C. rugosa*	≈1	47	24	74,2
Lipasa B *C. rugosa*	≈1	49	24	>98

[a]500 ml de agua añadida; [b]Conversion a éster; [c] Exceso enantiomérico de el ácido remanente.
[S (+)] < [R(-)], ácido 66 mM. 1-propanol en 5 ml de isooctano; T[a] = 30 º C;
[Lipasa Comercial o Semipurificada] = 20 mg Proteina/ml y [Lipasas A o B] = 2 mg Proteína/ml.

Otra estrategia de purificación sería la utilización de disolventes orgánicos ya que las lipasas presentan una hidrofobicidad elevada. Así, siguiendo un simple y rápido tratamiento basado en disolver el preparado comercial de lipasa de *C. rugosa* en diferentes porcentajes de disolventes orgánicos polares como metanol, etanol, acetona, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, y 2-butanol conduce a preparados más activos y con una estabilidad térmica mejorada (8, 9).

En la Tabla 2 mostramos los resultados obtenidos en la esterificación de S o R ketoprofeno al comparar la lipasa comercial con las enzimas obtenidas por el tratamiento con los diferentes disolventes. La actividad enzimática en la esterificación de ambos enantiómeros ha sido cuantificada a través de la actividad específica obtenida de la velocidad inicial de reacción. Para comprobar la validez de los experimentos se hicieron con dos lotes diferentes habida cuenta de la poca reproducibilidad de estas preparaciones comerciales. Puede verse como la relación S/R se incrementa en las lipasas tratadas con respecto a la comercial. También mostramos en la Tabla 3 la estabilidad térmica de estas preparaciones donde vemos que el tiempo de vida media es en la mayoría de los casos superior a la lipasa comercial.

2.3. Selección adecuada de microorganismos para llevar a cabo un proceso.

Existen muchos procesos de interés en la industria farmacéutica donde podrían utilizarse las enzimas pero debido a la diferente selectividad y especificidad mostrada por estas, hace que debamos explorar nuevas fuentes productoras de enzimas. Para ilustrar lo dicho baste como ejemplo el cribado (screening) realizado sobre 2000 cepas microbianas, las cuales se hicieron crecer sobre diferentes medios para buscar nuevas fuentes productoras de lipasas (10). La distribución taxonómica se muestra en la Figura 2.

Asimismo se determinó su actividad lipolítica utilizando sustratos cromogénicos para diferenciar las cepas que poseían actividad. La estereoselectividad de las lipasas obtenidas se ensayó en la resolución de los ácidos 2-aril-propiónicos así como en la resolución del *(R,S)* 1-fenil etanol, acilación de ciclopropilmetanol y en la síntesis

de carbamatos por acilación de aminas (Esquema 1). A modo de ejemplo mostramos los resultados obtenidos en la síntesis de N-1-feniletil- butil carbamato (11) (Tabla 4). Esquema 1:

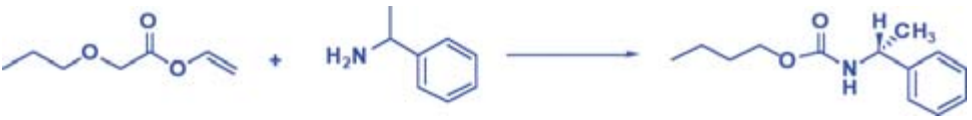


TABLA 2. ***Efecto de los disolventes orgánicos sobre la enantioselectividad.***

		***S*(+) Ketoprofeno**		***R*(-) Ketoprofeno**		
Entrada	**Lipasa**	**Actividad específica[b]**	**χ**	**Actividad específica[b]**	**χ**	***S/R*[a]**
1	CRL(L54)[d,e]	**6,9**	5	11,5	9	**0,6**
2	CRL(L85)[f,g]	**17,1**	8	28,9	17	**0,6**
3	SA-CRL[h,e]	**15,3**	7	15,2	5	**1,0**
4	E-CRL[i,e]	**15,9**	2	28,1	7	**0,6**
5	1P-CRL[j,e]	**27,6**	6	30,7	8	**0,9**
6	2P-CRL[k,e]	**30,2**	8,5	26,1	7,5	**1,2**
7	A-CRL[l,g]	**20,4**	5	18,2	5	**1,1**
8	M-CRL[m,g]	**22,5**	5	20,7	5	**1,1**
9	2B-CRL[n,g]	**41,3**	7,5	14,2	3	**2,9**
10	1B-CRL[o,g]	**18,1**	3	22,1	3	**0,8**

[a]Relación entre las actividades específicas obtenidas con cada enantiómero en la reaccion de síntesis. [b]Actividad específica sintética (mM $U^{-1}h^{-1}$)10^7. [c]Rendimiento (%) a 200 h. [d]Lipasa cruda de *C. rugosa*, lote 54HO260 de Sigma. [e]Obtenida por tratamiento Lot 54. [f]Lipasa cruda de *C. rugosa*, lote lot 85HO260 de Sigma. [g]Obtenida por tratamiento Lot 85. [h]60% sulfato amónico sobre CRL. [i]40 % (v/v) etanol sobre CRL. [j]30% (v/v) 1-propanol sobre CRL. [k]40% (v/v) 2-propanol sobre CRL. [l]30% (v/v) acetona sobre CRL. [m]30% (v/v) metanol sobre CRL. [n]30%(v/v) 2-butanol sobre CRL. [o]60%(v/v) 1-butanol sobre CRL.

TABLA 3. ***Efecto de los disolventes sobre la vida media de los biocatalizadores.***

Fracción	$t_{1/2}$(h)[a]	***F***[b]
CRL(L54)[c,d]	4,5	1
SA-CRL[e,d]	0,6	0,1
2P-CRL[f,d]	5,9	1,3
1P-CRL[g,d]	10,6	2,3
E-CRL[h,d]	8,2	1,8
CRL(L85)[i,j]	3,9	1
A-CRL[k,j]	10,8	2,8
M-CRL[l,j]	47,2	12,1
2B-CRL[m,j]	7,9	2,0
1B-CRL[n,j]	3,1	0,8

[a]Tiempo de vida media. [b]Factor de estabilización relacionado con la enzima nativa. [c]Lipasa cruda de *C. rugosa*, lote 54HO260 de Sigma. [d]Obtenido tratando el lote 54 [e]60 % sulfato amónico en CRL. [f]40% (v/v) 2-propanol en CRL. [g]30% (v/v) 1-propanol en CRL. [h]40 % (v/v) etanol en CRL. [i]Lipasa cruda de *C. rugosa*, lote 85HO260 de Sigma. [j]Obtenida tratando el lote 85 [k]30%(v/v) de acetona en CRL [l]30%(v/v) metanol en CRL [m]30%(v/v) 2-butanol en CRL.

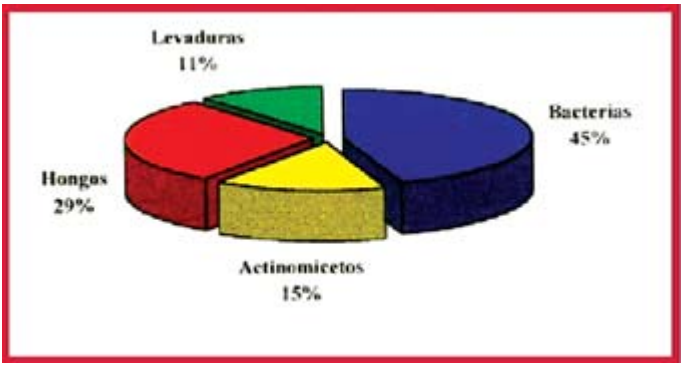


FIGURA 2. ***Distribución taxonómica de especies encontradas en el screening.***

TABLA 4. ***Selectividad mostrada por las diferentes lipasas*** *en la síntesis de N-1-feniletil-butil carbamato.*

Lipasa	**Rendimiento (%)[a]**	**e.e. (%)[b]**	**Configuración preferida**
O.sulphureo-ochraceum	6	99	S>R
F.oxysporum	58	95	R>S
F.solani	46	99	R
F.poae	47	85	R>S
Monascus sp	80	>10	R>S
M. mucoroides	80	10	R>S
P.chrisogenum	38	99	R
A.ciferri	25	40	R>S
R.aracauriae	21	19	R>S
P.cepacia	53	70	S>R
B.linens	10	99	R>S
S.halstedii	61	95	R>S

[a]Determinado por HPLC. [b]Determinado por RMN-^{1}H usando sales de Eu (III).

Por otra parte modificando el inductor así como la velocidad de crecimiento se produce la alteración de la composición en iso-enzimas así como el contenido en carbohidratos de la lipasa de *C. rugosa* (12). Este hecho va a condicionar la selectividad de la enzima como se puede ver en la Tabla 5 donde se comparan dos preparaciones de *C. rugosa* con diferente composición de iso-enzimas. Este hecho también ha sido puesto de manifiesto por Domínguez *y col.* (13, 14) como se muestra en la Tabla 6 ya que al cambiar el inductor o las condiciones de fermentación se modifica la proporción de iso-enzimas en relación a preparaciones obtenidas por nosotros y distintos proveedores.

2.4. Selección del disolvente de la biotransformación.

La elección del disolvente puede ejercer dos efectos principales sobre la biotransformación:

a) Control de la solubilidad del sustrato en el medio orgánico, dependiente de los valores del log P del disolvente y del sustrato (15).

TABLA 5. ***Selectividad de lipasas de C. rugosa en función de su perfil iso-enzimático*** *utilizando como reacción test la esterificación de los ácidos S y R-2-fenil-propiónico y del S y R-ketoprofeno.*

Enzima	**Acido**	**Velocidad inicial específica (x 10^6) (mmol de éster sintetizado por mg proteína por h)**
Sigma CRL	(S)-2-Fenil propiónico	227±9
CRL-UAB	(S)-2-Fenil propiónico	552±21
Sigma CRL	(R)-2-Fenil propiónico	Despreciable
CRL-UAB	(R)-2-Fenil propiónico	Despreciable
Sigma CRL	(S)-ketoprofeno	4±0,15
CRL-UAB	(S)-ketoprofeno	218±9
Sigma CRL	(R)-ketoprofeno	Despreciable
CRL-UAB	(R)-ketoprofeno	64±2,5
Sigma CRL[a]	(S)-ketoprofeno	Despreciable
CRL-UAB[a]	(S)-ketoprofeno	241±10
Sigma CRL[a]	(R)-ketoprofeno	Despreciable
CRL-UAB[a]	(R)-ketoprofeno	200,8

[a] sin agua añadida.

TABLA 6. ***Proporción de iso-enzimas en diferentes muestras de lipasa de C. rugosa*** *excretada en diferentes condiciones de fermentación.*

Lipasa	Fermentación/Inductor	Composición en Isoenzimas		
		Lip 1	Lip 2	Lip 3
Sigma	Desconocido	73±5	8±1	19±2
Roche	Desconocido	66±5	13±2	21±2
UCM-I	Batch/Acido oleico	—	30±5	40±4
UCM-II	Batch/Acido oleico	—	73±5	27±3
UCM-III	Batch/Aceite girasol	—	73±5	27±3
UCM-IV	Batch/1-dodecanol	22±3	34±3	44±4
UCM-V	Batch/1-glicerol	< 1%	< 1%	< 1%
UAB-II	Fed-Batch Q baja/Acido oleico	—	56±5	44±5
UAB-III	Fed-Batch Q baja /Acido oleico	—	56±5	44±5
UAB-IV	Fed-Batch Q alta/Acido oleico	33±3	40±4	27±3

b) Solvatación selectiva de cada enantiómero del sustrato racémico por las moléculas del disolvente.

El primer efecto controla, fundamentalmente, el rendimiento mientras que el segundo tiene que ver con la enantioselectividad vía formación de dos diaesteroisómeros entre el disolvente y las moléculas *R* o *S* del sustrato. Este aspecto ha sido comprobado en la esterificación de *R* o *S* ketoprofeno con 1-propanol utilizando *R* o *S*-carvona como disolvente quiral, catalizada por lipasa B de *Candida antarctica*. Podemos ver como las moléculas de disolvente quiral

juegan un importante papel en la estereoselectividad de la enzima. Esto es la (+)*S*-carvona mantiene la *S*-estereopreferencia observada en los disolventes aquirales mientras la (-) *R*-carvona cambia la enantioselectividad a largos tiempos de reacción (16) (Figura 3).

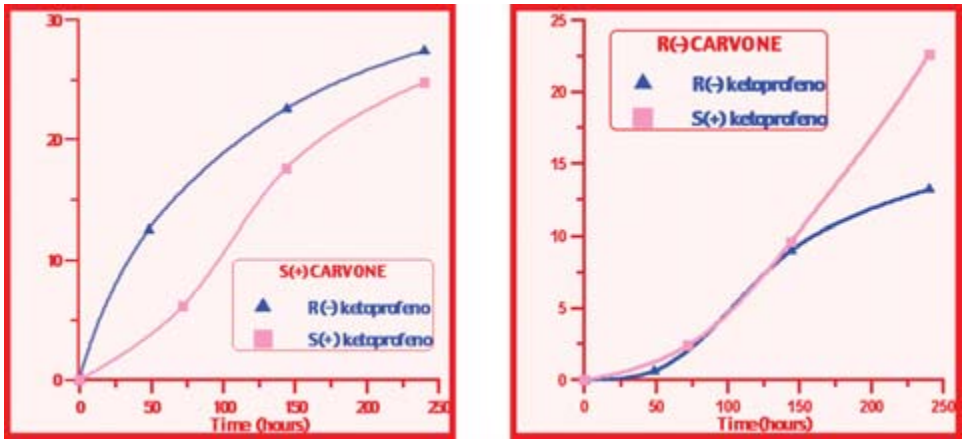


FIGURA 3. ***Esterificacion de (+)S-ketoprofeno y (-)R-ketoprofeno*** *con n-propanol en presencia de (+)S-carvona y (-)R-carvona catalizada por lipasa B de C. antártica.*

Sin embargo uno de los factores que más afecta al rendimiento final de reacción cuando trabajamos en medios orgánicos usando lipasas, es el contenido en agua y más concretamente la cantidad de agua unida a la proteína. Las características de esta agua unida han atraído un gran interés debido a que estas moléculas mantienen la estructura de la proteína en el medio orgánico (17). Esto está apoyado por la idea de que un nivel mínimo de hidratación se requiere para que una enzima sea activa y éste varía con el tipo de enzima como demostramos con la técnica de RMN de agua (18). En el caso de enzimas liofilizadas el agua juega un papel fundamental ya que ayuda a mantener la conformación activa y por otra parte favorece la síntesis frente a la hidrólisis. Dada la necesidad de controlar la cantidad de agua del sistema la determinación del parámetro a_w a partir de la isoterma de adsorción de agua ha dado excelentes resultados (19). Esta se ha de determinar con la lipasa en aire y en el disolvente y por último solo con el disolvente (19). Por otra parte el

valor de log P del disolvente va a condicionar enormemente el reparto de agua entre la enzima y el disolvente. Un ejemplo de lo anteriormente dicho se muestra en la Figura 4 donde se representa la esterificación de (*R,S)*-ibuprofeno catalizada por lipasa de *C. antártica* inmovilizada. Puede comprobarse como el control del agua añadida inicialmente ejerce un efecto crítico en el transcurso de la reacción (19). La máxima conversión se obtiene a a_w=0,85 que es el valor de equilibrio obtenido a partir de la isoterma mientras que a valores superiores o inferiores la conversión baja drásticamente.

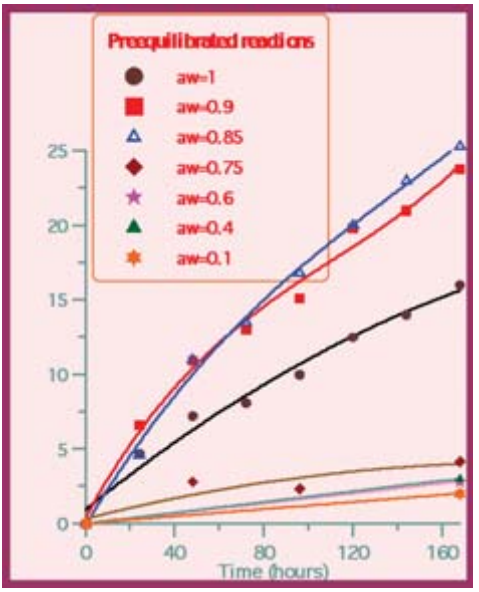


FIGURA 4. ***Esterificación de ibuprofeno*** *catalizado por CALB inmovilizado sobre sílice-activada con triclorotriazina. Condiciones 66 mM acido + 66 mM 1-propanol. 37º C; 300 rpm; 200 mg de derivado/ml isooctano (15.6 mg SP525/g derivado).*

2.6. Efecto de los aditivos como agentes estabilizantes de enzimas.

Las enzimas comerciales de *C. rugosa* se encuentran estabilizadas con lactosa que juega un papel muy importante como reservorio de

agua (20). El porcentaje de agua asociada a la superficie de la enzima puede ser modificada por la presencia de aditivos. A continuación mostramos el efecto que tiene sobre la actividad enzimática la adición de dextranos de diferente peso molecular a una preparación comercial de lipasa de *C. rugosa* a la que previamente se había eliminado la lactosa por diálisis, y en la que la cantidad de proteína permanece prácticamente constante en todas las preparaciones. En la Figura 5 se emplean 5 microlitros de agua por gramo de dextrano. En cuanto a la velocidad de reacción esta se incrementa notablemente en todos los casos. Las velocidades de reacción de los derivados preparados con dextranos son superiores en todos los casos respecto de la enzima comercial y la enzima semipurificada sin lactosa (21).

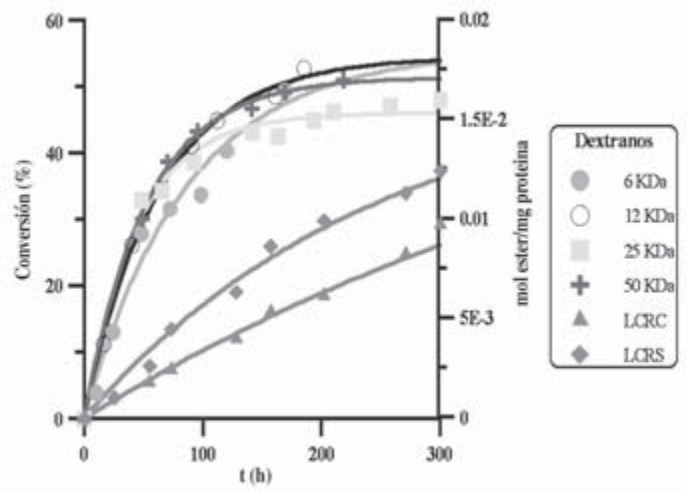


FIGURA 5. ***Esterificación del ácido (R,S)2-(4-sobutilfenil)propiónico con n-propanol*** *catalizado por lipasa de C. rugosa estabilizada con dextranos de diferente peso molecular (5µl de agua/mg de preparado).*

3. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS

Una de los problemas mas importantes que se pueden presentar a las generaciones futuras es la escasez de alimentos debido a la disminución de las superficies de cultivo y al aumento de la población. Las proteínas procedentes de organismos unicelulares, espe-

cialmente levaduras (single cell protein, SCP) podrían utilizarse para complementar y equilibrar ciertas dietas, tradicionalmente pobres en proteínas. Además de los problemas técnicos que conlleva la extracción de la proteína, la principal dificultad que impide la generalización de la utilización de concentrados de proteínas de levadura y otros microorganismos en alimentación humana es su alto contenido en ácidos nucleicos (hasta un 20%). La ingesta prolongada de estos produciría un aumento en el contenido plasmático los cuales serían metabolizados a ácido úrico poco soluble a los pHs de los fluidos corporales y con mala excreción por el riñón. De los métodos existentes el más interesante desde el punto de vista industrial podría ser la utilización de nucleasas exógenas, pues conducen a procesos de hidrólisis de ácidos nucleicos a temperatura ambiente y sin alteración de las proteínas.

La hidrólisis de las SCP se llevó a cabo utilizando derivados inmovilizados de nucleasas. Se utilizaron tres fuentes de *Saccharomyces cerevisiae,* dos de ellas comerciales MC 40, YSC y la tercera, ECC, proveniente de una industria cervecera (22).

Como se ve de los datos de la Tabla 7 en los tres casos se redujo el porcentaje de ácidos nucleicos a valores inferiores al 0.5 % perfectamente tolerables por el ser humano con una pérdida de proteína media del 6%.

TABLA 7. ***Eliminación del contenido de ADN y ARN en SCP*** *utilizando nucleasas inmovilizadas.*

SCP	Relación inicial ácido nucleico/ proteína (%)	Total hidrolizado		Relación final ácido nucleico/ proteína (%)	Pérdida de proteína (%)
		ADN	ARN		
MC-40	4,2	97	98	0,13	5
YSC	3,0	99	89	0,46	11
ECC	0,7	99	69	0,16	2

4. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR CÉLULAS ENTERAS

4.1. Síntesis en un solo paso de nucleósidos.

Los análogos de nucleósidos son una familia de compuestos con diferentes actividades farmacológicas entre las cuales destacan su actividad como agentes antivirales, antitumorales y como moléculas inmunosupresoras. Al ser moléculas lábiles, polifuncionales y quirales su síntesis química requiere de multitud de pasos, incluidos los de protección-desprotección. En 1999, Utagawa (23) presentó un proceso enzimático que ocurría en un solo paso utilizando las nucleósido fosforilasas o las N-desoxiribosiltransfeasas. Estas enzimas son intracelulares y multiméricas por lo cual el proceso de síntesis se realiza con células enteras. El principal problema reside en que se ha de trabajar a T > 60º C para evitar la acción de la adenosín deaminasa que descompone los nucleósidos de 6-amino purina (24).

Para encontrar nuevos microorganismos que evitaran este problema se han realizado una serie de búsquedas taxonómicas de bacterias de distintas colecciones habiéndose seleccionado una serie de cepas interesantes utilizando como reacciones test la síntesis de adenosina a partir de uracilo y adenina (microorganismos productores de nucleósido fosforilasas) y la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiuracilo y adenina (2'-deoxiribosiltransferasas) tal y como se muestra en el esquema. En la Figura 6 se muestra el efecto de la temperatura sobre la reacción de biosíntesis de adenosina catalizada por bacterias productoras de nucleósidos (A), *B. atrophaeus* (CECT 4071) y (B) *X. translucens* (CECT 4643). Los valores representan el promedio de tres experimentos (25). Las condiciones de reacción fueron: relación molar de sustratos = 3 (15 mM de uridina como donador de ribosa y 5 mM de adenina como aceptor, ambos disueltos en tampón fosfato de potasio de 25 mM (pH=7)), velocidad de agitación 200 r.p.m y 1 hora de reacción.

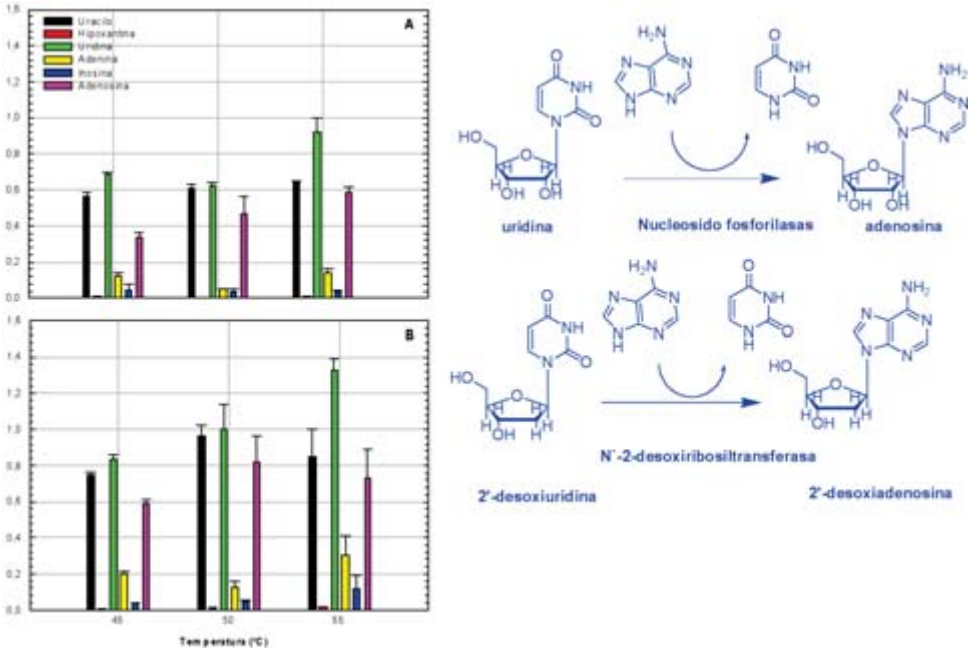
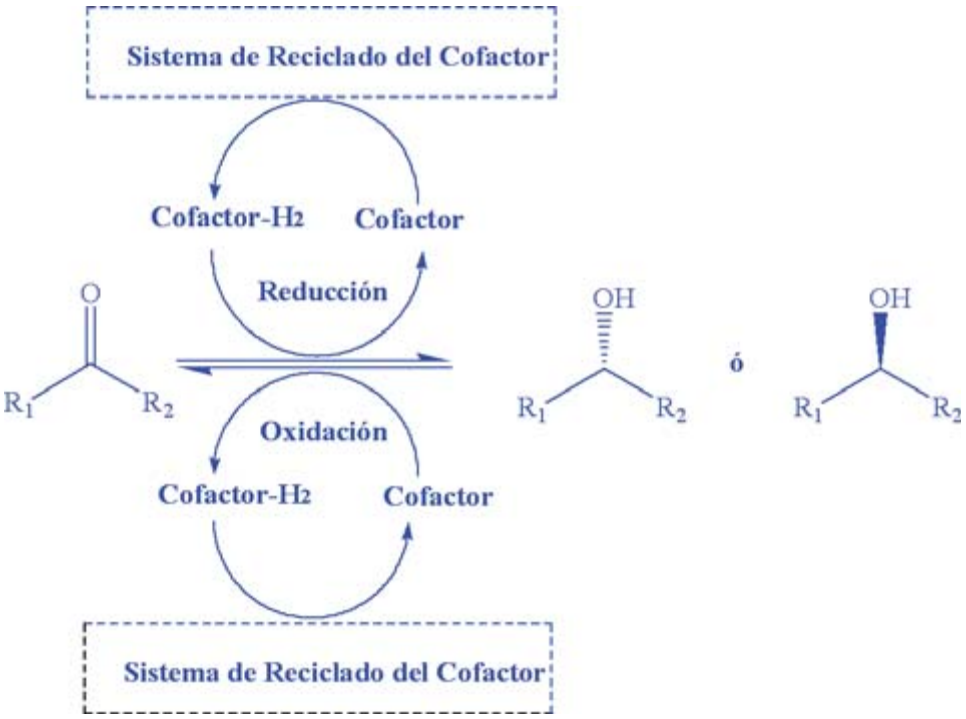


FIGURA 6. ***Efecto de la temperatura sobre la reacción de biosíntesis de adenosina*** *catalizada por bacterias productoras de nucleósidos. (A) B. atrophaeus (CECT 4071) y (B) X. translucens (CECT 4643).*

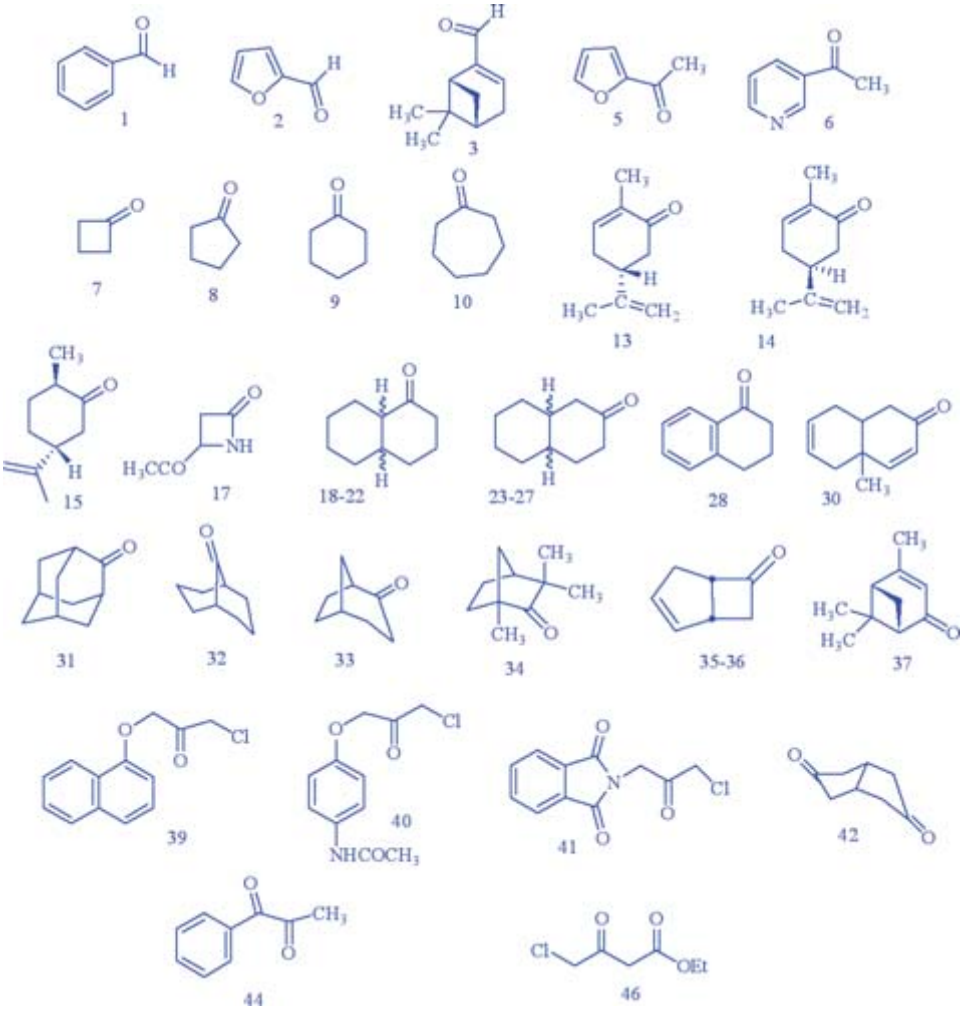
4.2. Reducción estereoselectiva de cetonas

Otras enzimas muy interesantes y de gran proyección industrial son las alcohol deshidrogenadas (ADH) que catalizan las reacciones red-ox y que son enzimas intracelulares. Estas enzimas tienen gran número de aplicaciones en el campo de las Biotransformaciones. El proceso permite la creación de alcoholes homoquiales de gran interés como intermedios de síntesis. Al ser enzimas intracelulares, dependen de una coenzima como NAD(P)H, PPQ, etc. que se consume en cantidades equimoleculares respecto al substrato a reducir. Esto implica que la regeneración de la coenzima hace al proceso económicamente inviable con enzimas libres sin la regeneración del cofactor (el precio aproximado de un mol de NADH es de 3.000$ USA y el de un mol de NADPH 25.000$ USA).

Es por ello por lo que se utilizan células enteras como biocatalizadores ya que éstas poseen sistemas para la regeneración de la coenzima. El único problema existente es que dentro de las células suele haber más de una enzima que cataliza el proceso, obteniéndose en algunos casos bajos e.e. La reacción se puede escribir:



Para aislar nuevas ADHs se realizó una búsqueda taxonómica de microorganismos que presentaran una buena actividad enzimática en la reducción de ciclohexanona, que se tomó como reacción test. Se seleccionaron en un primer estadio 31 cepas y finalmente se seleccionaron después de un *screening* secundario tres hongos filamentosos: *Gongronella (absidia) butleri, Monascus kaoliang,* y *Diplogelasinospora grovesii*, una levadura *Schizosaccharomyces octosporus*, y una levadura fungiforme *Geotrichum candidum,* caracterizados por primera vez como productores de ADHs (26-28). Estos microorganismos son capaces de reducir cetonas hidrófobas como las indicadas en el Esquema siguiente y en la Tabla 8 (29).



Una de las contribuciones principales del grupo, en el campo de las Biotransformaciones catalizadas por células enteras, ha sido la introducción de la metodología CoMFA para predecir la actividad de un biocatalizador frente a un sustrato o la estereoselectividad del proceso de reducción (29, 30). Los fundamentos de la metodología están descritos en la bibliografía QSAR (31, 32) pero no habían sido aplicados con éxito en el campo de las biotransformaciones.

El modelo CoMFA desarrollado se basa en considerar la conversión o el exceso enantiomérico como variables independientes frente

a una alineación predeterminada de los confórmeros de mínima energía de los sustratos (Figura7).

TABLA 8. **Resultados obtenidos en la reducción de distintas cetonas a sus alcoholes correspondientes**, usando los mejores microorganismos seleccionados (29) [Cetona]=2.5 mM, 250 rpm, 28º C, 48 h.

Cetona	***D. grovesii***	***G butleri***	***S. octosporus***	***G. candidum***
Benzaldehído	0	95	98	0
2-furaldehído	98	98	0	0
R-mirtenal	73	90	42	0
Tetradecanal	0	0	0	0
2-acetilfurano	0	11	39	80
2-acetylpiridina	14	13	73	0
Ciclobutanona	77	67	10	0
Ciclopentanona	14	33	2	0
Ciclohexanona	85	96	87	36
Cicloheptanona	9	26	8	0
Ciclooctanona	0	18	0	0
Ciclododecanona	0	25	0	0
4*R*-carvonea	90	87	65	77
4*S*-carvona	93	51	60	82
(1*R*,4*R*)-dihidrocarvona	79	88	75	76
2-azetidinona	10	6	0	0
4-acetoxi-azetidin-2-ona	12	0	0	0
1-decalonea	90	65	34	76
(4a*R*, 8a*R*)-*cis*-1-decalona	43	36	3	86
(4a*S*, 8a*S*)-*cis*-1-decalona	86	77	11	90
(4a*R*, 8a*S*)-*trans*-1-decalona	96	71	8	41
(4a*S*,8a*R*)-*trans*-1-decalona	96	86	14	92
2-decalonea	65	57	75	72
(4aR,8aS)-cis-2-decalonea	81	0	86	20
(4aS,8aR)-cis-2-decalona	24	65	90	26
(4aR,8aR)-trans-2-decalona	70	26	72	25
(4aS,8aS)-trans-2-decalona	73	12	18	5
α-tetralona	0	6	9	5
4-metil-deca-2-en-1-ona	3	1	0	0
4aR-metil-deca-2-ona	3	2	0	0
2-adamantanona	58	98	22	12
biciclo-[3.3.1]-nonan-9-ona	39	95	32	16
biciclo-[3.2.1]-octan-2-ona	74	32	10	0
R-fenchona	0	0	0	0
cis-biciclo-[3.2.0]-hept-2-en-6-ona	20	44	24	0

Cetona	*D. grovesii*	*G butleri*	*S. octosporus*	*G. candidum*
Trans-bicyiclo-[3.2.0]-hept-2-en-6ona	1	7	4	0
Verbenona	0	0	0	0
2-aza-biciclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona	0	2	0	0
1-cloro-3-(1-naftiloxi)-propan-2-ona	99	0	93	9
N-[4-(3-cloro-2-oxo-propiloxi)-fenil]acetamida	99	98	0	0
1-cloro-3-(ftalimidil)-propan-2-ona	68	0	0	0
Cis-biciclo[3.3.0]octan-3,7-diona	0	0	0	0
acetIl-ferroceno	0	0	0	0
1-fenyl-propan-1,2-diona	93	2	0	0
Colest-3-en-2-ona	0	0	0	0
4-cloro-etil-aceto-acetato	0	95	98	0

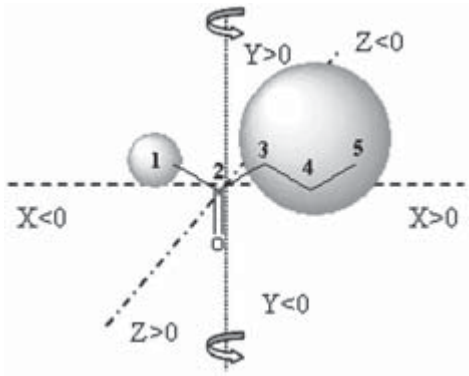


FIGURA 7. **Modelo de alineamiento de los confórmeros de mínima energía** de las cetonas de la Tabla 8 utilizados en el diseño del modelo CoMFA (26).

Una vez realizados los cálculos se obtienen los modelos CoMFA como los indicados, a modo de ejemplo, en la Figura 8. Este modelo puede considerarse como el complemento del centro activo desconocido de la ADH, cuya interpretación nos ayuda a explicar los resultados obtenidos en la Tabla 8.

En la Figura 8 se muestran los modelos CoMFA de *G. candidum* y *S. octosporus*. El código de colores es el que sigue: i) *Zonas de bajo impedimento estérico* (verde). Son zonas donde la presencia de restos químicos del sustrato favorece la interacción enzima-sustrato. ii) *Zonas de alto impedimento estérico* (amarillo). Son zonas donde la presencia de grupos en el sustrato disminuye la afinidad de la ADH por el sustrato. iii) *Zonas electrostáticas:* rojas, donde una elevada densidad electrónica favorece la interacción, y azules, donde una elevada densidad de carga negativa desfavorece la interacción (29).

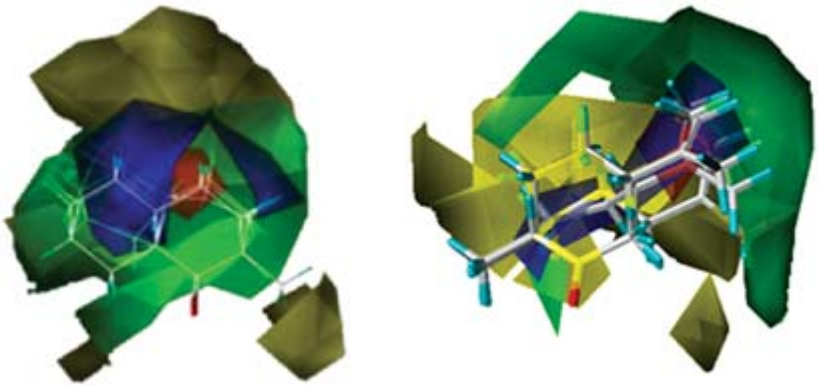
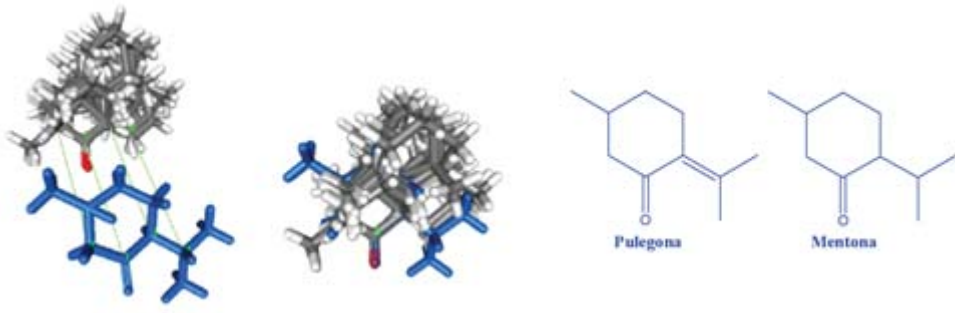


FIGURA 8. ***Modelos CoMFA de las ADHs de G. candidum* y *S. octosporus*.**

La principal ventaja de nuestra metodología para modelizar el centro activo de una enzima desconocida es que estamos ante un método puramente químico que permite predecir, sin conocer la estructura primaria de la enzima y sin siquiera haberla aislado. Por otro lado, nuestra metodología ha sido utilizada en el grupo del Dr. Reetz para sus estudios de evolución dirigida (32, 33). Finalmente los modelos CoMFA son predictivos como se demuestra por ejemplo en el caso de la reducción de la pulegona y de la mentona (28).

El alineamiento de los sustratos según el modelo (Figura 7) muestra que mientras la mentona se alinea perfectamente (Figura 9) y por eso se reduce en un 52% dando solo el mentol como alcohol predicho, la pulegona no se reduce. Ello se debe a que el doble enlace se coloca en la zona electrostática donde la presencia de alta densidad electrónica desfavorece el reconocimiento del sustrato por parte de la enzima como puede apreciarse en la figura.

Figura 9. ***CoMFA. Alineamiento de A) mentona y B) pulegona*** *en el modelo de ajuste de los sustratos seleccionados en el modelo CoMFA (29).*



Usando este modelo hemos podido explicar por ejemplo, los resultados de Ni y Yu (34) que indican que la acetofenona (50 mM) y la 2- bromo-acetofenona (2 mM) se reducen por *Rhodotorula* sp AS 2241 dando (*S*)-1-feniletanol (34,7% rendimiento, > 99.5% e.e) y (*R*)-2-bromo-1-feniletanol (20% rendimiento > 99% e.e.). Este y otros resultados indican una conservación evolutiva en el centro activo de las ADHs.

Hay muchas aplicaciones sintéticas de la reducción estereoselectiva de cetonas que tienen interés para la industria farmacéutica. Un ejemplo representativo es la reducción estereoselectiva de 3-halo-1-ariloxi 2-propanonas (35-37), precursores de los bloqueantes β-adrenérgicos.

La enantioselectividad depende del microorganismo y el rendimiento del estado fisiológico de las células. Los mejores resultados se obtuvieron con células en estado de no crecimiento como se muestra en la Tabla 9 mientras que las células liofilizadas no dieron actividad. Los mejores e.e. se obtuvieron con las levaduras *Y. lipolytica* y *P. mexicana,* así como con el hongo *D. grovesii*. Estos microorganismos conducen a mejores rendimientos y e.e. que la levadura de panadero de Sigma en las mismas condiciones experimenales (34, 36). *Y. lipolytica* CECT 1240 y *P. mexicana* CECT 11015 producen los enantiómeros opuestos con buenos rendimientos y e.e. Así *P. mexicana* conduce al isómero-*R* usado en la preparación del β-bloqueante adrenérgico de configuración *S* (activo farmacológicamente) mientras *Y. lipolytica* produce la *S*-halohidrona que daría el *R*-isómero del

bloqueante adrenérgico sin actividad farmacológica. Este resultado es muy interesante porque las ADHs siguen generalmente la regla de *Prelog* dando el alcohol-*S* y muy pocas ADHs dan el alcohol-R (*anti-Prelog*) como es el caso de *P. mexicana*.

Para facilitar el escalado del proceso, es necesaria la inmovilización de las células para una vez acabada la reacción separar el biocatalizador del medio de reacción por simple filtración. En esta línea se han inmovilizado algunas de las levaduras descubiertas por nosotros, activas en la reducción de halo-cetonas. La inmovilización se ha realizado por atrapamiento en agares o en agarosas, de distinto origen (38).

Más novedoso ha sido el desarrollo de una nueva metodología de inmovilización de hongos filamentosos en espumas de poliuretano (39). El proceso desarrollado es simple y se realiza sembrando esporas del hongo en una suspensión de la espuma previamente sumergida en el medio de cultivo. En la Figura 10 se muestra el aspecto de la espuma de poliuretano antes y después de la inmovilización del hongo *M. kaoliang*.

TABLA 9. ***Reducción de 1-cloro-3-(1-naftiloxi)-2-propanona usando diferentes microorganismos (35).***

Microorganismo	Condiciones de fermentación [a]		*Células en reposo* [b]			
	Rend. (%)	Enantiopre[d]	Rend. (%)	e.e.[c] (%)	Enantiopre[d]	e.e.[c] (%)
M. kaoliang	55	*R>S*	1	5	*R>S*	10
N. hiratsukae	39	*R>S*	6	10	*R>S*	90
Y. lipolytica CECT 1240	20	*S>>R*	99	87	*S>>>R*	99
P. mexicana CECT 11015	19	*R>>S*	85	85	*R>>>S*	95
S. bayanus CECT 1969	15	*R>S*	52	40	*R>>S*	87
S. cerevisiae (Type II)	12	*S>R*	70	30	*S>>R*	70
S. cerevisiae CECT 1317	13	*R>S*	70	27	*R>S*	71

[a] Reducciones fueron realizadas con células en crecimientos (48 hrs.).
[b] Reducciones fueron realizadas usando 0,19 mmol de sustrato y 4 g de sacarosa en 25 mL de medio reacción (0.1M tampón fosfato, pH 8.0). Incubaciones se realizaron a t 30º C durante 48 h.
[c] Conversion Molar y e.e. determinados por HPLC quiral.
[d] Configuración absoluta de la halohidrina fue determinada por el valor de la rotación específica.

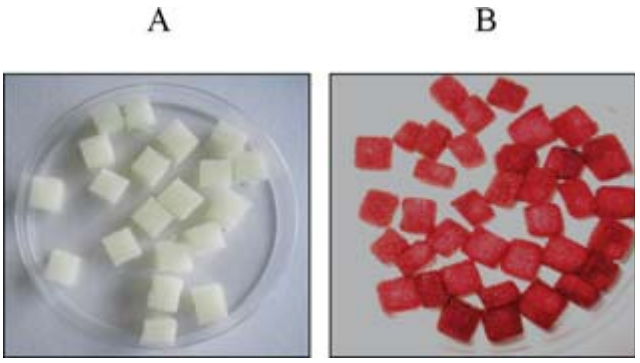


FIGURA 10. ***Espumas de poliuretano A) antes y B) después de la inmovilización del hongo M. kaoliang.***

Puede observarse claramente que la actividad del hongo inmovilizado en espumas de poliuretano es muy similar a las del hongo libre en estado de no crecimiento, por lo que se podría decir que las espumas de poliuretano constituyen un buen soporte para este hongo ya que el proceso de inmovilización no disminuye su actividad catalítica como ocurría en el caso del agar (39) (Figura 11).

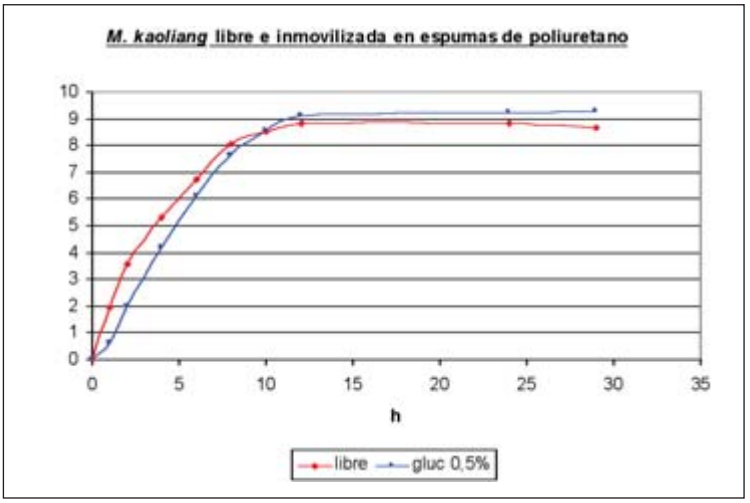


FIGURA 11. ***Comparación de la actividad de M. kaoliang libre e inmovilizado*** *en espumas de poliuretano en la reducción de ciclohexanona. Crecimiento del hongo 7 días. [ciclohexanona] = 10 mM, T = 28° C; 200 rpm., V = 100 ml tampón fosfato pH 6,5.*

Esto se debe atribuir a que el hongo está adherido a la superficie externa de las espuma y no presenta problemas difusionales por encontrarse expuesto directamente al medio de reacción como en el caso de las hifas libres en estado de no crecimiento, hecho que se pudo corroborar con las microfotografías de microscopía electrónica (Figura 12). Puede verse que las hifas del hongo se unen a la espuma de poliuretano. El hongo sigue manteniendo su capacidad reproductora como se deduce de la aparición de ascocarpios en este estado. Un aumento en el número de aumentos nos permite observar las ascas del ascomiceto a la izquierda sobre una parte de la espuma (Figura 12) y una cadena de conidios (Figura13), a la derecha del la foto en la parte superior.

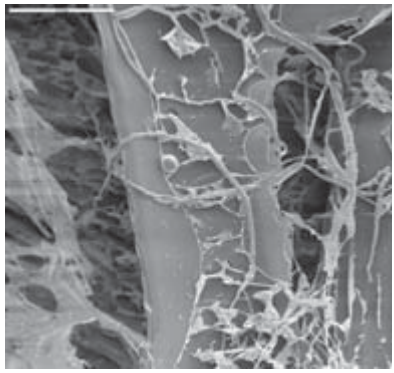


FIGURA 12. ***M. kaoliang* inmovilizado en espumas de poliuretano**. *Microfotografía electrónica de barrido a baja temperatura (500 aumentos).*

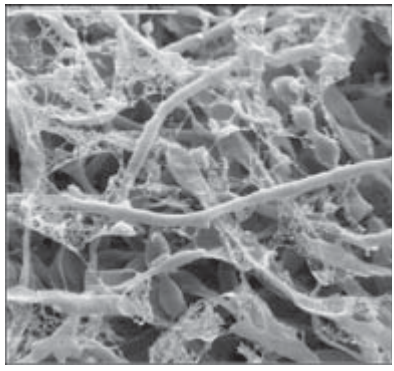


FIGURA 13. ***M. kaoliang* inmovilizado en espumas de poliuretano.** *Microfotografía electrónica de barrido de baja temperatura. (2.000 aumentos).*

Este catalizador es activo y puede ser reutilizado al menos 21 veces en la reducción de ciclohexanona usando *iso*-propanol como segundo sustrato para regenerar la coenzima NADH (Figura 14). Puede observarse que el catalizador obtenido es más activo y reutilizable que los obtenidos en agar o en agarosa al no presentar restricciones difusionales (39).

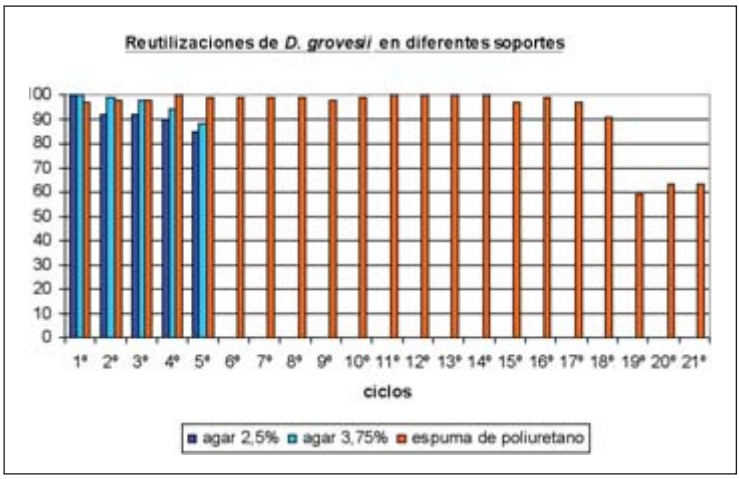


FIGURA 14. ***Reutilización de D. grovesii inmovilizado en diferentes soportes*** *en la reducción de cilohexanona. iso-PrOH como segundo sustrato.*

4.3. Oxidación de alcoholes utilizando alcohol deshidrogenadas.

La oxidación de alcoholes primarios y secundarios catalizada por deshidrogenasas para dar lugar a aldehídos o cetonas son reacciones que no aparecen con frecuencia en la bibliografía (40, 41) al contrario que las reacciones de reducción, ya que este tipo de reacciones no suelen presentar grandes problemas cuando se abordan por métodos tradicionales de Química Orgánica.

Las razones que han limitado hasta ahora el uso de las deshidrogenasas en el proceso han sido:

i) Las oxidaciones utilizando ADH NAD(P) dependientes son termodinámicamente desfavorables. Como consecuencia el reciclado

del cofactor se vuelve complicado, siendo esta la razón por la que la mayoría de los ensayos descritos en bibliografía se realizan con células enteras. Se encuentra descrito el uso de cepas de *Acetobacter* (40, 41) y *Gluconobacter* (42) entre otras.

ii) Debido a que los aldehídos o cetonas formados están unidos de un modo más fuerte a la zona hidrofóbica del sitio activo de la enzima que cualquier alcohol, la inhibición por acumulación de producto suele ser un fenómeno común en este tipo de reacciones (43).

iii) La oxidación de alcoholes normalmente transcurre de un modo más favorable a elevados pH. En estas condiciones los cofactores y los productos (particularmente los aldehídos) son inestables.

Dentro de una colaboración con el grupo del Dr. Molinari hemos llevado a cabo la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos sin producción de ácidos carboxílicos (44, 45). Como ejemplo diremos que se han obteniendo conversiones de 2-feniletanol en 2-fenilacetaldehído próximas al 60% empleando células de *Acetobacter aceti* inmovilizadas en agarosa y en poliacrilamida (45).

La oxidación de alcoholes secundarios racémicos con fines de lograr la desracemización se ha realizado con una serie de microorganismos descritos por el grupo por primera vez (Tabla 10). En esta tabla se comparan los resultados obtenidos con los microorganismos en las condiciones de crecimiento y reposo y con las células liofilizadas.

TABLA 10. ***Actividad comparada de los microorganismos seleccionados****, en diferentes estados fisiológicos (46).*

Microorganismo	**Código**	**Ferment. (% X)**	**No Crecim. (% X)**	**Liofilizada (% X)**
Williopsis californica	CBS 2158	94	74	12
Williopsis saturnus	NCYC 23	78	50	15
Fellomyces sp.	CBS 8616	61	41	9
Pachysolen tannophilus	NCYC 1597	60	53	13
Kluyveromyces lactis	CBS 2896	56	28	6
Arthroascus fermentans	CBS 7830	56	36	11
Tetracladium setigerum	IMI 94061	23	15	4
Coniochaeta velutina	CBS 981.68	23	20	9

Puede observarse que las células liofilizadas no son activas en el proceso. Esto puede deberse a que el periodo de liofilización empleado de 72 horas es demasiado largo como para mantener la estructura de las enzimas red-ox intracelulares de nuestros microorganismos. Otra posibilidad es que dado que el paso limitante de la velocidad de reacción es el transporte a través de las membranas (39), la liofilización debe alterar las membranas de manera notable limitando el proceso de difusión del ciclohexanol o del oxigeno encargado de regenerar el NAD(P)+ (47, 48).

Las células en estado de no crecimiento conducen a menores rendimientos en cetona aislada (previa extracción del medio con acetato de etilo) que el proceso realizado con las células en estado de crecimiento. Los mejores resultados de oxidación se consiguieron con levaduras del género *Williopsis*, lo que resulta de gran interés ya que esta capacidad de oxidar alcoholes, en el caso del género *Williopsis*, no aparece descrita en la bibliografía hasta nuestro trabajo (46). Las únicas cepas con las que se consiguieron al menos 50% de conversión de substrato en condiciones de reposo son *W. californica; W. saturnus y P. tannophilus*. Estas levaduras se inmovilizaron en cuatro soportes por diferentes métodos inmovilización (49):

a) método de atrapamiento en geles: soportes ensayados, agar de *Pterocladia* A27/03 (2.5% p/v y 3.75% p/v); y poliacrilamida 15% p/v,

b) método de adsorción: soporte ensayado, espumas de poliuretano,

c) método de enlace covalente: soporte ensayado, resina Lewatit.

Cabe destacar que con los soportes, espumas de poliuretano y resina Lewatit, no se obtuvieron resultados satisfactorios en el proceso de inmovilización de estas levaduras. En la Tabla 11 se muestran de manera comparativa los resultados obtenidos para la reacción de oxidación de ciclohexanol.

En esta tabla se puede observar en todos los casos que los derivados inmovilizados requieren tiempos largos de reacción comparados con las células libres recogidas a 48 horas. Esto indica una clara influencia del proceso de inmovilización en la actividad catalítica del microorganismo.

TABLA 11. ***Influencia del soporte en la productividad.*** *T = 28º C, 200 rpm.*

Levadura	Estado	T_{ind} h	[células][a] 10^6 cel/ml	T_{max}[b] h	X_{max} %	Carga[c] 10^6 cel/ gcat	Prod* 10^{*6} mM/(h . millón cell)
	Fermentación	0	1.374	96	99		1,50
	No crecimiento	0	1.346	131	89		1,01
P. tennophilus	Agar 2,5%	0	1.502	262	73	1.679	0,37
	Agar 3,75%	0	1.384	355	75	1.682	0,31
	Poliacrilamida 15%	30	1.554	468	83	1.746	0,23
	Fermentación	0	1.431	96	99		1,44
	No crecimiento	0	1.185	38	82		3,64
W. saturnus	Agar 2,5%	0	1.502	206	72	1.725	0,47
	Agar 3,75%	0	1.346	247	61	1.641	0,37
	Poliacrilamida 15%	30	1.521	433	100	1.691	0,30
	Fermentación	0	1 256	120	99		1,32
	No crecimiento	0	1 124	145	95		1,17
W. californica	Agar 2,5%	0	1 549	196	71	1.808	0,47
	Agar 3,75%	0	1 426	280	71	1.743	0,36
	Poliacrilamida 15%	0	1 658	637	32	1.863	0,06

[a] Concentración de células del cultivo.
[b] Tiempo al que se alcanza la máxima conversión.
[c] carga del catalizador expresada en 10^6 cel/g. cat húmedo.

A fin de comparar la actividad específica de los catalizadores inmovilizados con la obtenida con las células en condiciones fermentativas o de «no crecimiento» se determinaron los valores de productividad (P). En todos los casos al aumentar la concentración de agar (mayor reticulación), la productividad disminuye debido a que aumenta el tiempo de reacción. No obstante, las conversiones obtenidas son similares o ligeramente inferiores en el caso del agar (3,75%) comparadas con el agar (2,5%).

La inmovilización en poliacrilamida conduce a catalizadores activos en el caso de *P. tannophilus* y *W. saturnus*, aunque necesitan de tiempos de inducción (30 horas) para iniciar la biotransformación. Se alcanzan buenas conversiones y sus productividades son similares a las obtenidas con agar de *Pterocladia* (A27/03) (Figu-

ra 13), sin embargo, sus tiempos de reacción son muy elevados, lo que la hace poco interesante como soporte para estas levaduras (49).

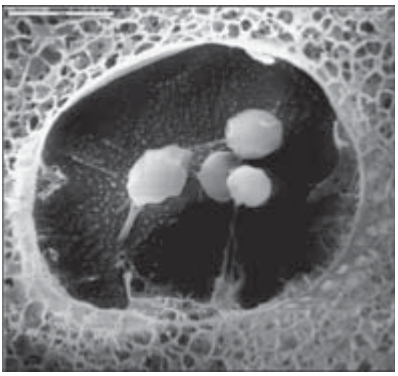


FIGURA 13. ***Williopsis californica* inmovilizada en agar de *Pterocladia*.** *Microfotografia electrónica de barrido a baja temperatura (5.000 aumentos).*

En el caso de *W. californica*, donde la ADH parece ser menos abundante en condiciones estacionarias que en las otras cepas, es el microorganismo más sensible a este proceso de inmovilización, así tenemos que es el único que no presenta tiempo de inducción al estar inmovilizado en poliacrilamida, sin embargo, la conversión es muy baja (32%) a pesar de la gran cantidad de biomasa. Esto quizás deba atribuirse a una destrucción de la ADH intracelular por efecto de la polimerización radicálica.

5. LAS BIOTRANSFORMACIONES DENTRO DE LA QUÍMICA SOSTENIBLE Y SU IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

Las diversas formas de contaminación ambiental, así como los graves accidentes ocurridos en diversas plantas químicas de todo el mundo han creado una conciencia de que la Química es generadora de contaminación lo cual ha ocasionado un rechazo de la misma que se muestra además en la disminución del interés de los alumnos universitarios por los estudios de Química en todas su vertientes. Este sentimiento *anti*-Química es más bien visceral pues en un diálogo social más reposado es evidente la percepción positiva de los

grandes beneficios originados por la Química en el campo del diseño de fármacos, de nuevos materiales e incluso en la lucha contra la contaminación producida por otras industrias distintas de la Química como son la del automóvil, las centrales térmicas, la polución debida al aumento de las ciudades, etc.

Todo lo expuesto hizo que a principios de los años setenta del siglo pasado una serie de investigadores en USA y en UK inicialmente (51, 52) y más tarde en Italia (53), España (54), etc. hayan desarrollado un cuerpo de doctrina que ya ha cristalizado tanto en aspectos de desarrollo de nuevas metodologías de síntesis respetuosas con el medio ambiente como en el diseño de las nuevas plantas industriales (55, 56) y que ha sido recogido por las autoridades de la UE, tan sensibilizadas a los problemas medioambientales por sus opiniones públicas, en una serie de normativas de obligado cumplimiento relacionadas con la regulación en el manejo y utilización de los productos químicos reflejadas en las normativas REACH, VOC, SEVESO. Este cuerpo de doctrina se resume en los doce principios de la Química Sostenible (54) cuya aplicación a la síntesis química va a revolucionar el desarrollo futuro de la síntesis orgánica así como su forma de explicarla y su desarrollo industrial tanto en la Industria Farmacéutica como en la de la Química Fina.

Es bien conocido que a pesar del pequeño tonelaje de las plantas que se dedican a la producción de intermedios de síntesis o de fármacos, son las industrias más contaminantes, estimándose que por cada kilogramo de producto acabado, la Industria Farmacéutica produce 200 kg de residuos potencialmente contaminantes (55). De ellos la parte principal lo constituyen los disolventes usados en la síntesis. La moderna normativa de la UE hace que ya la Industria Farmacéutica deba abandonar, para cumplir las nuevas normativas legales de la UE (REACH, VOC) haya de abandonar disolventes tan utilizados en la síntesis orgánica tradicional como son el CH_2Cl_2 (hepatotóxico y poco biodegradable), el hexano (inflamable) etc. así como los catalizadores tradicionales basados en metales de transición de difícil eliminación del medio ambiente. Los disolventes deberán ser sustituidos por disolventes no contaminantes o derivados de fuentes renovables (49-51) y los catalizadores metálicos por otras más eficaces y menos contaminantes como son los biocatalizadores —enzimas o células— más selectivos y eficaces que aquéllos.

De todo lo dicho anteriormente puede deducirse la importancia de la Biocatálisis así como de las Biotransformaciones encontrando un amplio campo de acción en la Industria Farmacéutica. Por tanto una de las mayores aportaciones que se espera de la utilización de enzimas y células es que ayude a reducir el impacto de la industria en el medio ambiente, consiguiendo que los procesos industriales sean mucho más eco-eficientes.

En esta línea es donde se enmarca el trabajo de investigación que se desarrolla en el Grupo de Biotransformaciones (con mención de la calidad en la CAM). Para ello no solo hemos trabajado en la investigación aplicada sino que también nos hemos implicado en el campo de la docencia participando en el Doctorado de Calidad Interunversitario de Química Sostenible y en el Master del mismo nombre y en la transferencia de tecnología a las pequeñas y medianas empresas españolas través del Servicio de Biotransformaciones Industriales del Parque Científico de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer de manera muy especial a los doctores que se han formado en el grupo, alumnos colaboradores y alumnos internos la labor realizada, ya que ellos son los artífices de que se lograran muchas veces los objetivos propuestos. Asimismo desean agradecer las colaboraciones que el Grupo de Biotransformaciones ha tenido por parte de investigadores de otros laboratorios como del Instituto de Catálisis, Instituto de Biomedicina (CSIC), Facultad de Ciencias (UAB), Facultad de Ciencias (UAM), Facultad de Ciencias (Universidad de Salamanca), Facultad de Farmacia (UCM) etc., que han permitido desarrollar nuevas líneas de trabajo y abrir nuevos campos de investigación.

5. REFERENCIAS

(1) Bott, P.D. (2004) Features, attributes and technology impact in Pharmaceutical Industry of Biotechnology. *Green Chemical Technology*. Edited by Crystal Faraday Partnership. 165-189 Railway Terrace, Rugby, CV21 2HQ, UK.

(2) Condezo, L.A.; Fernández-Lucas, J. y Sinisterra, J.V. Procedimiento para síntesis de nucleósidos mediante la utilización de microorganismos psicrofilos y psicrotrofos. Patente Española, solicitud P200400817, PCT/ES2005/00166.

(3) HAKI, G.D. AND RAKSHIT, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89: 17–34.
(4) DOMINGUEZ DE MARÍA, P.; XENAKIS, A. AND SINISTERRA, J.V. (2004) *Enz. Microb. Technol*. 35: 277-283.
(5) RAMOS MARTÍNEZ, J.; SINISTERRA, J.V. AND SÁNCHEZ-MONTERO, J.M. (2003) Esterification and transesterificacion catalysed by lipases of thermophilic microorganisms using liquid ionic as solvent. 9 th FECS Conference and 2nd SFC meeting on Chemistry and theEnvironment.Behaviour of Chemicals in the Environment. Olomouc (República Checa).
(6) RÚA, M.L.; DÍAZ-MAURIÑO, T., FERNANDEZ, V.M.; OTERO, C. Y BALLESTEROS, A. (1993) Purificación and Characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1078: 181-189.
(7) HERNAIZ, M.J.; SANCHEZ-MONTERO, J.M. Y SINISTERRA, J.V. (1997) New Differences between Isoenzymes A and B from *Candida rugosa* Lipase. *Biothechnology Letters*. 19: 303-306.
(8) CHAMORRO, S.A.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; ALCÁNTARA, A.R. AND SINISTERRA J.V. (1998) Treatment of *Candida rugosa* Lipase with short-chain polar organic solvents enhances its hydrolytic and synthetic activities**.** *Biotechnology Letters*. 5: 499-505.
(9) CHAMORRO, S.; ALCÁNTARA, A.R.; DE LA CASA, R.M.; SINISTERRA J.V. AND. SANCHEZ-MONTERO J.M. (2001) Small Water Amounts Increase the Catalytic Behaviour of Polar Organic Solvents Pretreated *Candida rugosa* Lipase. *Journal Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 11: 939-947.
(10) CÁRDENAS, F.; ÁLVAREZ, E.; DE CASTRO-ÁLVAREZ, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W. AND SINISTERRA J.V. (2001) Screening and Catalytic activity in Organic Synthesis of Novel Fungal and Yeast Crude Lipases. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*. 14: 11-123.
(11) CÁRDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M S.; ELSON, E. AND ÁLVAREZ, E. (2001) Screening of Lipase Producing Microorganisms and Prelyminary Characterisation of the Lipases in Organic Reactions. *Enzyme an*d *Microbial Technology*. 28: 145-154.
(12) SÁNCHEZ, A.; FERRER, P.; SERRANO, A.; VALERO, F., SOLÀ, C.; PERNAS, M.; RÚA, M.L.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M.; DE LA CASA, R.M.; SINISTERRA, J.V. AND SÁNCHEZ- MONTERO, J.M. (1999) A Controlled Fed-Batch Cultivation for the Production of New Crude Lipases from Candida Rugosa with Improved Properties in Fine Chemistry. *Journal of Biotechnology*. 69: 169-182.
(13) DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P.; ALCÁNTARA, A.R.; CARBALLEIRA, J.D.; DE LA CASA, R.M.; GARCÍA-BURGOS, C.A.; HERNÁIZ, M.J.; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M. AND SINISTERRA, J.V. (2006) Candida rugosa lipase: A traditional and complex biocatalyst. *Current Organic Chemistry*. 10: 1053-1066.
(14) DOMINGUEZ DE MARIA, P.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA J.V. AND ALCÁNTARA. A.R. (2006) Understanding *C. rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol. Advances*. 24: 180-196.
(15) HERNAIZ, M.J.; SANCHEZ-MONTERO J.M. AND SINISTERRA. J.V. (1999) Modification of Purified Lipases from *Candida rugosa* with Polyethylene Glycol: A Systematic Study. *Enzyme Microbial Technology*. 24: 182-190.

(16) Alcántara, A.R.; Sanchez-Montero, J.M. and Sinisterra J.V. (2000) Chemoenzymatic Preparation of Enantiomerically Pure S(+)-2-Arylpropionic Acids with Anti-Inflammatory ActivityStereoselective Biocatalysis, Ed. Marcel Dekker. Inc. Chapter 22: 659-702.
(17) Hunt, N.T.; Kattner, L.; Shanks, R.P. and Wynne, K. The Dynamics of Water-Protein Interaction Studied by Ultrafast Optical Kerr-Effect Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 2007-2031.
(18) Dominguez de Maria, P.; Alcántara, A.R,; Carballeira, J.D.; de la Casa, R.M.; Garcia-Burgos, C.; Hernaiz, M.J.; Sánchez-Montero, J.M. and Sinisterra, J.V. (2006) *Candida rugosa* lipase: A traditional and complex biocatalyst. *Current Organic Chemistry*. 10: 1053-1066.
(19) Arroyo, M.; Sanchez-Montero, J.M. and Sinisterra J.V. (1999) Thermal Stabilization of Immobilized Lipase B from *Candida antarctica* on Different Supports: Effect of Water Activity on Enzymatic Activity in Organic Media. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 3-12.
(20) Sánchez-Montero, J.M.; Hamon, V.; Thomas, D. and Legoy, M.D. (1991) Modulation of lipase hydrolysis and synthesis reactions using carbohydrates. *Biochim. Biophys. Acta*. 1078: 345-350.
(21) De La Casa, R.; Guisán, J.M., Sanchez-Montero, J.M. and Sinisterra. J.V. (2002) Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans. *Enzyme Microbial Technology*. 30: 30-40.
(22) Martinez, M.C.; Sanchez-Montero, J.M.; Sinisterra J.V. y Ballesteros, A. (1990) New Insolubilized Derivatives of Ribonuclease and Endonuclease for Elimination of Nucleic Acids in Single Cell Protein Concentrates (S.C.P.) *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 12: 643-652.
(23) Utagawa, T. (1999) Enzymatic preparation of nucleoside antibiotics. Review. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 6: 215-222.
(24) Yokozeki, K. and Tsuji, T. (2000) A novel enzymatic method for the production of purine 2'-deoxyribonucleosides. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 10: 200-213.
(25) Trilles, J.A.; Fernandez-Lucas, J.; Condezo, L.A. and Sinisterra, J.V. (2004) Nucleoside synthesis by immobilised bacterial whole cells. *J. Mol. Catal. B. Enzymatic* 35: 219- 227.
(26) Carballeira, J.D.; Alvarez, E.; Campillo, M.; Pardo, L. and Sinisterra, J.V. (2004) *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018, a new whole cell biocatalyst stereoselective reduction of ketones. *Tetrahedron Asymmetry*. 15: 951-962.
(27) Carballeira, J.V.; Alvarez, E. and Sinisterra, J.V. (2004) Biotransformation of cyclohexanone using *Geotrichum candidum* NCYC49. Factors affecting the selectivity of the process. *J. Mol .Catal. B: Enzymatic*. 28: 25-32.
(28) Carballeira, J.D.; Valmaseda, M.; Alvarez, E. and Sinisterra, J.V. (2004) *Gongronella butleri, Schizosaccharomyces octosporus; Diplogelasinospora grovesii:* Novel microorganisms useful for the stereoselective reduction of ketones. *Enzyme Microbial Technology*. 34: 611-623.
(29) Carballeira, J.D.; Alvarez, E. and Sinisterra, J.V. (2006). 3D-QSAR/CoMFA Models as a tool for Biocatalysis and protein engineering. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 20: 173-181.

(30) CARBALLEIRA, J.D.; QUEZADA, V.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA J.V. (2004) High throughput screening and QSAR-3D/CoMFA: Useful tools to design predictive models of substrate specificity for biocatalysts. *Molecules*. 9: 673-693.
(31) CRAMER, R.D.; BUNCE, J.D. Y PATTERSON D.E. (1988) Crossvalidation, bootstrapping and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies. *Quant. Struct.-Act. Relat*. b. 7: 18-25.
(32) CORNELL, W. D.; CIEPLAK, P.; BAYLY, C.; GOULD, I.R.; MERZ, K.M.; FERGUSON, D.M.; SPELLMEYER, D.C.; FOX, T.; CALDWELL, J.W. Y KOLLMAN P.A. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc*. 117: 5179-5197.
(33) REETZ, M. T. (2004) Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: Practical and theoretical ramifications. PAS 101: 5716-5722.
(34) NI, Y. AND XU, J.H. (2002) Asymmetric reduction of aryl ketones with a new isolate *Rhodotorula* sp AS.2241. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*. 18: 233-241.
(35) MARTINEZ-LAGOS, F. Y SINISTERRA, J.V. (2005) Enantioselective production of halohydrin precursor of propranolol catalysed by immobilized yeasts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 36: 17.
(36) MARTINEZ-LAGOS, F.; CARBALLEIRA, J.D.; BERMUDEZ, J.L.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA, J.V. (2004) Highly stereoselective reduction of haloketones using three new yeasts: application to the synthesis of (*S*) — adrenergic β-blockers related to propranolol. *Tetrahedron Asymmetry*. 15: 763-770.
(37) MARTINEZ-LAGOS, F.; DEL CAMPO, C.; LLAMA, E. AND SINISTERRA J.V. (2002) New yeast strains for enantioselective production of Halohydrine precursor of (*S*)-Propranolol. *Enzyme & Microb. Technol*. 30: 895-901.
(38) MARTINEZ-LAGOS, F. AND SINISTERRA. J.V. (2005) Enantioselective production of halohydrin precursor of propranolol catalysed by immobilised yeasts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 36: 1-7.
(39) QUEZADA, M.A. (2006) Reacciones estereoselectivas de reducción de cetonas y de oxidación de alcoholes empleando células enteras inmovilizadas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense Madrid.
(40) LEON, R.; PRAZERES, D.M.F.; MOLINARI, F. AND CABRAL, J.M.S. (2002) Microbial Stereoselective Oxidation of 2-methyl-1,3-propanediol to (R)-g-hydroxyisobutyric Acid in Aqueous/organic Biphasic Systems. *Biocatalysis & Biotransformation*. 20: 201-207.
(41) ROMANO, A.; GANDOLFI, R.; NITTI, P.; ROLLINI, M. AND MOLINARI, F. (2002) Acetic acid bacteria as enantioselective biocatalysts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 17: 235-240.
(42) VILLA, R.; ROMANO, A.; GANDOLFI, R.; SINISTERRA, J.V. AND MOLINARI, F. (2002) Chemoselective oxidation of primary alcohols to aldehydes with Gluconobacter oxydans. *Tetrahedron Letters*. 43: 6059-6061.
(43) LEMIÈRE; G.L.; LEPOIVRE, J.A. AND ALDERWEIRELDT, F.C. (1985) HLAD-catalyzed oxidations of alcohols with acetaldehyde as a coenzyme recycling substrate. *Tetrahedron Lett*. 26: 4527-4528.
(44) VILLA, R.; ROMANO, A.; GANDOLFI, R.; SINISTERRA, J. V. AND MOLINARI, F. (2002) Chemoselective oxidation of primary alcohols to aldehydes with *Gluconobacter oxydans. Tetrahedron Letters*. 43: 6059-6061.

(45) GANDOLFI, A.; BORROMETI, A.; ROMANO, A.; SINISTERRA, J. V. AND MOLINARI F. (2002) Enantioselective oxidation of (±)-2-phenyl-1-propanol to (S)-2-phenyl-1-propionic acid with *Acetobacter aceti:* influence of medium engineering and immobilization. *Tetrahedron Asymmetry.* 13: 2345-2349.
(46) CARBALLEIRA, J.D.; GARCÍA-BURGOS, C.; QUEZADA, M.A.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA. J.V. (2004) *Williopsis californica, Williopsis saturnus and Pachisoloen tannophilus* : Novel microorganisms for stereoselective oxidation of secondary alcohols. *Biotechnol. Bioeng*. 87: 632-640.
(47) QUINTANA, M.G. AND DALTON, H. (1998) Production of toluene *cis*-diol by immobilized *Pseudomonas putida* UV4 cells in barium alginate beads. *Enz. Microb. Technol.* 22: 713-720.
(48) HUANG, J.; HOOIJMANS, C.M.; BRIASCO, C.A.; GERAATS, S.G.M.; LUYBEN, K.; CH, A.M.; THOMAS, D. AND BARBOTIN, N. (1990) Effect of free-cell growth parameters on oxygen concentration profiles in gel-immobilized recombinant *Escherichia coli*. *Enz. Microb. Technol*. 33: 619-623.
(49) CARBALLEIRA, J.D.; GARCIA-BURGOS, C.A.; QUEZADA, M.A.; ALVAREZ, E. AND SINISTERRA, J.V. (2006) Immobilized derivatives of *Wiliopsis californica, Williopsis saturnus, Pachisolen tannophilus*: New biocatalysts useful in the streoselective oxidation of 1-tetralol. *Enzyme Microb. Technol*. 39: 949-957.
(50) INFORME AFAQUIM-SOLVSAFE elaborado para la UE, 2005.
(51) ANASTAS, P.T. AND WILLIAMS, T.C. EDS. (1998) «*Green Chemistry Frontiers in Begin Chemica*l *Synthesis and processes*» Oxford University Press, Oxford.
(52) ANASTAS; P.T.; HEINE, L.G. AND WILLIAMS T.C. EDS. (2000) «*Green chemical syntheses an*d *processes*» ACS Symposium Series 767, American Chemical Society.
(53) TUNDO, P. AND ANASTAS, P.T. EDS. (2000) «*Green Chemistry, challenging perspectives*» Oxford University Press, Oxford.
(54) MESTRES, R. (2003) Hacia la calidad ambiental a través de la Química. *An. Quim*. 99: 58-65.
(55) CLARK, J. AND MACQUARRIE, D. EDS. (2002) «*Handbook of Greenn chemistry and Technology*2 Blackwell Publishing Oxford.
(56) AGUADO, J. AND SERRANO, D. EDS. (1999) «*Feedstock recycling of plastics wastes*» The Royal Society of Chemistry.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1237-1264

Artículo original

Androesterilidad inducida mediante ingeniería genética en plantas: fundamentos y aplicaciones biotecnológicas

Recibido el 3 de octubre de 2007

JOSÉ-PÍO BELTRÁN* , EDELÍN ROQUE, MÓNICA MEDINA, FRANCISCO MADUEÑO, MARÍA DOLORES GÓMEZ, LUIS ANTONIO CAÑAS.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Laboratorio de Biología del Desarrollo Floral. Campus de la Universidad Politécnica de Valencia.

RESUMEN

La disponibilidad de genotipos de plantas androestériles es crucial para la obtención de semillas híbridas y abre la posibilidad del manejo de las plantas de forma más respetuosa con el medio ambiente. Nosotros hemos desarrollado herramientas biotecnológicas para la producción de plantas androestériles de interés agronómico (tomate, colza, tabaco) mediante el uso de la región promotora del gen *PsEND1* de guisante para dirigir la expresión de agentes citotóxicos específicamente a los tejidos estructurales de las anteras para producir su ablación genética. En las plantas androestériles obtenidas mediante ingeniería genética, hemos observado que se produce un mayor número de ramas y consecuentemente una mayor producción de flores. Además, la vida útil de estas plantas se prolonga de forma notable. Estas características son de interés para el sector de la floricultura, ya que actualmente se están produciendo híbridos mediante mejora convencional con flores muy vistosas y colores novedosos, pero con escasa producción de flores por

* Información de contacto:
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV). Laboratorio de Biología del Desarrollo Floral. Campus de la Universidad Politécnica de Valencia. Ciudad Politécnica de la Innovación. Avda. Ingeniero Fausto Elio, s/n. 46022-Valencia. España. Teléfono: + 34 96 387 78 70. Fax: +34 96 387 78 59
e-mail: jbeltran@ibmcp.upv.es

planta. Por otra parte, la introducción en la planta modificada genéticamente de un gen que le confiera androesterilidad, es otra característica deseable en el campo de las plantas ornamentales ya que evitaría la transferencia horizontal de transgenes al medio ambiente y a especies sexualmente compatibles.

Palabras clave: vigor híbrido, transferencia horizontal de genes, arquitectura de las plantas, *PsEND1,* barnasa.

ABSTRACT
Male-sterility obtained by genetic engineering: principles and biotechnological applications

The availability of male-sterile plant varieties is relevant for obtaining of hybrid plant lines which are more vigorous than the corresponding parental pure lines because the phenomenon known as heterosis. Moreover, the use of male-sterile plants prevents undesirable horizontal gene transfer. We have developed biotechnological tools to obtain androsteryle lines of plants with agronomic interest such as tomato, tobacco, rape seed and wheat. This is accomplished by the use of the promoter region of the *PsEND1* gene to drive the expression of cytotoxic agents, such as barnase, to the structural tissues of the anthers. The male-sterile transgenic plants obtained live longer and show a higher number of branches and flowers than the corresponding wild type plants. This will allow plant breeders to incorporate those valuable characteristics to increase the number of flowers of plants already displaying new colours, shapes and fragrances. These new ornamental plants are environmental friendly since horizontal gene transfer can not take place.

Key words: Hybrid vigor, horizontal gene transfer, plant architecture, *PsEND1,* barnasa.

INTRODUCCIÓN

Los estambres son los órganos reproductivos masculinos de las plantas con flores (Angiospermas). Se componen de una antera y de un filamento por el que se unen a la base de la flor. El proceso de diferenciación de la antera y liberación del polen está muy conservado entre las Angiospermas. Dicho proceso ocurre en un orden preciso y cronológico que se correlaciona con el tamaño de la yema floral y que está finamente regulado a nivel genético (30, 20, 11).

La disponibilidad de genotipos de plantas androestériles es crucial para la obtención de semillas híbridas y abre la posibilidad del

manejo de las plantas de forma más respetuosa con el medio ambiente. En algunos cultivos, el uso de plantas androestériles evitaría la contaminación por polen o la transferencia horizontal de genes entre especies compatibles. Esta característica sería de gran interés en el caso de plantas modificadas genéticamente ya que evitaría la dispersión de los transgenes entre especies relacionadas. Nosotros hemos desarrollado herramientas biotecnológicas para la producción de plantas androestériles de interés agronómico mediante el uso de la región promotora del gen *PsEND1* de guisante para dirigir la expresión de agentes citotóxicos específicamente a los tejidos estructurales de las anteras (12, 13, 27). En las plantas androestériles obtenidas mediante ingeniería genética, hemos observado que se produce un mayor número de ramas y consecuentemente una mayor producción de flores que en las correspondientes plantas silvestres. Además, la vida útil de estas plantas se prolonga de forma notable (4).

La ablación de anteras producida mediante transformación genética con genes citotóxicos que se expresan únicamente en dichos órganos, utilizando promotores específicos de algún tejido estaminal, ha permitido obtener plantas transgénicas androestériles y plantas transgénicas con androfertilidad restaurada en especies de importancia agronómica como maíz, colza o trigo (34). La ablación genética se basa en la inducción de la muerte celular mediante la expresión de cualquier enzima que sea capaz de destruir la integridad celular como proteasas, lipasas y RNasas. Los mismos resultados se pueden obtener expresando sustancias tóxicas para las células, por ejemplo, péptidos que inactivan los ribosomas como hace la cadena A de la toxina (DT-A) de *Corynebacterium diphteriae* (6). También es posible la ablación de flores completas en plantas transgénicas en las que el gen que codifica la DT-A se expresa bajo el control del promotor del gen *LEAFY* (25). Se han desarrollado métodos que no destruyen el tejido directamente, sino que dan lugar a células susceptibles a agentes ablativos específicos. Un ejemplo de esta estrategia es el uso de RNA «antisentido» de un gen que confiere tolerancia a un herbicida (8). El efecto del RNA «en antisentido» es eliminar la resistencia química de forma específica en polen, para que la aplicación del herbicida produzca la destrucción del mismo. Este método convierte a un herbicida en un gametocida. Para obte-

ner una eficiente ablación genética es crucial disponer de un gen citotóxico que actúe sólo allí donde se exprese y de un promotor apropiado que controle la expresión espacio-temporal del gen citotóxico. Los genes que se expresan exclusivamente en los órganos reproductivos de la flor (estambres y carpelos) son particularmente apropiados ya que sus promotores serían, potencialmente, capaces de dirigir la expresión de genes citotóxicos hacia dichos órganos y provocar esterilidad masculina o femenina en la flor. Los promotores que se seleccionen para expresar agentes tóxicos o degenerativos del tejido deben ser promotores suficientemente activos y específicos de las células diana. Si la diana celular es tejido tapetal, el promotor debe ser activo tempranamente para impedir su desarrollo antes de que las microsporas sean independientes del soporte del *tapetum*. Además, el promotor debe de actuar antes de la segregación meiótica para impedir la ausencia de actividad degenerativa en parte de las microsporas.

La primera estrategia de ablación diseñada para producir androesterilidad fue propuesta por Mariani *et al.* (22). El promotor del gen *TA29* de tabaco, específico de *tapetum*, se usó para dirigir la expresión de dos RNasas (RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* y barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens*) en tabaco y *Brassica napus*. Las anteras transgénicas androestériles que se obtuvieron carecían de *tapetum* y sus sacos polínicos carecían de microsporas o granos de polen. La construcción *TA29-barnasa* se fusionó al gen *bar*, un gen que confiere tolerancia al herbicida glufosinato amónico, para poder seleccionar las plantas androestériles en una población. La aplicación del herbicida a la progenie del cruce elimina las plantas fértiles masculinas e incrementa así la eficiencia con la que las plantas estériles pueden aislarse. Estas plantas transgénicas no serían más apropiadas que los mutantes espontáneos si no existiera la posibilidad de revertir la androesterilidad. Mariani *et al.* (23) resolvieron este problema mediante la producción de plantas transgénicas con una construcción que contenía el gen inhibidor de la ribonucleasa barnasa (*barstar*) bajo el control del promotor *TA29*. Las plantas *TA29-barstar* actúan como una línea restauradora y cuando se cruzan con plantas transformadas con la construcción *TA29-barnasa* se obtienen plantas androfértiles. Para producir semillas híbridas en cantidad suficiente es necesario propagar la línea femenina. Aunque

es posible producir muchas plantas androestériles a través de propagación *in vitro*, también se podría utilizar una estrategia basada en unir el gen ablativo a un gen que confiera resistencia a un herbicida (23). Después de cruzar la línea androestéril con una línea isogénica y fértil, las plantas que no han heredado la esterilidad se pueden eliminar por tratamiento con el herbicida. La restauración de la fertilidad en plantas híbridas puede conseguirse cruzándolas con líneas transgénicas que expresen un inhibidor específico del enzima tóxico causante de la androesterilidad, como es el caso del gen *barstar* cuyo producto inhibe la acción de la barnasa (23) o un RNA «en antisentido» del gen letal usado (31).

Por otra parte, la industria de la floricultura se esfuerza por conseguir variedades nuevas de plantas ornamentales con características mejoradas que van desde la resistencia frente a patógenos a la modificación de la arquitectura de la planta, incluyendo la arquitectura floral (inflorescencias alteradas) o modificaciones en el color y en el número de flores. Las técnicas clásicas de mejora van dirigidas al cruce de plantas con características deseables para obtener híbridos que incorporen dichas características, o al empleo de hormonas para alterar el fenotipo de la planta. Sin embargo, la tecnología del DNA recombinante se ha convertido en la estrategia alternativa a la mejora clásica para desarrollar plantas con un fenotipo alterado y que presenten determinadas características mejoradas, incluyendo la modificación de la arquitectura de la inflorescencia para producir un mayor número de ramas que a su vez produzcan un mayor número de flores. Por otra parte, la introducción en la planta modificada genéticamente de un gen que le confiera androesterilidad, es una característica deseable en el campo de las plantas ornamentales ya que evitaría la transferencia horizontal de transgenes al medio ambiente y a especies sexualmente compatibles.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivo de plantas en cámara e invernadero

Las especies vegetales empleadas en este trabajo fueron: *Arabidopsis thaliana* cv. Columbia (Nottingham *Arabidopsis* stock centre, UK) y colza (*Brassica napus* L.) cv. Drakkar (Centrum Grüne Gente-

chnik, Germany). Las plantas se cultivaron en fitotrones a 21ºC en condiciones de día largo (16h luz, 8h oscuridad), iluminadas con lámparas fluorescentes de luz blanca fría (150 μE m^{-2} sec^{-1}), en una mezcla (1:1:1) de turba:perlita:vermiculita). Las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1; IBMCP) se cultivaron en una mezcla (1:1) de turba:vermiculita con un fotoperiodo de 16h en el invernadero a 25ºC (día) y 18ºC (noche). Se les suministró una iluminación suplementaria con lámparas de 400w Phillips HDK/400 HPI [R] [N]. Las plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* cv. Micro-Tom; IBMCP) se cultivaron en las mismas condiciones en el invernadero. Las plantas de tabaco y tomate se regaron con una solución nutritiva Hoagland No. 1 (16) suplementada con oligoelementos. Las plantas de *Arabidopsis* y colza se regaron con agua y una vez por semana con la solución nutritiva.

2. Preparación de muestras vegetales para microscopía confocal y electrónica de barrido (SEM).

Las muestras vegetales se introdujeron en p-formaldehído al 4% (p/v) en 1XPBS pH 7,0 inmediatamente después de su recolección para ser fijadas. Posteriormente, fueron sometidas a dos o tres pulsos de vacío de 3 min. cada uno, se les cambió la solución fijadora por una fresca y se mantuvieron en ella durante toda la noche a 4ºC. Tras el proceso de fijación de los tejidos se lavaron con 1XPBS y se deshidrataron hasta etanol absoluto mediante una serie de lavados sucesivos de 30 minutos a 4ºC en soluciones crecientes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100%). A partir de este punto, las muestras sufrieron un proceso distinto en función de si fueron incluidas en parafina (Paraplast Plus, Sigma), o procesadas para ser analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para su inclusión en parafina, las muestras se introdujeron en soluciones crecientes de Histo-Clear en etanol (25%, 50%, 100% de Histo-Clear) y posteriormente se incluyeron gradualmente en series crecientes de parafina en Histo-Clear a 58ºC hasta llegar a parafina absoluta. Tras dos días en parafina absoluta en los cuales se iban haciendo cambios a parafina fresca, las muestras se colocaron en moldes adecuados para seccionarlas. Se mantuvieron a 4ºC hasta su

utilización. Las muestras incluidas en parafina se seccionaron en un microtomo rotatorio Microm (secciones de 7-10 μm de grosor). Los cortes obtenidos se depositaron sobre portaobjetos tratados con TESPA (Sigma) como adherente. Las secciones de tejidos incluidos en parafina una vez sobre los portas, se desparafinaron en Histo-Clear durante 10 min. y luego se rehidrataron en soluciones decrecientes de etanol/agua (100%, 70%, 50%), durante 1 min. en cada una y finalmente se lavaron con agua destilada. Posteriormente se realizó la inmunolocalización de la proteína PsEND1 bloqueando las secciones con BSA al 5% en PBS e incubándolas a continuación con un anticuerpo primario anti-PsEND1 diluido al 0.1% durante 2h (3). Luego se realizaron varios lavados con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (Anti-IgG-FITC). Finalmente las preparaciones se montaron permanentemente con un anti-fading. Las observaciones y fotografías se realizaron con un microscopio confocal (Leica, TCS SL).

Para ser utilizadas en SEM, las muestras almacenadas en etanol del 100%, se desecaron con CO_2 líquido en un aparato secador de punto crítico Polaron E300, se montaron en portaobjetos metálicos con cinta adhesiva de carbono activado sobre los que fueron orientadas y diseccionados convenientemente. Después del montaje, las muestras fueron recubiertas con un sombreado de partículas de oro-paladio de 200 nm, en atmósfera de argón ionizado en un Sputter Coater SCD005 (BALTEC). Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Autobeam de la plataforma ISIS (Oxford Instruments), con una velocidad de barrido de 200 s por imagen, en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410 operando bajo las condiciones de microanálisis de 10 kV y distancia de trabajo de 25 mm.

3. Transformación de bacterias: preparación de células competentes y electroporación

Las cepas que se emplearon en las transformaciones fueron la DH5α de *Escherichia coli* y las cepas *Agrobacterium tumefaciens* C58 pMP90 (21) y LBA4404 (17). La preparación de células competentes para su transformación mediante electroporación se llevó acabo según los protocolos descritos en el catálogo Pulse controller: Acce-

sory for bacterial and fungal electro-transformation (BioRad) en el caso de *E. coli*, y según Wen-jun y Forde (33) en el caso de *A. tumefaciens*. Tras descongelar en hielo una alícuota de 40 µl de células competentes preparadas mediante sucesivos lavados de glicerol, se añadió 1 µl de vector transformante. La mezcla se introdujo en una cubeta de 0,1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico con un aparato Gene Pulser™ (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron 200 Ù, 25 µF y 1,8 kV, para *E. coli*, y 400 Ù, 25 µF y 1,8 kV, para *A. tumefaciens*. Después del pulso eléctrico se añadió 1 ml de medio LB y se incubó 1 hora a 37ºC y a 200 rpm para *E. coli,* y 3 horas a 28ºC y a 200 rpm para *A. tumefaciens*.

La selección de recombinantes bacterianos se llevó a cabo mediante la siembra de las células bacterianas transformadas en placas con medio LB suplementado con el antibiótico al cual confería resistencia el plásmido en estudio, y en el caso de que el plásmido permitiese la selección por color, se añadía 40 µl (25 mg/ml) de IPTG y 25 µl (20 mg/ml) de X-Gal al medio de cultivo sólido.

4. Diseño de la construcción pBI-PsEND1::barnasa-barstar.

Para ensayar si la expresión del gen citotóxico barnasa en aquellos tejidos de la antera donde *PsEND1* es activo, era capaz de producir androesterilidad en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tabaco, se realizó la construcción *pBI-PsEND1::barnasa-barstar*. Para ello se partió de la construcción pBI101-F3 (13). Esta construcción contenía 2.731 pb de la región promotora de del gen *PsEND1* aislada del rastreo de una genoteca genómica de guisante. La región comprendía desde el fragmento –2.736 hasta el nucleótido –6 de la región 5', tomándose como nucleótido +1 el primer nucleótido del cDNA aislado previamente (clon 162) de una genoteca de cDNA de flores de guisante. El fragmento –2.736/-6 de la región promotora del gen *PsEND1* estaba fusionado al gen *uidA* que codifica la enzima β-glucuronidasa (GUS), (13). Este gen fue liberado con las enzimas de restricción *BamHI* y *SacI* y el fragmento correspondiente al plásmido pBI101 más el promotor del gen *PsEND1* fue extraído del gel de agarosa. El fragmento *barnasa-barstar* previamente clonado en el

sitio *BamHI* del plásmido pBluescript KS (+) (Stratagene), fue amplificado utilizando los cebadores Ribo 1 (5'-*TAGGATCCC*GACCATGGCACAGGTTATC-3') e Inhi 2 (5´-*GCGAGCTC*TTAAGAAAGTTGATGGTGATG-3´). Con el primero se mantiene el sitio de corte para la enzima *BamHI* del clon original a nivel del ATG de la *barnasa*, y con el último se crea un sitio de corte para *SacI* a nivel del codón de parada del gen barstar. El fragmento producto de la reacción de PCR, se ligó al vector pGEM-T Easy (Promega), y se liberó posteriormente con las enzimas *BamHI* y *SacI*. Este inserto fue clonado en el sitio que crearon estas mismas enzimas en la construcción *pBI-PsEND1*, creándose así la construcción *pBI-PsEND1::barnasa-barstar*. La barnasa es una ribonucleasa muy activa e incluso a bajo niveles de expresión en *E. coli* o *Agrobacterium* puede impedir el normal desarrollo y la supervivencia de las bacterias. Por este motivo se introduce en la construcción el gen *barstar* que produce un inhibidor de la barnasa e impide la muerte de las bacterias. El gen *bastar* no se expresa en estas condiciones en la planta (14).

5. Transformación de *Arabidopsis thaliana* y análisis de las plantas transgénicas

Para la producción de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se ha utilizado la planta silvestre del ecotipo *Columbia* (Col). La transformación se realizó siguiendo el protocolo de infiltración al vacío (2). Cuando las silicuas de las plantas transformadas estuvieron maduras se recogieron las semillas, se guardaron en bolsas de celofán y se incubaron en una estufa a 37ºC durante al menos una semana. Para la selección de los transformantes primarios (T_1), las semillas procedentes de plantas individuales T_1 se esterilizaron, se sembraron en cajas Petri de 15 cm. de diámetro con medio de selección con kanamicina y se cultivaron en cabinas de cultivo *in vitro*. Después de 7-10 días desde la siembra, los transformantes eran claramente identificables por su color verde y sus raíces desarrolladas; en ese momento se transplantaron a alvéolos (6,5 x 6,5 x 5 cm) con una mezcla turba:vermiculita:perlita (1:1:1) y se trasladaron a un fitotrón para su cultivo bajo las condiciones descritas anteriormente.

Se analizó el fenotipo de la población correspondiente a la primera (T_1) y segunda generación (T_2) de plantas transformadas con la

construcción *pBI-PsEND1::barnasa-barstar*. Las plantas se fotografiaron con una cámara Nikon F-601 M, acoplada a una lupa MZ8 (Leica). Las anteras de las plantas *PsEND1::barnasa* fueron fijadas y observadas por SEM (microscopía electrónica de barrido) y microscopía óptica. Para el análisis fenotípico de dichas plantas *PsEND1::barnasa* de la generación T_2, se realizó un análisis de segregación del fenotipo androestéril para determinar el índice de la segregación del transgén para 4 líneas transgénicas independientes en función de la proporción de plantas estériles frente a plantas fértiles obtenidas. Para ello, las semillas provenientes del cruce de líneas independientes T_1 con plantas silvestres, se sembraron en alvéolos individuales para cada una. Se observó el fenotipo de las plantas resultantes en cuanto a morfología de las anteras y formación de frutos para cuantificar el porcentaje de esterilidad de las plantas germinadas.

6. Evaluación del número de ramas y flores en plantas *PsEND1::barnasa* de *Arabidopsis thaliana*

Para la evaluación del número de flores producidas en relación con las producidas por una planta sin transformar se sembraron un total de 78 semillas de *Arabidopsis thaliana*; 18 de las cuales pertenecían al ecotipo silvestre *Columbia* y, las 60 restantes eran semillas resultantes del cruce de líneas independientes *PsEND1::barnasa* con plantas de genotipo silvestre. Las semillas fueron sembradas en alveolos de plástico de 6,5 x 6,5 x 5 cm. en una mezcla de turba:perlita:vermiculita (1:1:1). Se colocaron en bandejas dentro de cámaras de cultivo y se regaron por inmersión en una solución de Hoagland número 1 suplementada con oligoelementos. Tras la siembra, las bandejas se cubrieron con plástico para mantener la humedad. Se mantuvieron en oscuridad a 4ºC durante 72 horas a fin de sincronizar la germinación y al cabo de esos días se pasaron a cabinas. Al aparecer el primer par de hojas, se agujereó el plástico que recubría las bandejas y, terminó eliminándose por completo al cabo de tres días.

7. Transformación de *Nicotiana tabacum* y análisis fenotípico de las plantas transformadas

La transformación de plantas de *Nicotiana tabacum* se realizó siguiendo el método descrito por Horsh *et al.,* (19), con las modificaciones propuestas por Fisher y Guiltinan (9). Los brotes regenerados (uno de cada explante, para asegurar que se seleccionaban sucesos de transformación independientes) que iban apareciendo se cortaban evitando el callo y se transferían a frascos de 6 cm. de diámetro por 9,5 cm. de altura con medio de enraizamiento MS-SACK (medio MSS sólido con 0,2 mg/l de IAA, 200 mg/l de carbenicilina y 130 mg/l de kanamicina). De cada brote enraizado, se aislaban dos entrenudos, cada uno con una hoja, que se transferían a frascos de medio MSSABCK, a partir de los cuales se regeneraban dos plantas completas. Una de ellas se utilizó para mantener una réplica en cultivo *in vitro*, mientras que la otra, una vez enraizada, se transfería a tierra. Para ello, los brotes enraizados se extrajeron de los frascos, se les eliminó los restos de medio de las raíces, se transplantaron a macetas de 13 cm. de diámetro con una mezcla de turba:vermiculita (1:1) y se trasladaron al invernadero, donde se cultivaron bajo las condiciones descritas anteriormente. El análisis fenotípico de la primera generación (T_1) de plantas *PsEND1::barnasa* se llevó a cabo mediante del análisis de la morfología de las anteras de estas plantas por medio de fotografías realizadas con una cámara Nikon F-601 M, acoplada a una lupa MZ8 (Leica) y mediante la observación de las anteras a través de SEM y microscopía óptica.

8. Transformación de colza (*Brassica napus* L.) y análisis de las plantas transgénicas.

Se utilizaron plantas de colza del cv. Drakkar que se transformaron con la cepa C58C1 ATHV (18) de *Agrobacterium* siguiendo el protocolo de Damgaard *et al.* (5) con algunas modificaciones. Tras un periodo de 2 días de precultivo los explantos de hipocotilo se cortaron en segmentos de 5 mm y se incubaron durante 60 min en medio MS-CIM-G (MS combinado con 20 g l^{-1} glucosa, 1 mg l^{-1} 2, 4-D, 0.1 mg l^{-1} IAA) conteniendo 1 x10^8 células de *Agrobacterium* por ml^{-1}. Luego, el medio fue reemplazado por medio líquido fresco MS-CIM-

G y el cocultivo se continuó durante 2 días a 22ºC en condiciones de luz continua La selección se realizó sobre medio DKW (Duchefa) conteniendo 20 g l^{-1} sacarosa, 1 mg l^{-1} BAP, 0.01 mg l^{-1} IBA, 0.01 mg l^{-1} GA_3, 25 mg l^{-1} kanamicina y 500 mg l^{-1} carbenicilina. Las plántulas regeneradas se transfirieron luego a medio MS (24) con 250 mg l^{-1} carbenicilina y 25 mg l^{-1} kanamicina para regenerar y enraizar. Los transformantes primarios (T_1) fueron transferidos a pequeñas macetas y aclimatados en el invernadero. Tras 2 semanas, las plantas se colocaron en macetas de 1.5 l con sustrato Floraton-3. A las 4 semanas se añadió fertilizante (PlantoSan Compact, Aglukon). El fotoperiodo fue de 16h de luz y 8h de oscuridad. Para condiciones de día largo la luz se suplementó con lámparas fluorescentes (Son-T Agro 400).

9. Transformación de *Solanum lycopersicon* (cv. Micro-Tom) y análisis de las plantas transgénicas.

La transformación genética de plantas de *Solanum lycopersicon* (cv. Micro-Tom) se realizó utilizando el protocolo optimizado descrito por Ellul *et al*. (7) que utiliza como material de partida cotiledones procedentes de plántulas germinadas *in vitro*. Los brotes transgénicos, una vez enraizados, desarrollaron estructuras vegetativas que nos permitieron obtener nuevas plantas mediante propagación clonal. utilizando estas estructuras vegetativas se realizaron los análisis moleculares y el análisis de ploidía de los transformantes primarios.

El nivel de ploidía se analizó mediante citometría de flujo, utilizando para el aislamiento de núcleos hojas procedentes de transformantes primarios (T_1) cultivados en medio de enraizamiento libre de antibiótico. El tejido de aproximadamente 1cm^2 se colocó en una placa Petri de 50 mm. de diámetro, a la que se añadió 200 µl de tampón de extracción de núcleos (Partec) y se troceó con una cuchilla. Una vez troceado el tejido, se pasó la suspensión resultante a través de una malla de nylon de 50 µl (Nybolt), y se añadieron 800 µl de una solución colorante que contenía 1mg/l de DAPI (4,6-diamino-2.phenyl-indole), consiguiendo así la tinción fluorescente del DNA. El DNA de los núcleos aislados se midió utilizando un citómetro de flujo

Partec PAS-II, provisto de una lámpara de mercurio. El resultado aparece trazado sobre una escala semilogarítmica, en la que el histograma que alcanza desde 2C a 32C se distribuye a lo largo del eje de abscisas. Para calibrarlo se utilizó el pico 2C de núcleos de hojas jóvenes de plántulas de tomate diploides cultivadas *in vitro*.

10. Análisis de los transgenes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para el análisis por PCR de las líneas transgénicas, se extrajo DNA genómico siguiendo el método de Rogers y Bendich (26). La presencia del transgén de la *barnasa* se detectó mediante PCR utilizando los cebadores: Pro3 (5´-TGCTCACAACATAACCTTCCTTG-3´; nucleótidos –26 a –4 de la secuencia del promotor *PsEND1*, Gene Bank número de acceso: AY324651) e Inhi3: (5´-CGCAGCCTTC-CGCTTTCGC-3´; de la secuencia complementaria de gen *barstar* (nucleótidos 374 a 355, Gene Bank número de acceso: X15545). Las secuencias de DNA se analizaron siguiendo el método descrito por Sanger *et al.* (29) en un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin Elmer).

RESULTADOS

1. *PsEND1*, un gen que se expresa específicamente en las anteras del guisante.

En nuestro laboratorio, aislamos un clon de cDNA que contenía la secuencia codificante completa de la proteína PsEND1, cuya expresión es específica de anteras. El aislamiento de dicho cDNA fue posible gracias a la secuenciación del extremo N-terminal de la proteína PsEND1 que purificamos mediante cromatografía de afinidad a partir de extractos de antera utilizando un anticuerpo monoclonal obtenido por nosotros (3). Mediante experimentos de hibridación *in situ* e inmunolocalizaciones sobre secciones de flores en desarrollo comprobamos que la expresión de *PsEND1* se circunscribe a la epidermis, capa intermedia, endotecio y tejido conectivo (Figura 1A) desde estadíos tempranos del desarrollo de las anteras hasta la de-

hiscencia (13). *PsEND1* no se expresa en el *tapetum*, ni en el polen ni en el filamento de la antera. La función de PsEND1 es desconocida si bien presenta homología con los dominios tipo hemopexina de vitronectinas y metaloproteasas de matriz extracelular (Figura 1B). La falta de un método de transformación eficaz aplicable al guisante no nos ha permitido utilizar estrategias de genética reversa que desvelen la función de dicho gen.

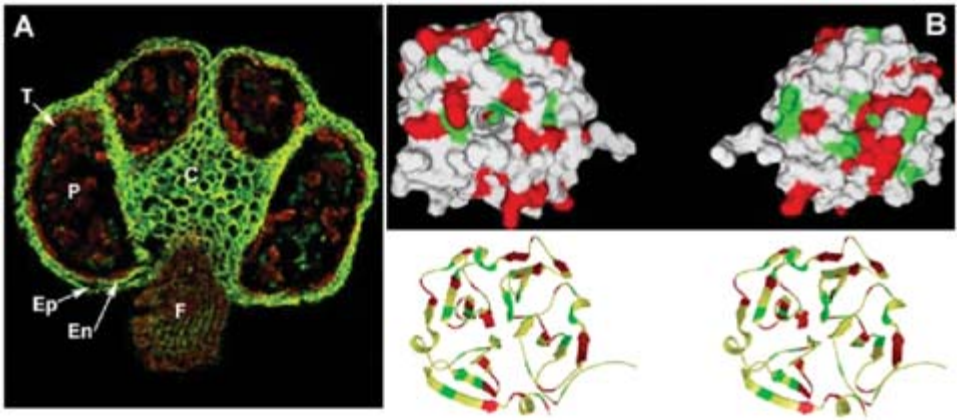


FIGURA 1. ***A: Inmunolocalización de la proteína PsEND1 mediante microscopía confocal.*** *Secciones en parafina de estambres de guisante se incubaron con un anticuerpo primario específico para la proteína y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado a un fluorocromo (Anti-IgG-FITC). La proteína se detecta en todos los tejidos que conforman la arquitectura del saco polínico (fluorescencia verde) como la epidermis (Ep), el endotecio (En), la capa intermedia y el tejido conectivo (C). La proteína no se detecta (fluorescencia roja) en el filamento (F), en el tapetum (T), ni tampoco en las células madre del polen (P).* ***B: Representación de la estructura tridimensional del dominio hemopexina (1GEN) de la Gelatinasa A*** *mediante un modelo sólido (visión estereoscópica). Los aminoácidos idénticos entre 1GEN y PsEND1 se muestran en rojo y los que representan cambios conservativos en verde.*

El patrón de expresión espacio-temporal de *PsEND1* nos sugirió que su región promotora podría ser de interés para la obtención de plantas transgénicas androestériles ya que podría utilizarse para impedir el desarrollo de las anteras mediante la expresión específica de genes citotóxicos en las mismas desde estadíos muy tempranos de su desarrollo. La utilización del cDNA de *PsEND1* en el rastreo de una genoteca genómica de guisante nos condujo al aislamiento de

un fragmento de DNA que contenía su región promotora. Dicha región contiene tres posibles cajas CArG, lo que sugiere que *PsEND1* podría estar regulado por alguno de los genes de la familia MADS-box implicados en la especificación de la identidad del estambre (32). Un análisis del promotor mediante delecciones selectivas del mismo nos indicó que el fragmento correspondiente a las –336 pares de bases más cercanas al inicio del gen es suficiente para mantener su actividad y especificidad de expresión. También hemos comprobado que la región promotora de *PsEND1* dirige de manera específica la expresión del gen de la β-glucuronidasa (*uidA*, GUS) a las anteras de plantas transgénicas de especies diferentes al guisante, como *Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum* (tabaco), *Brassica napus* (colza) y S*olanum lycopersicom* (tomate). La capacidad de la región promotora de *PsEND1* de dirigir la expresión de genes foráneos en sistemas experimentales heterólogos específicamente a los mismos tejidos que lo hace en guisante, nos ha llevado a proteger su uso mediante patente con objeto de desarrollar herramientas biotecnológicas encaminadas a producir la ablación de anteras (12, 13, 27). Recientemente, hemos comprobado que la región promotora de *PsEND1* es capaz de dirigir la expresión de GUS a polen de trigo en el estadio binucleado y durante el desarrollo del tubo polínico lo que abre la posibilidad de que esta herramienta sea útil también para la producción de líneas androestériles en monocotiledóneas (26).

2. Producción de plantas androestériles en Brássicas y Solanáceas

Para la producción de plantas androestériles mediante ingeniería genética hemos utilizado el sistema *barnasa/barstar* desarrollado por Mariani *et al.* (23) para producir líneas androestériles de dos especies de Brássicas (*Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus)* y de dos especies de Solanáceas (*Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicon*). En todas las plantas ensayadas obtuvimos buenos resultados al conseguir producir líneas androestériles (27), siendo de especial interés agronómico las plantas androestériles de colza y tomate. En el caso de *Arabidopsis thaliana*, las plantas transgénicas generadas mostraron desde el momento en que comenzaron a florecer una serie de características que las diferenciaban de las plantas control:

— Las flores presentes en las plantas control (fenotipo silvestre) poseen anteras normales con polen en su interior (Figura 2A) y el filamento del estambre posee su longitud normal (Figuras 2B y C). Las flores transgénicas no muestran anteras (Figura 2F) y si quitamos sépalos y pétalos podemos observar unas estructuras en forma de gancho en lugar de los sacos polínicos de la antera y un filamento muy corto en comparación con el de los estambres control (Figuras 2G y H). En el interior de dichas estructuras no se detectaron granos de polen viables.

— Las plantas transgénicas continúan desarrollándose y produciendo flores mientras que las plantas control entran en senescencia y sus frutos se abren para liberar las semillas de su interior. La vida media de estas plantas aumentó unos tres meses con respecto al control.

— Mientras que en las plantas control las flores se fecundaban y producían frutos (silicuas) normales, en las transgénicas al no producirse fecundación por la ablación de las anteras, las flores entraban en senescencia y en los pedicelos de las flores sólo permanecían los carpelos sin fecundar.

Por su parte, las plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* generadas mostraron, al igual que en el caso anterior, las mismas características en cuanto a desarrollo y floración:

— Las flores presentes en las plantas control (fenotipo silvestre) poseen anteras normales con polen en su interior y el filamento del estambre posee su longitud normal (Figuras 2K, L y M). Las flores transgénicas muestran anteras deformes y necróticas con abundantes tricomas recubriendo sus sacos polínicos colapsados, los cuales no muestran polen en su interior (Figuras 2P, Q y R).

— Mientras que en las plantas control (Figura 3A izquierda) las flores se fecundaban y producían frutos (cápsulas) normales, en las transgénicas al no producirse fecundación por la ablación de las anteras, las flores entraban en senescencia y en los pedicelos de las flores permanecían las flores sin fecundar (Figura 3A centro y derecha). Muchas veces las flores senes-

centes permanecen sobre los tallos que se alargan continuamente al producirse flores en sus meristemos inflorescentes. En la figura 3D se puede observar una de estas ramas florales en comparación con una de una planta control que ha producido un número determinado de flores, se han fecundado y producido cápsulas con semillas en su interior.

— Las plantas transgénicas continúan desarrollándose y produciendo flores (Figura 3B) mientras que las plantas control entran en senescencia y sus frutos (cápsulas) se abren para liberar las semillas de su interior (Figura 3C). Algunas plantas estuvieron produciendo flores sin marchitarse durante casi 2 años.

Con objeto de comprobar la reversibilidad del sistema, también se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción *PsEND1::bastar*. Estas plantas, al cruzarse con las plantas transgénicas portadoras de la barnasa, produjeron plantas fértiles cuyas flores presentaban estambres normales con polen viable (resultados no mostrados). Esto es debido a que el bastar actúa como inhibidor de la barnasa y consigue restablecer el desarrollo normal de las anteras y restaurar la fertilidad (23).

Realizamos también el mismo experimento en una Brássica de interés agronómico como es la colza (*Brassica napus*), utilizando la misma construcción quimérica (*PsEND1::barnasa*). Los resultados fueron muy similares, produciéndose la esperada androesterilidad de las flores al bloquearse el desarrollo de las anteras. Los estambres transgénicos mostraban filamentos cortos y las anteras estaban colapsadas, no presentando granos de polen viables en el interior de sus sacos polínicos. Los carpelos no polinizados permanecían unidos al pedicelo floral hasta su senescencia (Figuras 2D, E, I y J). Del mismo modo, también realizamos el mismo ensayo en una Solanácea de interés agronómico como el tomate (cv. Micro-Tom) utilizando la misma construcción quimérica. El desarrollo de las plantas transgénicas fue completamente normal pero sus flores presentaban alteraciones en sus estambres (anteras con malformaciones en sus sacos polínicos) que no llegaban a cubrir al carpelo, no formándose por tanto el cono estaminal (Figuras 2N, O, S y T). Como en los otros casos los sacos polínicos colapsados no tenían granos de polen

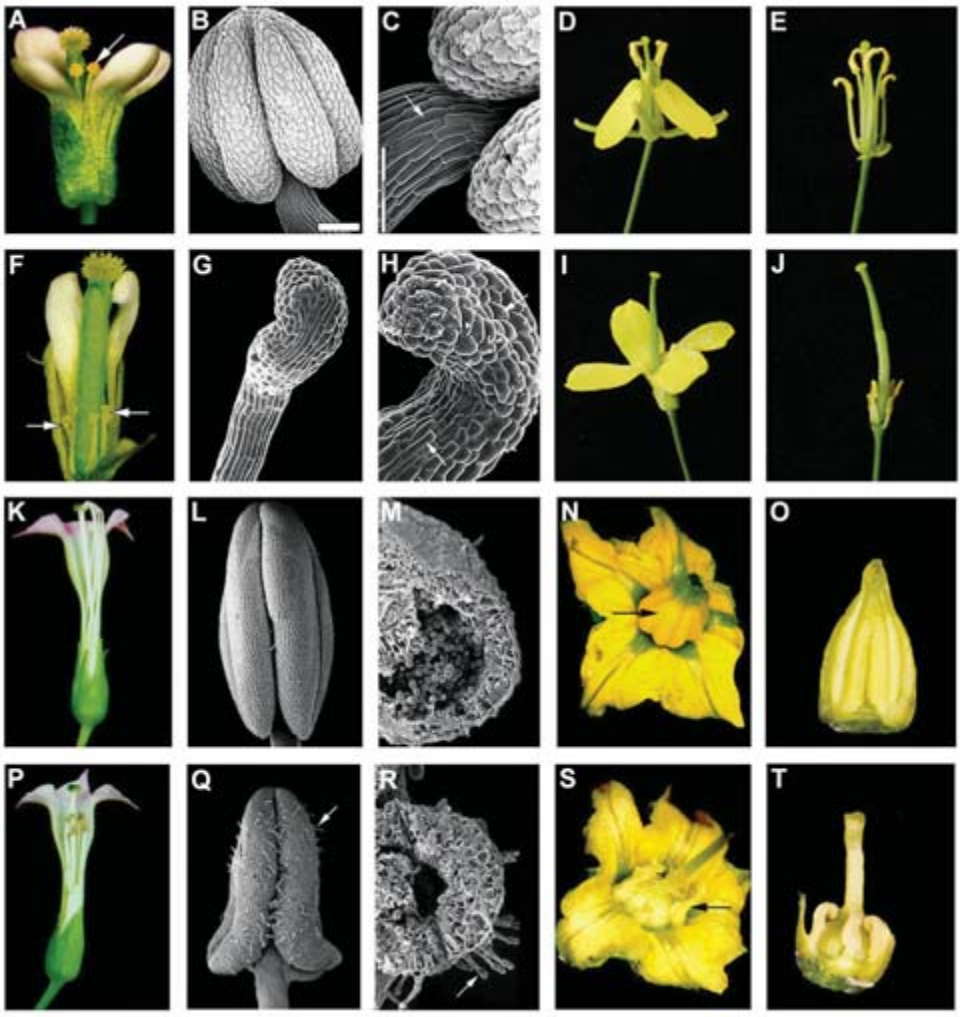


FIGURA 2. ***Producción de plantas androestériles mediante ingeniería genética utilizando el gen de la ribonucleasa barnasa bajo el control del promotor PsEND1 de guisante.*** ***A:*** *Flor con fenotipo silvestre de Arabidopsis thaliana mostrando sus estambres.* ***B:*** *Estambre normal (antera + filamento) de A. thaliana observada mediante microscopía de barrido (SEM).* ***C:*** *Tipos celulares presentes en la epidermis de la antera (festoneados) y del filamento (alargados) de una flor silvestre de A. thaliana observados por SEM.* ***D:*** *Flor silvestre de colza mostrando todos sus órganos florales.* ***E:*** *Flor silvestre de colza sin sépalos ni pétalos para apreciar la morfología de sus estambres.* ***F:*** *Flor transgénica de A. thaliana transformada con la construcción PsEND1::barnasa mostrando las estructuras estaminoides en forma de gancho que se han formado en lugar de las anteras.* ***G:*** *Detalle*

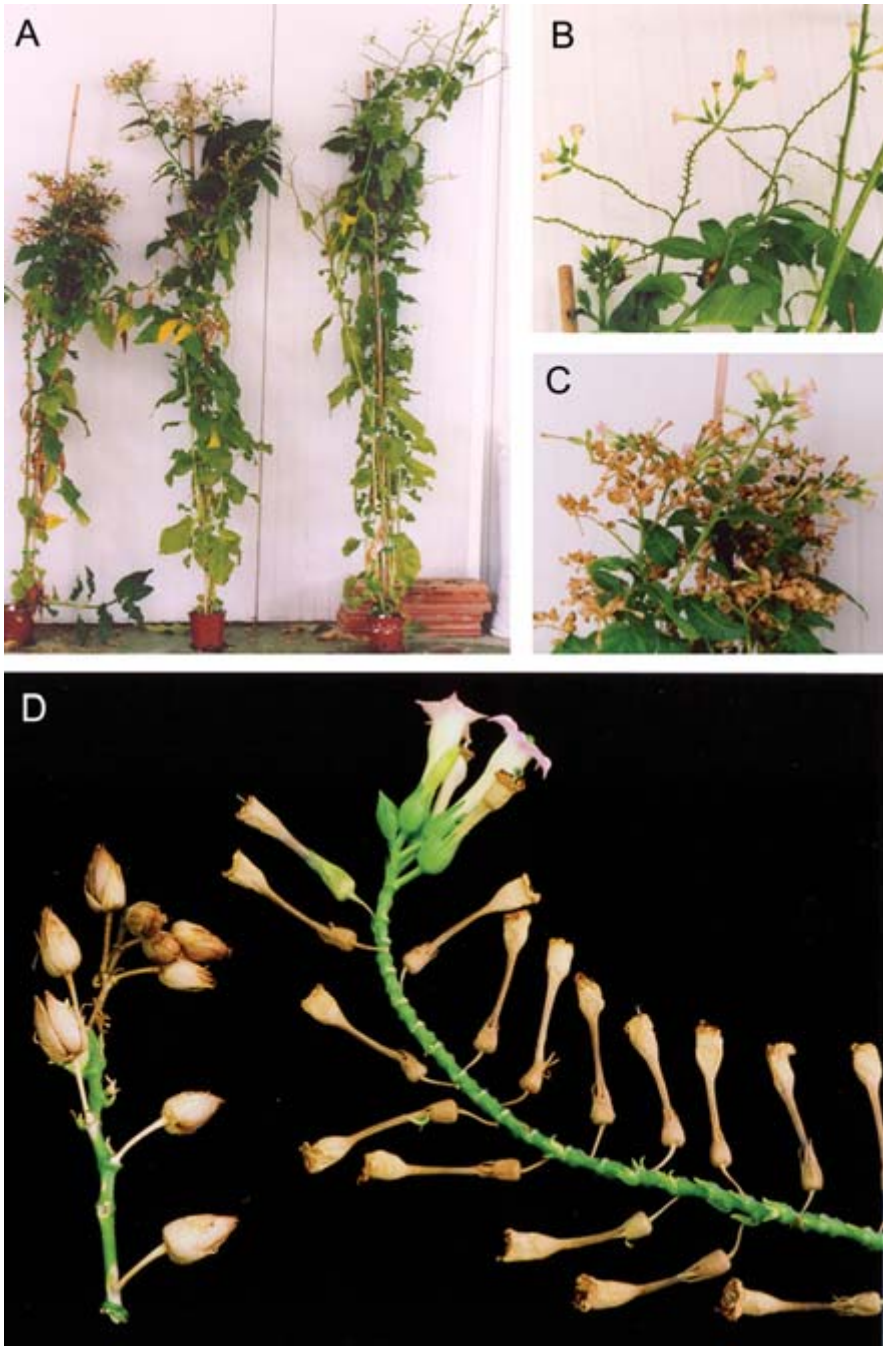
viable en su interior. Tampoco se detectaron variaciones en el nivel de ploidía de las líneas transgénicas seleccionadas.

La fertilidad femenina no se vio afectada en ninguna de las plantas transgénicas androestériles, siendo posible su fertilización con polen de una planta silvestre y por tanto el mantenimiento de las líneas transgénicas mediante retrocruzamiento.

3. Evaluación del número total de ramas y flores producidas por las plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana* en relación con una planta normal

Se calculó el número de ramas y se determinó su orden y el número de flores totales así como los valores medios de ambos parámetros, tanto para las plantas silvestres como para todas las plantas androestériles. Las plantas silvestres del cultivar Columbia empleado en este estudio producen un total de 36 ramas y que estas ramas y que estas ramas corresponden a ramas de primer y de segundo orden producidas en las axilas de las hojas de roseta y en las

*de una de las estructuras estaminoides observada por SEM. **H:** Tipos celulares presentes en la epidermis de una de esas estructuras. Predominan los tipos celulares presentes en el filamento. Los tipos celulares festoneados han desaparecido debido a la ablación celular selectiva inducida por el promotor PsEND1. **I:** Flor transgénica de colza transformada con la construcción PsEND1::barnasa. Los estambres no son visibles a simple vista. **J:** Flor transgénica de colza sin pétalos ni sépalos para mostrar el colapso sufrido por los estambres durante su desarrollo. **K:** Flor silvestre de tabaco mostrando sus estambres. **L:** Estambre normal de tabaco observado mediante SEM. **M:** Antera normal de tabaco seccionada para mostrar la presencia de polen viable en sus sacos polínicos. **N:** Flor silvestre de tomate mostrando todos sus órganos florales. **O:** Detalle del cono estaminal formado por los estambres al disponerse alrededor del carpelo. **P:** Flor transgénica de tabaco transformada con la construcción PsEND1::barnasa. Se observa la necrosis de las anteras y el acortamiento de sus filamentos. **Q:** Flor transgénica de tabaco observada mediante SEM. Se aprecia el colapso de sus sacos polínicos y la presencia de numerosos tricomas en su epidermis. **R:** Sección de una antera transgénica de tabaco en la que se observa la ausencia de granos de polen viable en el interior de sus sacos polínicos. **S:** Flor transgénica de tomate transformada con la construcción PsEND1::barnasa en la que se aprecia la desaparición del cono estaminal y el colapso de sufrido por las anteras durante su desarrollo. **T:** Flor transgénica de tomate sin sépalos ni pétalos para observar el colapso de las anteras y la ausencia de cono estaminal rodeando al carpelo.*


A
B
C
D

de las caulinares. Sin embargo, las plantas transgénicas muestran una modificación drástica de su arquitectura ya que producen ramas de primer, segundo, tercer y cuarto orden tanto en las axilas de las hojas de roseta como en las de las caulinares. Se observa un aumento drástico en el número de ramas, 288 en las transgénicas frente a 36 en las silvestres (Figura 4A). Dicho aumento se produce en el número de ramas de todos los órdenes. La modificación drástica del número y orden de las ramas que caracterizan la nueva arquitectura de la inflorescencia de las plantas transgénicas conlleva que dichas ramas son capaces de desarrollar un mayor número de flores. Así, mientras que el número de flores totales de las plantas silvestres del cultivar Columbia es de 659, el de las correspondientes plantas transgénicas resultó ser de 3.001 (Figura 4B). Además, se observa que se producen aumentos en la capacidad de desarrollar flores en las ramas de todos los órdenes.

El número de ramificaciones producido por las plantas con fenotipo androestéril es aproximadamente 8 veces mayor que en las plantas silvestres. En las plantas androestériles se observa un mayor número de órdenes de ramificaciones (llegando a obtenerse ramificaciones terciarias y cuaternarias) mientras que en las plantas silvestres sólo se observan ramificaciones primarias y secundarias (Figura 5A). En lo que respecta al número de flores en las plantas androestériles se observa que el número de flores es, aproximadamente 4,5 veces mayor que en las plantas silvestres (Figura 5B).

FIGURA 3.- ***Plantas de Nicotiana tabacum transgénicas y plantas de N. tabacum silvestres. A:*** *planta silvestre (izquierda) frente a dos plantas transgénicas (centro y derecha). La Figura* ***3B*** *muestra un detalle de las ramas de una planta transgénica de N. tabacum y la Figura* ***3C*** *muestra la correspondiente planta silvestre. Las plantas transgénicas muestran un mayor desarrollo que las silvestres, un mayor número de ramificaciones y un número mayor de flores cuando se comparan con las silvestres. En la Figura* ***3D*** *se puede observar cómo las ramas con flores de las plantas silvestres se fecundan y producen frutos (cápsulas) deteniendo su crecimiento (izquierda), mientras que en las ramas de las plantas transgénicas no se aprecia la formación de frutos y continúan produciendo flores, las cuales van entrando en senescencia al no fecundarse.*

DISCUSIÓN

La explotación de la heterosis o vigor híbrido, necesita de un mecanismo eficaz para controlar la polinización. La androesterilidad o incapacidad de una planta para producir polen funcional constituye una alternativa importante para controlar la polinización durante la producción de semilla híbrida en especies cultivadas de interés agronómico. La utilización de parentales femeninos androestériles durante la producción de semilla híbrida asegura que la semi-

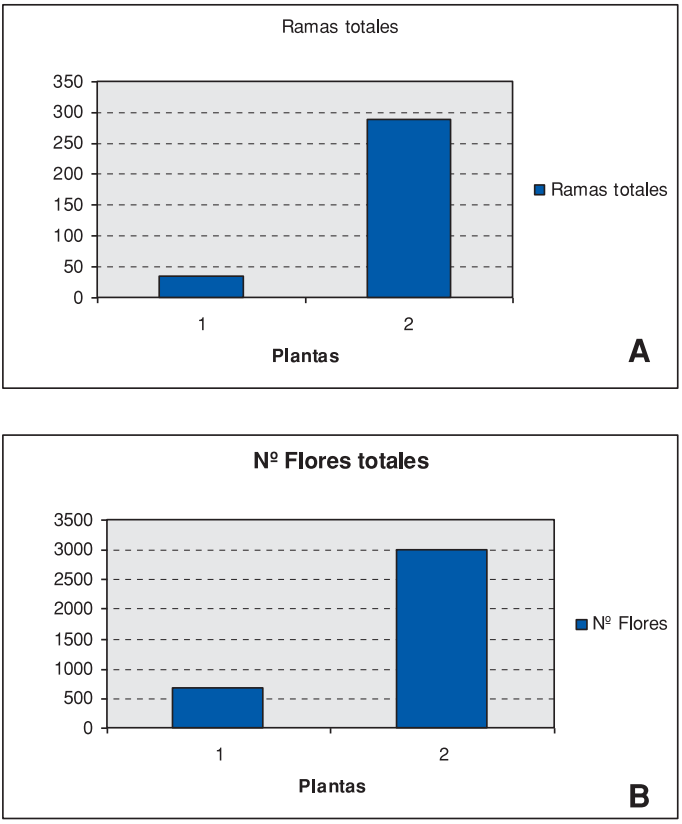


FIGURA 4. ***Las gráficas muestran el número de ramas producidas en las plantas silvestres frente a las transgénicas (A) y el número de flores producidas en las plantas silvestres frente a las plantas transgénicas (B)****. En ambas gráficas el número 1 corresponde a plantas silvestres y el número 2 a plantas transgénicas.*

lla que se cosecha sea efectivamente híbrida y no proceda de la autofecundación o del cruzamiento con plantas de su mismo genotipo. La androesterilidad, es también una característica deseable en plantas capaces de desarrollar frutos en ausencia de fertilización (frutos partenocárpicos). En este tipo de frutos las semillas están ausentes, con lo que se mejora su aceptación por los consumidores (28). Además, la disponibilidad de genotipos androestériles de plantas puede ser relevante para evitar la contaminación por polen en áreas urbanas, disminuir la producción de alergenos polínicos o evitar la posibilidad de transferencia genética horizontal indeseada, disminuyendo así la alarma social, por ejemplo, en el caso de algunos cultivos transgénicos (10). Por tanto, el desarrollo de técnicas de ingeniería genética para producir plantas androestériles sería rele-

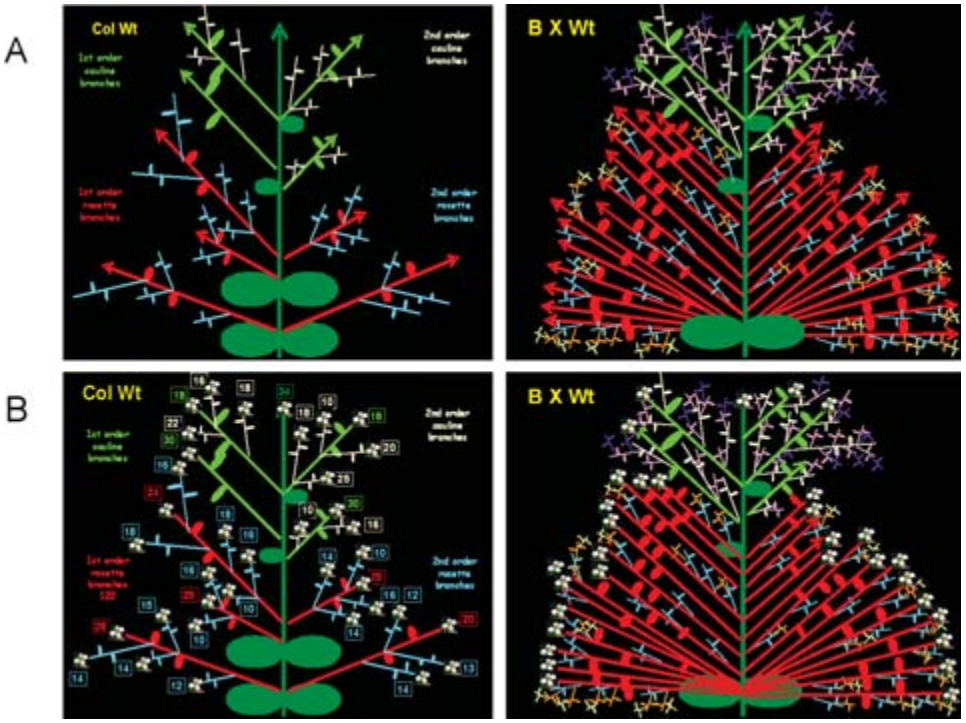


FIGURA 5. ***Diagramas representativos del número de ramificaciones producidas en las plantas silvestres y en las plantas transgénicas de A. thaliana (A) y del número de flores producidas en las plantas silvestres y en las plantas transgénicas de A. thaliana (B).***

vante en agroalimentación, medio ambiente y biomedicina. Cuando es posible, la producción de semillas híbridas comerciales se apoya en métodos genéticos para controlar la polinización, utilizándose plantas auto-incompatibles o plantas androestériles, es decir, plantas que no producen polen, no son capaces de liberarlo o desarrollan polen que no es capaz de provocar auto-fertilización.

El sistema desarrollado en nuestro laboratorio, que se basa en la utilización del gen *barnasa* bajo el control del promotor *PsEND1* de guisante con expresión específica en determinados tejidos que conforman la arquitectura de la antera, presenta una serie de ventajas con respecto a otros sistemas similares que se basan en el uso de promotores de expresión específica en el *tapetum*, tejido nutritivo de las células que darán lugar al polen y que se forma mas tardíamente en el desarrollo. En primer lugar la expresión del promotor *PsEND1* comienza a producirse en estadíos muy tempranos del desarrollo del estambre, concretamente en el primordio estaminal (13). Por tanto la expresión del gen bajo su control (barnasa) se realiza también tempranamente produciendo una ablación de los tejidos que conforman los sacos polínicos de la antera impidiendo así la formación de polen viable en los mismos. Además, la especificidad de su expresión exclusivamente en los tejidos del saco polínico (13) y no en otros órganos florales o vegetativos de la planta, produce únicamente la ablación de dichos tejidos respetando la integridad del resto de la planta y por tanto no impidiendo su desarrollo normal. Por último se puede señalar su potencial para investigar funciones celulares en la antera, las relaciones entre diversos linajes celulares, las interacciones entre distintos tipos celulares durante el desarrollo de la antera, etc.

Las plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana tabacum* obtenidas utilizando la tecnología anteriormente descrita, muestran una producción continuada de flores en comparación con plantas silvestres control así como un considerable alargamiento de su vida media. Una posible explicación a este fenómeno sería el hecho de que mientras que las plantas normales producen un determinado número de flores que tras su fecundación producen los correspondientes frutos, en las plantas androestériles al no producirse frutos, la planta continuaría produciendo flores sin cesar, ya que la sacarosa circulante en las mismas sigue llegando a los meristemos inflorescentes al no desviarse su uso hacia el desarrollo de los frutos

producidos. De este modo, las inflorescencias de las plantas androestériles continuarían con un crecimiento indeterminado al no producirse una inhibición de este fenómeno por algún tipo de señalización procedente de los frutos en desarrollo (15). Este fenómeno es de gran interés para las empresas de floricultura (flor cortada o en maceta). La mayoría de las plantas utilizadas por dichas empresas son híbridos que producen flores muy vistosas pero generalmente en muy poca cantidad. La producción, mediante el uso de nuestro sistema, de plantas ornamentales androestériles que produzcan más flores, tendría la ventaja adicional de no producir dispersión horizontal de genes al no producir polen ni por supuesto semillas, con lo que su autorización de uso a nivel de campo no debería entrañar demasiada dificultad (4).

En el caso del sector viverista o el de la floricultura, la construcción *PsEND1::barnasa* podría utilizarse para producir plantas androestériles con mayor número de flores y con una vida media más prolongada. Esto abriría la posibilidad de una serie de aplicaciones de dicha tecnología para producir mayor número de flores en plantas ornamentales de interés para el sector de la flor cortada o el de la planta en maceta. La mayoría de las plantas ornamentales que se comercializan actualmente son híbridos que producen flores muy vistosas, con colores novedosos, pero en poca cantidad (i.e. clavel). Generalmente la ausencia de anteras en este tipo de flores no sería muy importante desde el punto de vista comercial ya que suele ser la forma y el color de los pétalos las características más apreciadas. La producción, mediante el uso de nuestro sistema, de plantas ornamentales androestériles que produzcan más flores tendría la ventaja adicional de no producir dispersión horizontal de genes durante su cultivo en campo o invernadero al no producir polen ni por supuesto semillas. Por tanto, obtener la autorización para cultivar masivamente este tipo de plantas genéticamente modificadas no sería muy dificultoso según la legislación vigente.

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones descritas en este trabajo contaron con financiación del Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2003-01171 y PTR95-0979-OP-03-01) y de la Generalitat Valenciana. Mónica Medi-

na disfrutó de una beca predoctoral de la Universidad Politécnica de Valencia.

BIBLIOGRAFÍA

(1) BEALS, T.P. AND GOLDBERG, R.B. (1997) A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. *Plant Cell.* 9: 1527-1545.

(2) BECHTOLD, N.; ELLIS, J. AND PELLETIER, G. (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* 316: 1194-1199.

(3) CAÑAS, L.A.; ESSID, R.; GÓMEZ, M.D. AND BELTRÁN, J.P. (2002) Monoclonal antibodies as developmental markers to characterize pea floral homeotic transformations. *Sex. Plant Reprod*. 15: 141-152.

(4) CAÑAS, L. A.; MEDINA, M.; ROQUE, E.; GARCÍA-SOGO, B.; MORENO, V. Y BELTRÁN, J.P. (2007) Procedimiento para modificar la arquitectura de la inflorescencia de las plantas. Oficina Española de Patentes y Marcas P200700618. CSIC-UPV. PCT en trámite.

(5) DAMGAARD, O.; JENSEN, L.H. AND RASMUSSEN, O. S. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars. *Transgenic Res.* 6: 279-288.

(6) DAY, C.D. AND IRISH, V.F. (1997) Cell ablation and the analysis of plan development. *Trends Plant. Sci.* 2: 106-111.

(7) ELLUL, P.; GARCÍA-SOGO, B.; PINEDA, B.; RÍOS, G.; ROIG, L.A. AND MORENO, V. (2003) The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Solanum lycopersicon* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor. Appl. Genet.* 106: 231-238.

(8) FABIJANSKI, S.F.; ALBANI, D.; ROBERT, L.S. AND ARNISON, P.G. (1992) Characterization of genes expressed during the development of *Brassica napus* pollen. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28: 46-52.

(9) FISHER, D. K. AND GUILTINAN, J. (1995) Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens*: a seed to seed protocol. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 278-289.

(10) GATES, P. (1995) The environmental impact of genetically engineered crops. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13: 181-195.

(11) GOLDBERG, R.B.; BEALS, T.P. AND SANDERS, P.M. (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.

(12) GÓMEZ, M.D.; CAÑAS, L.A.; MADUEÑO, F. AND BELTRÁN, J.P. (2001) Sequence regulating the specific expression in anthers of a gene and use thereof in the production of androsteryle plants and hybrid seeds. Patente internacional (PCT/ES01/00127). Oficina Española de Patentes y Marcas, P. nº: P200000814. Patente en explotación por la empresa NBT (NewBioTechnic).

(13) GÓMEZ, M.D.; BELTRÁN, J.P. AND CAÑAS, L.A. (2004) The pea *END1* promoter drives anther-specific gene expression in different plant species. *Planta.* 219: 967-981.

(14) HARTLEY, R.W. (1988) *Barnase* and *barstar* expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *J. Mol. Biol.* 202: 913-915.
(15) HENSEL, L.L.; NELSON, M.A.; RICHMOND, T.A. AND BLEECKER, A.B. (1994) The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 106: 863-876.
(16) HEWITT, Y.M. (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultural Bureaux.
(17) HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J. AND SCHILPEROORT, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* tiplasmid. *Nature*. 303: 179-180.
(18) HOOD, E.E.; HELMER, G.L.; FRALEY, R.T. AND CHILTON, M.D. (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168: 1291-1301.
(19) HORSCH, R.B.; FRALEY, R.T.; ROGERS, S.G.; SANDERS, P.R.; LLOYD, A. AND HOFFMANN, N. (1984) Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*. 223: 496-498.
(20) KOLTUNOW, A.M.; TRUETTNER, J.; COX, K.H.; WALLROTH, M. AND GOLDBERG, R.B. (1990) Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. *Plant Cell*. 2: 1201-1224.
(21) KONCZ, C. AND SCHELL, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet*. 204: 383-396.
(22) MARIAN, C.; DE BEUCKELEER, M.; TRUETTNER, J.; LEEMANS, J. AND GOLDBERG, R.B. (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*. 347: 737-741.
(23) MARIANI, C.; GOSSELE, V.; DE BEUCKELEER, M.; DE BLOCK, M; GOLDBERG, R.B.; DE GREEF, W. AND LEEMANS, J. (1992) A chimaeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature*. 357: 384-387.
(24) MURASHIGE, T. AND SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
(25) NILSSON, O.; WU, E.; WOLFE, D.S. AND WEIGEL, D. (1998) Genetic ablation of flowers in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J.* 15: 799-804.
(26) PISTÓN, F.; GARCÍA, C.; DE LA VIÑA, G.; BELTRÁN, J.P.; CAÑAS, L.A. AND BARRO, F. (2007) The pea *PsEND1* promoter drives the expresión of GUS in transgenic wheat at the binucleate stage and during pollen tube development. *Molecular Breeding* (in press).
(27) ROGERS, S.O. AND BENDICH, A.J. (1984) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
(28) ROQUE, E.; GÓMEZ, M.D.; ELLULL, P.; WALLBRAUN, M.; MADUEÑO, F.; BELTRÁN, J.P. AND CAÑAS, L.A. (2007) The *PsEND1* promoter: a novel tool to produce genetically engineered male-sterile plants by early anther ablation. *Plant. Cell Rep.* 26: 313-325.
(29) ROTINO, G.L.; PERRI, E.; ZOTTINI, M.; SOMMER, H. AND SPENA, A. (1997) Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnol.* 15: 1398-1401.

(30) SANGER, F.; NICKLEN, S. AND COULSO, A. R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *PNAS. USA*. 74: 5463-5467.
(31) SCOTT, R.J.; SPIELMAN, M. AND DICKINSON, H.G. (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell*. 16 (suppl): S46-S60.
(32) SCHMÜLLING, T.; RÖHRIN, H.; PILZ, S.; WALDEN, R. AND SCHELL, J. (1993) Restoration of fertility by antisense RNA in genetically engineered male sterile tobacco plants. *Mol. Gen. Genet*. 237: 385-394.
(33) SHORE, P. AND SHARROCKS, A. D. (1995) The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem*. 229: 1-13.
(34) WEN-JUN, S. AND FORDE, B. G. (1989) Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. By high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res*. 17. 4415.
(35) WILLIAMS, M.E. (1995) Genetic engineering for pollination control. *Trends Biotechnol*. 13: 344-349.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1265-1285

Artículo original

Individualización de Carboplatino en el anciano con cáncer de pulmón no microcítico avanzado

Recibido el 8 de octubre de 2007

N. VÍCTOR JIMÉNEZ TORRES[1,2*], MATILDE MERINO SANJUÁN[2], DANIEL ALMENAR CUBELLS[3], JOAQUIM A. MONTEIRO[2], INMACULADA MAESTU MAIQUES[4], VÍCTOR JIMÉNEZ ARENAS[2]

[1]*Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Dr. Peset.* [2]*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia.* [3]*Servicio de Oncología. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia.* [4]*Servicio de Oncologia. Hospital Virgen de los Lirios. Alcoy-Alicante.*

RESUMEN

El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) se diagnostica mayoritariamente en pacientes mayores de 65 años. Los pacientes ancianos presentan una elevada comorbilidad asociada al tratamiento antineoplásico que demanda la individualización de las pautas posológicas. Las opciones de tratamiento son abundantes y el carboplatino (CbPt) se encuentra entre los fármacos de primera línea. La dosis de

* **Información de contacto:**
N. Víctor Jiménez Torres.
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Avda Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Valencia).
tel: 963543326
fax: 963544911
e-mail: victor.jimenez@uv.es

Abreviaturas: CPNM, Cáncer de pulmón no microcítico; **CbPt,** carboplatino; **AUC,** Área bajo la curva; **TFG,** Tasa de filtración glomerular; **SC,** Superficie corporal; $\mathbf{Cl_{CbPt}}$**,** Aclaramiento plasmático de CbPt libre; $\mathbf{Cl_{Cr}}$**,** Aclaramiento plasmático de creatinina; **Cp,** Concentración plasmática; **CG,** Cockroft-Gault; **IMC,** Índice de masa corporal; **ERM,** Error relativo medio; **RMSE,** Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

CbPt se establece con la fórmula de Calvert (estándar) que requiere la medida exacta de la función renal.

El objetivo de este trabajo es aportar un modelo farmacocinético que permita individualizar las dosis de CbPt en ancianos con CPNM avanzado y evaluar su exactitud y precisión respecto al estándar.

Los modelos farmacocinéticos para el CbPt no unido a las proteínas plasmáticas, obtenidos con las concentraciones plasmáticas de una población de 24 pacientes varones con CPNM, indican que la edad es la covariable biométrica más estrechamente relacionada con el aclaramiento plasmático de CbPt, sin dejar por ello de ser un factor de confusión. El error relativo medio (ERM) de la dosis ha sido para los pacientes adultos (edad < 65 años) del 5% (1-9%) y para los pacientes ancianos del 25% (19-30%). Por consiguiente, la dosificación de CbPt con la fórmula de Calvert conduce a una sobredosificación en los pacientes ancianos, produciendo mayor exposición al fármaco de la deseada. El alcance clínico de estos hallazgos requiere su validación en una nueva población de pacientes.

Palabras clave: Cáncer de pulmón en ancianos, Farmacocinética poblacional, Platinos.

ABSTRACT

Individual dosing of carboplatin in elderly patients with advanced non small cell lung cancer

Non small cell lung cancer (NSCLC) is frequently diagnosed in patients older than age 65 years. Elderly patients often have comorbidities associated with the antineoplasic treatment that request individualization of the chemotherapy. Treatment options are numerous and carboplatin (CbPt) is in the first line of treatment. Conventional doses of CbPt are individually adjusted applying the Calvert formulae (standar) that demands the accurate measure of renal function.

The aim of this study is to develop a pharmacokinetic model in order to individualise the dose of CbPt in elderly patients in advanced NSCLC, and to characterize its bias and precision respect to the standard.

The pharmacokinetic models for the unbound fraction of CpPt were obtained from concentration-time data of ultrafiltrate plasma samples of twenty-four advanced NSCLC men patients enrolled in the study. Age was significantly related to the carboplatin clearance, although is a confusion factor. The mean dose error, in percentage, was 5% (1-9%) in adult patients (Age< 65 years) and 25% (19-30%) in elderly patients. Consequently, CbPt the dose regimen in enderly patients, established by means of Calvert's formula is overestimated and the exposure to the antineoplastic is higher than desired. The clinical relevance of these results requires the validation of the model with a new population group.

Key words: Lung cancer in elderly, Population pharmacokinetics, Platinum.

1. INTRODUCCIÓN

El documento de Estrategia frente al Cáncer (1) plantea un respaldo a la investigación clínica y básica porque no es admisible que en el momento del diagnóstico de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), 80% del total de cánceres de pulmón, la gran mayoría de pacientes, presente la enfermedad con metástasis y, en no menos del 50%, con una edad media de 70 años (2), el estado de la enfermedad sea avanzada.

El paciente anciano presenta continuos cambios fisiológicos que demandan individualización de su tratamiento, con independencia del antineoplásico recibido para optimizar la respuesta en términos de eficacia y ausencia de toxicidad (2). Surge así la búsqueda de las mejores pautas posológicas y de selección de los fármacos antineoplásicos manejando predictores farmacocinéticos, farmacodinámicos y farmacogenéticos (3, 4).

La problemática de la monitorización de los tratamientos en el anciano con cáncer adolece de un referente claro al representar esta subpoblación menos de un tercio de los participantes en ensayos clínicos (5); por ello, los beneficios de la quimioterapia en la población general con CPNM no deben ser extrapolados a la subpoblación geriátrica, entre otros motivos, por su mayor riesgo de toxicidad. Otra dificultad es la disponibilidad de modelos poblacionales de ajuste de dosis sin considerar la edad, o bien manejarla truncada, lo que conlleva a sesgos equivalentes a realizar este proceso en la subpoblación pediátrica (6). En la práctica, los ancianos reciben menos dosis de antineoplásicos y son pocos los que completan los tratamientos (7), limitando la optimización de la respuesta; de hecho, la mortalidad por CPNM aumenta a partir de los 70 años, posiblemente porque estos pacientes están sometidos a un doble riesgo: el de tratamientos empíricos (2) con pobre resultado en supervivencia, y el de una toxicidad excesiva al utilizar la terapia estándar de pacientes jóvenes.

Las dificultades para individualizar la dosis en el anciano se agravan cuando se utiliza carboplatino (CbPt) al ser necesaria la medida exacta de su función renal, para la que no hay acuerdo sobre qué fórmula de cálculo del aclaramiento de creatinina (8) es óptima

para garantizar el mayor impacto sobre la supervivencia y calidad de vida del paciente añoso. El resultado es que la inexactitud de la dosis de CbPt (no inferior al 20%), para un valor de área bajo la curva (AUC) diana, es dependiente de la fórmula aplicada y a pesar de la propuesta de factores de corrección para las fórmulas de Calvert o de Chatelut o, de modelos poblacionales (9), se sigue necesitando su evaluación prospectiva.

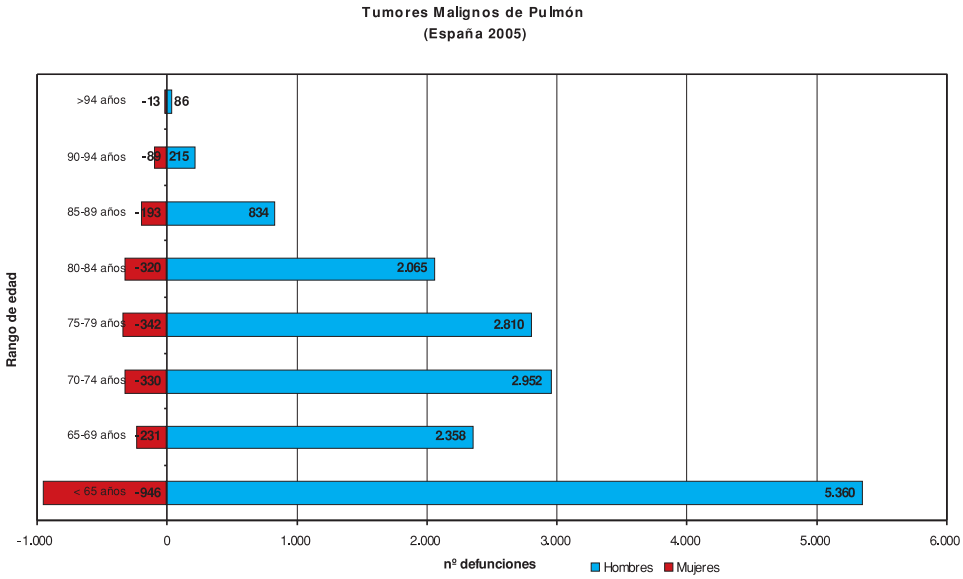
El estándar de práctica para la individualización posológica de CbPt se basa en obtener el valor diana de AUC predeterminado para cada tipo de cáncer, al haberse demostrado una relación estrecha entre AUC y respuesta (10, 11). Para la mayoría de los tumores sólidos se aceptan valores entre 4 y 8 mg/mL/min, aunque se reconoce que no siempre un incremento de AUC mejora la supervivencia (12). Para la población anciana con CPNM avanzado, la combinación de dos componentes (dobletes) y en particular gemcitabina más CbPt, duplica el porcentaje de respuesta (del 20% al 40%) y mejora la supervivencia (2, 13, 14).

El objetivo de este trabajo es informar del estado actual de la investigación de nuestro grupo sobre el desarrollo de modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos para mejorar la exactitud y precisión, respecto al modelo actual de Calvert, para calcular la dosis de CbPt en ancianos con CPNM avanzado.

1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón no microcítico

El cáncer de pulmón es el más mortal de todos los tipos de cáncer, cuya incidencia y mortalidad disminuye año tras año, pero durante el año 2007 y sólo en EEUU, habrá más de 200.000 personas diagnosticadas, con únicamente el 16 % en estadios localizados (15). En España, este cáncer es la primera causa de muerte por enfermedades malignas (85% hombres, 15% mujeres) con un incremento anual en pacientes mayores de 65 años con CPNM (Figura 1). Al diagnóstico, no menos del 50% de esta subpoblación presenta enfermedad avanzada y, según el registro del Servicio de Oncología Médica del H. U. Dr. Peset de Valencia, el 84% de los 931 pacientes tratados por cáncer de pulmón (1997-2006) corresponden a CPNM, con una mediana de edad de 68 años.

La supervivencia mayor de un año ha pasado del 37% en el periodo 1975-79 al 42 % en 2002 aunque a los 5 años, a pesar de los nuevos tratamientos quimioterápicos, sigue en porcentajes casi anecdóticos. De los 19.099 fallecimientos debidos a cáncer de pulmón en el año 2005 en nuestro país, el 67% tenían más de 64 años (16).



1.2. Tratamientos quimioterápicos del CPNM

El beneficio que aporta la quimioterapia a los pacientes con CPNM avanzado es superior al mejor cuidado de apoyo (17) y los tratamientos de dos componentes (dobletes) (18) son más eficaces que los de un único fármaco (19); los esquemas con tres fármacos no han demostrado ventajas. Los estándar de práctica se establecen, en general, con platinos (cisplatino y CbPt) y taxanos (paclitaxel y docetaxel), vindesina, vinorelbina y gemcitabina (20, 21, 22) y también sin platinos (23).

Frecuentemente se debate (2, 24, 25) si los pacientes mayores de 65 años, con CPNM avanzado, deberían ser tratados de la misma manera que los pacientes más jóvenes a pesar del aumento significativo en supervivencia y de la mejor calidad de vida en los pacientes que recibieron la quimioterapia, sin que se perciban ventajas de

unos esquemas sobre otros (26). En cualquier caso, se hace imprescindible mejorar la individualización de los tratamientos actuales, también la de los nuevos, porque la elección del tratamiento debe basarse, además de en la edad y el estado general (performance status o PS) del paciente, en su fenotipo ya que puede determinar el curso de la enfermedad y la respuesta a los antineoplásicos (27). Por ello, la integración en la quimioterapia de anticuerpos monoclonales activos frente a dianas terapéuticas —receptores como el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGFR)— tiene lógica en CPNM y representan un área de investigación clínica intensa.

Hasta el momento, la adición de Erlotinib ha mostrado ventajas sobre la quimioterapia sola (ensayos TRIBUTE (28) y TALENT (29)), con respuestas del 82% en los pacientes con deleciones del exón 19; sin embargo, el ensayo TRIBUTE (6 ciclos de CbPt y paclitaxel + erlotinib o placebo), no demuestra diferencia en la supervivencia total (10,6 contra 10,5 meses de mediana) o en el tiempo a la progresión, pero sí en los no fumadores, cuya tasa de supervivencia total era superior en la cohorte de erlotinib (22,5 contra 10,1 meses) (30). El ensayo TALENT, evaluó gemcitabina/cisplatino con o sin erlotinib no mejorando la supervivencia global ni el tiempo a la progresión. Resultados parecidos se han obtenido para los anti-EGFR Gefitinib (31, 32) y Cetuximab (33) en el tratamiento de primera línea de CPNM avanzado y diferentes dobletes. Bevacizumab, (anti-VEGF), mejora la supervivencia cuando se incorpora a la quimioterapia estándar (paclitaxel más CbPt), en pacientes no tratados con estadios IIIB o IV (34). La supervivencia media en el brazo de Bevacizumab fue de 12,3 meses frente a 10,3 meses. En el grupo paclitaxel/carboplatin/bevacizumab la toxicidad fue mayor y se registraron 15 muertes relacionadas con el tratamiento.

La toxicidad de estos antineoplásicos, especialmente en ancianos (2), es un factor limitante de la dosis. La Tabla 1 recoge, por tipo de pauta y como ejemplo, las tendencias de anemia y grados registrados para pacientes con CPNM (35).

TABLA 1. ***Relación entre tratamientos antineoplásicos en CPNM y grado de anemia.***

Esquema	Nº pacientes	Grado 1-2 (%)	Grado 3-4 (%)
CbPt-Paclitaxel	293	90	10
CbPt-Gemcitabina	334	Sin dato	5-6
Cisplatino-Docetaxel	297	85	15
Cisplatino-Paclitaxel	384	45-60	5-23
Cisplatino-VP16	119	73	20-42
Cisplatino-Gemcitabina	89	Sin dato	13-28
Cisplatino-Vinorelbina	204	Sin dato	24

1.3. Modelos para la individualización de la dosis de Carboplatino

Entre las diferentes opciones de tratamiento quimioterápico del CPNM avanzado en el anciano, los esquemas con cisplatino o CbPt son estándar de práctica asistencial por ser equivalentes en porcentajes de respuesta y supervivencia media (4), con la ventaja para CbPt de su menor toxicidad no hematológica (19). La mayor limitación para el uso de los platinos en el anciano radican, básicamente, en su menor aclaramiento de creatinina (entre 40 y 70 ml/min), compatible con indicadores de enfermedad renal (36) y con el agravamiento de la toxicidad hematológica y no hematológica de los antineoplásicos.

Las covariables que determinan la dosis de CbPt son dependientes del tipo de tumor, de la antropometría, de la función renal y de la genética de los pacientes. Las propuestas para su individualización se basan, mayoritariamente, en que entre el 54 y el 82% de la dosis administrada se excreta inalterada en orina y su aclaramiento renal se correlaciona con la tasa de filtración glomerular (TFG). El estándar asistencial para definir la dosis de CbPt, por ser superior al método tradicional de la superficie corporal (SC), es la fórmula de Calvert (6) que requiere la medida exacta de TFG (37) y manejar un valor constante de 25 ml/min como aclaramiento no renal (ecuación 1). Por ello, en la práctica, el cálculo del aclaramiento plasmático de

CbPt libre (Cl_{CbPt}) se estima, a partir del aclaramiento plasmático de creatinina (Cl_{Cr}), mediante las fórmulas de Cockroft-Gault (CG), Jelliffe, Jellife modificada, Wright y MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) (6, 36 38) en las que participan las covariables edad, peso, talla, sexo y la concentración de creatinina plasmática (Tabla 2). El objetivo en todos los casos es alcanzar en el paciente un AUC diana situado entre 4 y 8 mg·min/mL. Otra opción para este fin es recurrir a la fórmula de Chatelut (ecuación 2) si bien sobreestima la dosis de CbPt en los hombres y la subestima en las mujeres en un 20%, evidenciándose que el sexo femenino es un factor de confusión (6, 39).

$$\text{Dosis}_{CbPt} = \text{AUCdiana} \times (\text{TFG} + 25) \qquad \text{Ecuación (1)}$$

$$\text{Dosis}_{CbPt} = \text{AUC}_{\text{diana}} \times 0{,}134 \times \text{P} + \frac{(218 \times \text{P}) \times [1 - 0{,}00457 \times \text{E}]}{[\text{Cr}]} \times (1 - 0{,}314 \times \text{S}) \qquad \text{Ecuación (2)}$$

Dosis en mg; AUC: área bajo la curva diana en mg·min/mL y TFG en mL/min; Cr: creatinina sérica en mMolar; E: edad en años; P: peso en Kg; S: sexo (1=mujer; 0=hombre).

Una alternativa más a la individualización de la dosis de CbPt es manejar concentraciones plasmáticas y modelos no compartimentales o compartimentales con soporte de la metodología bayesiana. Finalmente, se ha propuesto (40) la individualización de la dosis de CbPt por la toxicidad limitante predefinida para cada paciente, mediante parámetros farmacodinámicos y modelos lineales (ecuación 3).

$$\text{Dosis}_{CbPt} = \frac{0.091 \times Cl_{Cr}}{SC} \times \%\,\text{RPdN} + 86 \qquad \text{Ecuación (3)}$$

Dosis en mg/m^2; Cl_{Cr}: aclaramiento de creatinina sérica en mL/min; SC: superficie corporal en m^2; % RPdN: porcentaje de reducción plaquetar deseada en el nadir

TABLA 2. ***Fórmulas utilizadas para el cálculo del aclaramiento plasmático de creatinina, o la tasa de filtración glomerular.***

Crockroft-Gault	**Jelliffe**
$Cl_{Cr} = \frac{(140 - E) \times P}{[72 \times Cr]} \times S$	$Cl_{Cr} = \frac{S \cdot (98 - (0.8 \cdot (E - 20)))}{[Cr]}$
S (1= hombre; 0,85= mujer)	S (1= hombre; 0,9= mujer)
Jelliffe modificada	**Wright**
$Cl_{Cr} = \frac{S \cdot SC \cdot (98 - (0.8 \cdot (E - 20)))}{[Cr \cdot 1.73]}$	$TFG = \frac{(6580 - 38.8 \cdot E) \cdot SC \cdot S}{[Cr]}$
S (1= hombre; 0,9= mujer)	S (1= hombre; 0,00832= mujer)
MDRD-4	
$TFG = 186 \cdot Cr^{-1.154} \cdot E^{-0.203} \cdot S \cdot R$	S (1= hombre; 0,742= mujer)

TFG: Tasa de filtración glomerular en ml/min; Clcr: aclaramiento plasmático de creatinina en ml/minuto; Cr: creatinina sérica en mg/dL; E: edad en años; P: peso real en Kg; SC: superficie corporal en m^2; R: raza (1= caucasiana; 1,210= negra). S: sexo.

2. PACIENTES Y MÉTODOS

Los Servicios de Oncología de los Hospitales Universitario Dr. Peset de Valencia y Virgen de los Lirios de Alcoy, han reclutado los 24 pacientes varones (población total) siguiendo el protocolo de estudio farmacocinético, aprobado en 2005 por los respectivos comités éticos de investigación clínica. Todos los pacientes son hombres diagnosticados de CPNM en estadio avanzado, no tratados anteriormente, que reciben el esquema gemcitabina-CbPt (gemcitabina 1250 mg/m^2, en perfusión IV durante 30 min, días 1 y 8, seguido de CbPt en perfusión IV de 60 min, día 1). Para esta muestra de pacientes (Tabla 3) se han definido dos grupos: 15 Ancianos (de más de 70

años) y 9 Adultos (de menos de 65 años), ambos dosificados con la fórmula de Calvert y estimación del Cl_{Cr} con la ecuación de Cockroft-Gault, (Calvert-CG) para un AUC diana de CbPt de 4 y 5 mg·min/mL, respectivamente. A cada paciente se le extrajeron tres muestras de sangre (Cp) postperfusión IV, entre 1-2 horas (Cp1), 3-5 horas (Cp2) y 12-24 horas (Cp3).

TABLA 3. ***Características biométricas de los 24 pacientes con CPNM.***

Parámetro	**Total (N= 24)**	**Adultos (N=9)**	**Ancianos (N= 15)**
Edad (años)	69 (10,28)	59 (6,17)	77 (2,71)
Peso (kg)	70 (10,01)	73 (10,14)	69 (10,04)
Talla (cm)	166 (0,05)	169 (3,78)	164 (5,16)
IMC (Kg/m^2)	25,4 (3,43)	25,4 (3,39)	25,7 (3,49)
Crs (mg/dL)	1,0 (0,26)	0,87 (0,15)	1,1 (0,29)
Dosis administrada (mg)	443 (151,15)	615 (90,52)	338 (58,51)

Valores medios y desviación estándar, Crs: concentración de creatinina plasmática, IV: perfusión intravenosa, IMC Índice de masa corporal.

En las muestras de plasma ultrafiltrado se valoró el platino libre (no unido a proteínas) tras adaptación de un método de espectrofotometría de absorción atómica de llama (11). La concentración plasmática de CbPt se estableció de acuerdo a su razón molar Pt:CbPt. El método analítico se ha validado para la linealidad de 0,1 y 91,2 mg/mL con un error relativo inferior a 10,6% (exactitud) y un coeficiente de variación intradía e interdía inferior a 8,1% (precisión); el límite de cuantificación fue de 0,05 mg/L.

El modelo farmacoestadístico para CbPt se estableció utilizando la regresión no lineal por mínimos cuadrados extendidos, con doble precisión y estimación condicional de primer orden (FOCE), implementada en el programa NONMEM 5,0 (41). Los modelos farmacocinéticos poblacionales se han caracterizado con las Cp experimentales de la población total (Modelo PK1) y de la subpoblación de ancianos (Modelo PK2). Se ha utilizado el modelo bicompartimental

IV con eliminación de primer orden (42). El Cl_{CbPt} se modeló con las covariables edad, peso, índice de masa corporal (IMC), Cp, de creatinina plasmática y Cl_{Cr}. El modelo seleccionado (ecuación 4) indica que el Cl_{CbPt} disminuye proporcionalmente a medida que aumenta la edad del paciente.

$$Cl_{CbPt} = \text{theta}(1) - EDAD \times \text{theta}(5) \qquad \text{Ecuación (4)}$$

La variabilidad interindividual del Cl_{Cr} y Vc se ha modelado de forma exponencial y las microconstantes k_{12} y k_{21} de forma aditiva. La variabilidad residual se modeló utilizando el modelo aditivo exponencial. La bondad del ajuste se ha evaluado mediante las representaciones gráficas de la Cp experimental frente a tiempo de muestreo, o de las Cp poblacional e individual, respectivamente; también de los valores residuales frente a la Cp predicha poblacional y de estos frente al tiempo. El valor de la función mínimo objetiva (FMO) determinó el modelo a seleccionar.

Con los parámetros farmacocinéticos poblacionales y sus variabilidades, se han estimado los parámetros individuales de Cl_{CbPt} y AUC, mediante la metodología bayesiana (posthoc de NONMEM). La exactitud y precisión de los parámetros Cl_{CbPt}, AUC y dosis individualizada de CbPt, según los dos modelos farmacocinéticos propuestos, se han expresado como el error relativo medio (ERM, ecuación 5) y la raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE, ecuación 6), utilizando como referente la fórmula de Calvert-CG, los valores de AUC diana predefinidos han sido 4 mg·min/mL para ancianos y 5 mg·min/mL para adultos.

$$ERM = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\frac{Cl_i\left(Calvert - CG\right) - Cl_i\left(estimado\right)}{Cl_i\left(Calvert - CG\right)} \qquad \text{Ecuación (5)}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\left(Cl_i\left(Calvert - CG\right) - Cl_i\left(estimado\right)\right)^2} \qquad \text{Ecuación (6)}$$

N: número de pacientes; Cl_i (Calvert-CG): aclaramiento de CbPt del paciente i calculado con la fórmula de Calvert y estimación del Cl_{Cr} a partir de la ecuación de Cockroft-Gault; Cl_i (estimado): aclaramiento de CbPt del paciente i estimado mediante metodología bayesiana.

Con el objetivo de cuantificar la mejora en la individualización de CbPt que proporciona la monitorización de sus concentraciones plasmáticas y los modelos PK1 y PK2, se propone como indicador de calidad que al menos el 80% de los pacientes presenten un valor de AUC calculada, cuya diferencia con el AUC diana predefinida no sea superior a ± 20%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta el momento, la experiencia clínica ha demostrado que los pacientes con CPNM en estadio avanzado, tratados con el esquema gemcitabina - CbPt presentan, en función de la edad, distinto perfil de toxicidad. Por ello, en la práctica asistencial se recurre a disminuir la dosis de CbPt en pacientes de edad superior a 70 años dirigiendo el AUC diana a 4 mg·min/mL y utilizando la fórmula de Calvert-CG para su individualización posológica a pesar de la ausencia de validación en este grupo de población. Huitema y col (9) para una población de 10 pacientes, 1 hombre y 9 mujeres, de 44 años de edad media (entre 25 y 48 años) obtienen un valor de 116,5 mL/min para el Cl_{ClPt} y de 14,4 L para el Vd del compartimento central (Vc). Ekhart y col (37), en una población de 218 pacientes, 107 mujeres y 71 hombres, de edad media de 48 años (entre 16 y 75 años) indican que el Cl_{CbPt} es de 138,8 mL/min.

En la Tabla 4 se muestran los parámetros farmacocinéticos poblacionales de CbPt libre, calculados para la población total (modelo PK1) y con la muestra de ancianos (modelo PK2); en ambos grupos el Cl_{CbPt} está relacionado con la edad de modo que para un paciente de 44 años se estima un Cl_{CbPt} de 162,7 mL/min (modelo PK1) o de 101,41 mL/min (modelo PK2). Estas diferencias con los datos precedentes explicarían alguna de las limitaciones de los modelos farmacocinéticos propuestos y ponen de manifiesto la necesidad de caracterizar el grupo de edad de los pacientes al que se dirigen los esfuerzos de individualización de la dosis de CbPt ya que estimar adecuadamente el Cl_{CbPt} es punto crítico para alcanzar el valor de AUC diana.

TABLA 4. ***Tendencia central y variabilidad de los parámetros farmacocinéticos poblacionales de carboplatino libre en la población total y subpoblación de pacientes ancianos.***

Parámetros (ES%)	**Total (N=24) (E:47-81 años)**	**Ancianos (N=15) (E:71-81 años)**
Cl_{CbPt} (mL/min)	[291,67-2,93·E]	[153,33-1,18·E]
K_{12} (h^{-1})	0,613 (48,3)	0,76 (64,9)
K_{21} (h^{-1})	0,547 (11,1)	0,552 (14,6)
Vc (L)	6,95 (69,4)	4,94 (16,3)
Variabilidad interindividual		
Cl	4,91 (64,5)	6,52 (110,6)
K_{12}	20 (fija)	20 (fija)
K_{21}	20 (fija)	20 (fija)
Vc	37,0 (50,7)	32,55 (115,1)
Variabilidad residual		
Aditiva	0,021 (124,6)	0,0289 (80,1)
Exponencial	0,05 (44,4)	0,056 (63,5)
FMO	-6,324	10,399

Modelo PK1 $Cl_{(CbPt)}$ (L/h)= [17,5 (45,1)-E·0,176 (57,4)].
Modelo PK2 $Cl_{(CbPt)}$ (L/h)= [9,2 (0)-E·0,0705 (16,3)].

Hasta el momento el estándar de práctica asistencial para calcular la dosis de CbPt es el Cl_{CbPt} determinado por la fórmula de Calvert, a pesar de estar aceptado (12, 38) que cuando se sustituye el método isotópico de cálculo de la TFG, por las ecuaciones de CG o de Jelliffe, se subestima la dosis CbPt de manera que el 20% o el 37% de los pacientes reciben, respectivamente, el 20% menos de la dosis (6). Se llega de este modo a la conclusión que la dosis de CbPt, para un AUC objetivo, es dependiente de la fórmula aplicada para el cálculo de la función renal y la propuesta de un factor de corrección requiere su evaluación prospectiva.

La Tabla 5 informa del Cl_{CbPt} individual estimado con los diferentes modelos. La exactitud y precisión de estos valores (Tabla 6) se ha establecido tomando como referente el valor proporcionado por el estándar (ecuación de Calvert-C-G). Para la población de adultos (9 pacientes de edad inferior a 65 años) las ecuaciones manejadas infraestimarían hasta el 14% (Jelliffe y Jelliffe modificada), 3% (modelo PK1), 2% (Wright) y, sobreestimarían el 35% (Chatelut) y 3% (MDRD-4). Para la población de ancianos (15 pacientes de edad superior a 70 años), las ecuaciones manejadas subestimarían hasta el 31% (Jelliffe y Jelliffe modificada), 24 % (modelo PK2) y 19% (modelo PK1) y, sobreestimarían el 38% (Chatelut), 21% (MDRD-4) y 3% (Wright); estas diferencias se transferirían a la dosis de CbPt en tendencia y magnitud. Así, para el modelo PK1, el ERM de la dosis en los adultos es de 0,05 (0,01 a 0,09) y en los ancianos de 0,19 (0,13 a 0,26); para el modelo PK2, el ERM en ancianos es 0,25 (0,19 a 0,30). La aparente mayor exactitud del modelo PK1 respecto al modelo PK2 es consecuencia de las diferencias de edad entre ambas subpoblaciones manifestándose como una factor o covariable de confusión.

Aplicando como estándar la determinación de la TFG por isotopía (6) se identifican tendencias semejantes a los valores obtenidos en nuestra muestra de pacientes recomendando, por su exactitud, la fórmula de Wright cuando el Cl_{Cr} se sitúa dentro de la normalidad; este dato es asimilable al comportamiento del modelo PK1. Sin embargo, para valores de Cl_{Cr} entre 50 a 70 mL/min ambas fórmulas sobreestimarían la dosis de CbPt un 8% y un 19%, respectivamente. Al utilizar como estándar la ecuación de C-G otros autores (12) encuentran para la fórmula de Jelliffe (no considera la superficie corporal) que sobreestimaría la dosis de CbPt en pacientes asiáticos, de menor IMC que los caucásicos. En consecuencia, es necesario seguir profundizando para alcanzar un consenso sobre la fórmula a utilizar para el cálculo del Cl_{CbPt} y determinar así el alcance o punto límite de variabilidad clínicamente aceptable, para los pacientes y los profesionales, en el cálculo de la dosis aunque actualmente se describen variaciones, entre la dosis empírica e individualizada de CbPt, de hasta el 35%.

TABLA 5.- ***Cl_{CbPt} libre estimado con las fórmulas de Calvert y Chatelut y los modelos poblacionales PK1 y PK2.*** *NA: no aplicable.*

	Cl CbPt libre (mL/min) calculado con las fórmulas							
	Calvert con					Chatelut	Modelo	
	C-G	Jellife	Jellife modificada	Wright	MDRD-4		PK1	PK2
Adultos	147,15	134,14	171,65	146,62	153,48	191,96	151,72	NA
	103,24	96,56	101,09	105,64	115,88	136,33	113,70	NA
	129,85	91,8	81,88	114,56	106,29	180,32	113,92	NA
	155,82	147	183,41	158,15	175,97	208,63	143,18	NA
	110,5	87,8	78,79	102,87	104,96	152,15	109,12	NA
	103,63	86,2	77,97	98,59	104,46	141,98	102,32	NA
	107,33	89,4	87	102,23	105,47	144,47	112,83	NA
	115,12	98,33	98,13	113,52	116,49	154,93	101,05	NA
	116,34	113,11	124,36	121,34	139,29	156,28	107,84	NA
Ancianos	70,05	64,14	51,43	71,98	77,65	89,41	71,32	65,76
	84,73	75,8	44,43	89,61	101,61	120,51	60,68	58,04
	84,6	69,73	34,64	83,83	93,28	123,66	65,58	61,12
	91,17	84,11	63,03	95,44	112,2	128,78	81,29	69,15
	82,93	70	47,76	82,14	87,73	114,3	73,36	66,46
	80,56	66,67	35,44	79,77	86,92	115	61,67	61,14
	60,08	59,4	48,18	64,77	73,11	72,82	49,56	49,66
	83,13	89,5	79,89	94,52	124,37	114,34	70,84	64,56
	58,63	55,12	40,18	61,4	67,58	72,11	63,70	60,18
	104,33	91,5	66,19	104,99	124,89	153,19	68,62	64,30
	92,08	106,71	117,81	105,96	143,16	123,16	69,64	65,65
	98,28	90,5	75,41	98,55	124,63	142,81	61,43	59,32
	71,21	71,18	59,81	76,36	93,63	93,97	62,14	59,39
	115,28	92,5	62,51	109,09	125,16	172,77	75,54	67,00
	93,12	74,09	45,64	89,36	94,36	133,4	66,67	64,06

TABLA 6, ***Exactitud y precisión del Cl_{CbPt} libre estimado con los modelos estudiados y la fórmula de Calvert-CG como estándar.***

Modelo	ERM		RECM (mL/min)	
	Adultos	Ancianos	Adultos	Ancianos
Jelliffe	0.14±0.08 (0.08; 0.19)	0.08±0.10 (0.03; 0.13)	18.77	11.89
Jelliffe modificada	0.13±0.25 (-0.03; 0.29)	0.31±0.23 (0.19; 0.42)	26.03	22.45
Wright	0.02±0.05 (-0.01; 0.06)	-0.03±0.06 (-0.06; 0.00)	6.52	33.22
MDRD-4	-0.03±011 (–0.10; 0.04)	-0.21±0.15 (–0.28; –0.13)	13.84	17.64
Chatelut	–0.35±0.03 (–0.37; -0.33)	–0.38±0.09 (–0.42; –0.34)	42.43	23.99
PK1	0.03±0.07 (–0.03; 0.08)	0.19±0.13 (0.13; 0.26)	9.69	22.02
PK2	NA	0.24±0.12 (0.18; 0.31)	NA	25.82

Valores positivos en el ERM indican infraestimación y valores negativos supraestimación. (error relativo medio, ERM, valor medio ± desviación estándar e intervalo de confianza 95%).

El AUC es el parámetro farmacocinético del CbPt mejor estudiado en relación a su eficacia y toxicidad (10, 11). En este trabajo, para valorar la mejora, que proporciona la monitorización de las Cp, a la individualización de la dosis de CbPt en ancianos se ha determinado el porcentaje de pacientes que presentan un valor de AUC estimada con diferencias inferiores a ± 20% respecto del AUC diana (Figura 2). En la población de ancianos, sólo un 20% alcanza esta condición; es decir, estarían bien dosificados para el modelo PK2. Este porcentaje se eleva a un 40% de los pacientes para el modelo PK1. A tenor de estos resultados, el cálculo del Cl_{CbPt} con la fórmula de Calvert sería mejorable si se acepta la monitorización de las Cp de CbPt como base del cálculo del Cl_{CbPt} mediante los modelos poblacionales

establecidos Esta práctica, en pacientes ancianos puede asociarse a una mejora en la individualización de la dosis y reducción de los efectos adversos del CbPt, aspectos que hasta el momento están pendientes de evidencia científica (2).

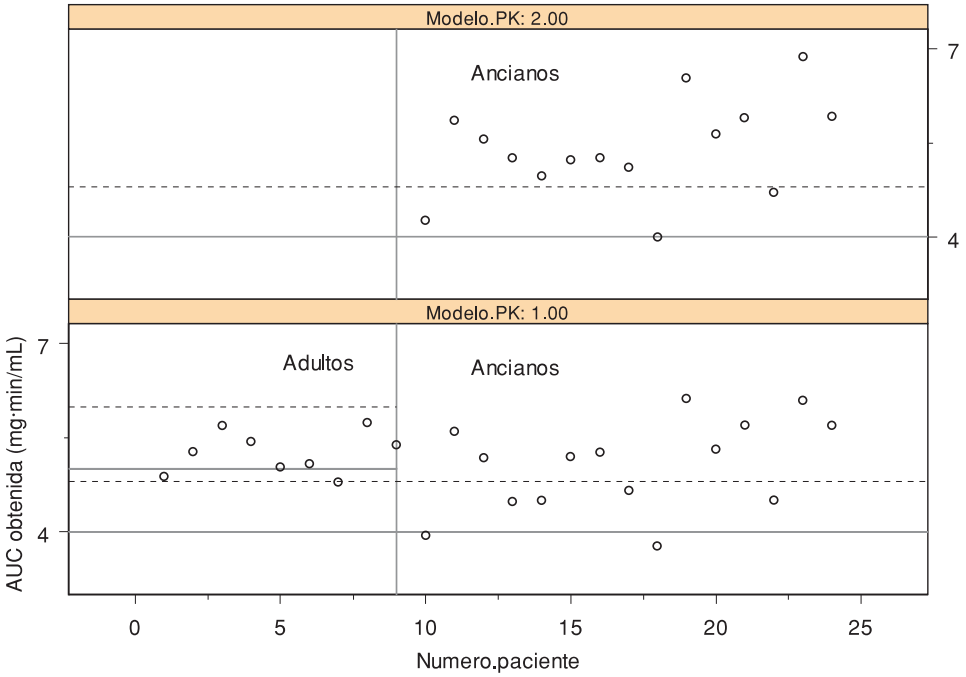


FIGURA 2. ***AUC individual de carboplatino, estimado por los modelos PK1 y PK2.*** *La línea continua indica el valor del AUC diana (adultos: 5 mg.min/mL, ancianos 4 mg.min/mL). La línea discontinua representa el valor de AUC aceptable (+20% del AUC diana). Adultos: Número de paciente del 1 al 9; Ancianos: Número de paciente del 10 al 24.*

4. CONCLUSIÓN

La estimación del aclaramiento de carboplatino libre, a partir de sus concentraciones plasmáticas, en la muestra de 24 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado, informa de la sobredosificación en los pacientes (19-30%) con el estándar de práctica (fórmula de Calvert). Esta condición proporciona mayor exposición de los pacientes al fármaco ya que el AUC estimada es, en general, superior

al AUC diana (5 mg·min/mL para adultos y 4 mg.min/mL para ancianos). No obstante, los modelos poblacionales descritos necesitan su validación con una nueva población de pacientes para aproximar, de manera individual, el valor de AUC real al valor de AUC diana.

5. AGRADECIMIENTOS

A Mercedes Carril, Mónica Tallón y Begoña Porta del grupo de trabajo de CbPt en ancianos.

A la Consellería de Sanitat de la Comunidad Valenciana por la subvención del proyecto de investigación, referencia: CS2007-AP-055.

6. BIBLIOGRAFÍA

(1) Estrategia en Cáncer del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro de Publicaciones. Madrid 2006.

(2) Gridelli, C.; Langer, C.; Maione, P.; Rossi, A. y Schild, S.E. (2007) Lung Cancer in the Elderly. *J. Clin. Oncol.* 25: 1898-1907.

(3) Simon, G.; Sharma, A.; Li, X.; Hazelton, T.; Walsh, F.; Williams, A.; Chiappori, C.; Haura, E.; Tanvetyanon, T.; Antonia, S.; Cantor, A. y Bepler, G. (2007) Feasibility and Efficacy of Molecular Análisis-Directed Individualizad Therapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol*. 25: 2741-2746.

(4) Cobo, M.; Isla, D.; Massuti, B.; Montes, A.; Sanchez, J.M.; Provencio, M.; Vinolas, N.; Paz-Ares, L.; Lopez-Vivanco, G.; Munoz, M.A.; Felip, E.; Alberola, V.; Camps, C.; Domine, M.; Sanchez, J.J.; Sanchez-Ronco, M.; Danenberg, K.; Taron, M.; Gandara, D. y Rosell, R. (2007) Customizing Cisplatin Base don Quantitative Excision Repair Cross-Complementing 1 mRNA Expression: A Phase III Trial in Non-Small-Cell Cancer. *J. Clin. Oncol*. 25: 2747-2754.

(5) Lewis, J.H.; Kilgore, M.L.; Goldman, D.P. Trimble, E.L.; Kaplan, R.; Montello, M.J.; Housman, M.G. y Escarce, J.J. (2003) Participation of patients 65 years of age or older in cancer clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 21: 1383-1389.

(6) Dooley, M.J.; Poole, S.G.; Rischin, D. y Webster, L.K. (2002) Carboplatin dosing: gender bias and inaccurate estimates of glomerular filtration rate. *Eur J. Cancer.* 38 (1): 44-51.

(7) Pepe, C.; Hasan, B. y Winton, T. (2006). Adjuvant chemotherapy in elderly patients: An analysis of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group and Intergroup BR 10. *J. Clin. Oncol.* 24:366s. (Abstr 7009).

(8) Ando, M.; Minami, H.; Ando, Y.; Saka, H.; Sakai, S.; Yamamoto, M.; Sasaki, Y.; Shimokata, K. y Hasegawa, Y. (2000) Multi-Institucional Validation Study of Carboplatin Dosing Formula Using Adjusted Serum Creatinine Level. *Clinical Cancer Research* 6: 4733-4738.

(9) HUITEMA, A.D.R.; MATHÔT, R.A.A.; TIBBEN, M.M.; SCHELLENS, J.H.M.; RODENHUIS, S. Y BEIJNEN, J.H. (2000) Validation of thecniques for the prediction of carboplatin exposure; Application of Bayesian methods. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67: 621-630.

(10) GORE, M. (2003). Carboplatin Equals Cisplatin: But How Do I Prescribe it? *J. Clin. Oncol.* 21:17, 1-3.

(11) KLOFT, C.; SIEGERT, W. Y JAEHDE, U. (2003) Individualised dosing strategy for high-dose CbPt in patients with germ cell cancer. *British Journal of Cancer* 89: 787-794.

(12) NAGAO, S.; FUJIWARAA, K.; IMAFUKU, N.; KAGAWA, R.; KOZUKA, Y.; ODA, T.; MAEHATA, K.; ISHIKAWA, H.; KOIKE, H.; AOTANI, E. Y KOHNO, I. (2005) Difference of carboplatin clearance estimated by the Cockroft–Gault, Jelliffe, Modified-Jelliffe, Wright or Chatelut formula. Gynecologic Oncology. 99: 327-333.

(13) SEDERHOLM, C. (2002) Gemcitabine versus Gemcitabine/Carboplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Preliminary Findings in a Phase III Trial od the Swedish Lung Cancer Study Group. *Semin. Oncol*. 29 (Supl 9) 50-54.

(14) WANG, L.; WU, X.; HUANG, M.; CAI, J.; XU, N. Y LIU, J. (2007) The efficacy and relationship between peak concentration and toxicity profile of fixed-dose-rate gemcitabine plus carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 60: 211–218.

(15) AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society 2007.

(16) http://www.ine.es/inebmenu/mnu_salud.htm#5 (Acceso el 22-8-2007).

(17) PFISTER, D.G.; JOHNSON, D.H.; AZZOLI, C.G.; SAUSE, W.; SMITH, T.J.; BAKER, S. JR.; OLAK, J.; STOVER, D.; STRAWN, J.R.; TURRISI, A.T. Y SOMERFIELD, M.R. (2004) American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *J. Clin. Oncol*. 22: 330-353.

(18) DEBALDO, C.; MICHIELS, S.; SYZ, N.; SORIA, J.C.; LE CHEVALIER, T. Y PIGNON, J.P. (2004) Benefits od adding a drug to a single agent or a 2 –agent chemotherapy regimen in advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis. *JAMA*. 292: 470-484.

(19) SEDERHOLM, C.; HILLERDAL, G.; LAMBERG, K.; KÖLBECK, K.; DUFMATS, M.; WESTBERG, R. Y GAWANDE, S.R. (2005) Phase III trial of gemcitabine plus carboplatin versus single-agent gemcitabine in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: the Swedish Lung Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* 23: 8380-8388.

(20) GEORGOULIAS, V.; ARDAVANIS, A.; TSIAFAKI, X.; AGELIDOU, A.; MIXALOPOULOU, P.; ANAGNOSTOPOULOU, O.; ZIOTOPOULOS, P.; TOUBIS, M.; SYRIGOS, K.; SAMARAS, N.; POLYZOS, A.; CHRISTOU, A.; KAKOLYRIS, S.; KOUROUSSIS, C.; ANDROULAKIS, N.; SAMONIS, G. Y CHATZIDAKI, D. (2005) Vinorelbine plus cisplatin versus docetaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 23: 2937-2945.

(21) PUJOL, J.L.; BRETON, J.L. ; GERVAIS, R.; REBATTU, P.; DEPIERRE, A.; MORERE, J.F. ; MILLERON, B. ; DEBIEUVRE, D.; CASTÉRA, D.; BOUQUET, P.J.; MORO-SIBILOT, D.; LEMARIÉ, E.; KESSLER, R.; JANICOT, H.; BRAUN, D.; SPAETH, D.; QUANTIN, X. Y CLARY, C. (2005) Gemcitabine-docetaxel versus cisplatin-vinorelbine in ad-

vanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a phase III study addressing the case for cisplatin. *Ann. Oncol.* 16: 602-610.

(22) GRIDELLI, C.; GALLO, C.; SHEPHERD, F.A.; ILLIANO, A.; PIANTEDOSI, F.; ROBBIATI, S.F.; MANZIONE, L.; BARBERA, S.; FRONTINI, L.; VELTRI, E.; FINDLAY, B.; CIGOLARI, S.; MYERS, R.; IANNIELLO, G.P.; GEBBIA, V.; GASPARINI, G.; FAVA, S.; HIRSH, V.; BEZJAK, A.; SEYMOUR, L. Y PERRONE, F. (2003) Gemcitabine plus vinorelbine compared with cisplatin plus vinorelbine or cisplatin plus gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the Italian GEMVIN Investigators and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* 21: 3025-3034.

(23) D'ADDARIO, G.; PINTILIE, M.; LEIGHL, N.B.; FELD, R.; CERNY, T. Y SHEPHERD, F.A. (2005) Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. *J. Clin. Oncol.* 23: 2926-2936.

(24) PUJOL, J.L.; BARLESI, F. Y DAURES, J.P. (2006) Should chemotherapy combinations for advanced non-small cell lung cancer be platinum-based? A meta-analysis of phase III randomized trials. *Lung Cancer*. 51: 335-345.

(25) AUTORES NO LISTADOS (1999) Effects of vinorelbine on quality of life and survival of elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer. The Elderly Lung Cancer Vinorelbine Italian Study Group. *J. Natl. Cancer Inst*. 91 (1): 66-72.

(26) SCHILLER, J.A.; HARRINGTON, D.; VELAN, C.P.; LANGER, C.; SANDLER, A.; KROOK, J.; ZHU, J. Y JOHNSON, D.H. EASTERN COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP. (2002) Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-call lung cancer. *N. Eng.l J. Med.* 346: 92-98.

(27) NOVELLO, S.; LONGO, M. Y GIAJ, M. (2007) Toward Therapies Tailored to Patients Characteristics. *J. Thorac. Oncol.* 2: 38-41.

(28) HERBST, R.S.; PRAGER, D.; HERMANN, R. FEHRENBACHER, L.; JOHNSON, B.E.; SANDLER, A.; KRIS, M.G.; TRAN, H.T.; KLEIN, P.; LI, X.; RAMIES, D.; JOHNSON, D.H. Y MILLER, V.A. TRIBUTE INVESTIGATOR GROUP. (2005) TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol* .23: 5892-5899.

(29) GATZEMEIER, U.; PLUZANSKA, A.; SZCZESNA, A. (2004) Results of a phase III trial of erlotinib (OSI-774) combined with cisplatin and gemcitabine (GC) chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Program and abstracts of the 40th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; June 5-8; New Orleans, Louisiana. Abstract 7010.

(30) MILLER, V.A.; HERBST, R.S. Y PRAGER, D. (2004) Long survival of never smoking non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts) treated with erlotinib HCl (OSI-774) and chemotherapy: sub-group analysis of TRIBUTE. Program and abstracts of the 40th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; June 5-8, New Orleans, Louisiana. Abstract 7061.

(31) GIACCONE, G.; HERBST, R.S. MANEGOLD, C. SCAGLIOTTI, G.; ROSELL, R.; MILLER, V.; NATALE, R.B.; SCHILLER, J.H.; VON PAWEL, J.; PLUZANSKA, A.; GATZEMEIER, U.; GROUS, J.; OCHS, J.S.; AVERBUCH, S.D.; WOLF, M.K.; RENNIE, P.; FANDI, A. Y

JOHNSON, D.H. (2004) Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small cell cancer: a phase III trial—INTACT 1. *J. Clin. Oncol.* 22: 777-784.

(32) HERBST, R.S.; GIACCONE, G.; SCHILLER, J.H.; NATALE, R.B.; MILLER, V.; MANEGOLD, C.; SCAGLIOTTI, G.; ROSELL, R.; OLIFF, I.; REEVES, J.A.; WOLF, M.K.; KREBS, A.D.; AVERBUCH, S.D.; OCHS, J.S.; GROUS, J.; FANDI, A. Y JOHNSON, D.H. (2004) Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small cell lung cancer: a phase II trial—INTACT 2. *J. Clin. Oncol*. 22: 785-794.

(33) ROSELL, R.; DANIEL, C. Y RAMLAU, R. (2004) Randomized phase II study of cetuximab with cisplatin (C) and vinorelbine (V) vs CV alone in the first-line treatment of patients (pts) with epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Program and abstracts of the 40th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; June 5-8; New Orleans, Louisiana. Abstract 7012.

(34) SANDLER, A.; GRAY, R.; PERRY, M.C. PERRY, M.C.; BRAHMER, J.; SCHILLER, J.H.; DOWLATI, A.; LILENBAUM, R. Y JOHNSON, D.H. (2006) Paclitaxel–carboplatin alone or with bevacizumab for non–small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med*. 355: 2542-2550.

(35) JEROME, E. Y GROOPMAN, L. M. I. *(*1999) Chemotherapy-Induced Anemia in Adults: Incidence and Treatment. *J. Natl. Cancer Inst*. 91: 1616-1634.

(36) GRACIA, S.; MONTAÑES, R.; BOVER, J.; CASES, A.; DEULOFEU, R.; DE FRANCISCO, A. Y ORTE L. (2006) Recomendaciones sobre la utilización de ecuaciones para la estimación del filtrado glomerular en adultos. *Química Clínica* 25 (5): 423-430.

(37) EKHART, C.; DE JORGE, M.E.; HUITEMA, A.D.R. Y SCHELLENS J.H.M. (2006) Flat dosing of carboplatin is justified in adult patients with normal renal function. *Clin. Cancer. Res*. 12 (21): 6502-6508.

(38) WRIGHT, J.G.; BODDY, A.V.; HIGHLEY, M.; FENWICK,J.; MCGILL, A. Y CALVERT, A.H. (2001) Estimation of glomerular filtration rate in cancer patients. *Br. J. Cancer*. 84: 452-459.

(39) CHATELUT, E.; CANAL, P.; BRUNNER, V.; CHEVREAU, C.; PUJOL, A.; BONEU, A.; ROCHÉ, H.; HOUIN, G. Y BUGAT, R. (1995) Prediction of carboplatin clearance from standard morphological and biological patient characteristics. *J. Natl. Cancer Inst*. 87(8): 573-580.

(40) EGORIN, M.J.; REYNO, L.M.; CANETTA, R.M.; JODRELL, D.I.; SWENERTON, K.D.; PATER, J.L.; BURROUGHS, J.N.; NOVAK, M.J. Y SRIDHARA, R. (1994) Modeling toxicity and response in carboplatin-based combination chemotherapy. *Semin. Oncol*. 21(5 Suppl 12): 7-19.

(41) LINDSTROM, M.J. Y BATES, T.M. (1990) Nonlinear mixed effects models for repeated measures. *Biometrics*. 46: 673-687.

(42) SHEN, M.; SCHILDER, R.J.; OBASAJU, C. Y GALLO, J.M. (2002) Population pharmacokinetic and limited sampling models for carboplatin administered in high-dose combination regimens with peripheral blood stem cell support. *Cancer Chemoter. Pharmacol*. 50: 243-250.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73 (4): 1287-1307

Artículo original

Heterogeneidad morfológica de la porción posterior del estriado humano

Recibido el 19 de octubre de 2007

JAVIER BERNÁCER[1], LUCÍA PRENSA[2] Y JOSÉ MANUEL GIMÉNEZ-AMAYA[2] *

[1]*Laboratorio de Neuromorfología Funcional. Clínica Universitaria, Universidad de Navarra. Avenida Pío XII, 36. 31080 Pamplona (España)*

[2]*Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. c/ Arzobispo Morcillo, s/n. 28029. Madrid (España)*

RESUMEN

El estriado (núcleo caudado, NC, y putamen, Put) forma parte de los ganglios basales, un conjunto de núcleos subcorticales cuya principal función es la planificación y ejecución de los movimientos voluntarios. La información nerviosa procedente de la corteza cerebral alcanza el estriado formando tres canales distintos, denominados asociativo, sensorimotor y límbico. La parte posterior del estriado, que incluye el cuerpo, el giro y la cola del NC, además del último tercio del Put postcomisural, ha recibido una escasa atención en cuanto a sus características químicas y composición celular. El presente trabajo tiene como objetivo analizar la distribución de dos poblaciones de interneuronas (nitrérgicas y colinérgicas) en

* **Información de contacto:** José Manuel Giménez-Amaya. Despacho A-39, Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. C/ Arzobispo Morcillo s/n, 28029 – Madrid (España). Teléfono: 91 497 5323; fax: 91 497 5353; correo electrónico: josemanuel.gimenezamaya@uam.es

Lista de abreviaturas: ABC, complejos avidina-biotina-peroxidasa; **ca**, comisura anterior; **ChAT**, colina acetiltransferasa; **DAB**, 3,3'-diaminobenzidina; **ENK**, encefalina; **F**, femenino; **M**, masculino; **NADPH-d**, NADPH-diaforasa; **NC**, núcleo caudado; **PB**, tampón fosfato; **PBS**, tampón fosfato salino; **postcom.**, postcomisural; **precom.**, precomisural; **Put**, putamen.

la parte posterior del estriado. Según nuestros resultados, ambas poblaciones presentan una mayor densidad en la parte posterior del estriado que en la parte anterior, siendo más abundantes en el NC que en el Put. La región más densamente poblada por las neuronas nitrérgicas es el giro del NC, mientras que las neuronas colinérgicas son especialmente abundantes en el cuerpo de dicho núcleo. Además, la organización de los dos grupos neuronales con respecto al compartimento estriosomal es diferente en la parte posterior del estriado que en las regiones anteriores, y también varía según se trate de las neuronas nitrérgicas o de las colinérgicas. En definitiva, nuestro estudio demuestra que la porción posterior del estriado puede llevar a cabo un procesamiento de la información tanto o más complejo que la parte anterior.

Palabras clave: ganglios basales, interneuronas, estriosomas, acetilcolina, NADPH-diaforasa.

ABSTRACT

Morphological heterogeneity of the human posterior striatum

The striatum (caudate nucleus, NC and putamen, Put) is a main part of the basal ganglia, a group of subcortical nuclei whose main function is the planning and execution of voluntary movements. Nervous inputs from the cerebral cortex are divided into three different channels in the striatum, termed associative, sensorimotor and limbic. The posterior aspect of the striatum comprises the body, gyrus and tail of the NC, and the postcommissural Put, and has been very much left out of most of chemical and cellular studies. The present work is aimed at analyzing the distribution of two populations of interneurons (nitrergic and cholinergic) in those striatal regions. According to our results, both populations are more abundant in the posterior striatum than in its anterior aspects, with a higher density in the NC than in the Put. The gyrus of NC is the most populated region by nitrergic cells, whereas cholinergic interneurons are especially abundant in the body of NC. Furthermore, the organization of both interneuronal groups regarding the striosomal compartment is different in the posterior striatum with respect to its anterior aspects, and this organization also varied when nitrergic or cholinergic interneurons were analyzed. Overall, our study demonstrates that the posterior aspect of the striatum might carry out a more complex processing of the information than its anterior counterpart.

Key words: basal ganglia, interneurons, striosomes, acetylcholine, NADPH-diaphorase.

INTRODUCCIÓN

El estriado forma parte de un grupo de núcleos subcorticales denominados ganglios basales. En principio, se creyó que estos núcleos tenían como única función la transmisión de la información desde unas zonas corticales a otras, pasando por el tálamo. Sin embargo, diversos hallazgos demostraron que ciertas alteraciones de los componentes de los ganglios basales daban lugar a diferentes patologías con una sintomatología característica, y que podían afectar a funciones cognitivas, emotivas o motoras.

El estriado dorsal se compone de dos núcleos: el núcleo caudado (NC) y el putamen (Put). En ambos núcleos, así como en cualquier otra estructura nerviosa, se pueden distinguir dos tipos de neuronas en atención a la diana de su axón; así, las neuronas de proyección inervan otros núcleos distintos de aquél en el que se encuentran, mientras que el axón de las interneuronas permanece en el mismo núcleo en el que se encuentra su soma. Existe un gran número de clasificaciones de los tipos neuronales del estriado (1-5), y todas ellas coinciden en observar la presencia de espinas sinápticas en las dendritas de las neuronas de proyección, y la ausencia de las mismas en las interneuronas. Uno de los aspectos más llamativos acerca de estas dos poblaciones de neuronas estriatales es la variación de su proporción según se asciende en la escala filogenética. Así, mientras el porcentaje de las neuronas de proyección es de alrededor del 95% en roedores (5), en humanos esta cifra cae hasta el 75% (6, 7). Esta diferencia parece indicar la importancia de las interneuronas en la organización integradora y funcional del estriado de los primates. Existen seis poblaciones distintas de interneuronas estriatales según los neurotransmisores y las sustancias neuroactivas que contienen: **1)** interneuronas nitrérgicas con neuropéptido Y, somatostatina y GABA (8, 9); **2)** interneuronas colinérgicas (10); **3)** interneuronas con calbindina (11); interneuronas gabaérgicas con **4)** calretinina (11, 12) y **5)** parvalbúmina (11, 13); y, finalmente, **6)** neuronas dopaminérgicas (14-17).

Desde que en 1978 Graybiel y Ragsdale describieran la presencia de los estriosomas, multitud de estudios han analizado la anatomía química del estriado (18-21). El compartimento estriosomal es un conjunto de laberintos tridimensionales situados en el estriado con

unas características químicas y conectivas distintas del resto del tejido estriatal, denominado matriz. En general, los estriosomas son ricos en encefalina (ENK), sustancia P y proteína de membrana ligada al sistema límbico, mientras que tienen una cantidad inferior con respecto a la matriz de las enzimas acetilcolinesterasa, calbindina y parvalbúmina. En el año 1999, Prensa y colaboradores demostraron que el compartimento estriosomal era heterogéneo en sí mismo, observándose en él una periferia con distinto marcaje que el centro, con algunos marcadores (20). En cuanto a sus características hodológicas, se ha demostrado que los estriosomas están relacionados con el sistema límbico (22-24).

En el presente trabajo, nos proponemos describir la distribución y organización compartimental de los dos grupos de interneuronas considerados más importantes, las neuronas nitrérgicas y las colinérgicas, en la porción posterior del estriado. Nuestra hipótesis de trabajo es comprobar si esta zona estriatal tiene una complejidad neuronal similar a la de la parte anterior, y de esta manera valorar su importancia en los procesos cognitivos, emotivos y motores que lleva a cabo el estriado, así como en las distintas enfermedades neurológicas y psiquiátricas que afectan a este núcleo de los ganglios basales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del tejido

El material biológico post mórtem empleado en este estudio fue obtenido a partir de 9 adultos de ambos sexos sin evidencias clínicas o patológicas de haber padecido alteraciones neurológicas o psiquiátricas (Tabla 1). Este tejido fue donado por el Banco de Tejidos Neurológicos de Navarra (Clínica Universitaria and CIB), el Departamento de Anatomía Patológica de la Clínica Universitaria de Navarra, y el del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. En el momento del fallecimiento, se requirió la autorización de los parientes para realizar la autopsia médica. Tras ello, varias muestras biológicas fueron anonimizadas y mantenidas en el hospital para emplearlas en investigación. Las muestras biológicas anónimas usadas en el presente estudio fueron proporcionadas por los Departamentos citados des-

pués de la aprobación de nuestro Proyecto por los correspondientes Comités Éticos de los hospitales donde se recogieron las muestras (Clínica Universitaria y Universidad Autónoma de Madrid). Todos los casos empleados en este estudio fueron recogidos entre 2001 y 2004.

TABLA 1. ***Datos clínicos de los casos empleados en este estudio.***

Caso	Sexo	Edad (años)	Tiempo post mórtem (h)	Causa del fallecimiento
1	M	35	4	Ataque cardíaco
2	F	58	6	Hemorragia gastrointestinal
3	M	66	17	Adenocarcinoma gástrico
4	M	67	4,5	Neumonía bilateral
5	M	74	7	Sarcoma gástrico
6	M	63	12	Cáncer de próstata
7	F	20	2	Fibrosis quística
8	M	78	6	Cáncer de pulmón
9	M	50	6	Enfermedad pulmonar

F, femenino; M, masculino

El hemisferio cerebral, una vez extraído y pesado, fue cortado en bloques de un grosor aproximado a 1 cm, que fueron fijados en una solución constituida por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (PB) con un 0,2% de ácido pícrico, a 4ºC y durante cerca de 10 días. Estos bloques fueron sumergidos en sacarosa al 15% diluida en PB a 4ºC durante al menos 7 días antes de ser cortados. Aquellos bloques que no fueron cortados inmediatamente se almacenaron en una solución constituida por sacarosa (15%), azida sódica (0,1%) y PB. El corte fue realizado en sentido coronal en un microtomo de congelación, a 50 µm, recogiendo cada sección con un pincel humedecido, y almacenando el tejido en una solución crioprotectora formada por etilenglicol (30%) y glicerol (30%) en PB 0,05 M.

Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas

Técnica histoquímica de la NADPH-diaforasa (NADPH-d)

Varios cortes seleccionados en distintos niveles anteroposteriores del estriado humano fueron procesados para la visualización de la actividad enzimática de la NADPH-d, según hemos explicado anteriormente (9). Después, los cortes fueron lavados en PB y montados en portas gelatinizados. Tras dejarlos secar al aire durante una noche, fueron deshidratados mediante pasos sucesivos en alcoholes de concentración creciente, aclarados en tolueno y cubiertos con DPX. Algunos cortes sirvieron como controles negativos, incubándolos en un medio carente de β-NADPH, sin mostrar ningún tipo de marcaje.

Técnica inmunohistoquímica simple

Otra serie de cortes que abarcaba los distintos niveles estriatales fue tratado inmunohistoquímicamente para visualizar las neuronas colinérgicas por medio de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT). Después de tres lavados de 10 minutos en PB salino (PBS), los cortes fueron tratados con una solución formada por un tercio de etanol y dos tercios de agua oxigenada al 3% en PBS durante 30 minutos, con el fin de inactivar la actividad de la peroxidasa endógena. Tras otros tres lavados en PBS, los cortes fueron incubados en una solución con su anticuerpo primario (1:500, 2 noches) generado en cabra, incluyendo PBS como tampón y Tritón X-100 al 0,1%. Después de varios lavados en PBS, los cortes fueron de nuevo incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente en la solución que contenía el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Ig G anti-cabra generado en conejo; Vector Labs, Burlingame, EE UU), a una dilución 1:250. Después, y tras varios lavados en PBS, los cortes fueron sumergidos durante 90 minutos a temperatura ambiente en una solución al 1:125 de complejos avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Labs). Los cortes fueron revelados al situarlos en un medio con un 0,05% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma) y un 0,003% de H_2O_2 en tampón Tris al 0,05 M, pH 7,6. Algunos cortes sirvieron como control negativo omitiendo el anticuerpo primario o el secundario en las distintas soluciones.

Técnica combinada histoquímica e inmunohistoquímica

Algunos cortes pertenecientes a todos los niveles estriatales fueron seleccionados para visualizar en la misma preparación la distribución de las interneuronas NADPH-d respecto a los distintos compartimentos estriatales. Después de tratar los cortes para la técnica histoquímica de la NADPH-d descrita anteriormente, fueron lavados abundantemente en PBS durante 2 horas. Después, se realizó la técnica inmunohistoquímica de la ENK, empleando un anticuerpo generado en ratón (Medicorp, Montreal, Canadá) a una concentración 1:50 durante 2 noches, deteniendo la reacción de revelado lo antes posible para evitar un exceso de fondo que dificultara la observación de las neuronas.

Técnica de doble inmunohistoquímica

Algunos cortes fueron procesados inmunohistoquímicamente para la visualización simultánea de las interneuronas colinérgicas y del compartimento estriosomal (ChAT y ENK). Para ello, tras varios lavados en PBS y la inactivación de la peroxidasa endógena, los cortes se incubaron durante dos noches en una solución compuesta por Tritón X-100 al 0,1%, seroalbúmina bovina al 10%, y los anticuerpos anti-ChAT y anti-ENK. Posteriormente, los cortes fueron incubados durante 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente a la ChAT, la solución ABC como se describió anteriormente, y se reveló con DAB. Tras ello, los cortes se lavaron durante 30 minutos en PBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario específico para la ENK, la solución de ABC, y se revelaron en una solución constituida por un 0,3% de sulfato amónico de níquel (Fluka, Buchs, Suiza), 0,025% de DAB, y 0,0015% de H_2O_2 en tampón Tris pH 7,6. Se obtuvo un precipitado gris oscuro que contrastaba con el color marrón de la DAB. Algunos cortes fueron procesados sin el anticuerpo primario o el secundario de la ChAT o la ENK, sirviendo como controles negativos.

Análisis de los datos

División del estriado

Para realizar un análisis topográficamente estandarizado, tanto el NC como el Put fueron divididos en distintos territorios en el eje anteroposterior (Figura 1). En primer lugar, empleamos la aparición de la comisura anterior para dividir el estriado precomisural y postcomisural. El primero incluía la cabeza precomisural del NC, y el Put precomisural (Figura 1A). El estriado postcomisural quedó formado por la cabeza postcomisural, el cuerpo, el giro y la cola del NC, y el Put postcomisural (Figura 1B-E). El comienzo del cuerpo del NC se estableció en aquel nivel en el que desaparecían los cuerpos mamilares hipotalámicos, y el del giro cuando el cuerpo y la cola se unían.

Para analizar todo este material experimental, hemos empleado los siguientes atlas del cerebro humano: Schaltenbrand & Wahren, Mai et al., y Nowinski et al. (25-27).

Distribución celular y recuentos neuronales

La densidad neuronal de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas fue realizada con técnicas estereológicas. Para realizar un estudio lo más completo posible de los distintos territorios, establecimos una fracción de muestreo del 15% del total de cortes que componían el estriado humano en cada cerebro, obteniendo así cerca de 50 preparaciones coronales por cerebro. Estos cortes fueron escogidos de modo sistemático con comienzo al azar.

La densidad de las interneuronas fue analizada por medio de la técnica del disector óptico (9), empleando un microscopio Olympus (Olympus Optical Co. Europe GmbH, Hamburgo, Alemania). Este microscopio, provisto de una platina motorizada, tenía acoplada a una videocámara (JVC España, Barcelona, España), conectada a un ordenador Dell OptiPlex. El programa empleado fue CAST (Visiopharm, Hørsholm, Dinamarca). El volumen del disector (V_{dis}) fue calculado a partir del área del mismo y la profundidad del corte. El muestreo de los disectores fue realizado con la misma fracción a lo

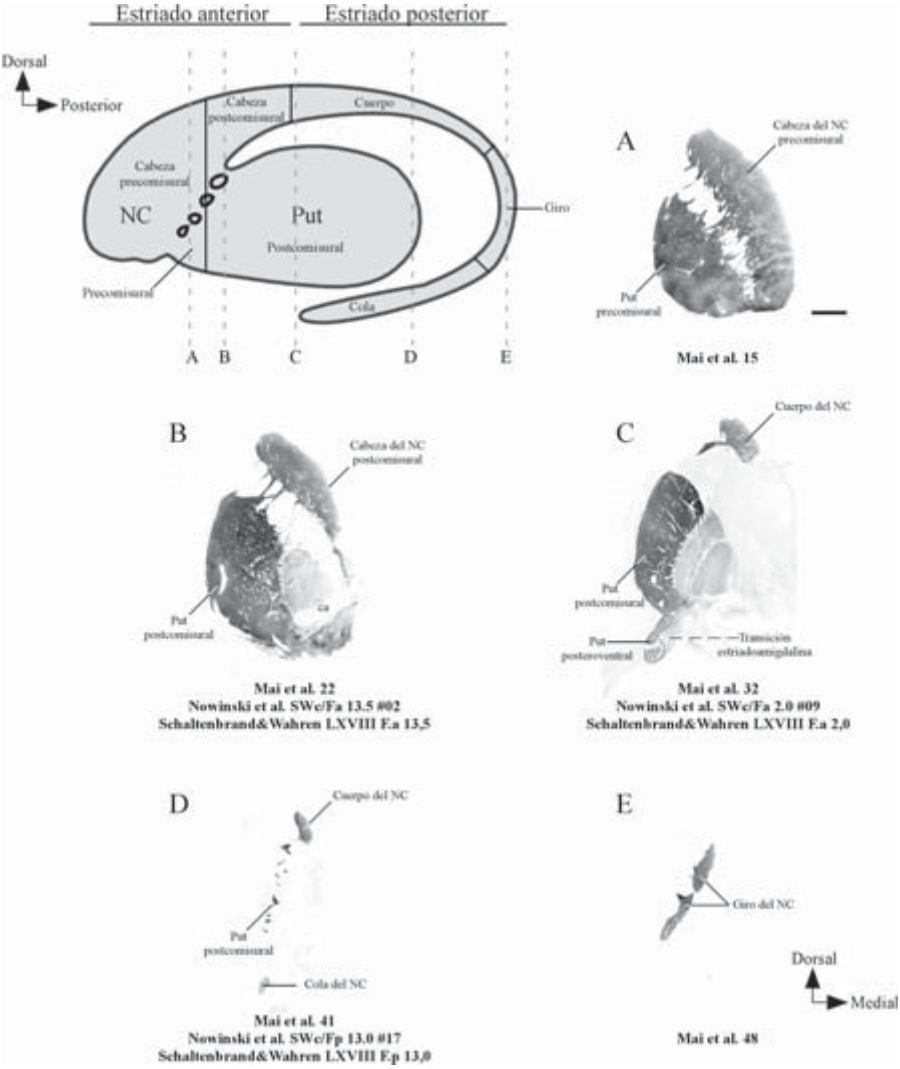


FIGURA 1. ***División del estriado humano en el eje anteroposterior.*** *Esquema sagital del NC y del Put que ilustra las diferentes regiones en las que estos núcleos fueron divididos. Las líneas continuas indican los límites entre las diferentes regiones, mientras que las discontinuas representan los niveles de los cortes mostrados en* ***A-E****. Éstos son secciones coronales en las que se indican las diferentes regiones estriatales contenidas en cada nivel. Además, debajo de cada corte se señala el nivel correspondiente de los atlas empleados en este estudio.* ***Abreviaturas****: ca, comisura anterior; NC, núcleo caudado; Put, putamen.* ***Barra de calibración****: 5 mm.*

largo de todos los territorios estriatales (1% en el caso de las neuronas nitrérgicas, y 3,25% en el caso de las colinérgicas). La suma de todos los somas contados en cada disector dio como resultado el parámetro ΣQ_d^-, y la densidad neuronal (N_v) fue calculada por medio de la fórmula:

$$N_v = \Sigma Q_d^- / \Sigma V_{dis} \text{ (células/mm}^3\text{)}$$

Distribución compartimental

La presencia de las interneuronas dentro de los estriosomas y en la matriz circundante fue dibujada por medio de una cámara clara acoplada a un microscopio, a 5 aumentos. Una vez las neuronas fueron punteadas, se pudo establecer su morfología a aumentos superiores.

RESULTADOS

Distribución de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas

Las neuronas NADPH-d positivas aparecían ampliamente distribuidas en todas las regiones del estriado analizadas (Figura 2; Tabla 2). El estudio estereológico llevado a cabo demostró que la región con una mayor densidad neuronal fue el giro del NC. El resultado de la prueba *ANOVA* al comparar las distintas regiones estriatales en el eje anteroposterior proporcionó diferencias muy significativas (P=0,005). El resultado de la prueba a posteriori reveló que la significación de *ANOVA* aparecía al compararse el giro con la cabeza precomisural del NC (P=0,006) y con el Put precomisural (P=0,006).

Acerca de las interneuronas colinérgicas, la región estriatal más densamente poblada por estas interneuronas resultó ser el cuerpo del NC (Figura 2; Tabla 3). La probabilidad asociada al *ANOVA* en este caso fue 0,005, por lo que se concluyó que existían diferencias muy significativas entre las distintas regiones. La prueba a posteriori demostró que existían diferencias muy significativas cuando el Put postcomisural era comparado con el cuerpo del NC (P=0,005).

Relación de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas con el compartimento estriosomal en la porción posterior del estriado

En la parte anterior del cuerpo del NC, se encontraron algunos somas dentro de los estriosomas, situados principalmente cerca de los bordes de los mismos, pero apenas aparecían interneuronas en la matriz circundante al compartimento estriosomal y en el límite entre los estriosomas y la matriz (Figura 5). Sin embargo, en la parte posterior del cuerpo y en el giro del NC no se encontraron apenas interneuronas en el interior de los estriosomas, y apareció un número considerable de somas entre la matriz y el compartimento estriosomal (Figuras 3, 4 y 5). En la cola del NC no se encontró ningún estriosoma en este apartado del estudio.

TABLA 2. ***Valores medios de la densidad de las neuronas nitrérgicas (neuronas/mm^3) en las distintas regiones y sectores en los que se dividió el estriado humano***[1].

	dm	dl	vm	vl	Total
Cabeza precom.	527 ± 46	419 ± 37	620 ± 97	497 ± 44	494 ± 24
Cabeza postcom.	871 ± 145	925 ± 114	615 ± 122	776 ± 145	820 ± 66
Cuerpo					962 ± 169
Giro	*Dorsal* 1153 ± 174		*Ventral* 653 ± 107		1060 ± 142
Cola					845 ± 319
Putamen precom.	421 ± 45	628 ± 71	350 ± 46	434 ± 48	490 ± 38
Putamen postcom.	492 ± 48	626 ± 62	538 ± 61	678 ± 74	638 ± 127

[1]Para cada uno de estos sectores, se indica la media ± SEM de la densidad. dl, dorsolateral; dm, dorsomedial; NC, núcleo caudado; Put, putamen; vl, ventrolateral; vm, ventromedial.

La mayoría de los estriosomas encontrados en toda la extensión anteroposterior del Put presentaban una clara distinción entre el centro y la periferia. La presencia de interneuronas nitrérgicas en el interior de los estriosomas (centro y periferia) y en los bordes entre

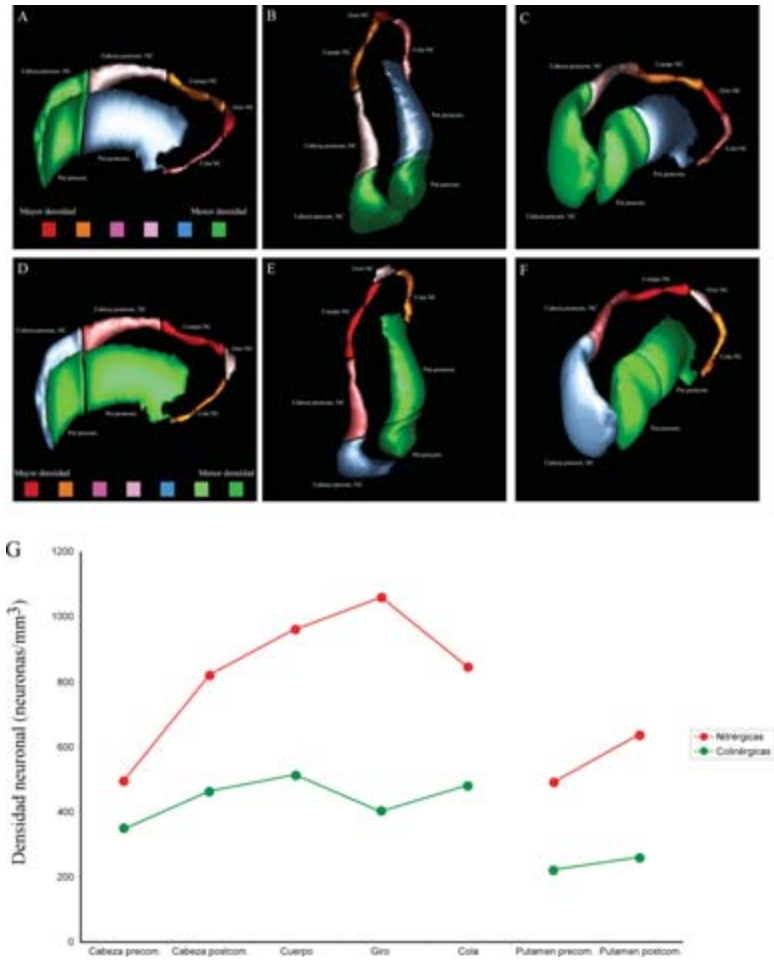


FIGURA 2. ***La distribución de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas es heterogénea en el estriado humano. A-F****, esquemas tridimensionales que muestran la distribución selectiva de las interneuronas nitrérgicas (**A-C**) y colinérgicas (**D-F**) a lo largo del eje anteroposterior del estriado. **A-C**, en el caso de las nitrérgicas, el giro del NC es la región más densamente poblada, seguida del cuerpo, la cola y la cabeza postcomisural de dicho núcleo, el Put postcomisural, y los territorios precomisurales de la cabeza del NC y del Put. **D-F**, en cuanto a las colinérgicas, el cuerpo del NC es la región más densamente poblada, seguido de la cola, la cabeza postcomisural, el giro, y la cabeza precomisural de dicho núcleo, el Put postcomisural y el precomisural. **G**, gráficos de líneas que ilustran la densidad de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas en las distintas regiones del estriado. **Abreviaturas**: NC, núcleo caudado; postcom., postcomisural; precom., precomisural; Put, putamen.*

los distintos compartimentos fue mayor en el Put postcomisural que en el precomisural (Figuras 3, 4 y 5).

TABLA 3. ***Valores medios de la densidad de las neuronas colinérgicas (neuronas/mm^3) en las distintas regiones y sectores en los que se dividió el estriado humano[1].***

	dm	dl	vm	vl	Total
Cabeza precom.	489 ± 23	284 ± 22	370 ± 25	248 ± 21	349 ± 14
Cabeza postcom.	649 ± 68	433 ± 56	377 ± 48	402 ± 43	462 ± 32
Cuerpo					513 ± 63
Giro	*Dorsal* 351 ± 73		*Ventral* 459 ± 84		400 ± 61
Cola					481 ± 223
Putamen precom.	162 ± 22	277 ± 26	168 ± 27	224 ± 26	219 ± 19
Putamen postcom.	291 ± 27	325 ± 25	215 ± 21	275 ± 29	258 ± 17

[1]Para cada uno de estos sectores, se indica la media ± SEM de la densidad. dl, dorsolateral; dm, dorsomedial; postcom., postcomisural; precom., precomisural; vl, ventrolateral; vm, ventromedial.

En cuanto a las neuronas colinérgicas, en el cuerpo del NC las interneuronas tendían a alejarse de los estriosomas, una tendencia que ya empezaba a aparecer en la parte posterior de la cabeza postcomisural. Así, en muchos estriosomas del cuerpo apenas aparecían 1 o 2 interneuronas colinérgicas en su interior y en el borde del compartimento estriosomal. En el giro del NC, esta tendencia llegó al extremo (Figuras 3 y 4). No se encontró ningún estriosoma que contuviera alguna interneurona colinérgica, que tampoco poblaron los límites entre ambos compartimentos (Figura 5).

Por último, en el Put postcomisural el número de somas en el compartimento rico en ENK fue bastante elevado, en ocasiones similar al de la matriz (Figuras 3 y 4). De los 17 estriosomas analizados, sólo uno homogéneo y otro heterogéneo aparecieron completamente despoblados de interneuronas colinérgicas. La presencia de neuronas en el centro estriosomal fue baja, aunque la proporción de estriosomas con interneuronas en la región estriosomal pobre en ENK fue la más elevada de todos los territorios del estriado. En la

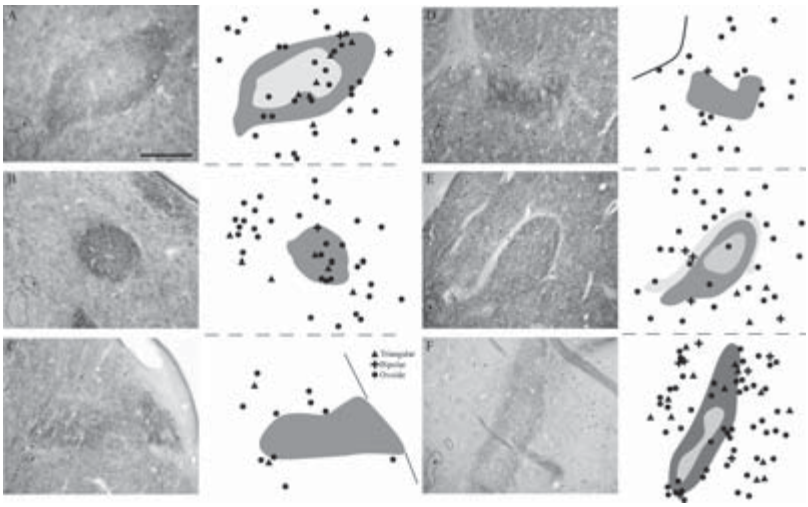


FIGURA 3. ***Organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas.*** *Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de los distintos grupos morfológicos de interneuronas nitrérgicas con respecto a los estriosomas, en la cabeza precomisural (**A**) y postcomisural (**B**), en el cuerpo (**C**) y giro (**D**) del NC, y en el Put precomisural (**E**) y postcomisural (**F**). **Barra de calibración**: 200 µm (A, B, E y F), 100 µm (C y D).*

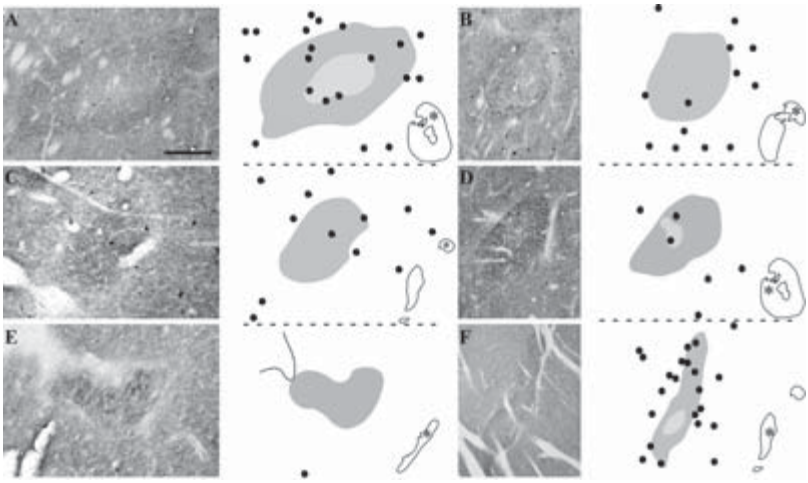


FIGURA 4. ***Organización compartimental de las interneuronas colinérgicas.*** *Microfotografías y dibujos realizados con cámara clara que muestran la posición de las interneuronas colinérgicas con respecto a los estriosomas, en la cabeza precomisural (**A**) y postcomisural (**B**), en el cuerpo (**C**) y giro (**D**) del NC, y en el Put precomisural (**E**) y postcomisural (**F**). **Barra de calibración**: 750 µm (A), 800 µm (B), 260 mm (C), 1 mm (D y F), 1,5 mm (E).*

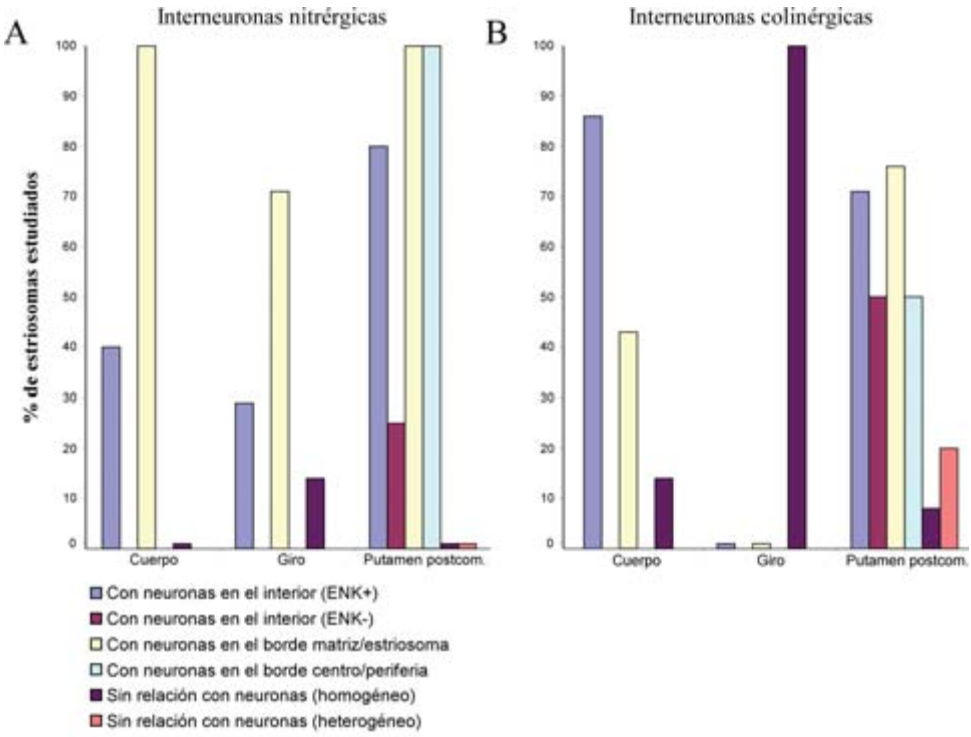


FIGURA 5. ***Análisis cuantitativo de la organización compartimental de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas.*** *Gráficos de barras que indican, para el estriado posterior, el porcentaje de estriosomas que cumplieron cada una de las condiciones citadas en la leyenda.* ***A****, el Put postcomisural es la región que presenta un mayor porcentaje de estriosomas en relación con las interneuronas nitrérgicas, especialmente en los bordes entre los distintos compartimentos. Por otra parte, el cuerpo y el giro del NC tienen pocos estriosomas con neuronas dentro, y la mayoría de ellos contienen somas en sus bordes.* ***B****, las interneuronas colinérgicas aparecen especialmente en el compartimento ENK positivo en todas las regiones excepto en el giro del NC, donde no se observa ningún estriosoma que contenga interneuronas. Las neuronas colinérgicas pueblan preferentemente el borde entre la matriz y el estriosoma, aunque también aparecen entre el centro y la periferia.* ***Abreviaturas****: ENK, encefalina; postcom., postcomisural; precom., precomisural.*

mayoría de los estriosomas analizados apareció al menos un soma en el límite entre el compartimento estriosomal y la matriz. Su presencia en el borde centro/periferia de los estriosomas fue más reducida (Figura 5).

DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra que la porción posterior del estriado humano tiene una mayor densidad de interneuronas nitrérgicas y colinérgicas que la porción anterior. Debido a que la proporción de interneuronas tiende a aumentar según se avanza en la escala filogenética, una mayor abundancia de interneuronas en ciertas regiones del estriado podría implicar una especial complejidad en la integración de la información nerviosa en dichas zonas. Además, el estudio demuestra que la relación de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas con el compartimento estriosomal varía a lo largo de toda la extensión anteroposterior del estriado, y por lo tanto la integración de los distintos tipos de información que procesan la matriz y los estriosomas parece ser distinta según la región estriatal analizada.

Las interneuronas estriatales podrían representar uno de los factores reguladores y responsables de la organización de la información en el estriado y, por lo tanto, en los ganglios basales y en sus estructuras relacionadas. Así, se ha visto que están implicadas en el aprendizaje y en la plasticidad de la respuesta estriatal (28-31), y se ha comprobado su alteración numérica, morfológica o funcional en procesos patológicos que afectan a actividades motoras, cognitivas o emocionales (32-38). Por lo tanto, pensamos que las interneuronas estriatales podrían jugar un importante papel en la integración de la información que fluye a través de los ganglios basales.

Teniendo en cuenta los resultados del presente estudio, la mayor densidad interneuronal en el NC con respecto al Put podría implicar la existencia de un mayor número de circuitos funcionales en este núcleo estriatal, algo que requeriría una mayor presencia de interneuronas para conseguir altos niveles de integración nerviosa de diversos tipos. Esto mismo se daría también en el estriado posterior con respecto al anterior. El grado de diversidad de las proyecciones corticoestriatales en una determinada región del estriado puede condicionar la presencia de un mayor número de interneuronas que integren la información de las distintas regiones corticales. Por lo tanto, la abundancia de interneuronas en un determinado territorio estriatal indicaría una gran variedad de proyecciones corticales en esa región.

Las características químicas de los estriosomas del estriado posterior coinciden a grandes rasgos con las de aquéllos del estriado

anterior (19, 20). La principal diferencia entre las regiones anteriores y posteriores radica en que en estas últimas los estriosomas son de menor tamaño y la heterogeneidad estriosomal es menor, ya que prácticamente desaparece en los niveles más posteriores (9, 20). En términos generales, podría decirse que la heterogeneidad estriosomal es directamente proporcional al tamaño del estriosoma. Sin embargo, no se puede descartar que los pequeños «parches» homogéneos que se observan en el estriado posterior sean la parte final de grandes estriosomas que se han formado en niveles más anteriores. Según nuestras propias observaciones, no ilustradas en este trabajo, en la porción más anterior del estriado todos los estriosomas parecen ser homogéneos. De esta manera, los estriosomas podrían ser vistos tridimensionalmente como un complejo sistema de túneles cuyas gruesas paredes presentan una composición química distinta con respecto a la zona central, y con dos extremos de gran grosor. Así, los estriosomas homogéneos que se observan en el estriado posterior podrían ser los extremos de las pequeñas ramificaciones que surgen de estriosomas más grandes.

Los resultados del presente estudio implicarían que la labor de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas como integradoras de la información de los dos compartimentos químicos del estriado (matriz y estriosomas) se conservaría a lo largo de toda la extensión anteroposterior de esta estructura subcortical, salvo en el caso del giro del NC para las interneuronas colinérgicas. En esta región estriatal no se encontró ninguna interneurona perteneciente a esta población en contacto con los estriosomas. La mayor densidad neuronal del NC con respecto al Put resulta lógica si se tiene en cuenta que el primero se encuentra implicado en funciones de integración nerviosa más complejas que el segundo (39, 40). Por otra parte, la presencia de interneuronas en todos los compartimentos químicos de ambas estructuras estriatales invita a pensar que tanto el NC como el Put necesitan coordinar la información presumiblemente de gran componente límbico de los estriosomas con otra de tipo asociativo o sensorimotor de la matriz. Es decir, la integración de los distintos tipos de información nerviosa es necesaria independientemente de la complejidad de las funciones de las distintas regiones estriatales. En un estudio reciente, Saka y colaboradores (37) describieron que, al aplicar agonistas dopaminérgicos al estriado de la rata, los estrioso-

mas mostraban una mayor activación de genes de expresión temprana. Sin embargo, cuando se eliminaban las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas con la neurotoxina SP-PE35, el patrón de activación cambiaba y era mayor en la matriz. Este hecho demuestra la importancia de la localización específica de las interneuronas nitrérgicas y colinérgicas en la organización morfofuncional de los distintos compartimentos estriatales.

El grado de conocimiento que alcancemos acerca de la distribución de las interneuronas estriatales en el cerebro humano normal y patológico, así como su relación con respecto al compartimento estriosomal, puede ser un factor muy importante a la hora de interpretar el papel que juega el estriado en el conjunto de los ganglios basales y en las relaciones corticosubcorticales, y su implicación en procesos patológicos neurodegenerativos y psiquiátricos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Clínica Universitaria (Universidad de Navarra), al Hospital de Navarra y al Hospital Ramón y Cajal de Madrid por la donación de las muestras biológicas utilizadas en este estudio, a los Drs. Silvano de las Heras y Luis Santamaría por su ayuda en la revisión del texto y en los estudios estereológicos, respectivamente, y a Mª Ángeles Erdozain por su ayuda técnica con el procesamiento del tejido en el laboratorio. Este estudio ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFI2003-02909 y BFU2006-01189). JB ha sido financiado por beca de la Comunidad de Madrid (FPI-CAM) y LP tiene un contrato Ramón y Cajal del Ministerio de Educación y Ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

(1) KEMP, J.M. AND POWELL, T.P. (1971) The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 262: 383-401.

(2) FOX, C.A.; ANDRADE, A.N.; SCHWYN, R.C. AND RAFOLS, J.A. (1971) The aspiny neurons and the glia in the primate striatum: a Golgi and electron microscopic study. *J. Hirnforsch.* 13: 341-362.

(3) FOX, C.A.; ANDRADE, A.N.; HILLMAN, D.E. AND SCHWYN, R.C. (1971) The spiny neurons in the primate striatum: a Golgi and electron microscopic study. *J. Hirnforsch.* 13: 181-201.
(4) DIFIGLIA, M.; PASIK, P. AND PASIK, T. (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* 114: 245-256.
(5) YELNIK, J.; FRANCOIS, C.; PERCHERON, G. AND TANDE, D. (1991) Morphological taxonomy of the neurons of the primate striatum. *J. Comp. Neurol.* 313: 273-294.
(6) ROBERTS, R.C.; GAITHER, L.A.; PERETTI, F.J.; LAPIDUS, B. AND CHUTE, D.J. (1996) Synaptic organization of the human striatum: a postmortem ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 374: 523-534.
(7) GRAVELAND, G.A. AND DIFIGLIA, M. (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res.* 327: 307-311.
(8) KOWALL, N.W.; FERRANTE, R.J.; BEAL, M.F.; RICHARDSON, E.P. JR.; SOFRONIEW, M.V. ET AL. (1987) Neuropeptide Y, somatostatin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience.* 20: 817-828.
(9) BERNÁCER, J.; PRENSA, L. AND GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. (2005) Morphological features, distribution and compartmental organization of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced-diaphorase interneurons in the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 489: 311-327.
(10) DIFIGLIA, M. (1987) Synaptic organization of cholinergic neurons in the monkey neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 255: 245-258.
(11) PRENSA, L.; GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. AND PARENT, A. (1998) Morphological features of neurons containing calcium-binding proteins in the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 390: 552-563.
(12) CICCHETTI, F.; BEACH, T.G. AND PARENT, A. (1998) Chemical phenotype of calretinin interneurons in the human striatum. *Synapse.* 30: 284-297.
(13) COWAN, R.L.; WILSON, C.J.; EMSON, P.C. AND HEIZMANN, C.W. (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J. Comp. Neurol.* 302: 197-205.
(14) COSSETTE, M.; LÉVESQUE, D. AND PARENT, A. (2005) Neurochemical characterization of dopaminergic neurons in human striatum. *Parkinsonism Relat. Disord.* 11: 277-286.
(15) TANDE, D.; HOGLINGER, G.; DEBEIR, T.; FREUNDLIEB, N.; HIRSCH, E.C. ET AL. (2006) New striatal dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain*. 129: 1194-1200.
(16) MAZLOOM, M. AND SMITH, Y. (2006) Synaptic microcircuitry of tyrosine hydroxylase-containing neurons and terminals in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys. *J. Comp. Neurol.* 495: 453-469.
(17) BETARBET, R.; TURNER, R.; CHOCKKAN, V.; DELONG, M.R.; ALLERS, K.A. ET AL. (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J. Neurosci.* 17: 6761-6768.

(18) GRAYBIEL, A.M. AND RAGSDALE, C.W. JR. (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5723-5726.
(19) HOLT, D.J.; GRAYBIEL, A.M. AND SAPER, C.B. (1997) Neurochemical architecture of the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 384: 1-25.
(20) PRENSA, L.; GIMÉNEZ-AMAYA, J.M. AND PARENT, A. (1999) Chemical heterogeneity of the striosomal compartment in the human striatum. *J. Comp. Neurol.* 413: 603-618.
(21) BERNACER, J.; PRENSA, L AND GIMENEZ-AMAYA, J.M. (2007) Chemical architecture of the posterior striatum in the human brain. *J Neural Transm*.
(22) BERENDSE, H.W.; GALIS-DE GRAAF, Y. AND GROENEWEGEN, H.J. (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J. Comp. Neurol.* 316: 314-347.
(23) FLAHERTY, A.W. AND GRAYBIEL, A.M. (1993) Two input systems for body representations in the primate striatal matrix: experimental evidence in the squirrel monkey. *J. Neurosci.* 13: 1120-1137.
(24) PARTHASARATHY, H.B.; SCHALL, J.D. AND GRAYBIEL, A.M. (1992) Distributed but convergent ordering of corticostriatal projections: analysis of the frontal eye field and the supplementary eye field in the macaque monkey. *J. Neurosci.* 12: 4468-4488.
(25) MAI, J.; ASSHEUER, J. AND PAXINOS, G. (1997) Atlas of the human brain. San Diego, California: Academic Press.
(26) NOWINSKI, W.; BRYAN, R. AND RAGHAVAN, R. (1997) The electronic clinical brain atlas. Version 1.0. Three-dimensional navigation of the human brain. Stuttgart (Germany): Georg Thieme.
(27) SCHALTENBRAND, G. AND WAHREN, W. (1977) Atlas for stereotaxy of the human brain. Stuttgart (Germany): Thieme.
(28) CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; BERNARDI, G. AND CALABRESI, P. (1999) Permissive role of interneurons in corticostriatal synaptic plasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31: 1-5.
(29) CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; PISANI, A. AND BERNARDI, G. (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends. Neurosci.* 23: 120-126.
(30) CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; MARFIA, G.A.; PISANI, A. ET AL. (2000) Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Pro.g Neurobio.l* 61: 231-265.
(31) PISANI, A.; BONSI, P.; PICCONI, B.; TOLU, M.; GIACOMINI, P. ET AL. (2001) Role of tonically-active neurons in the control of striatal function: cellular mechanisms and behavioral correlates. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 25: 211-230.
(32) PISANI, A.; BONSI, P.; CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; BERNARDI, G. ET AL. (2003) Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*. 45: 45-56.
(33) HOLT, D.J.; BACHUS, S.E.; HYDE, T.M., WITTIE, M.; HERMAN, M.M. ET AL. (2005) Reduced density of cholinergic interneurons in the ventral striatum in schizophrenia: an in situ hybridization study. *Biol. Psychiatry.* 58: 408-416.

(34) HOLT, D.J.; HERMAN, M.M.; HYDE, T.M.; KLEINMAN, J.E.; SINTON, C.M. ET AL. (1999) Evidence for a deficit in cholinergic interneurons in the striatum in schizophrenia. *Neuroscience*. 94: 21-31.
(35) CANNIZZARO, C.; TEL, B.C.; ROSE, S.; ZENG, B.Y. AND JENNER, P. (2003) Increased neuropeptide Y mRNA expression in striatum in Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 110: 169-176.
(36) SAKA, E. AND GRAYBIEL, A.M. (2003) Pathophysiology of Tourette's syndrome: striatal pathways revisited. *Brain. Dev*. 25 Suppl 1: S15-19.
(37) SAKA, E.; IADAROLA, M.; FITZGERALD, D.J. AND GRAYBIEL, A.M. (2002) Local circuit neurons in the striatum regulate neural and behavioral responses to dopaminergic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 9004-9009.
(38) LAUER, M.; JOHANNES, S.; FRITZEN, S.; SENITZ, D.; RIEDERER, P. ET AL. (2005) Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. *Neuropsychobiology*. 52: 111-117.
(39) LEHERICY, S.; BARDINET, E.; TREMBLAY, L.; VAN DE MOORTELE, P.F.; POCHON, J.B. ET AL. (2006) Motor control in basal ganglia circuits using fMRI and brain atlas approaches. *Cereb Cortex*. 16: 149-161.
(40) MIYACHI, S.; HIKOSAKA, O. AND LU, X. (2002) Differential activation of monkey striatal neurons in the early and late stages of procedural learning. *Exp. Brain Res*. 146: 122-126.

EDITORIAL 75 AÑOS DE PUBLICACIÓN

MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL

75 años en la vida de un ser humano suelen ser equivalentes a un ciclo vital completo, al menos en su etapa productiva. Cuando estos tiempos se refieren a una obra humana indican que ésta ha sido realizada por un colectivo que la consideraba necesaria por cumplir una función y que merecía la pena su continuidad en el tiempo.

En todos estos años los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia han sido el vehículo de expresión de las inquietudes científicas y hallazgos de un amplio grupo de Académicos e investigadores interesados por las ciencias farmacéuticas y afines. Sus trabajos han reflejado el buen hacer de unos profesionales que dejaron y dejan testimonio de la sociedad en la que en cada momento han estado inmersos y en la que han tenido que capear más de un temporal de escasez o de incomprensión. Incluso en algún momento nuestra revista tuvo que sobrevivir a la escasa valoración que se asignaba a cualquier publicación que no proviniera de editoriales extranjeras, cuando se hacía referencia al mundo de la ciencia. De modo casi heroico ha resistido todos los envites y en estos momentos en que las publicaciones científicas son tan abundantes, en las cuales la lengua inglesa se ha convertido en vehículo de comunicación, es necesario preguntarse por la razón de existir de los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.

El número 1 del año 2003, volumen LXIX, fue el primero en que actué como Editora Científica de los Anales. En esta época, estaba Doña Mª del Carmen Francés como Secretaria de la Real Academia y Directora de los Anales y aprendí de primera mano el esfuerzo que tenía que realizar para mantener viva la publicación. Los manuscri-

tos enviados eran muy escasos y la edición de 4 números anuales resultaba compleja.

Desde el número 1 del volumen LXXI del año 2005 y hasta el número 4 de 2006, actué como Directora y Editora de los Anales. En esos dos años la búsqueda de artículos de calidad y la actualización de los contenidos hacia áreas mas científicas requirió un considerable esfuerzo. La aparición de revisiones de gran calidad científica realizadas por nuestros Académicos de Número y Correspondientes y sus grupos de investigación sirvieron de punto de inflexión para que los Anales fueran considerados como una revista científica, a lo que se unió la posibilidad de publicar indistintamente en las dos lenguas vehículos del conocimiento, el castellano y el inglés. La disponibilidad de los Anales en la página web de la Real Academia y la posibilidad de acceder a los artículos directamente, en versión electrónica, ha incrementado notablemente la visibilidad de la revista y el interés por publicar en sus páginas.

En enero de 2007, al iniciar mi etapa como Presidenta de la Real Academia, se hacía necesario que la dirección de los Anales estuviese bajo la dirección del Sr. Secretario, Don Antonio Doadrio, quien tanto esfuerzo había dedicado a la digitalización de la revista y su disponibilidad en la red y a una futura edición directa de la versión electrónica. De nuevo, con el número 1 del volumen LXXIII de 2007 y hasta la actualidad, en calidad de Editora Científica, mi preocupación es la calidad de los artículos. Sinceramente creo que hemos avanzado un gran trecho, no solamente tenemos artículos excelentes, sino además en número elevado. Muchos de esos artículos proceden de la toma de posesión de Académicos Correspondientes de gran nivel y de conferenciantes, Académicos de Número, o invitados por su relevancia científica.

La revista es necesariamente plural, lo que no significa dispersa, y acoge artículos de todas las ciencias farmacéuticas y afines y de la vida y la salud, que son los mayoritarios. Tampoco podemos olvidar que tenemos por historia un legado al que no podemos renunciar y los artículos referentes al conocimiento de nuestro pasado y de los grandes nombres que lo han forjado son necesarios.

¿Cuál es la fórmula magistral que nos permitirá seguir otros muchos años? De nuevo la revista tendrá vida si es de todos y la

sentimos como nuestra, si es una obra colectiva que nos permite posicionarnos en el mundo de la ciencia y del pensamiento, si es plural y cumple la labor de rescatar ideas y descubrimientos protegiendo su tiempo y su autoría.

Este número extraordinario que conmemora los 75 años de la aparición de la revista, recoge trabajos de los grupos de investigación de Académicos de Número y Correspondientes en activo y, sin duda, da una visión de la potencialidad y vitalidad de nuestra Academia de cara al futuro.

Analizando el contenido de este número de celebración, uno puede imaginar que lo por venir será sorprendente en todas las áreas del conocimiento de ciencias farmacéuticas y afines, pero deberíamos de tener en cuenta, que el futuro en ciencia tiene que ser previamente imaginado por la mente humana. Nada de lo que no seamos capaces de imaginar se descubrirá. Nuestra Academia reúne a grandes e imaginativos científicos y tienen que servir de talismán para atraer a los mejores de las generaciones de renovación venideras y los Anales tienen que servir de vehículo de sus ansias y sus sueños, cuando cuajan y cuadran los descubrimientos. Este es el deseo para los próximos 75 años de una investigadora en neurociencias, que agradece la confianza de la Academia y los Académicos en estos años en que le ha correspondido el honor de ser Editora Científica de los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Madrid, Diciembre de 2007

M.ª Teresa Miras Portugal
Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Editora Científica de los Anales de la RANF.

EDITORIAL 75 AÑOS DE PUBLICACIÓN

ANTONIO L. DOADRIO VILLAREJO

Los actuales Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia se fundan en el año 1932, denominándose entonces Anales de la Academia Española de Farmacia, para después de nuestra contienda cambiar su designación a Anales de la Real Academia de Farmacia, hasta el año 2002, en que de acuerdo con los nuevos Estatutos toman el nombre de Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Desde su fundación y hasta la fecha, se han publicado más de 2.700 artículos, con participación de autores de prestigio nacional e internacional, como es el caso del Prof. Joan Massagué, los Dres. Geoffrey Burnstock, Bernard Portha, o el Prof. Losada Villasante, Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica, por citar a algunos, no siendo interrumpida mas que por nuestra Guerra Civil, desde 1936 a 1939, reanudándose su publicación en el año 1940 con 6 números. Desde entonces, se editan entre 4 y 6 números anuales, hasta el año 1970, donde se convierte en una revista científica trimestral.

Se cumplen pues, 75 años desde que vio la luz su primer número, cuya presentación corrió a cargo del Excmo. Sr. D. Toribio Zúñiga Sánchez-Cerrudo, por aquél entonces Presidente de nuestra Corporación.

Nuestra revista, ha entrado en la actualidad de la sociedad de la información, de la mano de nuestra prestigiosa página web (http://www.ranf.com), ofreciendo los artículos en pdf para su descarga directa y gratuita, desde el año 2000, además de un índice completo de todos ellos desde su primer número, con búsqueda por título o autor.

Un paso más, en nuestro esfuerzo de que nuestra revista sea un medio de difusión científica que sea útil a la sociedad a la que servimos, en especial a la comunidad farmacéutica iberoamericana, es su conversión en Open Journal, cuyo primer número será el nº 1 de 2008, sin por ello abandonar su publicación impresa tradicional.

Nuestra publicación, se distribuye hoy en día a todos los países iberoamericanos y europeos, además de algunos estados de EE.UU., bien mediante suscripción o en la mayoría de los casos de una forma gratuita, en especial a instituciones académicas y científicas, intercambiando además nuestra revista con otras publicaciones de organizaciones de reconocido prestigio, como la Brazilian Chemical Society, y Academias Iberoamericanas de Farmacia.

En el número que cierra esta celebración, se ha requerido la participación de grandes figuras de nuestra ciencia farmacéutica, que muestran su investigación en forma de revisiones de altísima calidad. Es el broche de oro de un feliz cumpleaños, que demuestra la vigencia de nuestra revista y su proyección futura.

No quiero dejar pasar la ocasión, para agradecer a mis dos antecesoras en la dirección de los Anales, su esfuerzo y sacrificio, que han hecho que mi labor sea más fácil, a la Prof.ª M.ª del Carmen Francés Causapé y a Dña. M.ª Teresa Miras Portugal, actual Presidenta de la Academia.

Gracias a todos los que han colaborado en todos estos años, dentro del comité científico, del editorial, maquetando la revista o con sus artículos, ayudando al engrandecimiento de una publicación que es el santo y seña de nuestra Academia.

Feliz Cumpleaños.

Madrid, Diciembre de 2007

Antonio L. Doadrio Villarejo
Director de los Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia.

INFORMACIÓN ACADÉMICA

Sesiones Científicas

18 de octubre

A las 19 horas, conferencia por el Prof. Pascual Segura, doctor en química; agente de la propiedad industrial; director del Centre de Patents de la Universitat de Barcelona; miembro electo de la Academic Advisory Board de la European Patent Academy, European Patent Office, sobre: «Una visión independiente sobre la actual polémica de las patentes farmacéuticas en España».

25 de octubre

El Excmo. Sr. D. César Nombela Cano, catedrático de Microbiología de la UCM, ha tomado posesión de su plaza de Académico de Número, medalla nº 13, el 25 de octubre, con la lectura de su discurso reglamentario: «Señales y respuestas celulares en microorganismos eucarióticos: globalización y reprogramación de sistemas». Le contestó en nombre de la Corporación el Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva.

8 de noviembre

A las 19 horas, Mesa Redonda sobre: «Centenario del fallecimiento de Henri Moissan». Apertura del acto por el Dr. Don Benito del Castillo García, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Ponentes: Prof. Dr. Don Dan A. Lerner, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier: «Moissan, un Nobel con manitas de plata», Prof. Dr. Don Agustín García Asuero, Académico Correspondiente: «Los halógenos: ¿materia mineral farmacéutica?».

15 de noviembre

A las 19 horas, Mesa Redonda organizada por la Sección 4ª sobre: «Estrategia de desarrollo de nuevos fármacos. Oportunidades y retos

de la investigación en la Universidad». Moderador: Prof. Dr. Ángel Mª Villar del Fresno. Ponentes: Profa. Dra. Mª José Alcaraz Tormo y Prof. Dr. José Mª Sánchez Montero.

22 de noviembre

A las 19 horas, Conferencia del Prof. Dr. D. Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, titulada: «Dispersión de beta-lactamasas de espectro extendido: un nuevo éxito para las bacterias». Presentado por el Académico de Número Dr. Don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

29 de noviembre

A las 19 horas, Sesión conmemorativa de los Premios Nobel 2007. Apertura del acto por el Dr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero. Ponente: Dr. D. Lluís Montoliú José, Investigador Científico del CSIC, Centro Nacional de Biotecnología: «La modificación genética dirigida en ratones es premiada con el Nobel de Fisiología y Medicina de 2007».

13 de diciembre

A las 19 horas, III Mesa Redonda Balneario Valdelateja. Intervienen: Dr. D. Francisco Javier Mantero Sáenz: «Estudio de la Climatología del Balneario de Valdelateja». Profa. Dra. Dña. Carmen de la Rosa Jorge y Profa. Dra. Dña. Ángeles Mosso: «Estudio Microbiológico de los Manantiales de aguas mineromedicinales del Balneario de Valdelateja» y Profa. Dra. Dña. Josefina San Martín Bacaicoa y Prof. Dr. D. Agustín Valero Castejón: «Estudio de la Acción Terapéutica de las aguas del Balneario de Valdelateja».

Noticias

El Dr. Gustavo Baraja, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, ha obtenido una plaza de Catedrático de Fisiología en el departamento de Fisiología Animal II, de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

* * *

La Real Academia Nacional de Farmacia ha colaborado en el I International Conference on Language and Health Care, celebrada en la Universidad de Alicante del 24 al 26 de octubre, en la que el Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, Académico de Número de nuestra Corporación, formó parte del Comité Científico. Asimismo, participó como moderador y ponente en una Mesa Redonda sobre «The language of pharmaceutical science».

* * *

El Excmo. Sr. D. Víctor Jiménez Torres, Académico de Número, ingresó en la Academia de Farmacia de Galicia el día 21 de noviembre, con la lectura de su discurso de ingreso: «Interacciones fármaco alimento en Oncología».

* * *

La Excma. Sra. Dña. M.ª Carmen Francés Causapé, Académica de Número ha sido nombrada Presidenta de Honor de la Academia Internacional de Historia de la Farmacia.

* * *

El pasado 29 de octubre falleció en Valencia el Excmo. Sr. D. Eduardo Primo Yúfera, Académico de Honor. Aunque desarrolló gran parte de su carrera científica en Valencia, Primo nació en 1918

en la localidad murciana de Mazarrón. Estaba casado y era padre de cuatro hijos. Licenciado en Ciencias Químicas en 1941 por la Universidad de Valencia, se doctoró en la de Madrid en 1944. Sus primeras investigaciones se centraron en aplicaciones relacionadas con los productos agrícolas de la región valenciana, como el arroz y la naranja. Trabajó en el laboratorio del Premio Nobel Dr. Tadeo Reichstein.

* * *

La Real Academia Nacional de Farmacia, con el patrocinio de la Fundación Casares Gil y Caja Madrid, participó en la Feria Internacional de la Salud (FISALUD), que se celebró en el recinto ferial del IFEMA en Madrid, del jueves 29 de noviembre al domingo 2 de diciembre con el stand y aula nº 127. Se proyectó en el aula una muestra de libros de plantas medicinales cedidas por el Museo Aboca.

* * *

El 23 de noviembre falleció nuestro Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Gregorio Varela Mosquera, que estaba en posesión de la medalla nº 29. El Prof. Varela era Catedrático emérito de Nutrición en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense.

Bibliografía

Medicamentos Genéricos. Una aproximación interdisciplinar.—López Guzmán, José.—Astrolabio. Serie Ciencias. Ediciones de la Universidad de Navarra.—Pamplona.—270 páginas.—ISBN: 978-84-313-2470-4.

José López Guzmán, Doctor en Farmacia por la Universidd de Valencia, es Profesor Agregado del Departamento de Humanidades Biomédicas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra y tiene a su cargo la enseñanza de la Legislación Farmacéutica en la Licenciatura de Farmacia en esa Universidad así como la dirección del Máster en Bioética.

En esta obra de la que el Dr. López Guzmán es Coordinador, que ha sido patrocinada por el Gobierno de Navarra y Laboratorios CINFA S.A., se ofrece como él dice en el *Estudio Introductorio* «una panorámica global de los medicamentos genéricos y de los problemas o beneficios que se ocasionan a pacientes, consumidores, Administración sanitaria, etc., con su utilización y promoción».

En el libro se abordan por un lado conceptos básicos necesarios para definir y configurar lo que son los medicamentos genéricos y por otro lado los aspectos legales, económicos, los derivados de la comunicación así como las implicaciones profesionales y sociales de los medicamentos genéricos.

La obra está estructurada en catorce capítulos y un anexo dedicado a cuatro de los sectores implicados. Los autores tratan de los medicamentos genéricos desde un punto de vista interdisciplinar y desde varios ángulos, así *Los genéricos en el siglo XXI* por Juan Luís Fernández Balaguer, *Biodisponibilidad y bioequivalencia* por María del Carmen Dios Viéitez, *Interés de los ensayos de disolución «in vitro» y su aplicación al desarrollo de medicamentos genéricos* por María del Mar Goñi Leza, *Medicamentos genéricos: garantía de calidad* por Francisco Aranda Campos, *Genéricos y propiedad industrial: el genérico como motor de la innovación* por Julio Mases Cañada, *Los medicamentos genéricos en el marco jurídico de la Unión Europea* por José Luís Valverde López, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, *Medidas del gobierno francés para*

desarrollar el mercado de genéricos por Florence Taboulet, *Importancia de los medicamentos genéricos en el control del gasto* por José Ignacio Centenera, *Fortalezas y debilidades de las campañas sobre genéricos* por Juan Luís Recio Díaz, *El acceso a los medicamentos genéricos, y países en vías de desarrollo* por Eduardo Satué de Velasco, *Genéricos, lo que pudo ser y no fue* por José Ramón García Solans, *La selección de medicamentos por el farmacéutico* por Ana Ortega Eslava, *Los genéricos y los pacientes* por Berta Lasheras y Guadalupe Beitia, *Medidas para fomentar la utilización de medicamentos genéricos* por Enrique Ordieres Sagarminaga, *La administración sanitaria* por Cristina Agudo Pascual, *La profesión médica* por Félix Zubiri Sáenz, *Los consumidores* por Manuel Arizcun Biurrum y *La industria* por Javier Galardi Echevarría.

En conclusión, una publicación cuya lectura es interesante pues el lector puede encontrar respuesta a aquellas interrogantes que la sociedad ha ido relacionando con los medicamentos genéricos.

María del Carmen Francés Causapé

Bases legales de los derechos y obligaciones de los pacientes. Responsabilidad del Farmacéutico.—2007.—María del Carmen Francés Causapé y María del Carmen Canseco González.—Impr. Realigraf, S.A.—Madrid.—148 páginas.—ISBN: 978-84-611-9271-7.

La Profesora Dra. Dña. María del Carmen Francés Causapé, Catedrática de Historia de la Farmacia y Legislación Farmacéutica de la Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, ha publicado con la inestimable colaboración de la Licenciada en Farmacia Dña. María del Carmen Canseco González, el libro anteriormente indicado. La Profesora Francés Causapé es Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España y Académica Correspondiente de las Academias de Farmacia de Argentina, Perú, Chile y Brasil, lo cual presupone que existirá una amplia difusión de la presente publicación en el ámbito iberoamericano en un campo como es el de los derechos y obligaciones de los pacientes y sus bases legales no siempre fáciles de conseguir y por tanto, de conocer, sobre las que el farmacéutico posee una patente responsabilidad.

Las autoras desarrollan el contenido del libro en once capítulos de los que tres de ellos son básicos por su referencia a los Derechos de los pacientes en el ordenamiento jurídico del derecho internacional, en el derecho europeo y en el español partiendo el primero de la Declaración Universal de los Derechos Humanos (1948) y la Declaración de Lisboa sobre los Derechos de los Pacientes (1945); en el segundo, la Carta Social Europea del año 1961 y la Acción Comunitaria en materia de los Servicios de la Salud (2006) y en el tercero las Disposiciones del ordenamiento jurídico español y la Declaración de Profesionales por la Seguridad del Paciente en mayo de 2006.

El libro alcanza sumo interés para el farmacéutico ya que su actividad ha traspasado el enfoque centrado en el medicamento y se amplía igualmente en el paciente, lo que le hace adquirir nuevas responsabilidades profesionales y con ello mayores deberes y esfuerzos formativos que le obliga necesariamente a conocer un amplio abanico de disposiciones jurídicas que relacionan la actividad de la profesión con los derechos y deberes de los pacientes. En este sentido se considera necesario el poseer a mano un ejemplar escrito en el que se puedan hallar las más importantes disposiciones que siempre hay que tener en cuenta en una actividad sanitaria y en este sentido el presente libro la proporciona en todo su contenido y en especial en el capítulo 11 en el que se encuentran las fuentes legislativas básicas para el desempeño profesional del farmacéutico y su relación con los pacientes.

Hay que agradecer sinceramente el trabajo encomiable de las autoras que demuestra el altísimo conocimiento sobre la materia, la cual en general se suele mostrar para el poco versado con una gran aridez y máxime en la legislación actual cada vez más compleja dado los amplios ámbitos geográficos en los que se desarrolla y en los que actúa.

Esperamos y así lo deseamos una calurosa acogida a este manual extenso e intenso sobre la legislación farmacéutica.

GONZALO GIMÉNEZ MARTÍN

ÍNDICES DEL AÑO 2007

I. ÍNDICE DE AUTORES

II. ÍNDICE DE MATERIAS

Índice de autores

ALARCÓN, B.—Véase RISUEÑO, R.M.—**Pág. 27**

ALARMA-ESTRANY, P.—Véase PELÁEZ, T.—**Pág. 947**

ALDANA, I.—Véase VICENTE, E.—**Pág. 927**

ALMENAR CUBELLS, D.—Véase JIMÉNEZ TORRES, N.V.—**Pág. 1265**

ALONSO BEATO, M.T.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 287**

ÁLVAREZ ESCOLÁ, C.—Véase FERNÁNDEZ MILLÁN, E.—**Pág. 453**

ÁLVAREZ-TABARÉS, I.; HAGAN, I.M.; ORTIZ MELÓN, J.M.—Roles of protein phosphatase type 1 in *Schizosaccharomyces pombe*.—**Pág. 901**

ANCIZU, S.—Véase VICENTE, E.—**Pág. 927**

ANSORENA, D.—Véase ASTIASARÁN, I.—**Pág. 1159**

ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D.; ECHARTE, M.; CONCHILLO, A.; MENÉNDEZ-CARREÑO, M.—Óxidos de colesterol en alimentos cocinados con presencia habitual en nuestra dieta.—**Pág. 1159**

AVENDAÑO LÓPEZ, M.C.—Síntesis de nuevos antitumorales por manipulación de modelos de origen marino.—**Pág. 1079**

BELTRÁN, J.P.; ROQUE, E.; MEDINA, M.; MADUEÑO, F.; GÓMEZ, M.D.; CAÑAS, L.A.—Androesterilidad inducida mediante ingeniería genética en plantas: fundamentos y aplicaciones biotecnológicas.—**Pág. 1237**

BERNÁCER, J.; PRENSA, L.; GIMÉNEZ-AMAYA, J.M.—Heterogeneidad morfológica de la porción posterior del estriado humano.—**Pág. 1287**

BOSCÁ, L.—Véase MAYORAL, R.—**Pág. 1093**

BOYA, P.—Véase DE LA ROSA, E.J.—**Pág. 1031**

BRAUN, N.—Véase ZIMMERMANN, H.—**Pág. 537**

BRAVO, I.G.—Véase REGLERO, A.—**Pág. 833**

BURGUETE, A.—Véase VICENTE, E.—**Pág. 927**

CAÑAS, L.A.—Véase BELTRÁN, J.P.—**Pág. 1237**

CARRASQUERO, L.M.G.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**

COMAS, J.V.—Véase PAGANI, R.—**Pág. 873**

CONCHILLO, A.—Véase ASTIASARÁN, I.—**Pág. 1159**

CORNWELL, E.—Aplicación en QSPR del parámetro topográfico V_c3 a sustancias derivadas de la benceno sulfonamida.—**Pág. 493**
CROOKE, A.—Véase PELÁEZ, T.—**Pág. 947**
DE ÁLVARO, C.—Véase LORENZO, M.—**Pág. 987**
DE LA ROSA, E.J.; GÓMEZ-VICENTE, V.; VALENCIANO, A.I.; BOYA, P.; DE PABLO, F.—Early neural cell death: an overlooked precess in neural development.—**Pág. 1031**
DE LA ROSA JORGE, M.C.; SÁNCHEZ BELTRÁN, M.C.; RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, C.; MOSSO ROMEO, M.A.—Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario Puente Viesgo.—**Pág. 251**
DE PABLO, F.—Véase DE LA ROSA, E.J.—**Pág. 1031**
DE PASCUAL-TERESA, B.—Véase GARCÍA, M.A.—**Pág. 703**
DEL CASTILLO, B.; OLIVES, A.I.; MARTÍN, M.A.—Proyección de las técnicas analíticas espectroscópicas y cromatográficas de aplicación en análisis farmacéutico en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia de Madrid (UCM) en los últimos 25 años.—**Pág. 1009**
DELIC, J.—Véase ZIMMERMANN, H.—**Pág. 537**
DELICADO, E.G.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
DÍAZ-HERNÁNDEZ, J.I.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
DÍAZ VICIEDO, R.—Farmacología de terpenoides de *Helianthus annuus L.*—**Pág. 725**
DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M.T.; MORENO FRIGOLS, J.L.—Modelo general y cuatro ecuaciones para el ajuste de curvas de calibración en RIA. Comparación de resultados.—**Pág. 65**
DIEZ ZAERA, M.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
DONATO, M.T.—Véase GÓMEZ-LECHÓN, M.T.—**Pág. 5**
ECHARTE, M.—Véase ASTIASARÁN, I.—**Pág. 1159**
ESTEBAN RODRÍGUEZ, M.—RNA interferente: del descubrimiento a sus aplicaciones.—**Pág. 97**
ESTEBAN RODRÍGUEZ, M.—Desarrollo de vacunas contra el VIH/SIDA.—**Pág. 1047**
FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, A.—Véase MAYORAL, R.—**Pág. 1093**
FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, V.—Véase REGLERO, A.—**Pág. 833**

FERNÁNDEZ MILLÁN, E.; MARTÍN ARRIBAS, M.A.; ÁLVAREZ ESCOLÁ, C.—Efecto de la subnutrición materna sobre el desarrollo, crecimiento y funcionalidad de las células β pancreáticas en el feto: implicación del sistema IGFs.—**Pág. 453**
FERNÁNDEZ-VELEDO, S.—Véase LORENZO, M.—**Pág. 987**
FIDEU, M.D.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
FRANCÉS CAUSAPÉ, M.C.—El Balneario de Puente Viesgo (Cantabria). Historia y generalidades.—**Pág. 199**
FUERTES LASALA, E.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 287**
GALVÁN RAMÍREZ, Y.—Véase MANTERO SÁENZ, F.J.—**Pág. 267**
GAMPE, K.—Véase ZIMMERMANN, H.—**Pág. 537**
GARCÍA, M.A.; MARTÍN-SANTAMARÍA, S.; RAMOS, A.; DE PASCUAL TERESA, B.—Are adrenomedullin positive modulators novel matrix metalloproteinase inhibitors?.—**Pág. 703**
GARCÍA-GUERRA, L.—Véase LORENZO, M.—**Pág. 987**
GARCÍA MATA, M.—Véase TORIJA ISASA, M.E.—**Pág. 223**
GARCÍA MENDOZA, C.—Efecto del fungicida procloraz-manganeso en la verticiliosis del champiñón cultivado.—**Pág. 403**
GARCÍA SACRISTÁN, A.—Véase PRIETO, D.—**Pág. 963**
GARCÍA SANZ, R.—Véase POZUELO CUERVO, M.—**Pág. 243**
GIMÉNEZ-AMAYA, J.M.—Véase BERNÁCER, J.—**Pág. 1287**
GIMÉNEZ MARTÍN, G.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano.—**Pág. 581**
GIRALDO SUÁREZ, R.—Roger Kornberg y la RNApol II: el mecanismo de síntesis del ácido ribonucleico desvelado al medio siglo de Severo Ochoa y su polinucleótido fosforilasa.—**Pág. 125**
GÓMEZ, M.D.—Véase BELTRÁN, J.P.—**Pág. 1237**
GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; DONATO, M.T.—*In vitro* investigation of drug metabolism and toxicity in man.—**Pág. 5**
GÓMEZ-VICENTE, V.—Véase DE LA ROSA, E.J.—**Pág. 1031**
GÓMEZ-VILLAFUERTES, M.R.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
GONZÁLEZ IGLESIAS, J.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 287**
GONZÁLEZ PARRA, J.—El suelo: integración de componentes minerales y orgánicos.—**Pág. 419**

GRIMM, I.—Véase ZIMMERMANN, H.—**Pág. 537**
GUALIX, J.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
GUZMÁN-ARÁNGUEZ, A.I.—Véase PELÁEZ, T.—**Pág. 947**
HAGAN, I.M.—Véase ÁLVAREZ-TABARÉS, I.—**Pág. 901**
HERAS ÍÑIGUEZ, M.—Véase POZUELO CUERVO, M.—**Pág. 243**
IZCO SEVILLANO, J.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano.—**Pág. 569**
JIMÉNEZ, R.—Véase MONTURIOL, F.—**Pág. 343**
JIMÉNEZ ARENAS, V.—Véase JIMÉNEZ TORRES, N.V.—**Pág. 1265**
JIMÉNEZ TORRES, N.V.; MERINO SANJUÁN, M.; ALMENAR CUBELLS, D.; MONTEIRO, J.A.; MAESTU MAIQUES, I.; JIMÉNEZ ARENAS, V.—Individualización de Carboplatino en el anciano con cáncer de pulmón no microcítico avanzado.—**Pág. 1265**
KOLLIGRIS, P.—Véase PELÁEZ, T.—**Pág. 947**
LACADENA CALERO, J.R.—La importancia del ARN en la genética: un comentario a los Premio Nobel 2006 en Fisiología o Medicina y en Química.—**Pág. 89**
LACADENA CALERO, J.R.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano.—**Pág. 587**
LADERO ÁLVAREZ, M.; FUERTES LASALA, E.; LUENGO UGIDOS, M.A.; SANTOS BOBILLO, M.T.; GONZÁLEZ IGLESIAS, J.; ALONSO BEATO, M.T.; SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, M.E.; LADERO SANTOS, I.—Vegetación del entorno del Balneario de Puente Viesgo (Cantabria).—**Pág. 287**
LADERO SANTOS, I.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 287**
LANGER, D.—Véase ZIMMERMANN, H.—**Pág. 537**
LEÓN, D.—Véase MARÍN-GARCÍA, P.—**Pág. 441**
LEÓN, D.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
LEÓN-OTEGUI, M.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
LOMA, P.—Véase PELÁEZ, T.—**Pág. 947**
LÓPEZ COLÓN, J.L.—Véase TORIJA ISASA, M.E.—**Pág. 223**
LÓPEZ-RODAS, G.—Véase SANDOVAL, J.—**Pág. 47**
LORENZO, M.; FERNÁNDEZ-VELEDO, S.; VILA-BEDMAR, R.; GARCÍA-GUERRA, L.; DE ALVARO, C.; NIETO-VÁZQUEZ, I.—Contribution of TNF-α to obesity-associated insulin resistance.—**Pág. 987**

LUENGO UGIDOS, M.A.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 287**
MADUEÑO, F.—Véase BELTRÁN, J.P.—**Pág. 1237**
MAESTU MAIQUES, I.—Véase JIMÉNEZ TORRES, N.V.—**Pág. 1265**
MANTERO SÁENZ, F.J.; GALVÁN RAMÍREZ, Y.—Climatología del Balneario de Puente Viesgo.—**Pág. 267**
MARÍN-GARCÍA, P.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; LEÓN, D.—Glutamate determinations using Amplex Red Glutamic Acid Assay are affected by P2X agonist BzATP.—**Pág. 441**
MARÍN-GARCÍA, P.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
MARTÍN, M.A.—Véase DEL CASTILLO, B.—**Pág. 1009**
MARTÍN ARRIBAS, M.A.—Véase FERNÁNDEZ MILLÁN, E.—**Pág. 453**
MARTÍN-SANTAMARÍA, S.; Véase GARCÍA, M.A.—**Pág. 703**
MARTÍN-SANZ, P.—Véase MAYORAL, R.—**Pág. 1093**
MAYORAL, R.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, A.; ROY, R.; BOSCÁ, L.; MARTÍN-SANZ, P.—Papel de la caveolina-1 en la regeneración hepática tras hepatectomía parcial. Mecanismos de señalización y función en la regulación de la proliferación hepática.—**Pág. 1093**
MEDIERO, A.—Véase PELÁEZ, T.—**Pág. 947**
MEDINA, M.—Véase BELTRÁN, J.P.—**Pág. 1237**
MENÉNDEZ-CARREÑO, M.—Véase ASTIASARÁN, I.—**Pág. 1159**
MERINO SANJUÁN, M.—Véase JIMÉNEZ TORRES, N.V.—**Pág. 1265**
MIRAS-PORTUGAL, M.T.—Physiological role of extracellular nucleotides at the central nervous system: signalling through P2X and P2Y receptors.—**Pág. 1127**
MISHRA, S.K.—Véase ZIMMERMANN, H.—**Pág. 537**
MONGE, A.—Véase VICENTE, E.—**Pág. 927**
MONTEIRO, J.A- Véase JIMÉNEZ TORRES, N.V.—**Pág. 1265**
MONTURIOL, F.; JIMÉNEZ, R.—Estudio edafológico del término municipal de Puente Viesgo (Cantabria).—**Pág. 343**
MORENO FRIGOLS, J.L.-Véase DÍEZ MONTORO, R.—**Pág. 65**
MORENO FRIGOLS, J.L.—Véase OLIVARES PALLEROLS, R.—**Pág. 693**
MOSSO ROMEO, M.A.—Véase DE LA ROSA JORGE, M.C.—**Pág. 251**
NIETO-VÁZQUEZ, I.—Véase LORENZO, M.—**Pág. 987**
OLIVARES PALLEROLS, R.; ROMERO OTERO, M.; MO-

RENO FRIGOLLS, J.L.—Cinética de la estabilidad del radiofármaco 99^{m}Tc-DTPA. Influencia de la temperatura.—**Pág. 693**
OLIVES, A.I.—Véase DEL CASTILLO, B.—**Pág. 1009**
ORTEGA, F.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
ORTIZ-MELÓN, J.M.—Véase ÁLVAREZ-TABARÉS, I.—**Pág. 901**
ORZÁEZ VILLANUEVA, M.T.—Véase TORIJA ISASA, M.E.—**Pág. 223**
PAGANI, R.; SERRANO, M.C.; COMAS, J.V.; TRIVIÑO, G.; PORTOLÉS, M.T.—Ingeniería de tejidos: aplicaciones en el diseño de implantes cardiovasculares.—**Pág. 873**
PASTOR VILLEGAS, J.—Vicente Cervantes Mendo: lugar y fecha de nacimiento, bicentenario no conmemorado y próximo 250 aniversario.—**Pág. 747**
PELÁEZ, T.; MEDIERO, A.; ALARMA, P.; LOMA, P.; GUZMÁN-ARÁNGUEZ, A.I.; CROOKE, A.; KOLLIGRIS, B.; PERAL, A. PINTOR, J.—Melatonin makes me feel awake! Seven years of lab experience (2000-2007).—**Pág. 947**
PERAL, A.—Véase PELÁEZ, T.—**Pág. 947**
PEREDA, J.—Véase SANDOVAL, J.—**Pág. 47**
PÉREZ-SEN, R.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
PÉREZ-SILANES, S.—Véase VICENTE, E.—**Pág. 927**
PINTOR, J.—Véase PELÁEZ, T.—**Pág. 947**
PINUAGA ESPEJEL, J.I.—Véase RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, M.L.—**Pág. 327**
PORTHA, B.—From pathogenesis to therapeutic of type 2 diabetes. The GK rat paradigm.—**Pág. 763**
PORTOLÉS, M.T.—Véase PAGANI, R.—**Pág. 873**
POZUELO CUERVO, M.; HERAS ÍÑIGUEZ, M.; GARCÍA SANZ, R.—Análisis de la radiactividad en aguas del Balneario de Puente Viesgo.—**Pág. 243**
PRENSA, L.—Véase BERNÁCER J.—**Pág. 1287**
PRIETO, D.; GARCÍA SACRISTÁN, A.—Physiology of penile vasculature: endothelium and erctile dysfunction.—**Pág. 963**
PUERTO, J.—La terapéutica farmacológica en España y Europa durante la Edad Moderna.—**Pág. 1175**
RAMÍREZ ORTEGA, A.—Véase RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, M.L.—**Pág. 327**
RAMOS, A.—Véase GARCÍA, M.A.—**Pág. 703**
REGLERO, A.; BRAVO, I.G.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, V.—Ácidos siálicos: distribución, metabolismo y función biológica.—**Pág. 833**

REOL TEJADA, J.M.—Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano.—**Pág. 595**
RISUEÑO, R.M.; ALARCÓN, B.—El cambio conformacional de TCR detecta la fortaleza del ligando en células T maduras y en timocitos.—**Pág. 27**
RODRÍGUEZ, J.L.—Véase SANDOVAL, J.—**Pág. 47**
RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, C.—Véase DE LA ROSA JORGE, M.C.—**Pág. 251**
RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, M.L.; PINUAGA ESPEJEL, J.I.; RAMÍREZ ORTEGA, A.—Geología, hidrogeología y protección del Balneario de Puente Viesgo (Cantabria).—**Pág. 327**
ROMERO OTERO, M.—Véase OLIVARES PALLEROLS, R.—**Pág. 693**
ROQUE, E.—Véase BELTRÁN, J.P.—**Pág. 1237**
ROY, R.—Véase MAYORAL, R.—**Pág. 1093**
SALABERT SALVADOR, M.T.—Véase DÍEZ MONTORO.—**Pág. 65**
SALAS, E.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
SAN MARTÍN BACAICOA, J.; VALERO CASTEJÓN, A.—Acción terapéutica de las aguas del Balneario de Puente Viesgo.—**Pág. 361**
SÁNCHEZ BELTRÁN, M.C.—Véase DE LA ROSA JORGE, M.C.—**Pág. 251**
SÁNCHEZ MONTERO, J.M.—Biotecnología blanca e industria farmacéutica.—**Pág. 501**
SÁNCHEZ MONTERO, J.M.; SINISTERRA GAGO, J.V.—Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica.—**Pág. 1199**
SÁNCHEZ MUNIZ, F.J.—Aceite de olive, clave de vida en la Cuenca Mediterránea.—**Pág. 653**
SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.—Véase MARÍN-GARCÍA, P.—**Pág. 441**
SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.—Véase MIRAS-PORTUGAL, M.T.—**Pág. 1127**
SÁNCHEZ RODRÍGUEZ, M.E.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 287**
SANDOVAL, J.; PEREDA, J.; RODRÍGUEZ, J.L.; SASTRE, J.; LÓPEZ RODAS, G.—Regulación epigenética en la pancreatitis necrótica aguda.—**Pág. 47**
SANTOS BOBILLO, M.T.—Véase LADERO ÁLVAREZ, M.—**Pág. 287**
SASTRE, J.—Véase SANDOVAL, J.—**Pág. 47**
SERRANO, M.C.—Véase PAGANI, R.—**Pág. 873**
SHUKLA, V.—Véase ZIMMERMANN, H.—**Pág. 537**

SINISTERRA GAGO, J.V.—Véase SÁNCHEZ MONTERO J.M.—**Pág. 1199**
SOLANO, B.—Véase VICENTE, E.—**Pág. 927**
TENORIO SANZ, M.D.—Véase TORIJA ISASA, M.E.—**Pág. 223**
TORIJA ISASA, M.E.; ORZÁEZ VILLANUEVA, M.T.; GARCÍA MATA, M.; TENORIO SANZ, M.D.; LÓPEZ COLÓN, J.L.—Análisis físico-químico de las aguas mineromedicinales del Balneario de Puente Viesgo.—**Pág. 223**
TRIVIÑO, G.—Véase PAGANI, R.—**Pág. 873**
VALENCIANO, A.I.—Véase DE LA ROSA, E.J.—**Pág. 1031**
VALERO CASTEJÓN, A.—Véase SAN MARTÍN BACAICOA, J.—**Pág. 361**
VICENTE, E.; VILLAR, R.; SOLANO, B.; BURGUETE, A.; ANCIZU, S.; PÉREZ-SILANES, P.; ALDANA, I.; MONGE, A.—Derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina y enfermedades olvidadas.—**Pág. 927**
VILA-BEDMAR, R.—Véase LORENZO, M.—**Pág. 987**
VILA JATO, J.L.—Nuevos aspectos biofarmacéuticos en nanotecnología farmacéutica.—**Pág. 813**
VILLAR, R.—Véase VICENTE, E.—**Pág. 927**
ZIMMERMANN, H.; MISHRA, S.K.; SHUKLA, V.; LANGER, D.; GAMPE, K.; GRIMM, I.; DELIC, J.; BRAUN, N.—Ectonucleotidases, molecular properties and functional impact.—**Pág. 537**

Índice alfabético de materias

Aceite de oliva.—**Pág. 653**
Acetilcolina.—**Pág. 1287**
Ácido-N-acetil-neuroamínico.—**Pág. 833**
Ácido siálico.—**Pág. 833**
Agaricus bisporus.—**Pág. 403**
Agonistas GLP-1R.—**Pág. 763**
Agua minero-medicinal.—**Pág. 299**
Aguas minero-medicinales.—**Pág. 223**, **251**, **361**
Amplex red.—**Pág. 441**
Análisis farmacéutico.—**Pág. 1009**
Análisis físico-químico.—**Pág. 223**
Análisis medioambiental.—**Pág. 1009**
Análisis toxicológico.—**Pág. 1009**
Apoptosis.—**Pág. 1031**
Arcillas.—**Pág. 419**
Arquitectura de las plantas.—**Pág. 1237**
Arterias peneanas.—**Pág. 963**
Aspectos biofarmacéuticos.—**Pág. 813**
Aterosclerosis.—**Pág. 1159**
ATP.—**Pág. 537**, **1127**
Balneario.—**Pág. 199**
Balnearios.—**Pág. 361**
Balneario de Puente Viesgo.—**Pág. 223**, **251**, **361**
Balneoterapia.—**Pág. 361**
Barnasa.—**Pág. 1237**
Biocatálisis.—**Pág. 1199**
Bioclimatología.—**Pág. 267**
Biocompatibilidad.—**Pág. 873**
Bioingeniería.—**Pág. 873**
Biomaterial.—**Pág. 873**
Biotransformaciones.—**Pág. 501**, **1199**
Botánica.—**Pág. 747**
BzATP.—**Pág. 441**
Cálculo Tiempo Validez.—**Pág. 693**
Cambio conformacional.—**Pág. 27**
Cáncer.—**Pág. 653**
Cáncer de pulmón en ancianos.—**Pág. 1265**
Cardiocirugía.—**Pág. 873**
Caspasas.—**Pág. 1031**
Caveolina.—**Pág. 1093**
Célula endotelial.—**Pág. 963**
Chagas.—**Pág. 927**
ChIP.—**Pág. 47**
Ciencia del suelo.—**Pág. 419**
Citocromo P450.—**Pág. 5**
Citotoxicidad.—**Pág. 1079**
Comunidades vegetales.—**Pág. 287**
Confort.—**Pág. 267**
COPs.—**Pág. 1159**
c-Raf.—**Pág. 1031**
Crecimiento polarizado.—**Pág. 901**
Cribado virtual.—**Pág. 703**
Cristalografía rayos-X.—**Pág. 125**
Cromatina.—**Pág. 47**

Cromatografía.—**Pág. 1009**
Cultivos celulares.—**Pág. 873**
Desarrollo tímico.—**Pág. 27**
Diabetes tipo 2.—**Pág. 763**
Dieta Mediterránea.—**Pág. 653**
Diferenciación.—**Pág. 1031**
Disfunción eréctil vasculogénica.—**Pág. 963**
Disolventes orgánicos.—**Pág. 501**
Distancias euclidianas.—**Pág. 493**
Docking.—**Pág. 703**
Ecto-ATPasa.—**Pág. 537**
Ecuación cuatro parámetros.—**Pág. 65**
Endocitosis.—**Pág. 901**
Enfermedad cardiovascular.—**Pág. 653**
Envejecimiento.—**Pág. 653**
España.—**Pág. 287**, **747**
Espectroscopia.—**Pág. 1009**
Estabilización.—**Pág. 501**
Estriosomas.—**Pág. 1287**
Factores de formación.—**Pág. 343**
Farmacéuticos.—**Pág. 199**
Farmacia.—**Pág. 747**
Fármacos racémicos.—**Pág. 1199**
Farmacocinética poblacional.—**Pág. 1265**
Flora medicinal.—**Pág. 287**
Fosfatasa alcalina.—**Pág. 537**
Fungicida procloraz-manganeso.—**Pág. 403**
Ganglios basales.—**Pág. 1287**
Geología.—**Pág. 327**
Glutamato.—**Pág. 441**
Grupo de unión al zinc.—**Pág. 703**
HAT/HDAC.—**Pág. 47**
Hepatectomía.—**Pág. 1093**
Hepatocito.—**Pág. 1093**
Hepatocitos humanos.—**Pág. 5**
Hepatotoxicidad.—**Pág. 5**
Hidrogeología.—**Pág. 327**
Historia.—**Pág. 1195**
HSC70.—**Pág. 1031**
Inflamación.—**Pág. 47**, **725**
Inhibición parcial de proteínas.—**Pág. 403**
Inmunoanálisis.—**Pág. 65**
Insulina.—**Pág. 453**, **1031**
Interacción fármaco-fármaco.—**Pág. 5**
Intercambio Catiónico.—**Pág. 419**
Interferencias.—**Pág. 441**
Interneuronas.—**Pág. 1287**
Islote.—**Pág. 453**
Leishmaniasis.—**Pág. 927**
Levadura de fisión.—**Pág. 901**
Liberación de neurotransmisores.—**Pág. 1127**
Linfocito T.—**Pág. 27**
LXR.—**Pág. 987**
Macrófagos.—**Pág. 725**
Malaria.—**Pág. 927**
Malnutrición.—**Pág. 453**
Manantial.—**Pág. 251**
Materia orgánica.—**Pág. 419**
Medicamentos.—**Pág. 1175**
Melatonina.—**Pág. 947**
Metabolismo de fármacos.—**Pág. 5**
Microbiología.—**Pág. 251**
Microondas.—**Pág. 1159**

Microsomas.—**Pág. 5**
Mitosis.—**Pág. 901**
Modificación de histonas.—**Pág. 47**
Muerte celular programada.—**Pág. 1031**
NADPH-diaforasa.—**Pág. 1287**
Nanotecnología Farmacéutica.—**Pág. 813**
Nanovehículos.—**Pág. 813**
Nervios.—**Pág. 963**
Neurodegeneración.—**Pág. 1031**
Neurogénesis.—**Pág. 537**, **1031**
Neuroprotección.—**Pág. 1031**
Neurulación.—**Pág. 1031**
Neu5Ac.—**Pág. 833**
Nueva España.—**Pág. 747**
Origen de la vida.—**Pág. 419**
Oxidación.—**Pág. 1159**
Óxido nítrico.—**Pág. 963**
Pacientes.—**Pág. 199**
Países en vías de desarrollo.—**Pág. 927**
Pared celular.—**Pág. 403**
Período de semidesintegración.—**Pág. 243**
Pirazinoisoquinolinas.—**Pág. 1079**
Platinos.—**Pág. 1265**
Premio Nobel Química **2006**.—**Pág. 125**
Presión intraocular.—**Pág. 947**
Productos naturales.—**Pág. 725**, **1079**
Progreso.—**Pág. 1047**
Proinsulina.—**Pág. 1031**
Proliferación.—**Pág. 1031**
Protección.—**Pág. 327**
Proteína fosfatasas.—**Pág. 901**
PsEND1.—**Pág. 1237**
PTP1B.—**Pág. 987**
Puente Viesgo.—**Pág. 199**
Pureza radioquímica.—**Pág. 693**
P2X.—**Pág. 441**
p38MAPK.—**Pág. 987**
Química.—**Pág. 747**
Química verde.—**Pág. 501**, **1199**
Radiactividad.—**Pág. 243**
Radionucleido.—**Pág. 243**
Rata GK.—**Pág. 763**
Reacción antígeno-anticuerpo.—**Pág. 65**
Receptor MT3.—**Pág. 947**
Receptores de melatonina.—**Pág. 947**
Receptores ionotrópicos P2X.—**Pág. 1127**
Receptores metabotrópicos P2Y.—**Pág. 1127**
Reducción.—**Pág. 493**
Reestructuración de polisacáridos.—**Pág. 403**
Regeneración de células beta.—**Pág. 763**
Regeneración hepática.—**Pág. 1093**
Relación litologías-suelos.—**Pág. 343**
Retina.—**Pág. 1031**
RNApol II.—**Pág. 125**
Rosiglitazona.—**Pág. 987**
Roger Kornberg.—**Pág. 125**
Santander.—**Pág. 287**
Señalización.—**Pág. 453**
Secreción de insulina.—**Pág. 763**
Series radiactivas.—**Pág. 243**
Siglos XV-XVIII.—**Pág. 1175**
Síntesis.—**Pág. 1079**

Síntesis ARNm.—**Pág. 125**
Síntesis de fármacos.—**Pág. 501**
Sistema nervioso central.—**Pág. 1127**
Suelos.—**Pág. 343**
Sustrato del receptor de insulina-2 (IRS-2).—**Pág. 453**
TCR.—**Pág. 27**
Tecnologías culinarias.—**Pág. 1159**
Temperatura efectiva.—**Pág. 267**
Terminales sinápticas.—**Pág. 1127**
Terpenos.—**Pág. 725**
Timocito.—**Pág. 27**
Transferencia horizontal de genes.—**Pág. 1237**
Transporte de glucosa.—**Pág. 987**
Tuberculosis.—**Pág. 927**
Uso del suelo.—**Pág. 343**
Vacunas VIH/SIDA.—**Pág. 1047**
Variables independientes.—**Pág. 493**
Vectores de poxvirus, MVA y NYVAC.—**Pág. 1047**
Verticillium fungicola.—**Pág. 403**
Vigor híbrido.—**Pág. 1237**
5´-nucleotidasa.—**Pág. 537**

Relación de publicaciones de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. Publicaciones Periódicas

1.1. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia

Tomo I, Año 1932, núms. 1-4
Tomo II, Año 1933, núms. 1-4
Tomo III, Año 1934, núms. 1-4
Tomo IV, Año 1935, núms. 1-4
Tomo V, Año 1936, núms. 1-4
2.ª Época (Año VI), Tomo I, Año 1940, núms. 1-6
2.ª Época (Año VII), Tomo II, Año 1941, núms. 1-6
2.ª Época (Año VIII), Tomo III, Año 1942, núms. 1-6
Año IX, 1943, núms. 1-6
Año X, 1944, núms. 1-6
Año XI, 1945, núms. 1-4
Año XII, 1946, núms. 1-4
Año XIII, 1947, núms. 1-6
Año XIV, 1948, núms. 1-6
Año XV, 1949, núms. 1-6
Año XVI, 1950, núms. 1-6
Año XVII, 1951, núms. 1-6
Año XVIII, 1952, núms. 1-6
Año XIX, 1953, núms. 1-6
Año XX, 1954, núms. 1-6
Año XXI, 1955, núms. 1-6
Año XXII, 1956, núms. 1-6
Año XXIII, 1957, núms. 1-6
Año XXIV, 1958, núms. 1-6
Año XXV, 1959, núms. 1-6
Volumen XXVI, Año 1960, núms. 1-6
Volumen XXVII, Año 1961, núms. 1-6
Volumen XXVIII, Año 1962, núms. 1-6
Volumen XXIX, Año 1963, núms. 1-6
Volumen XXX, Año 1964, núms. 1-6

Volumen XXXI, Año 1965, núms. 1-6
Volumen XXXII, Año 1966, núms. 1-6
Volumen XXXIII, Año 1967, núms. 1-4
Volumen XXXIV, Año 1968, núms. 1-4
Volumen XXXV, Año 1969, núms. 1-4
Volumen XXXVI, Año 1970, núms. 1-4
Volumen XXXVII, Año 1971, núms. 1-4
Volumen XXXVIII, Año 1972, núms. 1-4
Volumen XXXIX, Año 1973, núms. 1-4
Volumen XL, Año 1974, núms. 1-4
Volumen XLI, Año 1975, núms. 1-4
Volumen XLII, Año 1976, núms. 1-4
Volumen XLIII, Año 1977, núms. 1-4
Volumen XLIV, Año 1978, núms. 1-4
Volumen XLV, Año 1979, núms. 1-4
Volumen XLVI, Año 1980, núms. 1-4
Volumen XLVII, Año 1981, núms. 1-4
Volumen XLVIII, Año 1982, núms. 1-4
Volumen XLIX, Año 1983, núms. 1-4
Volumen L, Año 1984, núms. 1-4
Volumen LI, Año 1985, núms. 1-4
Volumen LII, Año 1986, núms. 1-4
Volumen LIII, Año 1987, núms. 1-4
Volumen LIV, Año 1988, núms. 1-4
Volumen LV, Año 1989, núms. 1-4
Volumen LVI, Año 1990, núms. 1-4
Volumen LVII, Año 1991, núms. 1-4
Volumen LVIII, Año 1992, núms. 1-4
Volumen LIX, Año 1993, núms. 1-4
Volumen LX, Año 1994, núms. 1-4 y apéndice
Volumen LXI, Año 1995, núms. 1-4 y apéndice
Volumen LXII, Año 1996, núms. 1-4
Volumen LXIII, Año 1997, núms. 1-4
Volumen LXIV, Año 1998, núms. 1-4
Volumen LXV, Año 1999, núms. 1-4 y extraordinario.
Volumen LXVI, Año 2000, núms. 1-4.
Volumen LXVII, Año 2001, núms. 1-4 y extraordinario.
Volumen LXVIII, Año 2002, núms. 1-4 y extraordinario.
Volumen LXIX, Año 2003, núms. 1-4 y extraordinario.

Volumen LXX, Año 2004, núms. 1-4 y extraordinario.
Volumen LXXI, Año 2005, núms. 1-4
Volumen LXXII, Año 2006, núms. 1-4 y extraordinario.
Volumen LXXIII, Año 2007, núms. 1-4 y extraordinario.

Agotados los años desde 1932 a 1969 completos.

Agotado núm. 2, Año 1977 Vol. XLIII; núms. 1 y 2, Año 1978 Vol. XLIII; núm. extraordinario, Año 2002 Vol LXVIII.

1.2. Anuarios

— Anuario núm. 1, Año 1948
— Anuario núm. 2, Año 1949
— Anuario núm. 3, Año 1950
— Anuario núm. 4, Año 1951
— Anuario núm. 5, Año 1952
— Anuario núm. 6, Año 1953
— Anuario núm. 7, Año 1954
— Anuario núm. 8, Año 1955
— Anuario núm. 9, Año 1956
— Anuario núm. 10, Año 1957
— Anuario núm. 11, Año 1958
— Anuario núm. 12, Año 1959
— Anuario núm. 13, Año 1960
— Anuario núm. 14, Año 1961
— Anuario núm. 15, Año 1962
— Anuario núm. 16, Año 1963
— Anuario núm. 17, Año 1964
— Anuario núm. 18, Año 1965
— Anuario núm. 19, Año 1966
— Anuario núm. 20, Año 1967
— Anuario núm. 21, Año 1968
— Anuario núm. 22, Año 1969
— Anuario núm. 23, Año 1970
— Anuario núm. 24, Año 1971
— Anuario núm. 25, Año 1972
— Anuario núm. 26, Año 1973
— Anuario núm. 27, Año 1974

— Anuario núm. 28, Año 1975
— Anuario núm. 29, Año 1976
— Anuario núm. 30, Año 1977
— Anuario núm. 31, Año 1978
— Anuario núm. 32, Año 1979
— Anuario núm. 33, Año 1980
— Anuario núm. 34, Año 1981
— Anuario núm. 35, Año 1982
— Anuario núm. 36, Año 1983
— Anuario núm. 37, Año 1984
— Anuario núm. 38, Año 1985
— Anuario núm. 39, Año 1986
— Anuario núm. 40, Año 1987
— Anuario núm. 41, Año 1988
— Anuario núm. 42, Año 1989
— Anuario núm. 43, Año 1990
— Anuario núm. 44, Año 1991
— Anuario núm. 45, Año 1992
— Anuario núm. 46, Año 1993
— Anuario núm. 47, Año 1995
— Anuario núm. 48, Año 1996
— Anuario núm. 49, Año 1997
— Anuario núm. 50, Año 1998
— Anuario núm. 52, Año 2000
— Anuario núm. 53, Año 2001
— Anuario núm. 54, Año 2002
— Anuario núm. 55, Año 2003.
— Anuario núm. 56, Año 2004.
— Anuario núm. 57, Año 2005.
— Anuario núm. 58, Año 2006.
— Anuario núm. 59, Año 2007.

Agotados núms. 1 al 27 (1948-1974); núm. 31 (1978); núm. 33 (1980); núm. 52 (1999).

2. Monografías

2.1. Monografías de Aguas Mineromedicinales

Caldelas de Tuy (Agotada)	1968
Caldas de Cuntis	1974
Montemayor (Agotada)	1975
Corconte (Agotada)	1976
Ledesma (Agotada)	1977
Solán de Cabras (Primera edición agotada)	1978
(Segunda edición) (Agotada)	1980
Lanjarón	1980
Carabaña	1981
Alhama de Aragón	1983
Caldas de Montbui	1984
Fuente Amarga de Chiclana de la Frontera	1985
Archena	1986
Fortuna	1987
Arnedillo	1988
Caldas de Bohi	1989
Alange	1990
El clima en algunos balnearios	1990
Fitero	1991
La Toja	1993
Lugo	1994
Blancafort	1995
Hervideros de Cofrentes	1998
Carratraca	1999
El Paraíso de Manzanera	2001
Alhama de Granada (Agotada)	2002
Balneario de Jaraba (Agotada)	2004
Balneario de Cervantes	2006
Balneario de Puente Viesgo	2007

2.2. Serie de monografías de actualización en Ciencias Farmacéuticas

— Diseño de Medicamentos. Publicada en colaboración con Farmaindustria en 1994.
Coordinador: Dr. Arturo Mosqueira Toribio.

— Proliferación celular y cáncer. Publicada en colaboración con la Asociación Española Contra el Cáncer en 1994.
Coordinadores: Dra María Cascales y Dr. Julio Rodríguez Villanueva.

— Autoinmunidad Algunos aspectos básicos y clínicos. Publicada en colaboración con la Hermandad Farmacéutica del Mediterráneo en 1996.
Coordinador: Dr. Antonio Portolés Alonso.

— Bioquímica y Fisiopatología del estrés oxidativo. Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia.
Coordinador: Dra. María Cascales Angosto.

— Los residuos y sus riesgos para la salud. Publicada en colaboración con ENRESA, TEDEC-MEIJI FARMA, CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 1998.
Coordinador: Dr. Segundo Jiménez Gómez.

— Alimentos y Salud. 2000.
Coordinador: Dr. Bernabé Sanz Pérez.

— Salud, Educación y Energía Recursos cualificados para el Siglo XXI. Publicada en colaboración con ENRESA y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2001
Coordinador: Dr. Segundo Jiménez Gómez.

— Proliferación celular y cáncer 2000. Publicada en colaboración de la Fundación Científica de la Asociación Española contra el Cáncer. 2001.
Coordinador: Dra. María Cascales Angosto.

— Antecedentes históricos de las Facultades de Ciencias Químicas, Biología y Farmacia de la Universidad de Salamanca. 2001.
Coordinador: Dr. José Antonio Cabezas Fernández del Campo.

— La Salud, prioridad en el VI Programa de Medio Ambiente de la Unión Europea. Foro de reflexión y difusión del conocimiento (29 de octubre a 8 de noviembre del 2001). 2002.
Coordinador: Dr. León Villanúa Fungairiño

— Bioquímica y Fisiopatología del Envejecimiento. 2003.
Coordinadores: Dra. María Cascales Angosto, Dr. José Antonio Cabezas Fernández del Campo y Dr. Pedro García Barreno.

— Temas escogidos de Seguridad Alimentaria. 2003.
Coordinadores: Dr. Bernabé Sanz Pérez y Dr. Manuel Domíguez Carmona.

— Citocromo P450. 2004.
Coordinadores: Dra. María Cascales Angosto y Dra. M.ª José Gómez Lechón.

— Nuevos Avances en Medicamentos. 2004.
Coordinadores: Dra. M.ª Carmen Avendaño y Dr. Juan Tamargo Menéndez.

— Agresivos químicos y microbiológicos en la guerra y el terrorismo. 2005.
Coordinador: Dr. Manuel Domínguez Carmona.

— Las Ómicas: Genómica, Proteómica, Citómica y Metabolómica. (Nuevas tecnologías para el desarrollo de fármacos). 2005.
Coordinadores: Dra. María Cascales Angosto, Dra. M.ª José Gómez-Lechón y Dr. José E. O'Connor Blasco.

— Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías. 2005.
Coordinador: Dra. Ana María Pascual-Leone Pascual.

— Liberación de fármacos en matrices biocerámicas: avances y perspectivas. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2006.
Coordinadores: Dra. María Vallet Regí y Dr. Antonio Luis Doadrio Villarejo.

— Enfermedades metabólicas. Publicada en colaboración con CAJA MADRID, Fundación Ramón Areces y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2006.
Coordinadores: Dr. Federico Mayor Zaragoza y Dra. María Cascales Angosto.

— Influenza aviar y gripe humana de origen aviario. 2006.
Coordinador: Dr. Bernabé Sanz Pérez.

— Contaminación y salud. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2007.
Coordinadores: Dr. Segundo Jiménez Gómez y Dr. Antonio L. Doadrio Villarejo.

2.3. Otras Monografías

— Sesión Científica en homenaje al Excmo. Sr. D. Rafael Roldán y Guerrero en el centenario de su nacimiento. Año 1989. (Agotado).
— Número monográfico conmemorativo del II Centenario de la muerte de Lavoisier. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1994.
— Número monográfico sobre temas de Actualidad Farmacológica. Apéndice de los Anales de la Real Academia de Farmacia, 1995.
— Sesión Científica en homenaje a Severo Ochoa. En prensa.
— Ayer y Hoy de las Academias. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— El Genoma Humano Ciencia y Ética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Toxicología Ambiental. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Farmacocinética. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéu-ticas, 1996.
— Biotecnologías aplicadas a la producción de medicamentos y vacunas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Patentes y Biopatentes. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Parasitismo y Desarrollo. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Patogenia de Iones Metálicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Uso actual de las plantas medicinales cultivadas. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— El uso ilegítimo de los agentes químicos. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— El SIDA Un reto a la Ciencia y a la Sociedad. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.

— Clausura de las Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas, 1996.
— Investigación y siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
— Prescripción, Dispensación y Evidencia Científica (Medicina basada en la evidencia). Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de amigos de la Real Academia de Farmacia, 1999.
— Las especialidades Farmacéuticas Genéricas y los Precios de Referencia. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de amigos de la Real Academia de Farmacia.
— Genómica y Farmacogenómica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002.
— La Universidad de Hoy y los Farmacéuticos de mañana. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002.
— Infección por VIH y SIDA. Publicada en colaboración con SEISIDA (Sociedad Española Interdisciplinaria del SIDA); Instituto de Salud Carlos III; GlaxoSmithKline y Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2002.
— Farmacoeconomía e Investigación de Resultados en la Salud Principios y Práctica. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y la Fundación «José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia». 2002.
Coordinador: Dr. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé y Dr. Javier Soto Álvarez.
— Sesión Extraordinaria conmemorativa del centenario del nacimiento del Excmo. Sr. D. José María Albareda Herrera.
Coordinador: Antonio Portolés Alonso. (separata del num. 2; Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia). 2002.
— Modificadores de la respuesta biológica. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.
— Autocuidado de la Salud. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real

Academia Nacional de Farmacia. Coordinación: Asociación para el Autocuidado de la Salud (ANEFP). 2003.
— Transferencias y coordinación farmacéutica. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.
— Investigación y Siglo XXI. Publicada en colaboración con CAJAMADRID y la Fundación José Casares Gil de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2003.
— Síndrome agudo respiratorio grave y gripe aviar. Publicada en colaboración con la Real Academia Nacional de Medicina. 2004.
— Mesa Redonda. Regeneración hepática. Publicada en colaboración con la Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. 2006.

3. Facsímiles

— Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica de Pedro Gutiérrez Bueno (Madrid, 1815). Prologado por la Dra M.ª del Carmen Francés Causapé, 1994
— Dissertacion hydraulico-pharmaceutica sobre el origen de las aguas de Hardales, su verdadero analysis chymico, y medicinales virtudes. De Juan José García (Málaga, 1759). Prologada por Dra. M.ª del Carmen Francés Causapé, 1995.
— Concordia Aromatariorum Caesaraugstanensium DDLIII. Prologada por Dra. M.ª del Carmen Francés Causapé. Publicada con la colaboración de la Real Academia de Farmacia y el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza.
— Edición Facsímil de los Discursos pronunciados en la Real Academia de Farmacia por el Excmo. Sr. D. José María Albareda Herrera. 2002.
— Edición Facsímil del Diccionario Biográfico y Bibliográficos de Autores Farmacéuticos Españoles. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Roldán y Guerrero. Tomo I. Presentación por Dr. D. Antonio Portolés Alonso y prologado por la Dra. M.ª del Carmen Francés Causapé. 2003.

4. Sesiones necrológicas

— Excmo. Sr. D. Enrique Otero Aenlle, 1992.
— Excmo. Sr. D. Felipe Calvo y Calvo, 1992.
— Excmo. Sr. D. Alfredo Carrato Ibáñez, 1995.
— Excmo. Sr. D. Juan Manuel López de Azcona. 1996.
— Excmo. Sr. D. Octavio Carpena Artés. 1997.
— Excmo. Sr. D. Víctor Villanueva Vadillo. 1998.
— Excmo. Sr. D. Eugenio Sellés Martí. 1998.
— Excmo. Sr. D. Ángel Vian Ortuño. 2000.
— Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. 2000.
— Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro. 2000.
— Excmo. Sr. D. Manuel Martel San Gil. 2001.
— Excmo. Sr. D. Manuel Gómez-Serranillos. 2004.
— Excmo. Sr. D. Pablo Sanz Pedrero. 2005.
— Excmo. Sr. D. Gregorio González Trigo. 2005.
— Excmo. Sr. D. León Villanúa Fungairiño. 2005.
— Excmo. Sr. D. Domingo Espinós Pérez. 2005.
— Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez. 2005.
— Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz. 2005.
— Excmo. Sr. D. Antonio Portolés Alonso. 2005.
— Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano. 2007.

5. Discursos leídos en las sesiones inaugurales de Curso.

— La vida in vitro. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz. Año 1969. Agotado.
— El alma de la Farmacia. Por el Excmo. Sr. D. Eugenio Sellés Martí. Año 1970. Agotado.
— La contaminación del ambiente y su influencia en la vida. Por el Excmo. Sr. D. Juan Manuel López de Azcona. Año 1971.
— Los medicamentos de ayer y de hoy. Por el Excmo. Sr. D. Guillermo Folch Jou. Año 1972.
— La Química médica ante el futuro. Por el Excmo. Sr. D. Ramón Madroñero Peláez. Año 1973.
— La revolución farmacéutica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Jáuregui González. Año 1974.
— Consideraciones sobre la crisis de energía y de materias primas. Por el Excmo. Sr. D. Víctor Villanueva Vadillo. Año 1975.

— El problema de la creación de nuevos medicamentos. Por el Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. Año 1976.
— El Real Colegio de Farmacia de San Fernando. Por el Excmo. Sr. D. Guillermo Folch Jou. Año 1977. Agotado.
— Momentos estelares del pensamiento científico. Por el Excmo. Sr. D. Enrique Otero Aenlle. Año 1978.
— Problemas de la utilización de la microbiología con fines bélicos. Por el Excmo. Sr. D. Eliseo Gastón de Iriarte. Año 1979. Agotado.
— La edafología como ciencia. El problema de las clasificaciones de suelos. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Hoyos de Castro. Año 1980.
— Consideraciones históricas sobre la porcelana. Por el Excmo. Sr. D. Vicente Aleixandre Ferrándiz. Año 1981.
— Anecdotario microbiano. Por el Excmo. Sr. D. Lorenzo Vilas López. Año 1982.
— Consideraciones sobre la evolución farmacognóstica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Gómez Serranillos. Año 1983.
— Técnica y Medio Ambiente. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Vian Ortuño. Año 1984.
— Albaro Alonso Barba. Un metalurgo del siglo de Oro. Por el Excmo. Sr. D. Felipe Calvo y Calvo. Año 1985.
— La ultracentrífuga de Svedberg. Un punto de partida de la Biología Molecular. Por el Excmo. Sr. D. Pablo Sanz Pedrero. Año 1986. Agotado.
— La Biosfera y el Hombre. Por el Excmo. Sr. D. Emilio Fernández Galiano. Año 1987.
— Del complejo droga a fármaco estructuralmente específico. Por el Excmo. Sr. D. Gregorio González Trigo. Año 1988.
— Bases experimentales en la farmacología y terapéutica del dolor. Por el Excmo. Sr. D. Perfecto García de Jalón y Hueto. Año 1989.
— El grave peligro de pensar. Por el Excmo. Sr. D. Román de Vicente Jordana. Año 1990.
— La contaminación ambiental y sus consecuencias biológicas y climatológicas. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio López. Año 1991.
— Sistema Nervioso Central (SNC). Por el Excmo. Sr. D. Alfredo Carrato Ibáñez. Año 1992.
— El Universo del Medicamento. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Cadórniga Carro. Año 1993.

— Alimentación y cáncer. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Ortega Mata. Año 1994.
— Legislación y Métodos en el control toxicológico de compuestos, residuos y vertidos. Por el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas. Año 1995.
— Las plantas medicinales. Ejemplo de nuevo escenario en una clásica aproximación para el descubrimiento del medicamento. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega. Año 1996.
— Impresiones sobre Severo Ochoa. Por el Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva. Año 1997.
— Métodos cuánticos semiempíricos en el diseño de medicamentos. Por el Excmo. Sr. D. Arturo Mosqueira Toribio. Año 1998.
— Farmacología de la Inflamación. Por el Excmo. Sr. D. Domingo Espinós Pérez. Año 1999.
— Moléculas y Comunicación Biológica. Por el Excmo. Sr. D. Manuel Ruiz Amil. 2000.
— Supervivencia e Individualidad en Biología. Por el Excmo. Sr. D. Antonio Portolés Alonso. Año 2001.
— Proteínas del estrés. Implicaciones clínicas y objetivos terapéuticos. Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto. Año 2002.
— Terapéutica Farmacológica en el anciano. Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé. Año 2003.
— La conservación del suelo. Base de su sostenibilidad y soporte de salud. Excmo. Sr. D. Segundo Jiménez Gómez. Año 2004.
— Avances en Geobotánica. Excmo. Sr. D. Salvador Rivas Martínez. Año 2005.
— Europa y globalización de la Sanidad. Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas. Año 2006.
— El desarrollo de fármacos. A propósito de la insuficiencia cardiaca: luces, sombras, reflexiones y perspectivas. Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez. Año 2007.

6. Otras publicaciones

— Diccionario biográfico y bibliográfico de autores farmacéuticos españoles. Por el Excmo. Sr. D. Rafael Roldán Guerrero. Tomo I, Año 1963. Agotado. Tomos II y III, Año 1975. Tomo IV, Año 1976.

— Código Deontológico Farmacéutico. Editado por el Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Año 1991.
— Estatutos y Reglamento de la Real Academia de Farmacia. Textos refundidos. Año 1992.
— Tríptico explicativo de «El Museo de la Real Academia de Farmacia». Año 1995.
— Colección de tarjetas postales sobre el «Museo de la Real Academia de Farmacia». Por la Excma. Sra. Dña. M.ª del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1998.
— Jornada sobre Atención Farmacéutica. Año 1998.
— Avances de la Ciencias a través del Premio Nobel. Por el Excmo. Sr. D. Ángel Santos Ruiz. Año 1998.
— El Museo de la Real Academia de Farmacia. Por Excma. Sra. Dña. M.ª Del Carmen Francés Causapé. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 1999.
— Historia de la Real Academia de Farmacia. por Excmo. Sr. D. Toribio Zúñiga Sánchez-Cerrudo. Revisado anotado e ilustrado por la Excma. Sra. Dña. M.ª del Carmen Francés Causapé. Año 2002.
— Lecturas Singulares 1. Del corazón y la mente. Excmo. Sr. D. Manuel Losada Villasante. Año 2005.
— Lecturas Singulares 2. Recuerdo y desagravio a León Felipe. Excmo. Sr. D. Mariano Turiel de Castro. Año 2006.
— Lecturas Singulares 3. La Farmacia en tiempos de Miguel de Cervantes Saavedra. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2006.
— Homenaje a las grandes figuras de las Ciencias Farmacéuticas: Obdulio Fernández y Enrique Molés. Coordinador: Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia y Amigos de la Cultura Científica Academia de Ciencias e Ingeniería de Lanzarote. Año 2006.
— En memoria de un maestro. Ángel Santos Ruiz. Editora: Dra. María Cascales Angosto. Año 2006.

— Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas. Publicada en colaboración con la Fundación CAJA MADRID, Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2007.
— Lecturas Singulares 4. Fe, esperanza y caridad en el mundo del medicamento: desde la Grecia clásica a la molecularidad del s. XXI. Excmo. Sr. D. Mario Sapag-Hagar. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2007.
— Lecturas Singulares 5. Farmacia y Arte. (Ligera visión de la pintura española a través de Goya, Velázquez y Murillo). Excmo. Sr. D. Guillermo Tena. Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2007.
— II Encuentro Iberoamericano de Academias de Farmacia (AIAF). Publicada en colaboración con CAJA MADRID y Fundación «José Casares Gil» de Amigos de la Real Academia de Farmacia. Año 2007.

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. 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 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. 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, recensiones 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. 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

ISSN 1697-4271