

ANALES

DE LA

REAL ACADEMIA NACIONAL DE

FARMACIA



2008

VOLUMEN LXXIV

Núm. 2

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

•

28004 MADRID

Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte II

Recibido el 9 de julio de 2007

MERITXELL NUS¹, FRANCISCO J. SÁNCHEZ-MUNIZ¹,
JOSÉ M. SÁNCHEZ-MONTERO^{2*}

¹Dpto. de Nutrición y Bromatología I (Nutrición); ²Grupo de Biotransformaciones, Dpto. de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) suponen la primera causa de muerte en los países desarrollados y se ha estimado que en el año 2010 también liderarán las causas de muerte en los países en vías de desarrollo. Numerosos estudios epidemiológicos han confirmado la relación entre colesterolemia y ECV, postulándose que el descenso de los niveles séricos de colesterol produce una dismi-

* Profesor Doctor J. M. Sánchez-Montero.

Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense.

Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria. 28040-Madrid.

e-mail: jsanchez@farm.ucm.es

Abreviaturas: **PON1:** paraoxonasa; **PDB:** protein data bank; **HPBP:** proteína que une grupos fosfato; **ECV:** enfermedad cardiovascular; **LDL:** lipoproteínas de baja densidad; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **SBF:** Simulated Body Fluid (mimético de suero humano); **SBFb:** SBF modificado en bicarbonato; **SBFc:** SBF modificado en cloruro; **SBFp:** SBF igual que el plasma IC 95%; intervalo de confianza al 95%; **HEPES:** ácido 2-[4-(2-hidroxietil-1-piperazino)]propilsulfónico; **K_m:** constante de Michaelis-Menten; **V_{max}:** velocidad máxima; **IMC:** índice de masa corporal; **P:** percentil; **IC 95%:** intervalo de confianza al 95%; **MOPS:** ácido 3-(N-morfolino)-propilsulfónico; **TES:** ácido N-[tris-(hidroximetil)-metil]-2-aminoetilsulfónico; **BICINE:** N,N-bis(2-hidroxietil) glicina; **FL:** Fosfolípidos; **HDL:** lipoproteínas de alta densidad; **VLDL:** lipoproteínas de muy alta densidad; **AGS:** ácidos grasos saturados.

nución de la incidencia y la prevalencia de muerte por cardiopatía isquémica y ECV. Además se ha demostrado que la concentración elevada de lipoproteínas de baja densidad (LDL) es un factor de riesgo, mientras que la de lipoproteínas de alta densidad (HDL) es un factor protector frente a la ECV.

Muchos autores han sugerido que esta acción beneficiosa de las HDL se debe a que, unida a su molécula, existe una enzima denominada paraoxonasa (PON1). La PON1 es una enzima que presenta varias actividades *in vitro*: paraoxonasa, arilesterasa y lactonasa. Parece inhibir la oxidación tanto de las LDL como de las HDL y facilitar el transporte reverso del colesterol, disminuyendo así el riesgo de aterosclerosis.

Su mecanismo de acción, propiedades catalíticas y sustratos naturales aun se desconocen. Se han desarrollado algunos métodos espectrofotométricos y calorimétricos para determinar su actividad arilesterasa que aunque muy utilizados no son muy sensibles y los resultados obtenidos no son muy reproducibles. En este trabajo se revisan muchos aspectos centrales referentes a esta enzima: mecanismos de acción, regulación por diferentes sustratos y mecanismos genéticos y dieta. Además se presenta un método que, utilizando como tampón un mimético de suero, permite obtener resultados más fiables y reproducibles de actividad arilesterasa en humanos y ratones. Por otra parte, se detectan posibles efectos de los polimorfismos sobre los valores basales de actividad arilesterasa en individuos con riesgo cardiovascular incrementado.

Palabras clave: Arilesterasa.—Aterosclerosis.—LDL-oxidada.—Mimético de suero humano.—Polimorfismos.

SUMMARY

Arylesterase. Methodological and Functional Aspects of a Key Enzyme in the Cardiovascular Disease. Part II

Cardiovascular diseases (CVD) are the first cause of death in developed countries and it is estimated that by 2010 they will also be the leading cause of death in developing countries. Epidemiologic studies have demonstrated that reduction of total serum cholesterol decreases prevalence and death rates associated with ischemic cardiopathy and CVD. Furthermore, a high concentration of LDL is considered a risk factor, while high levels of HDL are thought to be a protective factor.

Many authors have suggested that HDL-bound PON1 enzyme may confer the protective effects to HDL. PON1 is an enzyme with several *in vitro* activities: paraoxonase, arylesterase, and lactonase. It has been reported that PON1 inhibits LDL and HDL peroxidation, as well as it facilitates the cholesterol reverse transport, helping to inhibit the developing of atherosclerosis.

Its native substrates, its *in vivo* mechanism of action and its molecular targets in the human body are still unknown. Nevertheless, calorimetric and spectrophotometric methods, very often employed but reaching to low very precise

and sensible results, to determine its arylesterase activity have been developed. In this paper several aspects of this enzyme such as the mechanism of action, the regulation by substrates, genes and diet, are reviewed. Moreover, we present a method that uses a serum mimetic buffer that permits to obtain more precise and repeatable results of the arylesterase activity in humans and mice. Furthermore the relationship between PON1 polymorphisms and arylesterase activity is also tested in subjects at increased CVD-risk.

Keywords: Arylesterase.—Atherosclerosis.—Oxidized-LDL.—Human serum mimetic.—Polymorphisms.

MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ARILESTERASA

El proceso de purificación del enzima paraoxonasa (PON1) ha dado lugar a muchas controversias, ya que aunque en muchos estudios se asegura haber utilizado el enzima «purificado», resulta paradójico que no se hubieran incluido sus coordenadas en el Protein Data Bank (PDB) hasta el año 2004 (1-3). Parece obvio que tal purificación no debió ser completa, además estudios muy recientes han asegurado haber desarrollado un método fiable de purificación de PON1, porque según comentan, en los estudios anteriores junto con la PON1 siempre aparecía una proteína que une grupos fosfato (HPBP) (4).

Por otro lado, la purificación de un enzima suele ser un proceso bastante largo y complejo, por lo que en un laboratorio de rutina para realizar la determinación de la actividad arilesterasa es mejor hacerlo con un método que emplee directamente suero. Así pues, se han intentado desarrollar métodos rápidos de detección de la actividad arilesterasa a fin de asociar su actividad o su concentración con el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. La determinación de la actividad de la enzima PON1 tiene limitaciones ya que aun no se conocen los valores normales en suero debido a la variabilidad interindividual condicionada por polimorfismos de la enzima. Esto condiciona que su valor predictivo aun no esté totalmente definido.

El primer método propuesto para determinar la actividad arilesterasa, y el que ha sido utilizado en la mayoría de los estudios de intervención (5-11), es el método elaborado por Eckerson y col. (12),

que se considera el método de referencia. En este método se usa acetato de fenilo como sustrato, ya que es específico de esta esterasa. Las medidas se hacen espectrofotométricamente a una longitud de onda de 270 nm. El acetato de fenilo se disuelve hasta una concentración 1 mM en un tampón Tris/HCl 20 mM, con una concentración de CaCl_2 0.9 mM y de un pH = 8 a 25° C. La actividad del enzima se calcula usando un coeficiente de extinción molar de $1310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad (U) de actividad arilesterasa se define como 1 μmol de acetato de fenilo hidrolizado por minuto.

Sin embargo, el método de Eckerson y col. (12) da lugar a resultados de actividad arilesterasa poco reproducibles, además de muy bajo orden de actividad enzimática, por lo que numerosos autores han intentado modificarlo para aumentar la sensibilidad (Tabla 1).

TABLA 1. *Modificaciones realizadas al método de Eckerson y col. (12)*

<i>Estudio</i>	<i>Tampón</i>	<i>Concentración sustrato</i>	<i>pH</i>	<i>Temperatura</i>
Beltowsky y col. (13)	100 mM Tris/HCl 2 mM Ca Cl_2	2 mM	8	25 °C
Reiner y col. (14)	100 mM Tris/HCl	5 mM	7,4	37 °C
Liao y col. (15)	50 mM Tris/HCl 2 mM Ca Cl_2	40 mM	8	25 °C
Wallace y col. (16)	20 mM Tris/HCl 20 mM Tris/HCl	1 mM	7,4	25 °C
Azarsiz y col. (5)	0,9 mM Ca Cl_2 1 M NaCl*	1 mM	8	25 °C

* El NaCl se añade como potenciador de la actividad.

A pesar de todas estas modificaciones aún no se han obtenido resultados óptimos de actividad arilesterasa.

Otro método de determinación de la actividad arilesterasa más reciente es el propuesto por Lorentz y col. (17). Se trata de un ensayo automatizado basado en la medida de la disminución del hexacianohierro-III como consecuencia de la reacción acoplada de la hidrólisis del acetato del tiofenilo por acción de la arilesterasa (Figura 1).

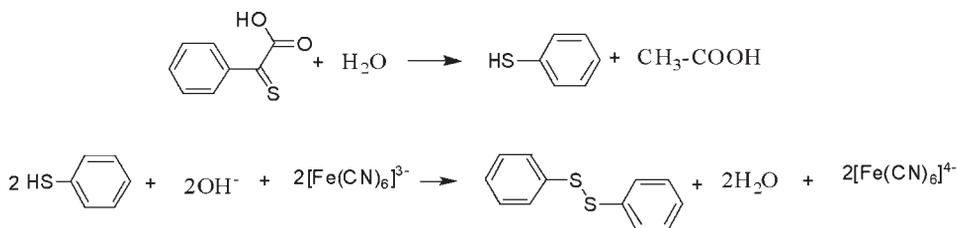


FIGURA 1. *Esquema del método propuesto por Lorentz y col. (13).*

Las medidas se llevan a cabo a 37° C y a un pH = 7,73 a una longitud de onda de 405 nm (a la que absorbe el hexacianohierro-III). En algunas de las muestras, cuando las velocidades iniciales eran muy pequeñas, se sustituyó el hexacianohierro-III por ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) haciéndose las medidas a 546 nm (17). Sin embargo este método resulta muy largo y tedioso para ser empleado como ensayo de rutina.

Otro método espectrofotométrico es el descrito por Butte y col. (18) usando como sustratos acetato y benzoato de p-nitrofenilo en un tampón fosfato 66 mM con 0,1% de Triton X-100 a pH = 7,5 y 37° C. El método se basa en el incremento de absorbancia a 321 nm, debido al aumento de concentración de α -naftol (producto de la hidrólisis de la arilesterasa sobre los sustratos). El inconveniente de este método es que los ésteres del α -naftol no son sustratos específicos de este enzima.

Los estudios llevados a cabo por Debord y col. (19-21) con muchos de los inhibidores de la actividad arilesterasa llevaron a la conclusión de que el método espectrofotométrico tenía muchas limitaciones por el efecto de los inhibidores de la actividad arilesterasa. Por ello pensaron que desarrollando un método microcalorimétrico evitarían estos problemas. Estos autores han puesto a punto un método calorimétrico usando acetato de fenilo como sustrato en un tampón Tris/HCl 9 mM con 1 mM CaCl₂ a pH = 8 y 37° C. Se mezcla la disolución de sustrato con el enzima purificado en un microcalorímetro y se mide la diferencia de entalpía hasta que se alcanza el estado estacionario (22). Los resultados obtenidos se ajustaron a una ecuación integrada de Michaelis-Menten no lineal y se ajustó por mínimos cuadrados (22). Observaron que se trata de una reacción ligeramente endotérmica ($\Delta H = 8,2 \text{ kJ mol}^{-1}$) (18). Sus resultados coinciden con los de Lorentz y col. (17). Sin embargo el manejo de la microcalorimetría

es muy complicado, por lo que tampoco parece una buena solución para sustituir al método de Eckerson y col. (12).

NUEVO MÉTODO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ARILESTERASA

A) Estudios en humanos

Nuestro equipo se planteó que todos estos inconvenientes podrían solucionarse empleando un medio que reprodujera la composición del medio interno en el que trabaja la arilesterasa. El Simulated Body Fluid (SBF), introducido por Kokubo y col. (23), es un líquido artificial que presenta la misma concentración iónica del suero y que ha sido utilizado con éxito en experimentos con biomateriales (24, 25). No obstante, hasta el momento nunca había sido utilizado para medir actividades enzimáticas. Como el SBF no tiene exactamente la misma composición electrolítica que el suero, ya que presenta 1,8 veces más cloruro y seis veces menos bicarbonato que el suero, se diseñaron tres tampones más (Tabla 2) (26):

- SBFc: modificado en cloruro y tamponado con ácido 2-[4-(2-hidroxietil-1-piperazino)]propilsulfónico (HEPES)/NaOH.
- SBFb: modificado en bicarbonato y tamponado con Tris/HCl.
- SBFp: con la misma composición que el plasma y tamponado con HEPES/NaOH.

TABLA 2. Composición iónica del suero, del SBF y de los SBF modificados

	Suero	SBF	SBFc	SBFb	SBFp
	mM	mM	mM	mM	mM
Na ⁺	142	142	142	142	142
Ca ²⁺	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Cl ⁻	103	187	103	187	103
K ⁺	5	4,6	4,6	4,6	5
HCO ₃ ⁻	27	4,6	4,6	27	27
Mg ²⁺	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

El diseño de la composición de los tampones se hizo mediante una hoja de cálculo Excel, modificando la concentración del ion que nos interesaba y manteniendo una fuerza iónica fija de 0,26 M.

Para compararlo con el método de Eckerson y col. (12) se diseñaron los siguientes experimentos:

1. Obtención de curvas patrón de actividad arilesterasa

Este ensayo se hace a concentración de sustrato fija (0,25 mM de acetato de fenilo) y distintos volúmenes de un *pool* de sueros humanos control. Las medidas en los cuatro SBF se llevaron a cabo a 37° C y pH = 7,34-7,4 (condiciones fisiológicas). Las medidas por el método de Eckerson y col. (12) según bibliografía ya descrita en el apartado anterior. Una unidad de actividad arilesterasa es igual a 1 mol de acetato de fenilo hidrolizado por L y por minuto.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 2. En la Tabla 3 se presentan los valores de las pendientes obtenidas. En ella

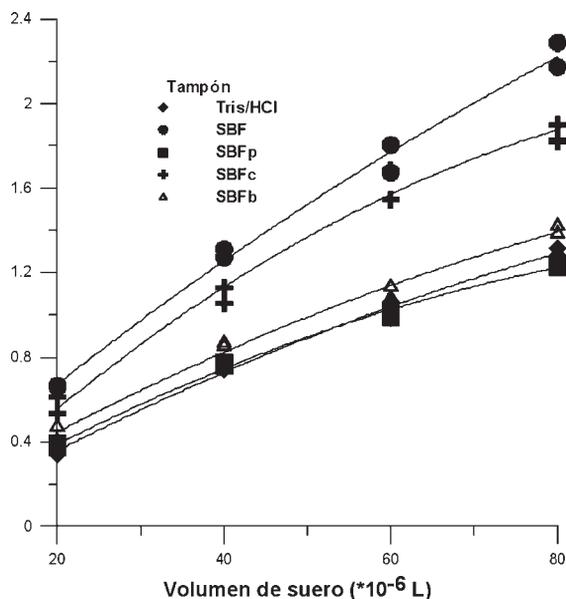


FIGURA 2. **Determinación de la actividad arilesterasa en humanos a concentración de enzima variable usando el método de Eckerson y col. (12), SBF, SBFc, SBFp y SBFb.**

se puede observar que el SBF da los mejores resultados, seguido del SBFc. Las actividades obtenidas con los otros tampones SBFb y SBFp fueron equivalentes a las observadas, empleando el método de Eckerson y col. (12).

TABLA 3. *Pendiente de la actividad arilesterasa en cinco tampones diferentes*

<i>Tampón</i>	<i>Pendiente</i>	<i>IC 95%</i>	<i>R²</i>
	U/L	U/L	
Tris/HCl	15,53	13,8-17,3	0,987
SBF	25,84	22,8-28,8	0,989
SBFc	21,97	18,0-25,9	0,969
SBFb	15,73	13,6-17,8	0,983
SBFp	13,92	12,0-15,9	0,981

2. Obtención de los parámetros cinéticos de la actividad arilesterasa

Este ensayo se llevó a cabo a un volumen de enzima fijo (50 μ L de suero humano control) y variando la concentración de sustrato (0,10-0,50 mM de acetato de fenilo) en tampón SBF (con el que se habían obtenido los mejores resultados) (22) y con el método de Eckerson y col. (12).

Por ambos métodos el enzima mostró una cinética de Michaelis-Menten. Los valores de K_m y V_{max} : obtenidos con el método de Eckerson y col. (12) fueron los siguientes: $V_{max} = 5,299 \cdot 10^{-5}$ U (IC 95% = $4,18 \cdot 10^{-5} - 6,42 \cdot 10^{-5}$ U) and $K_m = 2,765 \cdot 10^{-4}$ M (IC 95% = $1,62 \cdot 10^{-4} - 3,91 \cdot 10^{-4}$ M) y por el nuevo método (26) usando SBF $V_{max} = 6,305 \cdot 10^{-5}$ U (95% IC = $4,62 \cdot 10^{-5} - 7,99 \cdot 10^{-5}$ U) y $K_m = 2,643 \cdot 10^{-4}$ M (95% IC = $1,13 \cdot 10^{-4} - 4,16 \cdot 10^{-4}$ M).

3. Validación del nuevo método en 23 pacientes con riesgo cardiovascular incrementado

Los criterios de inclusión eran: edad: hombres > 45 años; mujeres postmenopáusicas (> 50 años); Índice de masa corporal (IMC)

> 25 kg/m². Además, una de las siguientes características debía ser presentada: colesterol total = 5,69 mmol/L, ser fumador (= 10 cigarrillos al día) y/o hipertensión (140-90 mm Hg de presión arterial sistólica/diastólica, respectivamente).

Se determinó su actividad arilesterasa por el método de Eckerson y col. (12) y por el nuevo método (26), obteniendo los resultados que aparecen en la Tabla 4. Los valores obtenidos, usando el método que utiliza SBF (26) fueron significativamente más bajos ($p < 0,038$; + 26,4%) que usando el método de Eckerson y col. (12). El coeficiente de variación, usando el SBF como tampón, fue un 6% inferior que cuando empleamos el Tris/HCl. Por otro lado, la precisión del nuevo método (26) fue significativamente superior que usando el método de Eckerson y col. (12) ($F = 4,627$; $p = 0,038$). Teniendo en cuenta los percentiles de actividad arilesterasa de nuestra población obtenidos con el SBF: percentil (P) $P_{25} = 30,6$ U/L; $P_{50} = 37,5$ U/L; $P_{75} = 50,7$ U/L, se observa que las muestras con actividad arilesterasa inferior a la del P_{75} estaban hiperestimadas ($p = 0,038$, + 53%) al utilizar el método de Eckerson y col. (12).

Por tanto, con todos estos resultados experimentales, se puede concluir que el nuevo método propuesto (26) da resultados menos erráticos y más reproducibles que el método de referencia (12). El rango de linealidad de la actividad arilesterasa fue muy superior usando el SBF, por lo que puede usarse para un mayor intervalo de concentración de arilesterasa (26). Esto implica que para una misma concentración de arilesterasa, al usar el método que emplea SBF (26) el enzima debe estar hiperactivada debido a que se encuentra en un medio iónico más favorable con lo que se obtiene un valor mayor de actividad arilesterasa. Por tanto debe concluirse que el nuevo método (26) puede sustituir al de Eckerson y col. (12) como método de referencia.

Por otro lado, el método de Eckerson y col. (12) sobreestima los valores de actividad en pacientes con muy baja actividad arilesterasa, aspecto de gran importancia ya que, como se ha comentado anteriormente, las personas con alto riesgo cardiovascular tienen disminuida la actividad de dicha enzima.

TABLA 4. *Actividad pseudo-específica arilesterasa determinada por el método de Eckerson y col. (12) y por el nuevo método (26) en pacientes con riesgo cardiovascular incrementado*

<i>Tampón</i>	<i>n</i>	<i>Actividad arilesterasa</i>	<i>Coficiente de variación</i>
		U/L	%
SBF	23	38,6 ± 13,8	35
Tris/HCl	23	48,8 ± 20,3*	41
SBF (A)	6	19,2 ± 5,7	30
Tris/HCl (A)	6	46,3 ± 30,6	66
SBF (B)	17	31,2 ± 10,3	33
Tris/HCl (B)	17	47,8 ± 21,5*	45
SBF (C)	11	37,8 ± 4,4	12
Tris/HCl (C)	11	48,7 ± 16,5	34

(A) Pacientes con muy baja actividad arilesterasa [$< 30,6$ U/L, Percentil (P)₂₅ con SBF].
 (B) Pacientes con baja y con muy baja actividad arilesterasa [$< 50,7$ U/L (P₇₅ con SBF)].
 (C) Pacientes con actividad arilesterasa entre = $30,6$ U/L y $< 50,7$ o entre el P₂₅ y el P₇₅ con SBF). * $p < 0,05$; diferente significativamente *vs.* su respectivo valor usando el SBF (Student-*t* test pareado).

B) Estudios en ratones

También nos propusimos poner a punto el método de determinación de la actividad arilesterasa en otros animales de experimentación y para ello se seleccionaron ratones balb-c, que es una estirpe muy resistente a desarrollar aterosclerosis (A. H. Terpstra, comunicación personal).

El diseño experimental para comparar el método de Eckerson y col. (12) y el método empleando SBF (26) en ratones fue el mismo que el comentado en el apartado anterior. Sin embargo, se alcanzaron resultados ligeramente diferentes (Figura 3).

El nuevo método (26) dio lugar a los mejores resultados en ratones al igual que en humanos, sin embargo este incremento de actividad fue más importante en ratones ya que se consiguió incrementar la actividad 180 veces respecto al método de Eckerson y col. (12). Resultados similares a los del SBF se obtuvieron al emplear el SBFc y el SBFp (Tabla 5) (27).

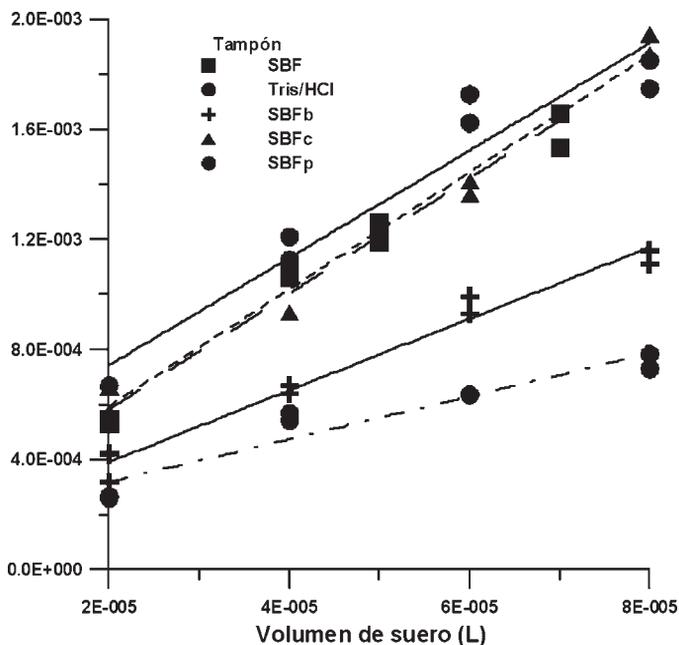


FIGURA 3. **Determinación de la actividad arilesterasa en ratones balb-c a concentración de enzima variable usando el método de Eckerson y col. (12), SBF, SBFc, SBFp y SBFb.**

TABLA 5. *Pendientes de la actividad arilesterasa en ratones usando cinco tampones diferentes*

<i>Tampón</i>	<i>Pendiente</i>	<i>IC 95%</i>	<i>R²</i>
	U/L	U/L	
Tris/HCl	0,13	0,096-0,167	0,917
SBF	21,03	17,9-24,2	0,988
SBFc	21,20	18,7-23,7	0,986
SBFb	13,22	11,1-14,4	0,974
SBFp	18,70	13,6-22,4	0,965

Los parámetros cinéticos obtenidos de la arilesterasa de ratones fueron por el método de Eckerson y col. (12): $K_m = 2,008 \cdot 10^{-4}$ (IC 95% = $9,52 \cdot 10^{-5} - 3,06 \cdot 10^{-4}$) y $V_{max} = 3,236 \cdot 10^{-5}$ (IC 95% = $2,54 \cdot 10^{-5} -$

$3,93 \cdot 10^{-5}$) y por el nuevo método (26) $K_m = 1,442 \cdot 10^{-3}$ (IC 95% = $5,01 \cdot 10^{-3} - 3,39 \cdot 10^{-3}$) y $V_{max} = 1,854 \cdot 10^{-4}$ (IC 95% = $1,54 \cdot 10^{-5} - 3,86 \cdot 10^{-4}$). Con el nuevo método (26) se obtuvieron una V_{max} y una K_m mucho más altas que con el método de Eckerson y col. (12) y además más elevadas que en humanos por ambos métodos, por lo que se puede concluir que la arilesterasa de ratones es más activa que la de humanos.

El estudio con los distintos tampones (SBF, SBFp, SBFc, SBFb) dio lugar a diferentes resultados sobre el efecto de los iones Cl^- y HCO_3^- , y de los agentes tamponantes Tris y HEPES que serán comentados en el siguiente apartado.

CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ARILESTERASA

1. Inhibidores de la actividad arilesterasa

1.1. Metales de transición

En el año 1960, Erdos y col. (28) ya identificaron a los metales de transición como inhibidores de la arilesterasa, pero su mecanismo de inhibición no fue descrito hasta décadas más tarde (19, 29) (Tabla 6).

TABLA 6. *Mecanismo de inhibición de la actividad arilesterasa por metales de transición*

<i>Metales</i>	<i>Mecanismo de inhibición</i>
	Unión al -SH de la cys284 según (29)
Cu^{2+} y Hg^{2+}	Unión al grupo carbonilo del sustrato inhibiendo su unión al Ca1 (19)
Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}	Unión a hys del sitio catalítico (19)
La^{3+}	Unión al sitio de unión del Ca^{2+} (19)

1.2. *EDTA y citrato*

Son utilizados como anticoagulantes en el plasma e inhiben la actividad arilesterasa por ser quelantes de Ca^{2+} , por lo que se recomienda el uso de suero en lugar de plasma para medir la actividad arilesterasa (29, 30).

1.3. *Disolventes orgánicos*

Debord y col. (20) han encontrado una inhibición de la arilesterasa por unión de disolventes orgánicos al enzima a través de interacciones hidrofóbicas por la cadena alifática y de unión de transferencia de carga a través del grupo polar funcional. Así, cuanto mayor es el número de carbonos de la cadena, mayor es su potencial de inhibición. Es decir, el etanol inhibe al enzima más que el metanol. Además demostró que el monoetil éter del etilenglicol inhibía ligeramente al enzima, pero la acetona, el tetrahidrofurano y el dimetilsulfóxido la inhibían más potentemente.

1.4. *Surfactantes*

En ocasiones se han estudiado surfactantes para solubilizar sustratos diferentes al acetato de fenilo para determinar la actividad arilesterasa. En un estudio llevado a cabo por Lorentz y col. (17) observaron que la mayoría de los surfactantes (por ejemplo, Triton, Tween) inhibían la actividad arilesterasa.

1.5. *Agentes tamponadores*

En el mismo estudio de Lorentz y col. (17) probaron distintos tampones para determinar la actividad arilesterasa, concluyendo que MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propilsulfónico), HEPES, Tris y trietilamina actúan como inhibidores, mientras que TES (ácido N-[tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetilsulfónico), BICINE (N,N-bis(2-hidroxiethyl)glicina) y borato no.

Sin embargo, en base a nuestros resultados en humanos y ratones (26, 27), el HEPES no parece demostrar un efecto tan inhibitorio,

ya que cuando usamos el tampón SBFc (tamponado con HEPES) obtenemos una pendiente muy superior a la obtenida al usar el tampón Tris/HCl. Además el Tris en ratones parece ejercer un papel activador.

1.6. *Alcoholes alifáticos*

Según Debord y col. (21), la inhibición de los alcoholes alifáticos es más potente cuanto mayor es el número de carbonos de la cadena alifática y a igualdad de carbonos cuanto menos polar sea la molécula. Concluyen, por tanto, que en esta inhibición deben intervenir aminoácidos poco polares de la arilesterasa y que se localizan en la zona central del enzima.

1.7. *Bicarbonato*

Nunca se había estudiado previamente el efecto del bicarbonato sobre la actividad arilesterasa. La concentración de ion bicarbonato se encuentra incrementada en los tampones SBFb y SBFp respecto de los demás tampones, con lo que parece actuar como un inhibidor tanto en humanos como en ratones. La razón de este efecto inhibitorio puede ser debido a la alta concentración de bicarbonato (27 mM) en contraste a la baja concentración de ión Ca^{2+} (2,5 mM) en los tampones SBFp y SBFb se favorece la formación del bicarbonato de calcio disminuyendo la concentración de Ca^{2+} en el medio que recordemos es un ión limitante para que la arilesterasa actúe (31).

1.8. *Albúmina*

Todos los ensayos que hemos realizado incorporando diferentes concentraciones de albúmina nos inhibieron de tal forma la arilesterasa que no obtuvimos actividad. Por tanto, podemos concluir que la albúmina es un potente inhibidor de la actividad arilesterasa.

Para explicar este efecto proponemos dos posibles hipótesis:

1. Que esta inhibición se deba a que el sustrato de la arilesterasa, el acetato de fenilo, se une a la albúmina, por lo que el enzima ya no podrá hidrolizarlo. Esta conclusión se ve reforzada por un estudio previo en el que se demostró que el acetato de fenilo en un tampón de pH = 7,6 y de fuerza iónica = 0,2 M se une a la albúmina (32). Sin embargo, la fuerza de unión no resultó ser demasiado alta, y desconocemos si sería suficientemente alta para competir con la PON1.
2. Que la inhibición se deba a la unión de la PON1 a la albúmina inhibiéndose la actividad arilesterasa. Para alcanzar esta hipótesis nos basamos en un estudio llevado a cabo por Ortigoza-Ferando y col. (33), en el que encontró dos bandas por electroforesis al purificar la PON1. Una banda que supuso era PON1 aislada que presentaba actividad arilesterasa, y otra banda en la que aparecía la PON1 unida a albúmina y no demostraba actividad arilesterasa. Por tanto, nosotros podemos asumir que puesto que actualmente se ha demostrado que existe una única PON1, las dos bandas encontradas se trataban del mismo enzima pero cuando se encuentra unido a la albúmina se inhibe su actividad arilesterasa, por interacciones albúmina-PON1.

2. Potenciadores de la actividad arilesterasa

2.1. Calcio

La PON1 es un enzima dependiente de Ca^{2+} . Se ha aceptado en el método de Eckerson y col. (12) que la concentración óptima es de 0,9 mM. En el estudio de Lorentz y col. (17) se llegó a la errónea conclusión de que el Ca^{2+} era potenciador de la arilesterasa hasta una concentración de 0,4 mM. Sin embargo, Nus y col., usando el SBF, concluyeron que con una concentración fisiológica de $\text{Ca}^{2+} = 2,5$ mM se obtienen mejores resultados (26, 27).

2.2. *Cloruro*

En muchos de los estudios se ha utilizado NaCl para estimular la actividad arilesterasa (5, 34), seguramente por aumentar la fuerza iónica del medio. Sólo existe un estudio (13) en el que se asegura que la adición de NaCl al medio inhibe la actividad arilesterasa. Nosotros hemos concluido que el ion Cl, más que la sal NaCl actúa como un potenciador en la actividad arilesterasa, ya que se obtienen mejores resultados al emplear SBF y SBFc (26, 27). Además este efecto potenciador es aún más potente en ratones, ya que incluso llega a revertir el efecto inhibitorio del bicarbonato en el SBFb.

2.3. *pH*

Se ha sugerido que el mejor pH al que trabaja la arilesterasa y en general todas las esterasas, es entre 7,5 y 8 (17); sin embargo, en nuestro estudio (26, 27) se obtuvieron valores más altos de actividad a un pH fisiológico (7,34-7,4).

2.4. *Fosfolípidos (FL)*

Para conocer el efecto de los FL sobre la actividad arilesterasa se han realizado estudios con el enzima purificada, unida a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y unida a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Se han ensayado distintos FL (35):

2.4.1. Fosfatidilcolinas: dependiendo del ácido graso que incorporan en la posición sn-2 tienen distintos efectos:

2.4.1.1. Si llevan ácidos grasos saturados (AGS), estimulan la actividad arilesterasa proporcionalmente a la longitud de cadena del ácido graso desde (C10-C16). A partir de AGS de cadena mayor de C16 se inhibe la actividad.

2.4.1.2. Si llevan AGP. Estimulan la actividad arilesterasa de forma más potente que cuando está unida a AGS.

- 2.4.1.3. Si llevan AGS de cadena corta (es decir, restos de AGS que han sido cortados), la estimulación de la actividad arilesterasa es más potente que en los otros dos casos.
- 2.4.2. Esfingomiolina. Estimula la actividad arilesterasa pero no la paraoxonasa.
- 2.4.3. Dimiristoilfosfatidilglicerol. Es un fosfolípido con carga negativa que parece estimular sólo la arilesterasa de forma dosis-dependiente e inhibir la paraoxonasa.
- 2.4.4. Fosfatidilinositol de la soja. También es un fosfolípido de carga negativa que estimula la arilesterasa e inhibe la paraoxonasa.

3. Sustratos de la actividad arilesterasa

3.1. Acetato de fenilo

Su producto es el fenol que absorbe a 270 nm. Es un sustrato artificial específico de este enzima que fue propuesto por Eckerson y col. (12). Hasta el momento es el que ha producido los mejores resultados.

3.2. Acetato de p-nitrofenilo

Su producto es el p-nitrofenol que absorbe a 410 nm. No es un sustrato muy específico, por lo que hay que añadir en el medio inhibidores de la acetilcolinesterasa que también hidrolizan este sustrato (36). Además la velocidad de hidrólisis es la mitad que cuando se utiliza el acetato de fenilo (37). Es más, la introducción de cualquier sustituyente en la posición produce una disminución muy importante de la actividad arilesterasa, ya que según parece es más importante para estabilizar el estado de transición del enzima la basicidad de Lewis del oxígeno del grupo carbonilo que el pKa (37).

3.3. *Acetato de tiofenilo*

Es el sustrato empleado en el estudio de Lorentz y col. (17), el cual presenta el problema de que da un producto no cromógeno, por lo que debe, posteriormente, acoplarse a una reacción con un complejo de hierro.

3.4. *Ésteres del α -naftol*

Su producto es el α -naftol que absorbe a 321 nm (18). El problema de este sustrato es que no es soluble en disoluciones acuosas, por lo que para hacer ensayos debe adicionarse un disolvente orgánico o un surfactante al medio que inhibe la actividad arilesterasa.

3.5. *Fosfatidilcolinas con estructura de isoprostano como el 1-palmitoil-2-linoleil-sn-glicero-3-fosfocolina y el 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina*

Son hidrolizados a lisofosfatidilcolina (35).

3.6. *Fosfatidilcolinas con grupos aldehído como 1-palmitoil-2-(9-oxo)nonanoil-sn-glicero-3-fosfocolina y la 1-palmitoil-2-(5-oxo)valeroil-sn-glicero-3-fosfocolina*

También son hidrolizados a lisofosfatidilcolina pero no rompe la unión de los ácidos grasos como haría una esterasa de serina (35).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a la Real Academia Nacional de Farmacia y a los Laboratorios Cinfa, la Concesión del Premio de Investigación 2007, que ha sabido valorar nuestro esfuerzo y nos ha permitido publicar en esta revista.

También queremos agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de dos Proyectos de Investigación de referen-

cias AGL2001-2398-C03-03 y AGL2005-07204-C02-01/ALI que han financiado toda la investigación. Así como a la Universidad Complutense de Madrid la concesión de la Beca Predoctoral a Meritxell Nus Chimeno.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HAREL, M.; AHARONI, A.; GAIDUKOV, L.; BRUMSHTEIN, B.; KHERSONSKY, O.; MEGED, R.; DVIR, H.; RAVELLI, R. B. G.; MCCARTHY, A.; TOKER, L. *et al.* (2004): Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 412-419.
- (2) HAREL, M.; AHARONI, A.; GAIDUKOV, L.; BRUMSHTEIN, B.; KHERSONSKY, O.; MEGED, R.; DVIR, H.; RAVELLI, R. B. G.; MCCARTHY, A.; TOKER, L. *et al.* (2004): Corrigendum. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 1253.
- (3) PROTEIN DATA BANK. <http://www.rcsb.org/pdb/navbarsearch.do?newSearch=yes&isAuthorSearch=no&radioset=All&inputQuickSearch=1v04>
- (4) RENAULT, F.; CHABRIERE, E.; ANDRIEU, J. P.; DUBLET, B.; MASSON, P. and ROCHU, D. (2006): Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *J. Chromatog. B.* 836: 15-21.
- (5) AZARSIZ, E.; KAYIKCIOGLU, M.; PAYZIN, S. and YILDIRIM SOZMEN, E. (2003): PON1 Activities and oxidative markers of LDL in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.* 91: 43-51.
- (6) WHEELER, J. G.; KEAVNEY, B. D.; WATKINS, H.; COLLINS, R. and DANESH, J. (2004): Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43. *Lancet.* 363: 689.
- (7) MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; McELDUFF, P. *et al.* (2003): Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective. *Circulation.* 107: 2775-2779.
- (8) TOMÁS, M.; SENTÍ, M.; GARCÍA-FARIA, F.; VILA, J.; TORRENTS, A.; COVAS, M. and MARRUGAT, J. (2000): Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 2113-2119.
- (9) INOUE, M.; SUEHIRO, T.; NAKAMURA, T.; IKEDA, Y.; KUMON, Y. and HASHIMOTO, K. (2000): Serum arylesterase/diazoxonase activity and genetic polymorphisms in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 49: 1400-1405.
- (10) ABBOTT, C. A.; MACKNESS, M. I.; KUMAR, S. *et al.* (1995): Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15: 1812-1818.
- (11) SUTHERLAND, W. H. F.; MANNING, P. J.; DE JONG, S. A.; ALLUM, A. R.; JONES, S. D. and WILLIAMS, S. M. (2001): Hormone-replacement therapy increases serum

- paraoxonase/arylesterase activity in diabetic postmenopausal women. *Metabolism*. 50: 319-324.
- (12) ECKERSON, H. W.; ROMSON, J.; WYTE, C. and LA DU, B. N. (1983): The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am. J. Human Genet.* 35: 214-227.
 - (13) BELTOWSKY, J.; GRAZYNA, W. and MARCINIAK, A. (2002): Species and substrate-specific stimulation of human plasma paraoxonase 1 (PON1) activity by high chloride concentration. *Acta Biochim. Pol.* 49: 927-936.
 - (14) REINER, E.; SVEDRUZIC, D.; SIMEON-RUDOLF, V.; LIPOVAC, V.; GAVELLA, M. and MRZLJAK, V. (1999): Paraoxonase end arylesterase activities in the serum of two hyperlipoproteinaemic patients alter repeated extracorporeal lipid precipitation. *Chem-Biol. Interac.* 120: 405-411.
 - (15) LIAO, F.; LIU, W. L.; ZHOU, Q. X.; ZENG, Z. C. and ZUO, Y. P. (2001): Assay of serum arylesterase activity by fitting to the reaction curve with an integrated rate equation. *Clin. Chim. Acta.* 314: 67-76.
 - (16) BUTTE, W. and KEMPER, K. (1999): A spectrophotometric assay for pyrethroid-cleaving enzymes in human serum. *Toxicol. Lett.* 107: 49-53.
 - (17) LORENTZ, K.; WIRTZ, W. and WEIß, T. (2001): Continuous monitoring arylesterase in human serum. *Clin. Chim. Acta.* 308: 69-78.
 - (18) BUTTE, W. and KEMPER, K. (1999): A spectrophotometric assay for pyrethroid-cleaving enzymes in human serum. *Toxicol. Lett.* 107: 49-53.
 - (19) DEBORD, J.; BOLLINGER, J. C.; MERLE, L. and DANTOINE, T. (2003): Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides. *J. Inorg. Chem.* 94: 1-4.
 - (20) DEBORD, J.; BOLLINGER, J. C.; ABRAHAM, M. H.; MERLE, L. and DANTOINE, T. (2002): Inhibition of arylesterase by organic solvents: Structure-activity relationships. *Internet J. Chem.* 5: 4.
 - (21) DEBORD, J.; DANTOINE, T.; BOLLINGER, J. C.; ABRAHAM, M. H.; VERNEUIL, B. and MERLE, L. (1998): Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols. *Chem-Biol. Interact.* 113: 105-115.
 - (22) DEBORD, J.; HAREL, M.; BOLLINGER, J. C.; VERNEUIL, B.; MERLE, L. and DANTOINE, T. (2005): Flow microcalorimetric study of enzyme reactions. Application to arylesterase from human serum. *Thermochimica Acta.* 427: 85-91.
 - (23) KOKUBO, T.; KUSHITANI, H. and SAKKA, S. (1990): Solutions able to reproduce in vivosurface structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mat. Res.* 24: 721-734.
 - (24) TAKADAMA, A.; HASHIMOTO, H.; MIZUNO, M.; ISHIKAWA, K. and KOKUBO, T. (2004): Newly improved simulated body fluid. *Key Engin. Mat.* 255: 115-118.
 - (25) OYANE, A.; ONUMA, K.; ITO, A.; KIM, H. M.; KOKUBO, T. and NAKAMURA, T. (2003): Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *J. Biomed. Mat. Res.* 64: 339-348.
 - (26) NUS, M.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. and SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. (2006): A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using Simulated Body Fluid. *Atherosclerosis*. 188: 155-159.
 - (27) NUS, M.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. and SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. (2006): Determinación de la actividad arylesterasa en ratones utilizando un mimético de suero. *BioSpain, BIOTEC 2006*. Madrid (Comunicación oral).

- (28) ERDOS, E. G.; DEBAY, C. R. and WESTERMAN, M. P. (1960): Arylesterase in blood: effect of calcium and inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 5: 173-186.
- (29) AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BILLECKE, S.; EROGUL, J.; SORENSON, R.; BISGAIER, C. L.; NEWTON, R. S. and LA DU, B. (1999): Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 892-904.
- (30) MACKNESS, M. I. (1998): Why plasma should not be used to study paraoxonase. *Atherosclerosis.* 136: 195-196.
- (31) MACKNESS, B.; HINE, D.; LIU, Y.; MASTORIKOU, M. and MACKNESS, M. (2004): Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 680-683.
- (32) TERESI, J. D. and LUCK, J. M. (1948): The combination of organic anions with serum albumin. *J. Biol. Chem.* 6: 653-661.
- (33) ORTIGOZA-FERADO, J.; RICHTER, R. J.; HORNUNG, S. K.; MOTULSKY, A. G. and FURLONG, C. E. (1984): Paraoxon hydrolysis in human serum mediated by a genetically variable arylesterase and albumin. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 295-305.
- (34) FERRÉ, N.; CAMPS, J.; PRATS, E.; VILELLA, E.; PAUL, A.; FIGUERA, L. and JOVEN, J. (2002): Serum paraoxonase activity: a neww additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48: 261-268.
- (35) NGUYEN, S. D. and SOK, D. E. (2006): Preferable stimulation of PON1 arylesterase activity by phosphatidylcholines with unsaturated acyl chains or oxidized acyl chains at sn-2 position. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758: 499-508.
- (36) GAN, K. N.; ECKERSON, H. W. and LA DU, B. N. (1991): *Drug Metab. Dispos.* 19: 100.
- (37) BARGOTA, R. S.; AKHTAR, M.; BIGGADIKE, K.; GANI, D. and ALLEMANN, R. K. (2003): Structure-Activity relationship on human serum paraoxonase (PON 1) using substrate analogues and inhibitors. *Bioinorg. Med. Chem. Lett.* 13: 1623-1626.
- (38) AVIRAM, M.; ROSENBLAT, M.; BILLECKE, S.; EROGUL, J.; SORENSON, R.; BISGAIER, C. L.; NEWTON, R. S. and LA DU, B. (1999): Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 892-904.

————— *Artículo original* —————

Una aproximación farmacológica al tratamiento de la acondroplasia

Recibido el 27 de marzo de 2008

ANA I. GUZMÁN-ARÁNGUEZ, MARTA IRAZU, TERESA PELÁEZ,
ALMUDENA CROOKE, JESÚS SÁNCHEZ-NOGUEIRO y
JESÚS PINTOR *

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV,
Universidad Complutense de Madrid*

RESUMEN

La acondroplasia es una patología caracterizada por una mutación en el receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 3 (FGFR3). Esta alteración causa la patología que conocemos habitualmente con el nombre de enanismo congénito y que se manifiesta con individuos de talla baja con diversos problemas músculo-esqueléticos. La aplicación de nucleótidos y dinucleótidos ha permitido observar que las células acondroplásicas pueden fenomenológicamente comportarse como células normales, en especial cuando son tratadas con el dinucleótido Ap_4A . Este compuesto reestablece los niveles de calcio en los condrocitos acondroplásicos, permitiendo que se comporten como células absolutamente normales en lo que respecta a este ion. Por otro lado, también este dinucleótido permite que el receptor de FGFR3, que no se internaliza y degrada con normalidad, pueda pasar a ser degradado por las vías proteosomales y lisosomales, como sucede en las células normales, haciendo que el receptor motivo de la patología desaparezca de

* **Dirección de contacto:**

Doctor Jesús Pintor.

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV. E. U. Óptica. Universidad Complutense de Madrid. C/ Arcos de Jalón, s/n. 28037 Madrid. Telf.: +34-91-3946859. Fax: +34-91-3946885.

e-mail: jpintor@vet.ucm.es

Página web Fundación Magar Acondroplasia: www.acondroplasia.com

las membranas de los condrocitos acondroplásicos. Por último, hemos podido comprobar cómo el derivado del piridoxalfosfato, el PPADS, presenta propiedades extraordinarias al reducir prácticamente a cero los niveles de fosforilación de las proteínas ERK, que son anormalmente elevadas por el receptor FGFR3 acondroplásico y que originan la patología. En resumen, se plantean una serie de nuevas estrategias encaminadas al tratamiento de la acondroplasia por medio de estrategias de tipo farmacológico en claro contraste con las estrategias actuales de tipo quirúrgico.

Palabras clave: Acondroplasia.— Ap_4A .—Diadenosina polifosfatos.—Enanismo congénito.—Nucleótidos.—Receptores purinérgicos.

SUMMARY

A pharmacological approach to achondroplasia treatment

Achondroplasia is a pathology due to a mutation in the receptor for the fibroblast growth factor type 3 (FGFR3). This alteration produces problems in individuals' stature as well as other muscle-skeletal problems. The application of nucleotides and dinucleotides permit achondroplastic cells (chondrocytes) to recover, apparently, from this pathology. In particular, the application of the dinucleotide Ap_4A , permits to restore the correct calcium levels in achondroplastic cell. Moreover, this dinucleotide permits the right degradation of the FGFR3 receptor, which does not downregulate properly in achondroplastic chondrocytes, by facilitating the proteosomal and lysosomal pathways alter the dinucleotide application. Also we have discovered that the pyridoxal phosphate derivative PPADS can dramatically reduce the activation of ERK cascade which is abnormally elevated by the achondroplastic FGFR3 receptor raising the pathology. In summary, we wish to introduce a series of new pharmacological strategies for the treatment of achondroplasia in clear contrast with the current surgery ones.

Keywords: Achondroplasia.— Ap_4A .—Congenital dwarfism.—Nucleotides.—Purinergic receptors.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de los huesos largos depende de la proliferación y maduración de las células que constituyen el cartílago, los condrocitos. Estas células van a ser reemplazadas de modo gradual por el tejido óseo durante el crecimiento del individuo. Los condrocitos, en su proceso de maduración, pasan por una primera etapa en la que

se hipertrofian para posteriormente morir en un proceso de tipo apoptótico (1, 2).

El crecimiento y desarrollo de los condrocitos en los cartílagos que flanquean los huesos está controlado por los factores de crecimiento de fibroblastos. Estos factores activan cuatro tipos diferentes de receptores denominados FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4, estando los tres primeros implicados en enfermedades congénitas esqueléticas y craneales. Dentro de estas alteraciones destaca **la acondroplasia**, la forma más común de **enanismo congénito** (Figura 1). Esta patología se caracteriza por una talla baja desproporcionada y otras anormalidades del esqueleto entre las que se incluyen el acortamiento rizomélico de los huesos largos, macrocefalia, abombamiento frontal y parietal, hipoplasia de la facies media, lordosis lumbar, mano en tridente y disminución caudal de la distancia interpedicular en la región lumbar (3).



FIGURA 1. *El enanismo congénito o acondroplasia y las características óseas que lo identifican.*

El receptor alterado en la acondroplasia es el FGFR3, cuyo gen se localiza en el extremo distal del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Estudios realizados en distintas poblaciones han establecido la existencia de una mutación frecuente (Gly380Arg) en el dominio transmembrana del receptor (4, 5).

Junto con esta modificación, observada en el 97% de los casos (Figura 2), también se han identificado otras mutaciones menos frecuentes como el cambio de una Gly 375 por Cys fuera de la región transmembrana (6, 7), la sustitución de la Gly 346 por Glu (8), así como el reemplazamiento de la Lys 650 por Met en el caso de la forma más severa de acondroplasia (9).

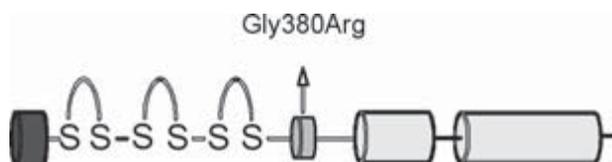


FIGURA 2. *Monómero del receptor FGFR3.*

Ratones knock-out para el gen del receptor FGFR3 presentan un aumento del crecimiento endocondrial, expansión de la placa de crecimiento ósea y aumento de la proliferación de condrocitos, lo que ha permitido sugerir el papel del receptor FGFR3 como regulador negativo del crecimiento del hueso (10), si bien las rutas a través de las cuales influye en los procesos de proliferación y diferenciación de los condrocitos no han sido totalmente esclarecidas.

Como miembro de la familia de receptores con actividad tirosina quinasa, este receptor se activa en presencia del FGF y de proteoglicanos del grupo heparán sulfato, para producir la dimerización del receptor y la posterior autofosforilación de los residuos de tirosina. Estos residuos fosforilados de tirosina sirven como sitios de unión de proteínas y efectores que propagan las señales de FGFR3 (11, 12). Los desórdenes en el crecimiento del hueso son resultado del aumento de la transmisión de señales por parte del receptor mutado como consecuencia de la activación sostenida del mismo. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar cómo se produce esta activación continuada de FGFR3. Por ejemplo, en el caso de la mutación G380R, la más típica de la acondroplasia y que afecta a la región transmembrana, se origina una estabilización del dímero, prerequisite para la activación del receptor y que le conduce a activarse incluso en ausencia del agonista (13, 14). Las mutaciones que provocan la introducción de residuos de cisteína libres en el dominio

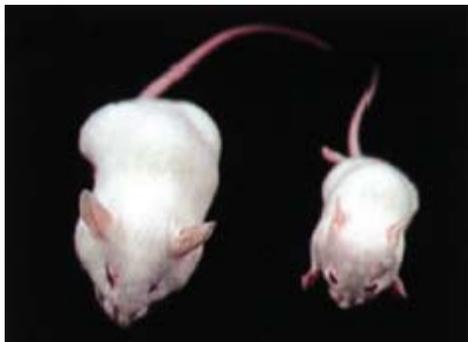
extracelular del receptor originan la formación de puentes disulfuro, lo que igualmente ocasiona la presencia continua de la forma dimérica del receptor (15). Otras mutaciones como la K650M se piensa que alteran la conformación del receptor y llevan a la activación constitutiva de la actividad tirosina quinasa (12, 16). Adicionalmente se ha sugerido que el receptor FGFR3 mutado presenta una menor degradación lisosomal permitiendo su desvío a la ruta de reciclaje y prolongando de esta forma su supervivencia y consiguientemente su capacidad continua de enviar señales (17).

Independientemente de cómo se origine la activación sostenida del receptor, una vez que ésta se produce se altera el equilibrio normal entre los procesos de proliferación y maduración inhibiéndose el correcto crecimiento de la placa ósea.

Gran parte de los estudios que se han realizado hasta el momento están dirigidos a determinar las vías de señalización celular empleadas por el receptor FGFR3 activado para mediar sus efectos sobre la proliferación y diferenciación de condrocitos. Así, distintas investigaciones han identificado a la ruta de señalización de STAT1 como la vía a través de la cual el receptor FGFR3 inhibe la proliferación de los condrocitos (18). La activación de STAT1 provoca el aumento de expresión del inhibidor de ciclo celular p21, bloqueándose de esta forma el crecimiento celular.

Con respecto a la influencia del receptor FGFR3 en la diferenciación de condrocitos existe aún una cierta controversia. Mientras algunos autores sostienen que la activación de FGFR3 acelera el proceso de diferenciación promoviendo el incremento de condrocitos hipertróficos (19, 20), otros plantean que la activación del receptor inhibe la diferenciación de condrocitos a través de la ruta de señalización celular de las MAP kinasas (21). Además, también mediante esta cascada de señalización celular de las MAP kinasas, la activación constitutiva de FGFR3 provoca una menor síntesis de matriz extracelular, hecho que también influiría en la inhibición del crecimiento óseo (22).

Para abordar todos estos estudios están siendo empleados diversos sistemas modelo. Así, se ha diseñado un ratón modificado genéticamente al que se le ha incorporado el gen mutado del receptor FGFR3 (23, 24) (Figura 3).

FIGURA 3. *Ratón normal y acondroplásico.*

Este ratón presenta alteraciones características de la acondroplasia como pequeño tamaño, área cráneo facial reducida, hipoplasia facial, distorsión craneal, cifosis y placas de crecimiento óseo de los huesos largos muy reducidas. Junto con este modelo animal también se utilizan cultivos primarios de condrocitos o células como las de condrosarcoma de rata (RCS), que presentan marcadores característicos de condrocitos (25). Adicionalmente se emplean condrocitos de rata (RCJ) transfectados de manera estable tanto con el receptor FGFR3 humano intacto como con la forma mutada G380R (Figura 2) (26).

Los nucleótidos y dinucleótidos son moléculas biológicamente activas capaces de modificar la actividad de numerosos tejidos (27, 28). Tanto los mononucleótidos, como el ATP, como los dinucleótidos ejercen sus acciones a través de una familia de receptores denominados receptores purinérgicos P2 (Figura 4). Aunque el ATP es por todos bien conocido, no lo son tanto los dinucleósidos polifosfatos. Estas moléculas son dinucleótidos formados por dos nucleósidos (corrientemente adenosinas o uridinas) unidos entre sí por un número variable de fosfatos (N_pnN, donde n es el número de fosfatos). Los dinucleósidos polifosfatos más habituales son los formados por adenina, como base nitrogenada, conformando una familia de compuestos denominada *diadenosín polifosfato* o Ap_nA, donde la longitud de los fosfatos oscila entre 2 y 7 (29).

La actividad de estos dinucleótidos se lleva a cabo tanto a través de receptores de naturaleza ionotrópica, denominados P2X, como a

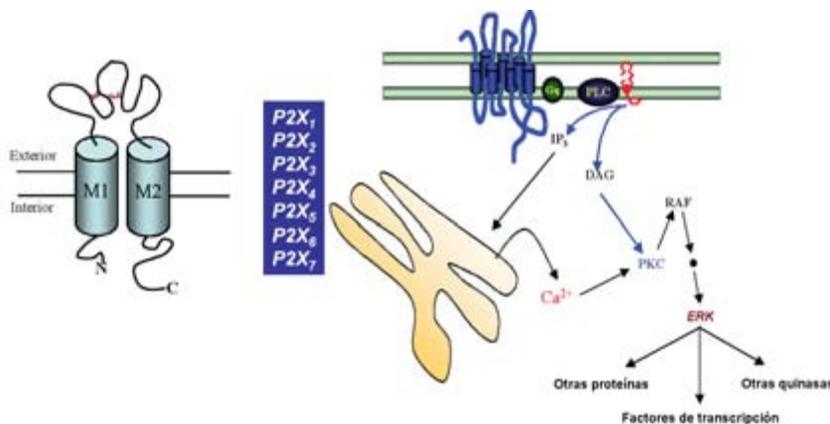


FIGURA 4. *Receptores purinérgicos P2X (izquierda) y P2Y (derecha).*

través de receptores metabotrópicos del tipo P2Y (27). Los receptores del tipo P2Y, más importantes en este estudio, tienen la estructura clásica de siete dominios transmembrana, estando acoplados a fosfolipasa C (PLC) y a la consiguiente producción de diacil glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Existen hasta ocho tipos diferentes de receptores P2Y, entre los cuales algunos como el P2Y₁₂ está también acoplado negativamente a la adenilato ciclasa. En otros casos como en el del P2Y₁ y P2Y₂ se ha podido constatar su capacidad de activar la guanilato ciclasa con la consiguiente producción del GMPc (30). Otra propiedad de los receptores P2Y es estar en la mayoría de los casos acoplado igualmente a la cascada de las MAP kinasas.

Es precisamente la habilidad que presentan algunos nucleótidos de intervenir en la cascada de las MAP kinasas y de activar la guanilato ciclasa lo que puede hacer atractivas a estas moléculas para el tratamiento de la acondroplasia. Por un lado, porque todo lo que sea disminuir la actividad de las MAPK va a redundar en una diferenciación celular de los condrocitos y una calidad de la matriz extracelular adecuada para permitir un crecimiento normal de hueso. Por otra parte, la posibilidad de que los nucleótidos y dinucleótidos puedan activar receptores acoplados a la guanilato ciclasa puede ayudar en el mismo sentido, ya que las elevaciones en los niveles citoplasmáticos de GMPc se sabe disminuye el nivel de fosforilación de p24 y p44 (ERK 1/2). Por este motivo, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Determinación de la presencia de receptores purinérgicos P2Y en condrocitos acondroplásicos.
2. Verificación de la actividad de dichos receptores en términos de movilización de Ca^{2+} .
3. Comprobar el efecto de los nucleótidos y dinucleótidos sobre la cascada de las MAPK activada por el receptor FGFR3 acondroplásico.
4. Estudiar el efecto de los nucleótidos y dinucleótidos sobre la degradación del receptor FGFR3 acondroplásico.
5. Verificar el comportamiento de los derivados del piridoxal fosfato (PPADS y PPNSD).

MÉTODOS

Lás células: características y mantenimiento

Disponemos de células en cultivo primario obtenidas de ratones normales y acondroplásicos mantenidas en DMEM con 10% de SBF y 1% de Penicilina-Estreptomicina, y de una línea celular denominada RCJ, inmortalizadas y transfectadas con el receptor FGFR3 (a las que llamamos FGFR3), con FGFR3 mutado (a las que llamamos ACH) y sin transfectar. Estas células son mantenidas en α -MEM con 15% FBS, 1% Penicilina-Estreptomicina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Tetraciclina, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Geneticina y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Higromicina. El medio de cultivo con el que se realizan los pases de las células consta de los mismos componentes que el de mantenimiento a excepción de la higromicina, que añadiremos 24 horas después de realizar el pase.

Si incubamos estas células con un medio de cultivo sin tetraciclina, permitiremos que el receptor FGFR3 se exprese, y tras incubarlo con diferentes concentraciones de FGF9 podremos obtener qué concentración de este factor de crecimiento es la óptima para que se active el receptor FGFR3.

Inmunocitoquímica

Los condrocitos se adhieren a coverslips para posteriormente ser fijados con paraformaldehído al 4% y ser tratados con la solución de bloqueo durante una hora (para evitar la unión inespecífica). Tras realizar dos lavados con PBS-BSA, se incuba con el anticuerpo primario (dilución 1:1000) del receptor purinérgico correspondiente o el del FGFR3. Se lava tres veces diez minutos para pasar a poner el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína o rodamina durante una hora. Se lava a continuación tres veces (10 min.) de nuevo con PBS-BSA. El montaje se realiza añadiendo 5 mL de medio de montaje sobre el porta y esperando a su secado. Las muestras se visualizan en el microscopio confocal Zeiss (Axiovert 200) con un módulo confocal Pascal.

Estudios de la movilización del calcio citosólico

Las medidas de calcio intracelular se realizan fijando las células a cubreobjetos con poli-L-Lys durante una hora a 37° C seguidas de una incubación con 5 μ M FURA2-AM o FLUO3-AM durante un tiempo que oscila entre 30 y 45 minutos. Después de ese tiempo las células lavadas y los cubreobjetos son montados en una cámara de perfusión para ser estimuladas por los diferentes mono y dinucleótidos. La fluorescencia fue observada por medio de un microscopio confocal Zeiss LSM Pascal o bien por uno Nikon conectado a una cámara CCD. La transformación de la fluorescencia en concentraciones intracelulares de calcio se realizó empleando la ecuación de Grynkiewicz (31).

Western blot

Las células se lisan y centrifugan a 13.000xg, 10 minutos, a 4° C, 5 μ g de proteína se mezclan con tampón de electroforesis y se desnaturaliza 5 minutos a 100° C para ser corridos en un gel de poliacrilamida al 10% (v/p) y SDS durante 100 minutos. Tras la electroforesis, los geles se equilibran durante 30 minutos en tampón de transferencia y se transfieren durante dos horas a una membrana de PVDF. La

membrana se incuba durante una hora con tampón PBS, para ser incubado a continuación con el anticuerpo primario (FGFR3) a una dilución 1:1000 durante 18 horas a 4° C. Tras el lavado, se incuba con el anticuerpo secundario ligado a la peroxidasa (anti IgG HRP de ratón a dilución 1:1000), durante una hora. Tras el lavado, en condiciones idénticas a las del primer anticuerpo, el revelado de la membrana se realiza utilizando el kit comercial de ECL (Enhanced ChemiLuminescence; Amersham) basado en la emisión de luz por la oxidación de luminol (una diacilhidrazida cíclica) en presencia de H₂O₂ catalizada por la peroxidasa conjugada al segundo anticuerpo. La exposición de una película fotográfica (Hyperfilm-ECL; Amersham) a la membrana permite la detección de las bandas proteicas reconocidas por el anticuerpo tras el revelado de la película (líquidos de revelado de AGFA).

Estudio de la cascada de las MAP kinasas (isoformas ERK1 y ERK2)

Para el estudio de la cascada de las MAP kinasas se partirá de células, bien sean condrocitos normales, acondroplásicos o células inmortalizadas y transfectadas con el receptor FGFR3 normal y mutado (acondroplásico). Se hará especial énfasis en la detección de las proteínas ERK1 y ERK2 por medio de un anticuerpo comercial frente al residuo Tyr204, presente en las dos isoformas. Las células serán sembradas en pocillos a razón de un millón de células por pocillo, para ser lavadas con pervanadato y así inhibir la actividad tirosina fosfatasa.

Las células tratadas serán lisadas y centrifugadas a 13.000xg, 10 minutos, a 4° C. 5 µg de proteína se mezclan con tampón de electroforesis y se desnaturaliza 5 minutos a 100° C, para ser corridos en un gel de poliacrilamida al 10% (v/p) y SDS durante 100 minutos. Tras la electroforesis, los geles se equilibran durante 30 minutos en tampón de transferencia y se transfieren durante dos horas a una membrana de PVDF. La membrana se incuba durante una hora con tampón TBS, para ser incubado a continuación con el anticuerpo primario (ERK1) a una dilución 1:1000 durante 18 horas a 4° C. Tras el lavado, se incuba con el anticuerpo secundario ligado a la peroxidasa (anti IgG HRP de ratón a dilución 1:1000), durante una hora.

Tras el lavado, se revelará la membrana con el Super Signal Substrate Western Blotting según fabricante.

Estudios sobre la matriz extracelular

Para el estudio de los cambios de la matriz extracelular se empleará el método del *alcian blue*, que permite medir la producción de matriz extracelular al registrarse un aumento en la absorbancia a 605 nm como consecuencia de la producción de dicha matriz. El protocolo seguido es el descrito por la casa comercial (Sigma-Aldrich).

Los estudios detallados de los niveles de producción de los colágenos II y X se llevaron a cabo realizando los correspondientes wester blots, como se ha descrito previamente, empleando los anticuerpos comerciales de las casas Calbiochem y Santa Cruz, a diluciones 1:500 y 1:100, respectivamente.

RESULTADOS

Identificación de los receptores P2Y presentes en los condrocitos

Por medio de las técnicas de inmunocitoquímica ha sido posible identificar los receptores presentes en los condrocitos normales y acondroplásicos. De todos los anticuerpos ensayados las células se marcaron positivamente frente a los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆ y P2Y₁₁ (Figura 5). No fue posible observar marcaje frente a otros receptores P2Y ni en las células acondroplásicas ni en las normales.

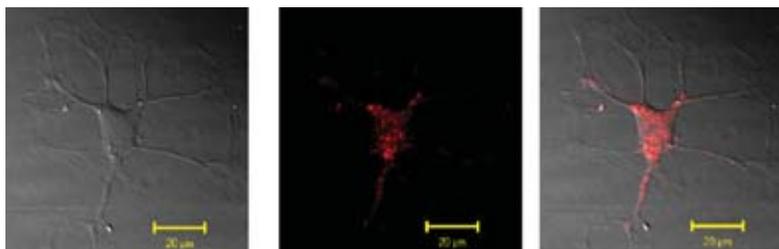


FIGURA 5. *Presencia de los receptores P2Y₂ en los condrocitos acondroplásicos.*

Un análisis realizado por la técnica de inmunotransferencia (western-blot) confirmó la presencia de los mencionados receptores en ambas poblaciones de condrocitos (resultados no mostrados).

Tanto la inmunocitoquímica como la inmunotransferencia pusieron de manifiesto la existencia de los receptores P2Y, sin embargo fue necesario dar un paso más, profundizando en la funcionalidad de los receptores, midiendo su actividad por medio de la sonda fluorescente FURA-2.

Medidas de calcio en los condrocitos acondroplásicos

Con la idea de probar la funcionalidad de los receptores P2Y presentes en los condrocitos normales y acondroplásicos y dado que estos receptores están acoplados a la movilización del calcio citosólico de los reservorios intracelulares, estas células fueron cargadas con FURA-2AM y los niveles de calcio fueron analizados tras la estimulación con diversos mono y dinucleótidos.

La superfusión de mononucleótidos como el ATP, ADP, UTP y ADP sobre los condrocitos mostraron diferentes niveles de movilización del $[Ca^{2+}]_i$ en las células en estudio (Figura 6).

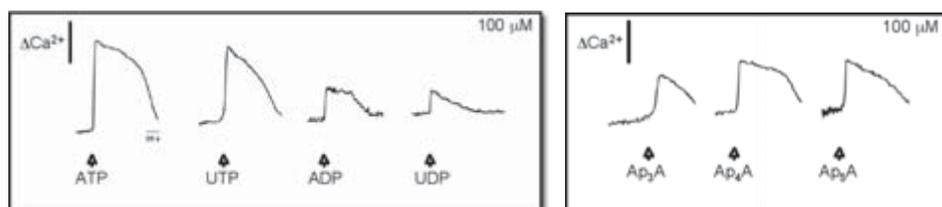


FIGURA 6. *Respuesta en los niveles de calcio intracelular de los condrocitos a los diferentes mono y dinucleótidos.*

También los diadenosina polifosfatos fueron capaces de inducir cambios en el calcio, siendo el Ap₄A y el Ap₅A los que indujeron mayores movilizaciones del calcio en los condrocitos.

Tanto las movilizaciones de los mononucleótidos como la de los dinucleótidos fueron independientes del calcio extracelular, confir-

mando que se trataba de receptores P2Y. Cuando el ATP, UTP y el Ap₄A fueron ensayados a varias concentraciones fue posible establecer las correspondientes curvas de concentración respuesta (Figura 7).

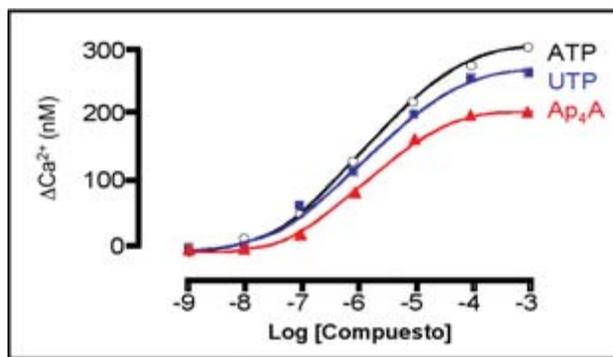


FIGURA 7. *Curvas concentración respuesta para los nucleótidos ATP, UTP y Ap₄A.*

De estas curvas se pudo deducir valores de EC₅₀ que fueron 1,58 μM para el ATP, 2,51 μM para el UTP y 1,25 μM para el Ap₄A. El nucleótido que mostró mayores niveles de movilización fue el ATP, con un valor máximo de 312 nM, seguido por el UTP con 274 nM y el Ap₄A con 197 nM.

Los estudios realizados con los antagonistas para los receptores P2 (100 μM) mostraron diferencias cuando antagonizaban al ATP que cuando lo hacían con el Ap₄A (ambos a 100 μM). Aunque la suramina (antagonista general P2) y el MRS2179 (selectivo P2Y₁) presentaron el mismo rango de antagonismo y el reactivo azul 2 (RB-2, no selectivo P2) no hizo apenas nada, el derivado del pirodoxal PPADS (no selectivo P2) funcionó de modo diferente en el caso del ATP que en el del Ap₄A. El PPADS abolió el 30% de la respuesta inducida por el ATP, mientras que prácticamente abolió el 100% de la movilización de calcio inducida por el Ap₄A. Este hecho sugiere que tal vez las acciones del ATP y del Ap₄A, aunque semejantes en cuanto a que movilizan el calcio, podrían ocurrir a través de receptores diferentes.

Los condrocitos acondroplásicos y la cascada de las MAP kinasas

Por medio de una línea celular de condrocitos transfectada con el receptor FGFR3 acondroplásico y el normal, regulados ambos por un sistema del tipo TET-OFF (se expresan los receptores FGFR3 en ausencia del antibiótico tetraciclina), ha sido posible estudiar la relación que existe entre los receptores P2Y y los receptores del FGF.

Los niveles de expresión del receptor FGFR3 en ausencia de la tetraciclina son grandes en comparación con los mismos en presencia del antibiótico, por lo que todos los experimentos se realizaron a continuación en ausencia de la tetraciclina.

Este control no sólo se manifestaba en los niveles del receptor, sino que también se podía valorar a nivel de la fosforilación de las proteínas ERK1/2 (p42 y p44), ya que al ser estimulado el receptor FGFR3 (normal y acondroplásico) con el sustrato FGF9, mostraban un fuerte aumento en los niveles de fosforilación de las ERK (Figura 8).

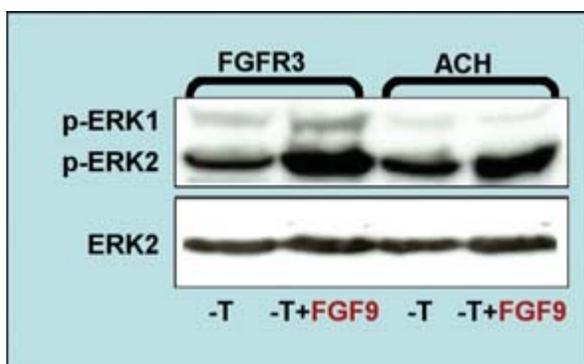


FIGURA 8. *Comportamiento de las células a la tetraciclina en relación con las proteínas ERK.*

Uno de los primeros aspectos a abordar fue probar cuál era el papel de los nucleótidos sobre la cascada de las MAP kinasas (ERK1/2), ya que antes de comprobar si la aplicación de estas sustancias pueden bajar el nivel de fosforilación de las ERK tras la estimulación del receptor FGFR3 (que sería esencial para rescatar a las células de la acondroplasia), hay que conocer qué hacen estas moléculas por sí solas.

Todos los mononucleótidos naturales estimularon la fosforilación de las ERK entre un 40 y un 50%, sin embargo, los diadenosina polifosfato apenas modificaron los valores control de fosforilación (Figura 9).

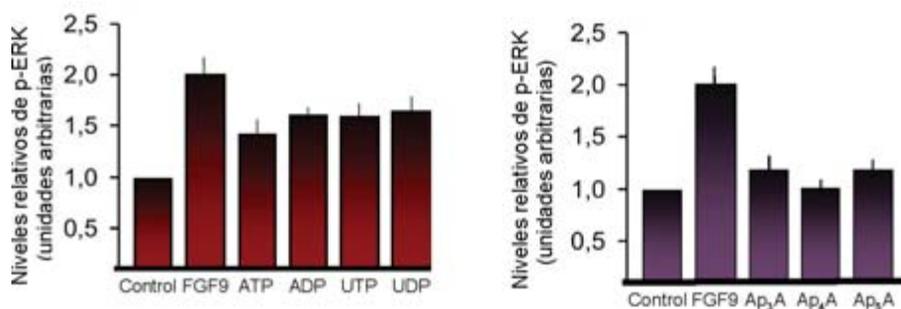


FIGURA 9. *Efecto de los mononucleótidos (izquierda) y dinucleótidos (derecha) sobre el nivel de fosforilación de las ERK.*

Cuando se ensayaron los agonistas de los receptores P2Y, 2-me-S-ADP y ATP- γ -S, entre otros, se pudo comprobar cómo la mayoría de éstos eran capaces de aumentar el grado de fosforilación de ERK1/2.

Sin embargo, si queremos comprobar si alguno de los nucleótidos es capaz de ayudar en el tratamiento de la acondroplasia, deberíamos ensayar el nucleótido en presencia del agonista del receptor FGFR3 acondroplásico, pues de esa manera mimetizaremos el entorno real de los condrocitos acondroplásicos en la placa de crecimiento ósea.

Efecto de los nucleótidos y dinucleótidos en condrocitos estimulados con FGF9

El rescate de los condrocitos de su estado acondroplásico se logrará cuando se pueda reducir el grado de fosforilación de ERK1/2 por la administración de nucleótidos o dinucleótidos. Por ello se ensayaron estas sustancias en presencia de FGF9 que de antemano incrementa la fosforilación de las ERK, tal y como sucede en la patología. La aplicación de mononucleótidos y FGF9 no hizo sino incrementar los niveles de fosforilación por encima incluso del valor producido por FGF9 (Figura 10). Cuando se repitió este protocolo con los diadenosi-

na polifosfato, fue posible observar cómo Ap_3A y Ap_5A no incrementaron la respuesta inducida por FGF9, sin embargo Ap_4A fue capaz de reducir la fosforilación inducida por FGF9 hasta los niveles del control (Figura 10).

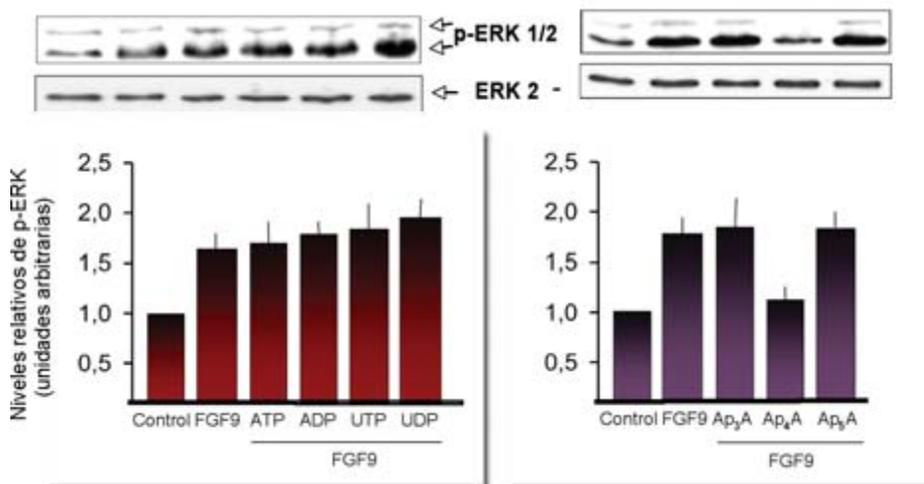


FIGURA 10. *Efecto de los mononucleótidos (izquierda) y dinucleótidos (derecha) sobre la fosforilación de ERK estimulada por FGF9.*

Cuando se ensayaron los agonistas sintéticos de los receptores P2Y, ninguno de ellos fue capaz de reducir el grado de fosforilación de las ERK, obteniéndose incluso el efecto contrario, es decir, más fosforilación.

Dado el sorprendente resultado obtenido en el caso del Ap_4A , se trató de profundizar un poco más para saber qué receptor era el responsable de la disminución de la fosforilación de las ERK. Para ello se ensayaron los antagonistas, que ya se habían valorado en el caso del calcio. La aplicación de estos compuestos a la concentración $100 \mu M$ modificaron la respuesta del Ap_4A de manera variable (Figura 11).

Uno de los detalles más sorprendentes fue observar cómo el antagonista PPADS no sólo antagonizó el efecto del Ap_4A , sino que fue capaz de reducir los niveles de fosforilación hasta valores muy inferiores al control. Este hecho nos animó a probar el efecto del PPADS con el FGF9 a diversas concentraciones y en ausencia de cualquier nucleótido o dinucleótido.

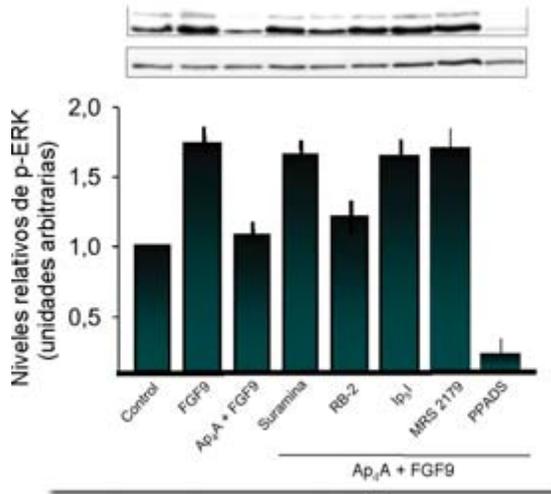


FIGURA 11. Efecto de los antagonistas sobre el efecto del Ap₄A y FGF9.

Sorprendentemente, el antagonista PPADS, a concentraciones en el rango micromolar, fue capaz de reducir el nivel de fosforilación de ERK 1/2 inducido por el FGF9, muy por debajo de nivel del control (Figura 12). Este hecho, inesperado pero muy interesante, abre la po-

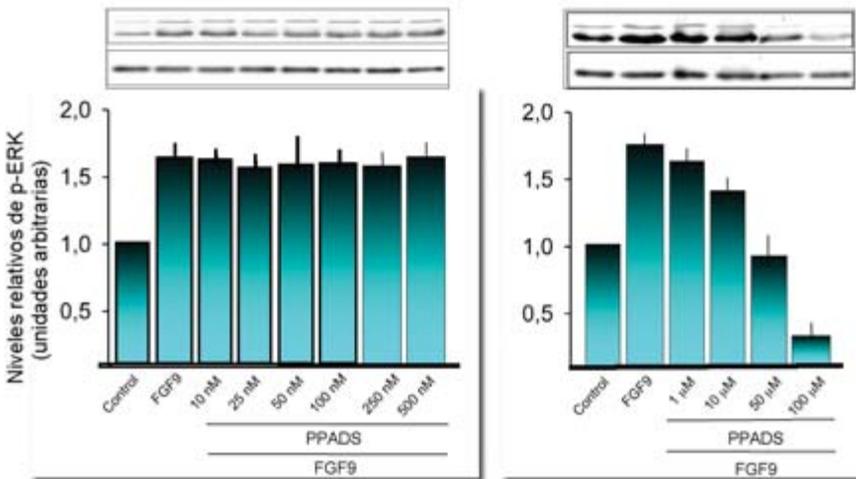


FIGURA 12. Efecto del PPADS sobre la fosforilación de ERK1/2 estimulada por FGF9.

sibilidad del empleo de este compuesto como agente rescatador de la condición acondroplásica, por lo menos en los condrocitos en cultivo.

El Ap₄A reduce la proporción de receptores de FGFR3 en la membrana de los condrocitos

Uno de los hechos que hace que el hueso no crezca en longitud como debiera es la dificultad que tiene el receptor FGFR3 de ser «downregulado». Ciertamente, la acondroplasia se convierte en enfermedad severa porque aunque el FGF se una al receptor FGFR3, en el caso de ser acondroplásico no se internaliza como lo hace el receptor normal.

Debido a la existencia de anticuerpos frente a los receptores FGFR3 es posible visualizar la densidad de receptores presentes en las células normales y acondroplásicas, tanto por inmunocitoquímica como por inmunotransferencia (western-blot).

Estudiamos cuál era el comportamiento de los receptores cuando las células eran tratadas por el FGF9 y comprobamos, tal y como indicaban otros autores, que tras la aplicación de este agonista era posible observar la desaparición del receptor FGFR3 normal y como el de FGFR3 acondroplásico seguía inalterablemente en la membrana.

Dado que el Ap₄A tenía un efecto diferente al resto de los nucleótidos al reducir la fosforilación de las ERK, pensamos en la posibilidad de que el Ap₄A, a través de un receptor no definido todavía, pudiese estar internalizando al receptor FGFR3 acondroplásico. Para verificar esta hipótesis estudiamos por técnicas de inmunocitoquímica si existían variaciones en el receptor FGFR3 acondroplásico cuando pre-tratábamos las células con Ap₄A.

Como se puede observar en la Figura 13, el efecto del dinucleótido sobre la proporción de receptores fue notable, produciendo una caída significativa de los receptores FGFR3 acondroplásicos. La disminución de receptores fue del 15 al 25%, dependiendo de la dosis empleada.

Este mismo efecto fue verificado por western-blot observando que del mismo modo que sucede en las imágenes anteriores la pro-

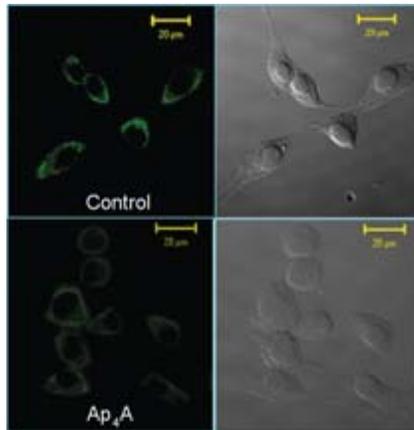


FIGURA 13. *Desaparición del receptor FGFR3 acondroplásico tras la aplicación de Ap₄A.*

porción de receptores se ve disminuida tras el tratamiento con Ap₄A 100 µM. La disminución fue de aproximadamente un 35% respecto a los niveles control, como se puede apreciar en la Figura 14.

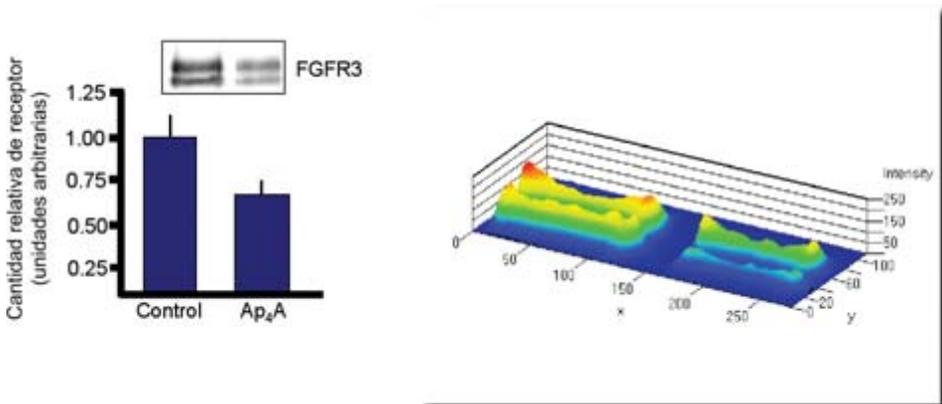


FIGURA 14. *Desaparición del receptor FGFR3 acondroplásico tras la aplicación de Ap₄A analizado por western-blot.*

Este hecho sugiere que el Ap₄A está modificando la proporción de los receptores de FGFR3 acondroplásicos pudiendo ser este el motivo por el que la fosforilación de las ERK disminuya.

¿Cómo puede el Ap₄A disminuir la presencia del receptor FGFR3 acondroplásico?

Solamente de modo reciente hemos comenzado a trabajar en este aspecto, que en la actualidad nos parece uno de los más interesantes. Es sabido que debido a la mutación, el receptor FGFR3 acondroplásico no tiene una internalización como la del receptor normal. Parece ser que cuando se forma el endosoma, como fase previa a la degradación del receptor, en lugar de comenzar el ciclo degradativo el receptor vuelve de nuevo a la membrana plasmática.

Nuestra primera idea ha sido comprobar si como consecuencia de la presencia de los dinucleótidos, la degradación del receptor FGFR3 acondroplásico se acelera. Con esta idea, lo que hicimos fue tomar al Ap₄A y ensayarlo en presencia ausencia de inhibidores de la degradación lisosomal y proteosomal (MG-132 y cloroquina).

Los resultados presentados en la Figura 15 parecen sugerir que lo que hace el Ap₄A es facilitar la degradación de los receptores FGFR3 acondroplásicos porque favorece la degradación de los mismos con una eficacia mayor, o bien porque sean capaces de impedir que el endosoma vuelva a reintegrar al receptor en la membrana. Es indudablemente necesario conocer más en profundidad cómo se activan

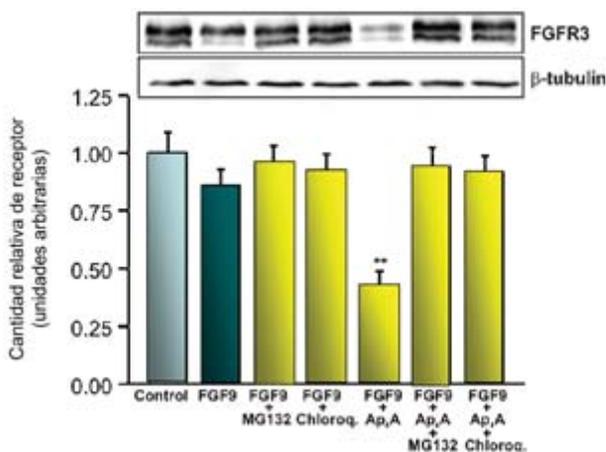


FIGURA 15. *Efecto de los inhibidores de la degradación proteosomal y lisosomal sobre el efecto del Ap₄A.*

los dos mecanismos (lisosomal y proteosomal), así como qué receptor y qué mecanismo podría permitir la interacción entre los dinucleótidos y el receptor FGFR3 acondroplásico.

La sorpresa con los análogos del piridoxal fosfato

Como se ha podido comprobar en la Figura 12, algunos análogos del piridoxal fosfato son capaces de reducir drásticamente los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2. Pensamos que si bien PPADS y PPNDS eran capaces de producir este efecto, tal vez el piridoxal y el fosfato de piridoxal podrían hacerlo igualmente. Por ello, todas estas sustancias fueron ensayadas y como se puede apreciar por la Figura 16, lamentablemente fueron incapaces de modificar la fosforilación de las ERK.

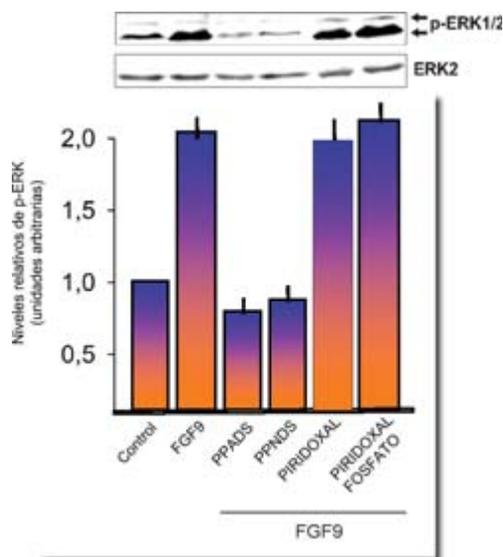


FIGURA 16. *Efecto del piridoxal y análogos sobre la fosforilación de las ERK1/2.*

La falta de efecto por parte del piridoxal fosfato sugiere que sea fundamentalmente la estructura de la molécula asociada al grupo piridoxal fosfato y no el grupo piridoxal fosfato la que introduce el efecto inhibitorio sobre las proteínas ERK 1/2.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se describe el esperanzador papel que los dinucleósidos polifosfatos pueden desempeñar para el tratamiento farmacológico de la acondroplasia. Desde el punto de vista de la patología, esta enfermedad es de las denominadas huérfanas, al no disponer en la actualidad de tratamiento de ningún tipo. La única aproximación al tratamiento es la elongación quirúrgica de las extremidades, proceso este muy tedioso, doloroso y traumático, tanto física como psíquicamente.

Dada la baja incidencia de la acondroplasia, uno cada 25.000 nacimientos, las empresas farmacéuticas no tienen interés en la investigación de esta patología porque no es económicamente rentable. Este hecho hace que solamente existan tres laboratorios en el mundo investigando sobre el tratamiento de la acondroplasia.

El Instituto Weissman de Israel, a través de una SPIN-OFF, creó los laboratorios PROCHON BIOTECH, que están estudiando la posibilidad del uso de un fragmento de un anticuerpo para bloquear al receptor FGFR3 acondroplásico como posible terapia para esta patología. Por otro lado, un laboratorio en Japón investiga con éxito el empleo de péptidos natriuréticos, que al activar la producción de GMPc consiguen disminuir la fosforilación de las MAP kinasas y así rescatar a las células acondroplásicas de la patología. Otras aproximaciones, más complejas en sus mecanismos de acción, ponen de manifiesto que los péptidos derivados de la hormona paratiroidea podrían ser buenos candidatos para el tratamiento de la acondroplasia.

Nosotros, con toda la modestia, nos gustaría contribuir a estas pocas iniciativas sugiriendo que el empleo de los dinucleósidos polifosfatos y en particular de Ap_4A , puede ser también una buena estrategia para el tratamiento, bien solo o en combinación con alguna de las otras terapias, como la producida por el PPADS y PPNS aquí descrita.

Desde un punto de vista práctico, la molécula diadenosina tetrafosfato, Ap_4A es eficaz disminuyendo los niveles de fosforilación de las ERK1/2, de manera semejante a cómo lo hacen los péptidos natriuréticos.

Uno de los aspectos más interesantes es reflexionar de qué modo el PPADS o el PPNDS pueden realizar su acción. Visto que la parte de piridoxal fosfato de la molécula es necesaria, pero insuficiente para llevar a cabo la acción inhibidora sobre las proteínas ERK, es necesario buscar otras posibilidades que justifiquen el efecto de estas dos moléculas. Recientemente se ha descubierto que las moléculas con la estructura naftalén trisulfonato se unen eficazmente al FGF, impidiendo la unión del heparán sulfato, elemento esencial para la unión del FGF a su receptor (32, 33). Si nos fijamos en la estructura de los compuestos PPADS y PPNDS, ambos con tres grupos sulfónicos y el segundo con la estructura naftaleno, sugiere que podrían tener un papel semejante al que presentan los naftalén trisulfonados. Es necesario realizar más experimentos para poder tener la certeza de que el mecanismo sugerido en esta discusión para el PPADS y PPNDS es el correcto.

Es todavía muy pronto para saber si alguna de las novedosas aproximaciones presentadas en este documento van a tener la posibilidad de ser ensayadas en un futuro en los seres humanos. Sin embargo, una reflexión detallada de la naturaleza de estas sustancias ponen de manifiesto su origen natural. Este hecho facilitaría extraordinariamente el avance de los correspondientes ensayos clínicos, ya que de algunas de ellas, como los dinucleótidos o los derivados del piridoxal, ya se han hecho las pruebas de tolerancia y toxicidad, lo que permitiría iniciar los ensayos clínicos en un breve período de tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestra gratitud a los laboratorios PROCHON BIOTECH por la cesión de los precursores de condrocitos RCJ-FGF receptor tipo 3^{G380R}. Este trabajo ha sido financiado gracias a becas de investigación de la Fundación Magar, Fundación López Hidalgo, Asociación Pegral, Asociación Crecer y Santander-Complutense PR41/06-14962.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ROACH, H. I.; ERENPREISA, J. and AIGNER, T. (1995): Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J. Cell Biol.* 131: 483-494.
- (2) GIBSON, G.; LIN, D. L. and ROQUE, M. (1997): Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture. *Exp. Cell Res.* 233: 372-382.
- (3) ANON, J. (1988): Human achondroplasia. A multidisciplinary approach. Proceeding of the first international symposium. November 19-21, Rome, Italy. *Basic Life Sci.* 48: 1-419.
- (4) SHIANG, R.; THOMPSON, L. M.; ZHU, Y. Z.; CHURCH, D. M.; FIELDER, T. J.; BOCIAN, M.; WINOKUR, S. T. and WASMUTH, J. J. (1994): Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell.* 78: 335-342.
- (5) ROUSSEAU, F.; BONAVENTURE, J.; LEGEAI-MALLET, L.; PELET, A.; ROZET, J. M.; MAROTEAUX, P.; LE MERRER, M. and MUNNICH, A. (1994): Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature.* 371: 252-254.
- (6) SUPERTI-FURGA, A.; EICH, G.; BUCHER, H. U.; WISSER, J.; GIEDION, A.; GITZELMANN, R. and STEINMANN, B. (1995): A glycine 375-to-cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with achondroplasia. *Eur. J. Pediatr.* 154: 215-219.
- (7) CHEN, L.; ADAR, R.; YANG, X.; MONSONEGO, E. O.; LI, C.; HAUSCHKA, P. V.; YAYON, A. and DENG, C. X. (1996): Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* 271: 15292-15297.
- (8) PRINOS, P.; COSTA, T.; SOMMER, A.; KILPATRICK, M. W. and TSIPOURAS, P. (1995): A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 4: 2097-2101.
- (9) IWATA, T.; CHEN, L.; LI, C.; OVCHINNIKOV, D. A.; BEHRINGER, R. R.; FRANCOMANO, C. A. and DENG, C. X. (2000): A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1603-1613.
- (10) COLVIN, J. S.; BOHNE, B. A.; HARDINNG, G. W.; MCEWEN, D. G. and ORNITZ, D. M. (1996): Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* 12: 390-397.
- (11) SCHLESSINGER, J.; PLOTNIKOV, A. N.; IBRAHIMI, O. A.; ELISEENKOVA, A. V.; YEH, B. K.; YAYON, A.; LINHARDT, R. J. and MOHAMMADI, M. (2000): Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell.* 6: 743-750.
- (12) HART, K. C.; ROBERTSON, S. C. and DONOGHUE, D. J. (2001): Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Mol. Biol. Cell.* 12: 931-942.
- (13) NASKI, M. C.; WANG, Q.; XU, J. and ORNITZ, D. M. (1996): Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat. Genet.* 13: 233-237.

- (14) WEBSTER, M. K. and DONOGHUE, D. J. (1996): Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.* 15: 520-527.
- (15) SOROKIN, A.; LEMMON, M. A.; ULLRICH, A. and SCHLESSINGER, J. (1994): Stabilization of an active dimeric form of the epidermal growth factor receptor by introduction of an inter-receptor disulfide bond. *J. Biol. Chem.* 269: 9752-9759.
- (16) LIEVENS, P. M.; MUTINELLI, C.; BAYNES, D. and LIBOI, E. (2004): The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J. Biol. Chem.* 279: 43254-43260.
- (17) CHO, J. Y.; GUO, C.; TORELLO, M.; LUNSTRUM, G. P.; IWATA, T.; DENG, C. and HORTON, W. A. (2004): Defective lysosomal targeting of activated fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 609-614.
- (18) SAHNI, M.; AMBROSETTI, D. C.; MANSUKHANI, A.; GERTNER, R.; LEVY, D. and BASILICO, C. (1999): FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.* 13: 1361-1366.
- (19) MININA, E.; KRESCHEL, C.; NASKI, M. C.; ORNITZ, D. M. and VORTKAMP, A. (2002): Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell.* 3: 439-449.
- (20) DAILEY, L.; LAPLANTINE, E.; PRIORE, R. and BASILICO, C. (2003): A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *J. Cell. Biol.* 161: 1053-1066.
- (21) MURAKAMI, S.; BALMES, G.; MCKINNEY, S.; ZHANG, Z.; GIVOL, D. and DE CROMBRUGGHE, B. (2004): Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.* 18: 290-305.
- (22) YASODA, A.; KOMATSU, Y.; CHUSHO, H.; MIYAZAWA, T.; OZASA, A.; MIURA, M.; KURIHARA, T.; ROGI, T.; TANAKA, S.; SUDA, M.; TAMURA, N.; OGAWA, Y. and NAKAO, K. (2004): Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat. Med.* 10: 80-86.
- (23) WANG, Y.; SPATZ, M. K.; KANNAN, K.; HAYK, H.; AVIVI, A.; GORIVODSKY, M.; PINES, M.; YAYON, A.; LONAI, P. and GIVOL, D. (1999): A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 4455-4460.
- (24) SEGEV, O.; CHUMAKOV, I.; NEVO, Z.; GIVOL, D.; MADAR-SHAPIRO, L.; SHEININ, Y.; WEINREB, M. and YAYON, A. (2000): Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3(G380R) transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 9: 249-258.
- (25) ROZENBLATT-ROSEN, O.; MOSONEGO-ORNAN, E.; SADOT, E.; MADAR-SHAPIRO, L.; SHEININ, Y.; GINSBERG, D. and YAYON, A. (2002): Induction of chondrocyte growth arrest by FGF: transcriptional and cytoskeletal alterations. *J. Cell. Sci.* 115: 553-562.
- (26) MONSONEGO-ORNAN, E.; ADAR, R.; FEFERMAN, T.; SEGEV, O. and YAYON, A. (2000): The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3

- uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 516-522.
- (27) BURNSTOCK, G. and KNIGHT, G. E. (2004): Cellular distribution and functions of P2 receptors subtypes in different systems. *Int. Rev. Cyt.* 240: 31-304.
- (28) MIRAS-PORTUGAL, M. T.; GUALIX, J.; MATEO, J.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTE, R.; CASTRO, E. and PINTOR, J. (1999): Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog. Brain Res.* 120: 397-409.
- (29) PINTOR, J.; DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GUALIX, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTE, R.; HERNADO, F. and MIRAS-PORTUGAL, M. T. (2000): Diadenosine polyphosphates receptors: from rat and guinea pig brain to human central nervous system. *Pharmacol. Ther.* 87: 103-115.
- (30) BUVINIC, S.; BRIONES, R. and HUIDIOBRO-TORO, J. P. (2002): P2Y1 and P2Y2 receptors are coupled to the NOS/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Brit. J. Pharmacol.* 135: 847-856.
- (31) GRYNKIEWICZ, G.; PONIE, M. and TSIEN, R. Y. A. (1985): New generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
- (32) CUEVAS, P.; REIMERS, D.; DÍAZ, D.; LOZANO, R. M. and GIMÉNEZ GALLEGO, G. (1999): Apoptosis of glioma cells induced by the fibroblast growth factor inhibitor 1, 3, 6 naphthalene trisulphonate. *Neurosci. Lett.* 275: 149-151.
- (33) LOZANO, R. M.; JIMÉNEZ, M. A.; SANTORO, J.; RICO, M. and GIMÉNEZ GALLEGO, G. (1998): Solution structure of acidic fibroblast growth factor bound to 1,3,6 naphthalentrisulfonate: a minimal model for the antitumoral action of suramins and suradistas. *J. Mol. Biol.* 281: 899-915.

————— *Artículo original* —————

Diseño y desarrollo de nuevas formulaciones para la vehiculización de genes terapéuticos con aplicación al cáncer de hígado y colon

Recibido el 23 de enero de 2008

NAVARRO DíEZ, GEMMA y TROS DE ILARDUYA APAOLAZA *,
M.^a CONCEPCIÓN

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra*

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La liberación de genes terapéuticos vehiculizados en nuevas formas farmacéuticas se presenta como una prometedora alternativa en el tratamiento de esta enfermedad. Los dendrímeros PAMAM son polímeros catiónicos cuya aplicación como vehículos en terapia génica está generando un interés creciente en la comunidad científica. La mezcla de los dendrímeros con DNA lleva a la formación de complejos por interacción electrostática que reducen el tamaño y la carga del DNA, lo protegen de la degradación por las nucleasas del suero y aumentan su entrada en la célula por endocitosis. Sin embargo, la influencia de los aspectos físico-químicos en la eficacia de estos vectores, así como el balance óptimo entre su eficacia y toxicidad no han sido totalmente elucidados. En este trabajo se han empleado dendrímeros de distintos pesos moleculares (14.000 Da y 28.000 Da) y se han asociado a DNA plasmídico en cantidades crecientes. Las formulaciones preparadas con el dendrí-

* **Información de contacto:**

Conchita Tros de Ilarduya.

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 31080 Pamplona.

Tel.: 948/425600. Ext. 6375.

Fax: 948/425649

e-mail: ctros@unav.es

mero de 14.000 Da presentaron tamaños de partícula de entre 150 y 170 nm, mientras que a las mismas relaciones de carga, los complejos preparados con el polímero de mayor peso molecular presentaron valores menores, de alrededor de 100 nm. El potencial de superficie fue positivo en todos los casos excepto cuando se utilizó la misma cantidad de polímero y de DNA (punto de electroneutralidad). Además, en este estudio se ha demostrado la capacidad de estas formulaciones para proteger al DNA frente a la degradación por DNAasas independientemente del peso molecular y cantidades utilizadas. Los resultados *in vitro* en células HepG2 (hepatocarcinoma humano) y CT26 (cáncer de colon murino) sugieren que a mayor peso molecular y a mayor cantidad de dendrímico se obtienen mayores niveles de expresión génica. Por último, señalar que los estudios de toxicidad determinaron una viabilidad celular superior al 80% en todos los casos.

Palabras clave: Terapia génica.—Dendrímicos.—Polímeros.—Galénica.—PAMAM (poliamidoamina).

SUMMARY

Design and development of new pharmaceutical dosage forms for therapeutic gene delivery applied to liver and colon cancer

The success of gene therapy is largely dependent on the development of vectors (new pharmaceutical dosage forms) capable of effectively transferring therapeutic genes into cells. One mayor approach in non-viral gene therapy is based on cationic polymers, like PAMAM (polyamidoamine) dendrimers. In the latest years, the growing interest in the use of dendrimers as gene carries has lead into numerous *in vitro* and less *in vivo* studies. The combination of DNA with dendrimers forms complexes that reduce the size and the charge of DNA, protects the genetic material against degradation by serum nucleases and enhances the uptake into cells by endocytosis. However, the mechanisms of internalization and the influence of biophysical features in transfection efficacy are not fully elucidated. Moreover, the safe limits in terms of toxicity of dendrimers when condensed with DNA are still not clear. More systematic studies are needed to gain a better understanding of the rules that govern dendrimer-based gene delivery. In this study, we have developed, characterized and optimized nanoparticles composed of PAMAM dendrimers (14.000 Da and 28.000 Da) and plasmid DNA, which can deliver genetic material into tumour cells. The quantities of both components were calculated in order to prepare complexes at charge ratio (+/-) from 1/1 to 10/1 (dendrimer/DNA). The size of the complexes ranged from 150 nm to 170 nm for those prepared with the 14.000 Da dendrimer at charge ratio 2/1 to 10/1. At the same charge ratios, the complexes prepared with the highest molecular weight polymer showed lower values (around 100 nm). The zeta potential was positive in all cases, except for the ratio 1:1 (neutrality point). Complexes prevented nuclease digestion. The protection was observed in both polymer generations at all the charge ratios prepared. *In vitro* gene expression by complexes was performed in HepG2 cells (human hepatocellular

carcinoma) and CT26 cells (murine colon adenocarcinoma). Transfection levels increased with the charge ratio and with the molecular weight with maximum levels at charge ratio 10/1 in both generations. Finally, *in vitro* toxicity assays showed a viability higher than 80% in all the complexes prepared.

Keywords: Gene therapy.—Dendrimers.—Polymers.—Pharmaceutical.—PAMAM (polyamidoamine).

INTRODUCCIÓN

1. Terapia génica. Desafíos actuales

La terapia génica se define como el tratamiento de una enfermedad mediante la transferencia de material genético a las células específicas de un paciente. Se presenta como un método para tratar o prevenir enfermedades mediante el uso de genes que doten al paciente de información genética adecuada para producir las proteínas necesarias para corregir o modular una enfermedad.

Los avances en genómica, proteínómica y la secuenciación del genoma humano, han permitido identificar nuevos genes implicados en la aparición y desarrollo de enfermedades como el cáncer, la fibrosis quística, la hipercolesterolemia familiar o enfermedades cardiovasculares. Al igual que en otras áreas de la biomedicina, la mayoría de la investigación en terapia génica está dirigida al tratamiento del cáncer. De todos los ensayos clínicos de terapia génica aprobados en el mundo hasta este momento, casi un 70% corresponden a ensayos dirigidos al tratamiento del cáncer.

La terapia génica del cáncer tiene como finalidad la eliminación selectiva de las células tumorales por medio de tres estrategias principales: la corrección génica de las células tumorales, la destrucción de células tumorales y la terapia adyuvante. En cualquiera de ellas es necesario que el gen terapéutico llegue al interior de la célula tumoral, atravesase el citoplasma hasta el núcleo y exprese la proteína para la que codifica. Esta proteína será la encargada de destruir a la célula tumoral, corregir su base genética, etc.

El gen terapéutico debe superar diversos obstáculos extracelulares e intracelulares hasta su expresión en el interior de la célula.

Estas barreras varían en función del tejido y de la vía de administración elegida. Uno de los problemas principales es la estabilidad y la supervivencia del sistema administrado en el torrente circulatorio. Por un lado, las enzimas nucleasas presentes en el suero son capaces de degradar el DNA desnudo. Por otro, la interacción con las proteínas séricas puede dar lugar a la formación de grandes agregados que son rápidamente eliminados por las células fagocíticas. Además, la entrada de material genético extraño al organismo asociado a un sistema sintético o viral va a dar lugar a la aparición de respuestas de inmunidad celular y humoral generando procesos inflamatorios, sobre todo en el caso de los vectores virales que poseen elementos muy inmunogénicos en su composición.

El DNA ha de ser capaz de alcanzar el núcleo celular. Dependiendo del mecanismo del vehículo o del procedimiento empleado, la entrada en la célula se produce por endocitosis, por fusión de membranas o por desestabilización de la membrana. Una vez que el ácido nucleico llega al citoplasma es captado por el sistema endosomal-lisosomal. El material genético es almacenado en unas vesículas llamadas endosomas que poseen un pH ácido y con un contenido rico en enzimas capaces de degradar moléculas libres de DNA. La última barrera es la entrada de DNA exógeno en el núcleo celular. La membrana celular permite el transporte pasivo de moléculas pequeñas a través de unos poros que tienen un tamaño de 80 nm aproximadamente. Algunos sistemas de transfección son más eficaces con células en proliferación. Durante la profase temprana de la mitosis se produce la disgregación de la envoltura nuclear. Esto permite una distribución homogénea del vector en el interior celular, quedando una porción intranuclear del mismo, una vez reconstituido el núcleo.

La manera más sencilla de administrar el DNA es la inyección directa del DNA desnudo a los tejidos o bien su administración sistémica, pero son técnicas muy limitadas. Como se acaba de exponer, el DNA sin protección presenta una biodisponibilidad celular muy baja. La búsqueda de nuevos sistemas de liberación de genes, eficaces y seguros, supone uno de los campos principales de investigación en terapia génica.

2. Vectores en terapia génica

Se distinguen fundamentalmente dos tipos de vectores en terapia génica: los vectores virales y los vectores no virales o sintéticos. Un vector ideal debería cumplir los siguientes requisitos:

- Que proteja el DNA frente a la degradación enzimática.
- Que sea capaz de empaquetar altas cantidades de DNA.
- Que posea mecanismos que favorezcan la internalización celular, el escape del endosoma y el transporte al núcleo.
- Que sea fácil de administrar.
- Que sea estable en el suero.
- Que produzca una nula o baja toxicidad, inmunogenicidad y patogenicidad.
- Que sea fácil de purificar.
- Que sea fácil de fabricar.
- Que posea un bajo coste.

2.1. *Vectores virales*

Con el uso de los vectores virales se aprovecha la capacidad natural que tienen los virus para introducir material genético en el interior de las células. La aplicación de estos vectores en terapia génica exige ciertas propiedades del propio virus. Por un lado, el genoma viral debe ser capaz de acomodar el gen terapéutico, y por otra debe tratarse de un virus defectivo, es decir, un virus al que se le ha privado de alguna función necesaria para desarrollar su ciclo replicativo, de modo que no pueda ser patógeno para el paciente. Los principales grupos de vectores virales empleados en terapia génica son los retrovirus, los adenovirus, los virus adenoasociados y los herpesvirus. A pesar de que son unos vectores que alcanzan una alta eficiencia de transfección, presentan algunos inconvenientes entre los que destacan la limitación del tamaño de DNA que puede ser empaquetado, los bajos títulos de vector que se obtienen durante su producción, el riesgo potencial de infección y la mutagénesis

insercional. Si bien, la principal desventaja de estos vectores es que la respuesta del hospedador al virus parece limitar la duración de la expresión y la posibilidad de administrar dosis repetidas.

2.2. *Vectores no virales*

Las limitaciones de los vectores virales hacen que los vectores sintéticos se presenten como una alternativa atractiva en la terapia génica. Entre sus ventajas, se puede destacar que no inducen inmunogenicidad, que presentan una baja toxicidad y que son fáciles de producir a gran escala. Sin embargo, su principal inconveniente es su menor eficiencia de transfección respecto a los vectores virales.

De todos los vectores no virales, los que más posibilidades presentan y mejores resultados están alcanzando son los sistemas químicos basados bien en la encapsulación, o en la condensación del DNA con el objeto de protegerlo y de facilitar su entrada en la célula. Entre ellos encontramos los sistemas lipídicos, poliméricos y peptídicos.

Dentro de los sistemas poliméricos se encuentran los polímeros catiónicos. Estos sistemas se basan en la condensación del DNA cargado negativamente en partículas compactas mediante la interacción electrostática con policationes. Las partículas resultantes protegen al DNA y facilitan su internalización. Existen numerosos policationes que permiten la formulación del DNA entre los que se incluyen la polilisina (PLL), la polietilenimina (PEI), el poli (2-dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA), el quitosano y los dendrímeros catiónicos. Estos últimos constituyen la base de este trabajo.

3. **Los dendrímeros PAMAM**

Dentro del grupo de polímeros catiónicos cabe destacar los dendrímeros PAMAM (poliamidoamina) por su relación con el trabajo experimental. Los dendrímeros (del griego *dendron*: árbol, y *meros*: parte) son macromoléculas esféricas altamente ramificadas. Su descubrimiento y síntesis se llevó a cabo a principios de los años ochenta. Presentan una estructura de «estrella densa» caracterizada por un núcleo central del que surgen numerosas ramificaciones. Existen

dos tipos principales de dendrímeros PAMAM, los que tienen como núcleo un grupo amonio y los que presentan una molécula de etilendiamina, dando lugar a estructuras con tres y cuatro puntos de ramificación respectivamente.

La síntesis de este polímero se realiza mediante la adición de metacrilato al núcleo, seguida de una amidación con etilendiamina del grupo éster resultante. Con cada repetición de este proceso aparece una nueva generación. Si consideramos el núcleo como la generación 0, la primera adición de metacrilato y posterior amidación daría lugar a la generación 1, la repetición de este proceso daría lugar a la generación 2 (G2), y así sucesivamente. Con cada generación, el peso molecular del dendrímero se incrementa exponencialmente y el número de grupos amino terminales de su superficie se dobla. En general, los dendrímeros PAMAM presentan un tamaño y estructura bien definidos con un índice de polidispersión bajo en comparación con otros polímeros de similar peso molecular.

Cuando el DNA se mezcla con el polímero PAMAM, se forma un complejo basado exclusivamente en una interacción de los grupos fosfato negativos del DNA y los grupos amino primarios que se encuentran protonados en su superficie. Una neutralización de las cargas del complejo o una alteración en su carga neta producen cambios en las características físico-químicas y biológicas del mismo. La morfología de estos complejos es toroidal, muy similar a la que forma el DNA con otros polímeros catiónicos como la polilisina o la polietilenamina.

La caracterización de la unión PAMAM-DNA y del proceso de condensación no han sido totalmente elucidados. Parece que un aumento en la relación de carga (+/-), favorece el proceso de formación del complejo.

En general, los complejos catiónicos se unen por interacción electrostática a la membrana celular cargada negativamente. El proceso de internalización de los complejos PAMAM-DNA está mediado por endocitosis. Así lo demuestran estudios realizados siguiendo la incorporación en las células de DNA desnudo marcado con radioactividad o condensado con dendrímeros marcados con radioactividad. Además, se ha demostrado que una depleción del colesterol en la membrana celular provoca una inhibición total del proceso de inter-

nalización. En cualquier caso, es importante señalar que un menor tamaño y una carga superficial positiva favorecen el proceso de internalización mediado por endocitosis. Una vez dentro de la célula, la eficacia de los complejos depende de su habilidad para escapar del endosoma. Los dendrímeros PAMAM tienen una alta capacidad tampón, debido a que poseen grupos amina protonables. Esto hace que en el interior del endosoma se comporten como bases débiles y taponen el medio ácido (1). Sus propiedades tampón hacen que el dendrímero actúe como una «esponja de protones». Al decelerar la acidificación del endosoma, se activa una ATPasa endosomal que provoca la entrada masiva de protones al endosoma seguido de un flujo de iones cloruro. Estos cambios en la osmolaridad conducen a un aumento del volumen del endosoma de un 140% con la consecuente ruptura del mismo (2).

Todas las propiedades y características anteriormente descritas hacen del polímero PAMAM un candidato adecuado para la liberación de genes en el núcleo. En general, las generaciones más altas, la generación 5 y superiores, son las que muestran una mayor eficacia de transfección. Parece que la naturaleza del núcleo central, amonio o etilendiamina, no influye en las eficacias de transfección y que los parámetros más importantes en este sentido son el peso molecular y el número de grupos amino terminales característicos de cada generación (3).

Los dendrímeros pueden sufrir un proceso de activación que da lugar a los llamados «dendrímeros activados» o «dendrímeros fracturados» (4). Este proceso de activación consiste en la solubilización del dendrímero en un solvente adecuado (agua, butanol) y un posterior calentamiento que da lugar a la degradación del dendrímero por ruptura de algunos enlaces amida. Esto hace que la estructura del dendrímero activado sea más flexible, lo que se relaciona con una mayor eficacia de transfección (5). En la actualidad el dendrímero activado de la generación 6 del PAMAM, que se comercializa bajo el nombre de Supefect™, se utiliza como un agente de transfección estándar.

Se han realizado numerosos estudios que demuestran la habilidad de los dendrímeros como agentes de transfección *in vitro* en numerosas líneas celulares (1, 6-8). Los estudios *in vivo* desarrollados hasta ahora no han sido muy prometedores. Las causas principales son la falta de eficacia y la toxicidad asociada a estos polímeros. Desta-

can algunos realizados por distintas vías de administración, sistémica (9, 10), intratumoral (11), pulmonar (12) y por inyección directa en el ojo (13) o en el corazón (14). También se han realizado estudios *in vitro* (15) e *in vivo* (16) para terapia antisentido.

A determinadas dosis, los dendrímeros PAMAM, como la mayoría de los policationes, son capaces de desestabilizar la membrana y provocar la lisis celular. Es importante advertir que prácticamente la mayoría de los estudios de toxicidad realizados *in vitro* e *in vivo* (17), muestran datos de toxicidad asociados a la administración de los dendrímeros solos. Si la toxicidad de los dendrímeros es debida a las cargas positivas de su superficie, cabe pensar que al formar complejos con el DNA, la toxicidad varíe con respecto a los dendrímeros solos, aunque los estudios comparativos de los que se dispone son confusos y contradictorios (18). Los estudios *in vitro* han demostrado que los dendrímeros pueden presentar citotoxicidad y hematotoxicidad dependientes de la generación siendo las generaciones altas, las más tóxicas (19).

Hasta el momento, el número de estudios sistemáticos sobre la toxicidad *in vivo* es muy escaso. La inyección en ratones de dendrímeros G5 e inferiores a una dosis de 10 mg/kg de ratón no pareció ser tóxica (20). Con respecto a la inmunogenicidad, en estudios iniciales los dendrímeros mostraron una débil o nula inmunogenicidad y cierta actividad como adyuvantes (21) aunque posteriormente se ha demostrado que poseen cierta inmunogenicidad (22).

La biodistribución tras la administración parenteral de los dendrímeros ha sido ampliamente estudiada, sobre todo en relación al desarrollo de estos dendrímeros como posibles agentes de imagen (23). Las generaciones más pequeñas son rápidamente eliminadas de la circulación vía hígado, para ser excretadas por el riñón. Aunque es posible que los perfiles de distribución puedan verse alterados cuando se modifica la superficie del dendrímero (17).

Por todo lo anterior, la optimización de los dendrímeros PAMAM como vehículos para la liberación de genes requiere necesariamente un balance entre la eficacia terapéutica y los efectos tóxicos. En este sentido, se han desarrollado nuevas síntesis a partir de los dendrímeros PAMAM con el fin de buscar modificaciones estructurales que incrementen su eficacia y disminuyan su toxicidad (24 y 25).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1. *Material génico*

El DNA plasmídico (pDNA) utilizado que contiene el gen de la luciferasa bajo el promotor del citomegalovirus (CMV), fue el pCMV-Luc (VR-1216), (BioServe Biotechnologies, EE.UU.). Su crecimiento se llevó a cabo en *Escherichia coli* XL-12 y su purificación con «Quia-gen Endofree® Plasmid Giga Kit» (Quiagen, Alemania).

1.2. *Productos y reactivos*

Los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) con etilendiamina (EDA) como iniciador tetavalente de la polimerización fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Para este estudio se utilizaron las generaciones cuarta, G4 (EDA) y quinta G5 (EDA) con un peso molecular de 14.215 Da y 28.826 Da, y un número de grupos amino terminales de 64 y 128, respectivamente.

Para el crecimiento e identificación del plásmido y para las electroforesis en gel de agarosa se utilizó: agar, medio LB Broth, agarosa D-1 Baja EEO (Pronidasa, España), kanamicina (Sigma-Aldrich, EE.UU.), tampón Tris-bórico-EDTA (TBE) formado por Tris 0.1 M, ácido bórico 0,09 M y EDTA 0,01 M (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido), bromuro de etidio (50 µL/mL) (Gibco BRL® Life Technologies, EE.UU.), desoxirribonucleasa I (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido), glicerol (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido) y azul de bromofenol (Sigma, EE.UU.).

Las nanopartículas se prepararon en buffer Hepes Glucosado a partir de HEPES (Sal sódica) y D- (+) - Glucosa (Sigma-Aldrich, Alemania).

Para la disociación de los complejos se utilizó: sal sódica de heparina (Sigma, Alemania), EDTA (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y lauril sulfato sódico (Roig Farma, España).

Para los estudios de transfección *in vitro* se utilizaron los reactivos «Luciferase Assay Sustrate» (Promega, EE.UU.), «Reporter Lysis

Buffer 5X» (Promega, EE.UU.) y el kit «Bio-Rad D_c Protein Assay» (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.). Para evaluar la viabilidad se utilizó el reactivo «Alamar Blue» (Trek Diagnostic System, Inglaterra).

1.3. *Cultivos celulares*

Las líneas celulares empleadas en este estudio fueron HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) y CT26 (células de cáncer de colon de ratón) (American Type Culture Collection, MD, EE.UU.). Se mantuvieron a 37° C en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose con 4500 mg/L de glucosa y Glutamax-I) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Todos los productos empleados en los cultivos celulares se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (Reino Unido).

2. **Métodos**

2.1. *Purificación del plásmido*

El plásmido empleado en los estudios (pCMVLuc) se obtuvo tras el crecimiento de bacterias *E.coli* modificadas en placas de cultivo de agar-agar con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL. Se tomó una unidad formadora de colonias y se creció primero en 5 mL de precultivo LB Broth (1% p/v peptona de caseína, 0,5% p/v de extracto de levadura y 0,5% p/v de NaCl), y kanamicina (50 µg/mL) durante 4 horas a 37° C, y después en 2 L del mismo medio durante 12 horas a la misma temperatura bajo agitación orbital en un agitador Shaker modelo 625 (New Brunswick Scientific, Co. Inc, Edison, EE.UU.).

Tras la centrifugación de las bacterias a 6.000 r.p.m. y 4° C durante 15 minutos en una centrífuga Beckman J2-HS, la purificación se llevó a cabo con el kit «Qiagen Endofree® Plasmid Giga». Una vez purificado, el plásmido fue resuspendido en 1 mL de agua estéril. La concentración y pureza del plásmido se determinó mediante espec-

troscopia UV midiendo la absorbancia del DNA plasmídico purificado a 310, 280 y 260 nm en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8452 (EE.UU.). El cociente de las absorbancias A_{260}/A_{280} de todas las muestras fue siempre mayor o igual a 1,8, indicando un grado de pureza adecuado para el plásmido. La concentración del plásmido se calculó mediante la ley de Lambert-Beer, según la cual una unidad de absorción a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de doble cadena o a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de cadena sencilla.

Además, para garantizar la pureza del pDNA, las muestras fueron sometidas a digestión con enzimas de restricción, comparando los fragmentos obtenidos con los productos de digestión obtenidos de un pCMVLuc patrón. Para ello se tomó 1 μg de pDNA, 0,5 μL de enzima Pst I, 0,5 μL de enzima Xho I, 2 μL de REact[®] 2 (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido) y la cantidad suficiente de agua para alcanzar 20 μL . Tras mantener la muestra en un baño a 37° C durante 2 horas, se analizaron los productos de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% usando TBE como buffer. La fuente electrofórica utilizada fue un Power Pac 300 de Bio Rad (EE.UU.). Las muestras se sometieron a un voltaje continuo de 80 mV durante 2 horas. El DNA se visualizó mediante luz UV en una cámara oscura de aislamiento Gel doc 2000 (Bio Rad, EE.UU.) tras la intercalación con bromuro de etidio.

2.2. Preparación de los sistemas PAMAM/DNA

Los complejos se prepararon mediante la mezcla de volúmenes iguales de una solución de pDNA con una solución del dendrímero (PAMAM G4 o PAMAM G5), ambas preparadas en BHG (Buffer HEPES Glucosado) (HEPES 10 mM, glucosa al 10%, pH 7,4). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La concentración final del DNA en los complejos fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Las cantidades de dendrímero y DNA fueron calculadas para obtener complejos a distintas relaciones de carga (+/-) respecto al número de grupos amino terminales del polímero frente al número de grupos fosfato del DNA. Para cada generación de dendrímero se obtuvieron complejos con relaciones de carga desde 1/1 hasta 10/1 (PAMAM/DNA). Dado que las generaciones del polímero fueron su-

ministradas por la casa comercial en forma de solución metanólica, fue necesaria la eliminación del disolvente mediante rotaevaporación (23 mbar, 143 r.p.m.) durante 20 minutos. El film de polímero obtenido se secó a vacío durante dos horas y posteriormente se hidrató con BHG.

2.3. *Determinación del tamaño y potencial zeta*

El tamaño y potencial zeta se midieron por difracción de láser en un Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido). Para ello, se diluyeron 200 μL de complejo en 1 mL de agua bidestilada. Las medidas se realizaron por triplicado.

2.4. *Microscopia de fuerza atómica (AFM)*

Se prepararon complejos con PAMAM G5 a una relación de carga 10/1 en BHG. Tras depositar un pequeño volumen de los complejos sobre una superficie de mica, se dejaron secar al aire. Las imágenes fueron tomadas en un Cervantes AFM System (Nanotec Electrónica, S. L., España). Se han utilizando cantilevers Nanosensor NCH-W. Las medidas se realizaron en modo dinámico.

2.5. *Estudios de condensación*

En una placa de 96 pocillos se añadieron 1,5 μg de DNA y 0,17 μg de bromuro de etidio por pocillo, es decir, a una relación molar 10:1 (DNA: Bromuro de etidio). A continuación se añadieron cantidades crecientes de dendrímero y BHG hasta 300 μL de volumen total en los pocillos y se incubaron 10 minutos en la oscuridad. La concentración de pDNA fue de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La fluorescencia emitida se determinó, tras dos horas de incubación, mediante un espectrofluorímetro Genios (Tecan, Austria) a una longitud de onda de excitación de 540 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm. La fluorescencia relativa de cada muestra se calculó de la siguiente manera:

$$F_r = (F_{\text{obs}} - F_e) \times \frac{100}{(F_0 - F_e)}$$

Donde F_{obs} es la fluorescencia en cada muestra, F_c es la fluorescencia en ausencia del DNA, y F_o es la fluorescencia del DNA en presencia de bromuro de etidio y en ausencia de polímero.

2.6. *Gel de retardo*

Se prepararon complejos para cada generación de PAMAM a distintas relaciones de carga. Se incubaron durante 15 minutos y se sometieron a electroforesis. La cantidad de pDNA por pocillo fue de 1 μg . Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: agarosa al 1,2% y un voltaje constante de 80 mV durante 2 horas en TBE.

2.7. *Ensayo de protección frente a DNAsa I*

La protección del pDNA condensado frente a DNAsa I se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello se incubaron los complejos y el DNA control en presencia de desoxirribonucleasa I (1 U/ μg DNA) en un baño Grant Instrument (Reino Unido) a 37° C durante 30 minutos. A continuación se interrumpió la digestión añadiendo 6 μL de EDTA (0,25 M). Para disociar los complejos se añadieron 11,4 μL de SDS al 15% y tras 10 minutos de incubación se adicionaron 25 μL de heparina al 7%. Tras una hora de incubación las muestras se sometieron a electroforesis.

Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: agarosa al 0,8% y un voltaje constante de 80 mV durante 2 horas en TBE. La fuente electroforética utilizada fue un Power Pac 300 (Bio Rad, EE.UU.). El DNA se visualizó mediante luz UV en una cámara oscura de aislamiento Gel doc 2000 (Bio Rad, EE.UU.) tras la intercalación con bromuro de etidio. El DNA extraído de los complejos se comparó con un pDNA control y con una muestra de pDNA desnudo en las mismas condiciones de digestión con nucleasas.

2.8. *Estudios de transfección in vitro en cultivos celulares*

Para los estudios de transfección se utilizaron las líneas celulares HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) y CT26 (células de cán-

cer de colon de ratón). Se platearon 3×10^5 células por pocillo en DME-10 sobre placas de 48 pocillos (Iwaki Microplate 48-Well, Japón). Cuando el grado de confluencia fue del 80% se procedió a la transfección. En cada pocillo se añadieron 300 μL de FBS completo activado y 200 μL complejo, de forma que la concentración final de FBS en el pocillo fue del 60%. La cantidad de pDNA por pocillo fue de 1 μg . Tras 4 horas de incubación a 37° C y 5% CO_2 en un incubador (Forma Scientific, Inc, CO_2 water Jacked incubator 3121, EE.UU.), se retiró el medio de transfección y se añadió DME-10. Después de 48 horas, las células se lavaron con PBS y se lisaron con 100 μL de buffer de lisis 1X (RLB, «Reporter Lisis Buffer») (Promega, EE.UU.). Posteriormente se sometieron a dos ciclos de congelación-descongelación a -80% . El contenido de cada pocillo se centrifugó a 12.000 g durante 10 minutos. Se analizaron 20 μL del sobrenadante obtenido, midiendo la expresión de luciferasa con el kit «Luciferase Assay» y la cantidad de proteína total mediante el kit «Bio-Rad D_c Protein Assay». Los resultados se expresaron en ng de luciferasa por mg de proteína.

2.9. Estudios de viabilidad celular

Los estudios de viabilidad celular se llevaron a cabo mediante el ensayo «Alamar Blue», que permite cuantificar la proliferación celular. Para ello, se plantearon 3×10^5 células por pocillo en DME-10 sobre placas de 48 pocillos (Iwaki Microplate 48-Well, Japón). Las células fueron transfectadas según el procedimiento del epígrafe anterior. Tras 4 horas de incubación a 37° C y 5% CO_2 , se retiró el medio de transfección y se añadió DME-10. Después de 48 horas, se retiró el medio de cultivo y se añadió 1 mL de solución de Alamar Blue al 10% en DME-10. Tras 2 horas de incubación, se determinó la absorbancia a 570 y 600 nm de 200 μL de sobrenadante, mediante un lector de placas iEMS READER (Labsystem, Finlandia). El porcentaje de viabilidad de las células tratadas con cada uno de los complejos, se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{(A_{570} - A_{600}) \text{ células tratadas} \times 100}{(A_{570} - A_{600}) \text{ células sin tratar}}$$

RESULTADOS

1. Influencia de la generación del polímero y de la relación de carga PAMAM/DNA sobre el tamaño de partícula

El tamaño de partícula se analizó mediante difracción de láser. Se prepararon formulaciones con las generaciones 4 y 5 del dendrímero PAMAM a distintas relaciones de carga, como se indicó en el apartado de «Material y Métodos».

En la Tabla 1 se observa cómo la generación del polímero influye en el tamaño de los complejos, siendo los complejos preparados con la generación 4 de mayor tamaño respecto a aquellos preparados con la generación 5. Esto se observa en todas las relaciones de carga, a excepción de la relación 1/1 (electroneutralidad), que presenta tamaños de partícula no homogéneos y superiores al resto.

TABLA 1. *Tamaño de los complejos en función de la generación del dendrímero y de la relación de carga polímero/DNA*

Relación de cargas (+/-)	Tamaño de partícula (nm)	
	Complejos G4-DNA	Complejos G5-DNA
1/1	471 ± 85	585 ± 260
2/1	150 ± 37	113 ± 11
4/1	173 ± 16	110 ± 15
6/1	160 ± 16	108 ± 3
8/1	154 ± 23	100 ± 25
10/1	153 ± 24	102 ± 10

En cuanto a la influencia de la relación de carga (cargas positivas del polímero frente a negativas del DNA) en el tamaño de partícula, no se observan diferencias significativas en los tamaños de los complejos preparados con la generación 4 o con la generación 5. La Tabla 1 muestra cómo los complejos con relación de carga 2/1 y superiores poseen una alta homogeneidad en el tamaño de partícula con desviaciones estándar muy pequeñas.

2. Influencia de la generación del polímero y la relación de carga PAMAM/DNA sobre el potencial zeta

Para estudiar la influencia de la generación del polímero y de la relación de carga sobre la carga superficial de las partículas (potencial zeta), se prepararon complejos con las generaciones 4 y 5 del dendrímero PAMAM a distintas relaciones de carga.

Como indica la Tabla 2, los complejos preparados con la generación 5 del polímero presentan un potencial zeta ligeramente superior al de los complejos formulados con la generación 4.

TABLA 2. *Potencial zeta de los complejos en función de la generación del dendrímero y de la relación de carga polímero/DNA*

Relación de cargas (+/-)	Potencial Zeta (mV)	
	Complejos G4-DNA	Complejos G5-DNA
1/1	-5 ± 5	-9 ± 3
2/1	8 ± 1	6 ± 2
4/1	9 ± 5	11 ± 6
6/1	11 ± 3	15 ± 5
8/1	11 ± 2	14 ± 4
10/1	11 ± 3	18 ± 5

Respecto a la influencia de la relación de carga, observamos que a una relación 1/1, el potencial zeta tiene un valor negativo, aunque muy cercano a la neutralidad. A partir de la relación 2/1, los valores son positivos en todos los casos. En los complejos preparados con la generación 4, el potencial zeta aumenta ligeramente con la relación de carga, hasta alcanzar una meseta a partir de 6/1 donde los valores se mantienen alrededor de 11 mV. Sin embargo, en aquellos preparados con la generación 5, el potencial zeta tiende a aumentar ligeramente con la relación de carga hasta alcanzar un valor de 18 mV en la relación 10/1.

3. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La Figura 1 muestra la imagen obtenida por AFM de los complejos preparados con PAMAM G5 a una relación de carga 10/1. Se observan que los complejos son compactos y con una morfología redondeada. No se detectaron moléculas libres de DNA, lo que determina que la mayoría del plásmido está condensado.

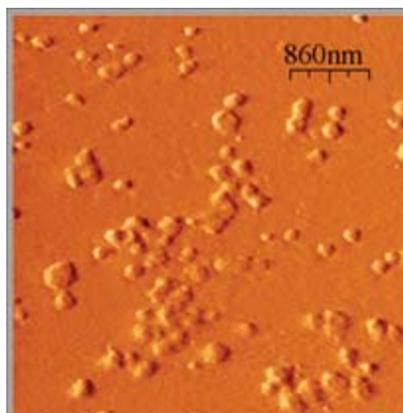


FIGURA 1. *Imágenes AFM (4,3 μm \times 4,3 μm) de los complejos G5/DNA a una relación de carga 10/1.*

4. Ensayo de condensación

Para estudiar el proceso de condensación del DNA en los complejos, se evaluó la capacidad de las generaciones G4 y G5 para desplazar a un agente intercalante, el bromuro de etidio, en su unión con el DNA.

Como se observa en la Figura 2, la curva de condensación de ambas generaciones es similar. A medida que se añaden cantidades crecientes de dendrímero, la fluorescencia relativa debida a la unión del DNA con el bromuro de etidio va disminuyendo, hasta alcanzar el grado máximo de condensación a una relación de carga de 4/1 para PAMAM G4 y de 2/1 para PAMAM G5.

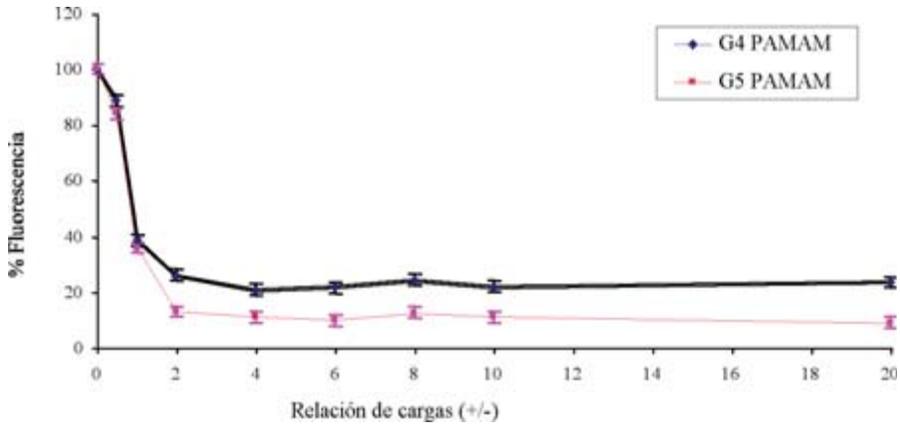


FIGURA 2. *Estudio de condensación de los complejos.*

5. Caracterización de la unión PAMAM-DNA en los complejos

Para demostrar la unión del dendrímero PAMAM al DNA se realizó un gel de retardo. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 3.

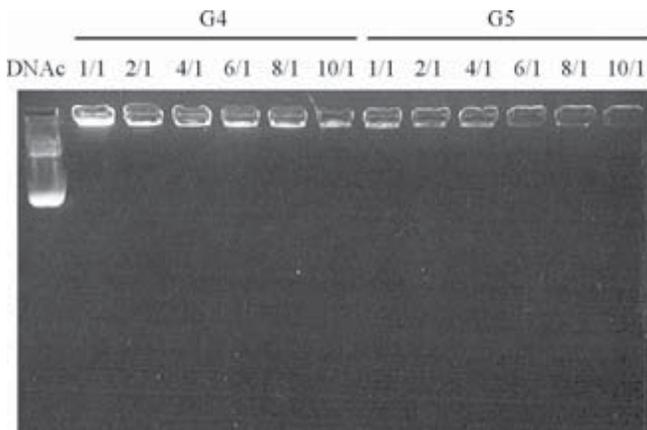


FIGURA 3. *Gel de retardo para los distintos complejos preparados.*

El gel de retardo es el resultado de los efectos electrostáticos y estéricos debidos a la formación del complejo cargado entre el den-

drímero catiónico y el DNA. En la primera columna del gel aparecen las bandas del DNA control correspondientes tanto al DNA circular abierto como al superenrollado. Las siguientes columnas corresponden al DNA acomplejado a distintas relaciones de carga con las generaciones 4 y 5 del dendrímero. Ambas generaciones son capaces de retener e inmovilizar el pDNA en el gel. La retención total del plásmido se produce en todas las relaciones de carga, desde 1/1 hasta 10/1.

6. Protección del pDNA frente a la degradación enzimática por DNAsas

Para estudiar la protección del pDNA al ser condensado en los complejos, éstos se incubaron a 37° C en presencia de la enzima DNasa I y se analizó el pDNA una vez realizada la desacomplejación. Los resultados aparecen en la Figura 4.

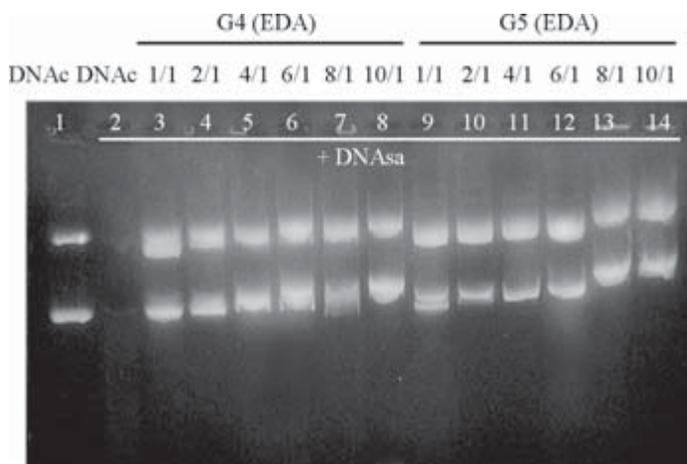


FIGURA 4. *Estudio de protección frente a DNAsas de los distintos complejos preparados.*

En el gel se observa cómo el pDNA control (columna 1) aparece intacto, presentando las dos bandas correspondientes al DNA superenrollado y al abierto circular; por el contrario, el pDNA desnudo incubado en presencia de DNAsas (columna 2) aparece totalmente degradado tras 30 minutos de incubación. En el resto de las colum-

nas, correspondientes al pDNA obtenido tras la ruptura de los complejos preparados con PAMAM G4 (columnas 3-8) y PAMAM G5 (columnas 9-14) incubados 30 minutos en presencia de DNAsa, el pDNA está totalmente protegido independientemente de la relación de carga o de la generación.

7. Evaluación *in vitro* en cultivos celulares

Para la evaluación *in vitro* de las formulaciones galénicas se realizaron estudios de eficacia de transfección y de toxicidad en las líneas celulares HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) y CT26 (células de cáncer de colon de ratón).

7.1. Eficacia de transfección

Los resultados de la eficacia de transfección *in vitro* aparecen recogidos en la Figura 5. Las células fueron transfectadas con los complejos preparados con las generaciones 4 y 5 del polímero a distintas relaciones de carga. También se transfectaron con DNA desnudo (control) para poder evaluar las diferencias en la expresión génica entre el DNA libre y el condensado. Se observó que el DNA desnudo presentaba una eficacia de transfección prácticamente nula.

Los complejos PAMAM G5/DNA presentan eficacias de transfección 5 y 30 veces superiores a los formulados con PAMAM G4 en HepG2 y CT26, respectivamente. Además, si analizamos los valores de transfección dentro de una misma generación, observamos que en ambos casos la expresión de luciferasa aumenta con la relación de carga hasta alcanzar su máximo nivel a 10/1. En este punto máximo, los complejos preparados con las generaciones 4 y 5 presentan una eficacia de transfección 50 y 250 veces superior respecto al DNA solo, respectivamente en la línea celular HepG2 (Figura 5A). En las células CT26, el incremento respecto al control fue 7 y 225 veces mayor para los complejos de PAMAM G4 y G5, respectivamente (Figura 5B). En la Figura 6 se muestran las eficacias de transfección de los complejos en presencia o ausencia de suero. Los resultados indican que los valores de expresión en presencia de suero fueron superiores en todos los casos.

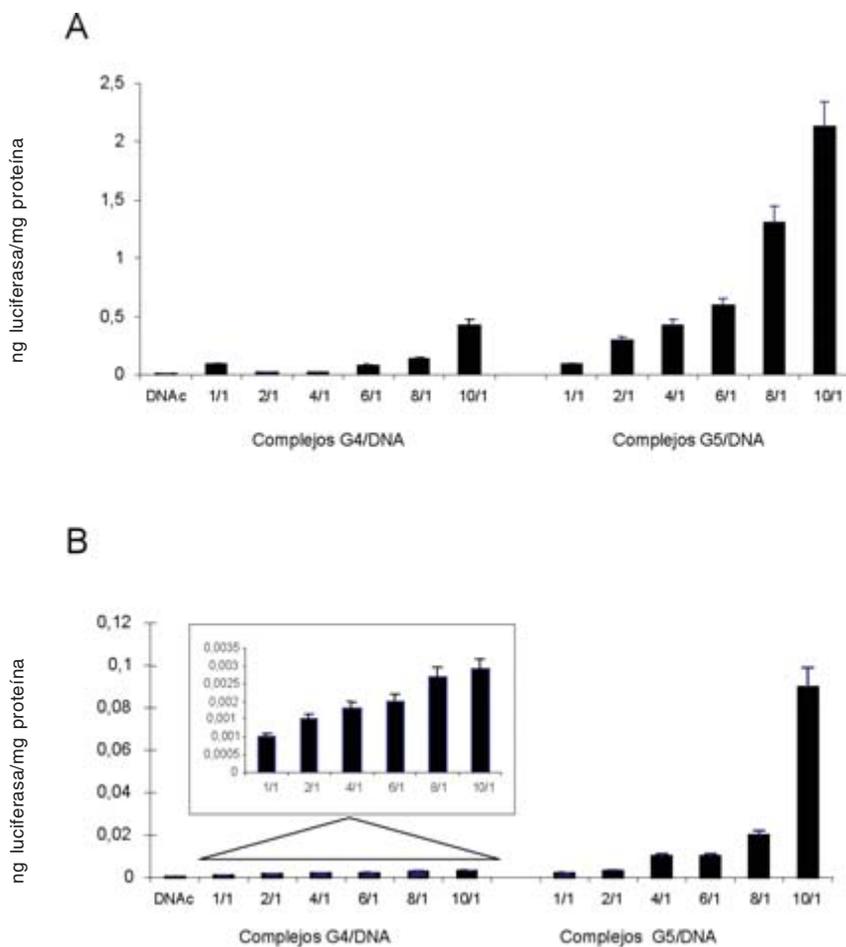


FIGURA 5. *Transfección in vitro de las células HepG2 (A) y CT26 (B) con los complejos PAMAM/DNA a distintas relaciones de carga en presencia de un 60% de suero. La cantidad de DNA por pocillo fue de 1 μ g. Los datos se representan como la media \pm d.s. de tres pocillos.*

7.2. Estudio de viabilidad celular

Como muestra la Figura 7, la mayoría de los complejos presentan viabilidades cercanas al 90% y en ningún caso inferiores al 80%, independiente de la relación de carga o de la generación empleada.

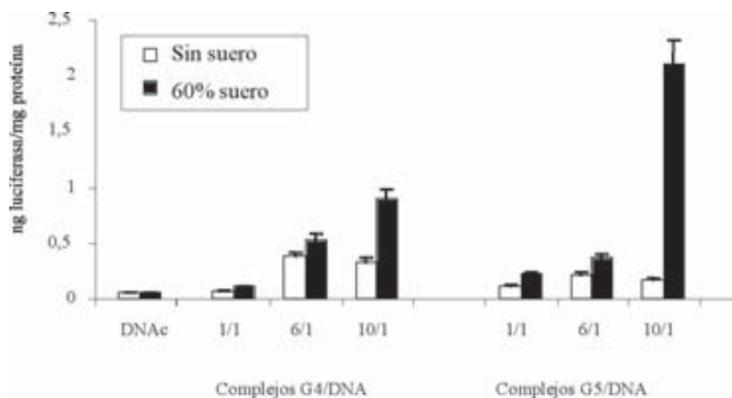


FIGURA 6. *Transfección in vitro en HepG2 de los complejos PAMAM/DNA en presencia o ausencia de suero. La cantidad de DNA por pocillo fue de 1 μ g. Los resultados se expresan como la media \pm d.s. de tres pocillos.*

DISCUSIÓN

En este trabajo se han preparado y caracterizado nuevas fórmulas galénicas en presencia del polímero PAMAM y el plásmido DNA y se ha evaluado su eficacia de transfección y su citotoxicidad *in vitro*.

Muchos de los vectores desarrollados en terapia génica no viral están basados en moléculas catiónicas que se unen al DNA mediante interacción electrostática. Cuando estas moléculas son de naturaleza polimérica forman estructuras denominadas «poliplejos». En la actualidad, el proceso de unión, transferencia y expresión del material genético no ha sido totalmente elucidado. Se piensa que la naturaleza del complejo determina en gran parte la eficacia de transfección, y que la formación de complejos con el DNA condensado facilita la entrada del material génico en las células.

Para caracterizar las formulaciones preparadas en este trabajo, se realizaron medidas de tamaño y carga superficial, estudios de retardo en gel de agarosa y ensayos de condensación.

En la determinación del tamaño y potencial zeta de los complejos se estudió la influencia de la generación y de la relación de carga. La generación 5 dobla en su número de grupos amino terminales a la generación 4, es decir, posee un mayor número de cargas positivas

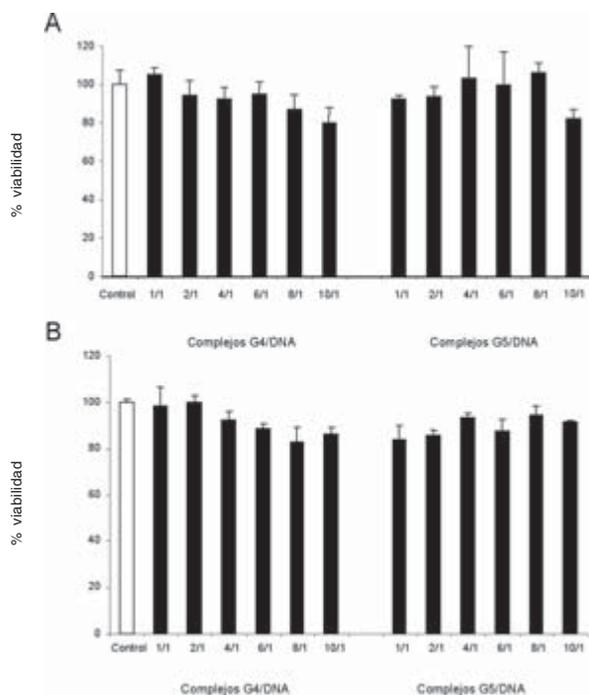


FIGURA 7. *Viabilidad celular. Efecto de los complejos PAMAM/DNA sobre la viabilidad celular en HepG2 (A) y CT26 (B). Los resultados se expresan como la media \pm d.s. de tres pocillos.*

en su superficie, lo que explicaría que al aumentar la generación, los complejos disminuyan ligeramente su tamaño y aumenten su carga superficial (Tablas 1 y 2). Por otro lado, con el incremento en la relación de carga, el exceso de cargas positivas es mayor, haciendo que las formulaciones tiendan a aumentar su potencial zeta. La relación 1/1 supone un equilibrio de las cargas presentes en el complejo (electroneutralidad) que da lugar a tamaños mayores y poco homogéneos en comparación con el resto.

En los ensayos de condensación se estudió la afinidad entre el dendrímero y el DNA, analizando su capacidad para desplazar al bromuro de etidio en su unión al plásmido. Como muestra la Figura 2, a partir de la relación 2/1 y 4/1, respectivamente, para PAMAM G4 y G5, no se observan variaciones en la fluorescencia relativa, lo que indica que se ha alcanzado el grado máximo de condensación del

DNA. Podemos afirmar que la generación G5 tiene una mayor capacidad de condensación (porque la disminución en la fluorescencia relativa es mayor con respecto a la G4) y una mayor eficacia de condensación (porque se alcanza el máximo grado de condensación a menor relación de carga).

Las imágenes obtenidas por AFM muestran complejos compactos y de tamaño similar al obtenido por difracción de láser. Además confirman los estudios de condensación, ya que no se observan moléculas libres de DNA (Figura 1).

Para analizar la formación y estabilidad de estas formulaciones PAMAM/DNA, se llevó a cabo un gel de retardo (Figura 3). Se evaluó la capacidad del dendrímero para retener el DNA mediante electroforesis en gel de agarosa. Los dos pesos moleculares del polímero son capaces de provocar la retención total del plásmido en todas las relaciones de carga preparadas. Este retardo en la migración no se produce con generaciones pequeñas (G3 e inferiores), pero se ha observado con generaciones superiores (G4-G10). Todo ello sugiere que es necesario un peso molecular y una carga superficial mínima para que el dendrímero acompleje de manera eficaz el DNA.

El DNA es altamente susceptible de ser degradado por las DNAsas presentes en el suero. Este hecho hace que muchos de los vectores empleados en terapia génica no funcionen *in vivo*. Por esto se llevó a cabo un estudio *in vitro* para analizar si el DNA acomplejado estaba protegido frente a las DNAsas. Se observó cómo el material génico permanecía íntegro independientemente de la relación de carga preparada y la generación del dendrímero utilizada, mientras que el DNA en ausencia de polímero era totalmente degradado (Figura 4). Además, los estudios *in vitro* posteriores (Figuras 5 y 6) confirmaron la capacidad protectora de los complejos.

La evaluación *in vitro* mostró diferencias significativas entre las distintas formulaciones. La generación del polímero y la relación de carga influyen en la eficacia de transfección (Figura 5). Por un lado, la actividad de transfección de los complejos formulados con PAMAM G5 es notablemente superior a la de PAMAM G4 en las dos líneas celulares evaluadas. Este aumento en la transfección puede ser debido a que los complejos formulados con la generación 5 tienen menor tamaño y mayor potencial zeta. Un menor tamaño favorece el proce-

so de internalización mediado por endocitosis y un exceso de cargas positivas favorece la interacción con las glicoproteínas aniónicas y los fosfolípidos de la membrana celular y con ello la internalización del complejo. Por otro lado, el aumento de la relación de carga resultó en un incremento progresivo de la eficacia de transfección tanto en HepG2 como en CT26. Un aumento en la relación de carga supone un exceso de las cargas positivas existentes en el complejo, ya que se van añadiendo cantidades crecientes de dendrímero catiónico, con lo que se favorece la interacción con la membrana celular, y en consecuencia la internalización del complejo.

Las dos líneas celulares evaluadas presentan niveles de expresión muy distintos, obteniéndose mejores resultados en las células HepG2 (Figura 5A). Los bajos niveles de expresión génica obtenidos en CT26 hacen que las diferencias en la eficacia de transfección de los distintos complejos se aprecien peor en esta línea celular. Las células CT26 ofrecen gran dificultad a la hora de ser transfectadas. De hecho, existen muy pocos estudios de transfección con células CT26, y en la revisión bibliográfica que se realizó para este trabajo no se encontró ningún dato de transfección con PAMAM G4 y G5 para esta línea celular.

Cabe asimismo señalar que todas las transfecciones celulares que se han realizado en este trabajo han sido en presencia de 60% de suero (FBS), a diferencia de la mayoría de las transfecciones descritas en la bibliografía, que se realizan en ausencia o en presencia de bajas concentraciones de suero.

La protección que ofrecen los complejos PAMAM-DNA frente a la degradación por DNAsas contribuye también a los valores de eficacia de transfección obtenidos. Es más, se observa que en presencia de suero la eficacia de transfección aumenta con respecto a los experimentos realizados sin suero (Figura 6). Este efecto ya ha sido observado en otros vectores desarrollados por nuestro equipo y puede ser debido a una mayor estabilidad físico-química de los complejos en presencia de suero.

Cabría pensar que las diferencias en la eficacia de transfección de los distintos complejos y líneas celulares se pudieran deber a diferencias en la toxicidad de los complejos. A determinadas dosis el PAMAM puede llegar a ser citotóxico mediante una fuerte interacción con la membrana celular y la consecuente ruptura de la misma.

En los primeros estudios realizados con dendrímeros similares (15) se obtuvieron bajas eficacias de transfección a relaciones de carga superiores a 6/1 debido a un incremento de la citotoxicidad. Sin embargo, los estudios de viabilidad realizados en este trabajo demostraron una supervivencia celular superior al 80% para todas las formulaciones y en ambas líneas celulares (Figura 7).

Por último, destacar que el método de preparación de los complejos PAMAM-DNA mediante la simple mezcla de ambos componentes, hace que puedan ser preparados a gran escala y de manera sencilla, lo que supone una gran ventaja frente a otros vectores utilizados en terapia génica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Universidad de Navarra (FUN) y por el Gobierno de Navarra (Departamento de Educación).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HAENSLER, J. y SZOKA, F. C. JR. (1993): Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* 4: 372-379.
- (2) SONAWANE, N. D.; SZOKA, F. C. JR. y VERKMAN, A. S. (2003): Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J. Biol. Chem.* 278: 44826-44831.
- (3) DUFES, C.; UCHEGBU, I. F. y SCHATZLEIN, A. G. (2005): Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57: 2177-2202.
- (4) DENNING, J. y DUNCAN, E. (2002): Gene transfer into eukaryotic cells using activated polyamidoamine dendrimers. *J. Biotechnol.* 90: 339-347.
- (5) TANG, M. X.; REDEMANN, C. T. y SZOKA, F. C. JR. (1996): *In vitro* gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* 7: 703-714.
- (6) BIELINSKA, A. *et al.* (1996): Regulation of *in vitro* gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 24: 2176-2182.
- (7) BRAUN, C. S. *et al.* (2005): Structure/function relationships of polyamidoamine/DNA dendrimers as gene delivery vehicles. *J. Pharm. Sci.* 94: 423-436.
- (8) HARADA, Y. *et al.* (2000) Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by epstein-barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer. *Cancer Gene Ther.* 7: 27-36.

- (9) KUKOWSKA-LATALLO, J. F. *et al.* (2000): Intravascular and endobronchial DNA delivery to murine lung tissue using a novel, nonviral vector. *Human Gene Ther.* 11: 1385-1395.
- (10) KIHARA, F. *et al.* (2003): *In vitro* and *in vivo* gene transfer by an optimized alpha-cyclodextrin conjugate with polyamidoamine dendrimer. *Bioconjug. Chem.* 14: 342-350.
- (11) MARUYAMA-TABATA, H. *et al.* (2000): Effective suicide gene therapy in vivo by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine dendrimer. *Gene Ther.* 7: 53-60.
- (12) RUDOLPH, C. *et al.* (2000): *In vivo* gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J. Gene Med.* 2: 269-278.
- (13) HUDDE, T. *et al.* (1999): Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Ther.* 6: 939-943.
- (14) WANG, Y. *et al.* (2000): DNA/dendrimer complexes mediate gene transfer into murine cardiac transplants ex vivo. *Mol. Ther.* 2: 602-608.
- (15) YOO, H. y JULIANO, R. L. (2000): Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 28: 4225-4231.
- (16) MAMEDE, M. *et al.* (2004): Hepatocyte targeting of 111 In-labeled oligo-DNA with avidin or avidin-dendrimer complex. *J. Control Release.* 95: 133-141.
- (17) DUNCAN, R. e IZZO, L. (2005): Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 2215-2237.
- (18) BOAS, U. y HEEGAARD, P. M. (2004): Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* 33: 43-63.
- (19) FISHER, D. *et al.* (2003): *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials.* 24: 1121-1131.
- (20) ROBERTS, J. C.; BHALGAT, M. K. y ZERA, R. T. (1996): Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J. Biomed. Mater. Res.* 30: 53-65.
- (21) RAJANANTHANAN, P. *et al.* (1999): Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses. *Vaccine.* 17: 715-730.
- (22) KOBAYASHI, H. *et al.* (2001): Novel liver macromolecular MR contrast agent with a polypropylenimine diaminobutyl dendrimer core: comparison to the vascular MR contrast agent with the polyamidoamine dendrimer core. *Magn. Reson. Med.* 46: 795-802.
- (23) SVENSON, S. y TOMALIA, D. A. (2005): Dendrimers in biomedical applications- reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 2106-2129.
- (24) WADA, K. *et al.* (2005): Enhancing effects of galactosylated dendrimer/alpha-cyclodextrin conjugates on gene transfer efficiency. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 500-505.
- (25) KIM, T. I. *et al.* (2004): PAMAM-PEG-PAMAM: novel triblock copolymer as a biocompatible and efficient gene delivery carrier. *Biomacromolecules.* 5: 2487-2492.

————— *Artículo original* —————

Estudio morfológico de la neurocarcinogénesis experimental inducida por nitroso-ureas

Recibido el 28 de enero de 2008

ZURITA, M.; VAQUERO, J. *; OYA, S.; BONILLA, C.
Y AGUAYO, C.

*Unidad de Investigación en Neurociencias
del Hospital Universitario Puerta de Hierro. Madrid*

RESUMEN

En el presente trabajo se hace una revisión de la neurocarcinogénesis química, con especial referencia a los tumores del Sistema Nervioso inducidos por etil-nitrosourea en la rata Wistar. El estudio morfológico de los tumores del Sistema Nervioso Central y del Sistema Nervioso Periférico inducidos por exposición prenatal a este carcinógeno (50 mg/kg día 17 de gestación) muestra la aparición de tumores compatibles con un diagnóstico histológico de schwannoma maligno o de oligodendroglioma. Sin embargo, los estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales permiten clasificar a estos tumores, independientemente de su morfología, como tumores malignos, de tipo neuroectodérmico indiferenciado, con posibilidad de diferenciación hacia líneas neuronales y gliales. Sus características biológicas y su posible diagnóstico *in vivo*, por medio de Resonancia Magnética, hacen que este modelo de neurocarcinogénesis sea extraordinariamente útil para valorar el efecto de nuevos tratamientos farmacológicos, aplicables a tumores cerebrales malignos en el hombre.

Palabras clave: Etil-nitrosourea.—Tumores cerebrales experimentales.—Neurocarcinogénesis.

* Resumen del trabajo galardonado con el Premio «Consejo General de Colegios Farmacéuticos», 2007.

Correspondencia:
Doctor J. Vaquero. Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario Puerta de Hierro. San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid.
E-mail: jvaquero@telefonica.net.

SUMMARY

Morphological study of the experimental neurocarcinogenesis induced by nitrosoureas

This work shows a revision of the chemical neurocarcinogenesis, with special reference to the Nervous System tumors induced by ethyl-nitrosourea in the Wistar rat. Prenatal administration of this carcinogen (50 mg/kg, day 17 of pregnancy) induces Nervous System tumors with histological features of malignant schwannomas or oligodendrogliomas. However, and independently of their morphology, the immunohistochemical and ultrastructural studies allow to classify to these tumors as undifferentiated malignant tumors, with tumor cells showing possible differentiation toward neuronal and glial phenotypes. Their biologic properties and their possible diagnosis *in vivo*, by means of Magnetic Resonance, make this neurocarcinogenesis model to be extraordinarily useful to value the effect of new drug treatments, applicable to human malignant brain tumors.

Keywords: Ethyl-nitrosourea.—Experimental brain tumors.—Neurocarcinogenesis.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los carcinógenos químicos ha estimulado la investigación neuro-oncológica ya que, tras su aplicación sistémica, estos compuestos inducen un alto índice de tumores en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) (1-23). Algunos de estos compuestos tan sólo de forma ocasional inducen tumores en el SNC de animales adultos, pero representan, sin embargo, poderosos agentes neuro-oncogénicos cuando se administran transplacentariamente o durante las primeras etapas del desarrollo de la vida postnatal. La capacidad de inducir tumores neurogénicos depende en muchos casos del modo de aplicación de carcinógeno, y así, compuestos como el 20-metilcolantreno, 1,2,5,6-dibenziantraceno y 3,4-benzopireno sólo producen tumores en el Sistema Nervioso después de su aplicación local (24). Por otra parte, algunos de los compuestos químicos que inducen tumores neurogénicos tras su administración sistémica pueden además producir tumores locales en el lugar de aplicación. Sin embargo, en las últimas décadas se ha señalado la superioridad de los compuestos nitrosos para desarrollar tumores cerebrales experimentales. La mayoría de los compuestos nitrosos actúan como potentes agentes neuro-oncogénicos que favorecen

la aparición de tumores selectivos en diferentes órganos, además de los propios del Sistema Nervioso, siendo eficaces en un amplio rango de animales experimentales. Entre ellos, destacan la N-metil-nitrosourea y la N-etil-nitrosourea.

La metilnitrosourea (MNU) fue el primer carcinógeno químico utilizado, que producía un alto índice de tumores en el Sistema Nervioso después de su administración sistémica (5). Su efecto neuro-oncogénico en ratas depende en gran medida del modo de aplicación. La administración en ratas adultas de una sola dosis de MNU (70-100 mg/kg) induce el desarrollo de tumores malignos en varios órganos y tejidos. Sin embargo, en este caso, los tumores cerebrales están prácticamente ausentes (25) o aparecen con una incidencia menor del 10% de los animales experimentales. Cuando la MNU es administrada en dosis repetidas de forma oral induce tumores cerebrales en un 65-80% de los animales experimentales, entre un 54-72% cuando se aplica intraperitonealmente y en un 38% cuando se inyecta de manera subcutánea. Este hecho parece ser debido a la gran inestabilidad que presenta la MNU *in vivo*, lo que resulta en una parcial degradación de la molécula en el lugar de aplicación y por lo tanto una disminución de la concentración de MNU que entra en la circulación sistémica. La administración intraperitoneal, oral o subcutánea de la MNU puede provocar también la aparición de tumores locales en el lugar de aplicación, además de los inducidos en el Sistema Nervioso.

La administración crónica de etilnitrosourea (ENU) en ratas BD adultas (10 mg/kg semanal, dosis total de 250 mg/kg) induce tumores neurogénicos en el 25% de los animales. Una simple inyección intravenosa de 60, 140 y 200 mg/kg induce tumores en el Sistema Nervioso en el 6, 45 y 60% de los animales, respectivamente. Por otra parte, una sola inyección intravenosa de 40-80 mg/kg en ratas en el día 15 de gestación, induce tumores malignos en el SNC y SNP en el 98-100% de la descendencia. Por otra parte, la incidencia, distribución, histología de los tumores y el tiempo de supervivencia de los animales se ven influenciados por la especie y la edad de los animales, además de por la dosis y el modo de aplicación del carcinógeno.

Los tumores inducidos por ENU en el Sistema Nervioso son morfológicamente similares a los oligodendrogliomas y «schwannomas» de la neuropatología humana y el estudio de las etapas precoces del

desarrollo de los tumores experimentales inducidos por nitrosureas sugieren que la mayoría de los gliomas se originan en la región de la placa subependimaria del tubo neural que deriva directamente de la capa germinal. Esta capa representa una zona activa de división y diferenciación celular, y es posiblemente la zona blanco para el carcinógeno.

La secuencia del desarrollo de los tumores cerebrales inducidos por la administración transplacentaria de ENU en ratas muestra un período de latencia que es el intervalo de tiempo transcurrido entre el nacimiento y las primeras manifestaciones neurológicas. Este período generalmente se ha estimado entre 5 ó 6 meses. Cuando se sacrifican los animales durante este período de tiempo, se pueden observar lesiones tumorales con distintos grados de desarrollo.

Teniendo en cuenta los escasos datos de que aún se dispone acerca de las características biológicas de los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar, además del gran número de dudas que existen sobre la correcta clasificación de los tumores inducidos por nitrosoureas en roedores y las recientes observaciones ultraestructurales acerca de que algunos de estos tumores incluyen células indiferenciadas, nos planteamos como hipótesis que el carcinógeno (ENU) podría actuar sobre un elemento celular indiferenciado capaz de diferenciarse en el desarrollo ontogénico de forma dual, hacia la línea glial o neuronal, en cuyo caso, las características de los tumores ENU-inducidos deberían ser propias de neoplasias neuroectodérmicas primitivas.

Basándonos en la hipótesis planteada, en el presente trabajo de investigación hemos realizado un diseño experimental sobre la acción de la ENU en la rata Wistar, tras una dosis establecida y administrada en el día 17 del desarrollo postnatal, planteándonos los siguientes objetivos: 1. Estudiar el número, tipo histológico y latencia de inducción de los tumores experimentales. 2. Estudiar la posible utilidad de la Resonancia Magnética convencional para el diagnóstico *in vivo* de tumores cerebrales experimentales en roedores. 3. Estudiar las características ultraestructurales de los tumores inducidos por este modelo experimental. 4. Estudiar los marcadores inmunohistoquímicos que expresan dichos tumores, al objeto de clarificar las dudas actualmente existentes en la literatura acerca de su correcta clasificación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo hemos partido de seis ratas Wistar adultas, gestantes. Todos los procedimientos experimentales se hicieron de acuerdo con las directrices de la «Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio» preparada por la National Academy of Sciences (USA) y el Comité de Ética para experimentación con animales de laboratorio del Hospital Puerta de Hierro aprobó el estudio.

El día 17 de gestación, cada una de las ratas recibió una dosis única por vía intraperitoneal de ENU (50 mg/kg) en suero fisiológico. Tras finalizar el período de gestación, de estos seis animales se obtuvieron un total de 48 crías. Cada camada fue mantenida con su madre respectiva hasta los 25 días de edad, momento en el que fueron mezcladas todas las crías, y se escogieron al azar 14 animales que sirvieron de base al presente estudio. Los 14 animales fueron mantenidos en las condiciones habituales del laboratorio, con una temperatura ambiente aproximada de 22° C y alimentación uniforme (dieta A.04 de Panlab, S. A. y agua a demanda), además éstos fueron evaluados diariamente hasta la aparición de síntomas neurológicos, momento en que fueron sometidos a estudios de Resonancia Magnética (RM) a fin de verificar la presencia de un tumor intracraneal. Dichos estudios se realizaron mediante un aparato convencional de uso para el diagnóstico clínico, con una intensidad de campo magnético de 0,5 Teslas. Los parámetros generalmente empleados fueron un área de estudio (FOV) de 15 cm, una matriz de 192 × 192, cortes con espesor de 2 ó 4 mm, y secuencias de spin-echo (SE) con potenciación T1 y T2, y de gradient-echo (GE) con potenciación en T1. En la mayor parte de las exploraciones se completó el estudio con la administración de contraste paramagnético (gadolinio-DPTA), a la dosis de 1 cc por vía intraperitoneal. Durante el tiempo de exploración (aproximadamente 30 minutos para cada caso), los animales permanecieron anestesiados (con 0,15 cc de clorhidrato de ketamina y 0,1 cc de valium por cada 100 gr de peso del animal) con respiración espontánea y en su posición anatómica habitual. Posteriormente estos animales fueron sacrificados mediante sobredosisificación anestésica, y sometidos de forma inmediata a estudio necrópsico completo. Tras dichos estudios, los tumores del Sistema Nervioso

obtenidos fueron doce tumores intracerebrales y seis tumores extraparenquimatosos en la base del cráneo, incluyendo un tumor que nació en una raíz cervical de la médula espinal. Estas neoplasias se aislaron y dividieron para su posterior estudio histológico, inmunohistoquímico y de microscopía electrónica.

RESULTADOS

Tumores inducidos y período de latencia

Los 14 animales que sirvieron de base para el presente estudio desarrollaron un total de 18 tumores macroscópicos del Sistema Nervioso, de los cuales doce se hallaban localizados intracerebralmente a nivel de la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales, y seis de ellos eran tumores extraparenquimatosos originados en la base del cráneo a nivel del nervio trigémino o del ganglio de Gasser, excepto un caso que se desarrolló en la región cervical de la médula espinal. En ningún caso se encontró más de un tumor de iguales características y localización en el mismo animal, obteniéndose, sin embargo, cuatro animales que sí habían desarrollado simultáneamente un tumor cerebral intraparenquimatoso y un tumor extraparenquimatoso en la base del cráneo. Las neoplasias que primero se desarrollaron en los animales fueron los tumores de la región del ganglio de Gasser y del nervio trigémino. Estas neoplasias comenzaron a dar síntomas neurológicos tras un período de latencia que osciló entre los cuatro y siete meses después de la administración del carcinógeno, dándose el caso de un tumor que se extendió por la base del cráneo e invadió estructuras extracraneales. A partir de los ocho meses dejaron de aparecer estos tumores, desarrollándose entonces las neoplasias intracerebrales, que comenzaron a hacerse sintomáticas entre los ocho y diez meses de edad de los animales.

Estudios de resonancia magnética

En todos los animales con un tumor cerebral macroscópico, la RM fue positiva, delimitando claramente la localización y extensión de la lesión. En todos los casos, los tumores detectados con la téc-

nica de RM correspondían a neoplasias que tenían un diámetro superior a los 3 mm, siendo siempre visibles macroscópicamente en el estudio necrópsico de los animales.

A pesar de que, al menos en seis de los animales estudiados con RM, existían en el momento de la exploración, focos histológicos compatibles con los conceptos de «microtumor» o de «proliferación inicial neoplásica», estas lesiones no fueron detectadas con los parámetros de RM utilizados. Los tumores detectados por RM fueron, de forma característica, hipointensos en T1 e hiperintensos en T2, y también característicamente, mostraron un claro aumento de señal tras la administración de gadolinio (Figuras 1 y 2).

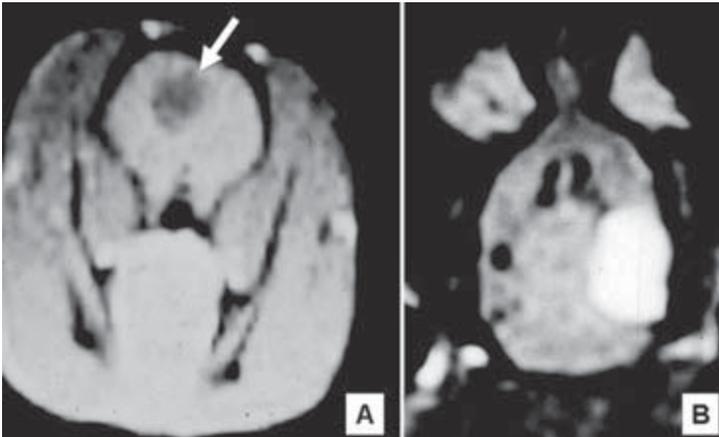


FIGURA 1. **A:** Resonancia Magnética (RM) en fase T1, corte coronal, en un tumor cerebral experimental inducido por exposición prenatal a ENU. La flecha señala el tumor, que se delimita por su hipointensidad. **B:** Tumor hemisférico en RM (fase T1, tras administración de contraste paramagnético, corte axial) que se delimita por su hiperintensidad.

Estudio morfológico de los tumores con aspecto de neurinoma

Estas neoplasias desarrolladas en la base del cráneo, a partir de los trayectos iniciales del V par craneal y el tumor localizado en la raíz espinal, se muestran macroscópicamente, como tumores bien definidos, que se identifican como masas de tejido tumoral de espec-

to fusiforme, consistencia firme y a veces quística, apareciendo generalmente bien encapsulados (Figura 3A).

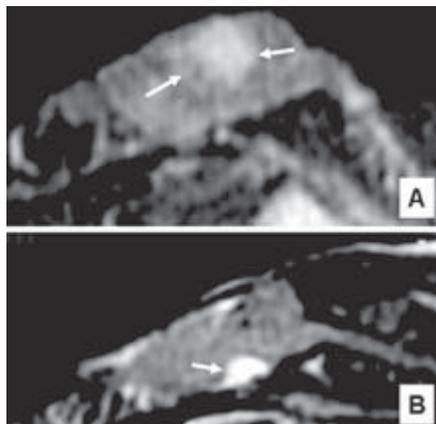


FIGURA 2. **RM de tumores cerebrales experimentales (flechas) inducidos por exposición prenatal a ENU.** **A:** Fase T1 tras administración de contraste, mostrando un tumor intraparenquimatoso. **B:** RM (T1 tras administración de contraste) mostrando un tumor basal, extraparenquimatoso, localizado a nivel del ganglio de Gasser. Cortes en proyección axial.

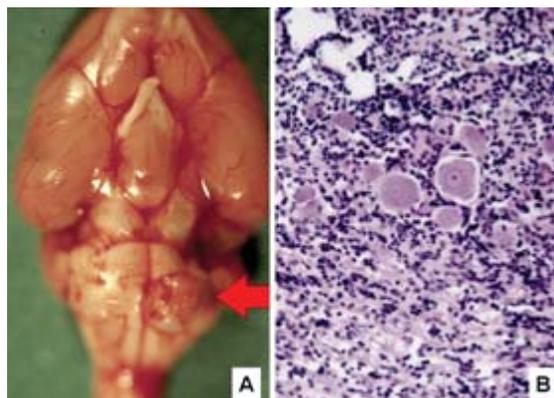


FIGURA 3. **Tumores basales, extraparenquimatosos, inducidos por exposición prenatal a ENU.** **A:** Aspecto macroscópico del tumor (flecha), localizado a nivel de la emergencia del nervio trigémino. **B:** Aspecto histológico del tumor. Se aprecian células de aspecto neuronal, atrapadas en el tumor, que pueden corresponder a neuronas del ganglio de Gasser. Entre ellas se aprecia una población de células con aspecto indiferenciado.

El estudio con microscopía óptica, utilizando la técnica convencional para microscopía óptica de Hematoxilina-Eosina, muestra que estas neoplasias presentan una serie de características histológicas análogas a las clásicamente admitidas en neurocarcinogénesis experimental para clasificar los «schwanomas malignos» o «neurinomas malignos». Se observa, por lo general, una población celular muy isomorfa, formada por células pequeñas, de núcleo oscuro y más o menos redondeado, generalmente en posición central, que tienen el aspecto típico de las células indiferenciadas. Además, estos neurinomas malignos presentan una gran celularidad y es posible observar en ellos un elevado número de figuras de mitosis. Entremezcladas con las células pequeñas de aspecto indiferenciado que constituyen el tumor, existen en menor proporción una población de células de mayor tamaño, que corresponden a neuronas atrapadas, posiblemente provenientes del ganglio de Gasser (Figura 3B).

Por otra parte, en estas neoplasias existe una gran vascularización, con hiperplasia de los vasos y es típico la formación de grandes espacios quísticos. En algunas ocasiones, aunque muy raramente, es posible encontrar zonas de necrosis.

Sin embargo, a pesar del gran isomorfismo celular que caracteriza a estas neoplasias, en algunas ocasiones, es posible observar pequeñas zonas tumorales, constituidas por una población celular que no posee el aspecto típico de las células indiferenciadas características de estos tumores, sino que se muestran como células de aspecto fusiforme y dispuestas en empalizada, predominando en algunos casos un tejido de aspecto compacto o, por el contrario, a veces se puede observar la existencia de un tejido más laxo de aspecto reticular.

El estudio de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos tanto de la línea glial como de la línea neuronal sobre estos aparentes neurinomas, nos reveló que en todos los casos existía una clara positividad a la proteína S-100 y a la sinaptofisina de forma muy marcada. Sin embargo, la proteína de NF mostró una positividad en menor grado, limitándose a determinados grupos celulares. La vimentina fue claramente positiva sólo en tres de los seis casos estudiados y dudosamente positiva en el resto. Por último la detección de la PGA fue negativa en todos los casos. Los marcadores neuro-

blásticos específicos, como el NB-84, fueron muy positivos en todos los casos (Figura 4A).

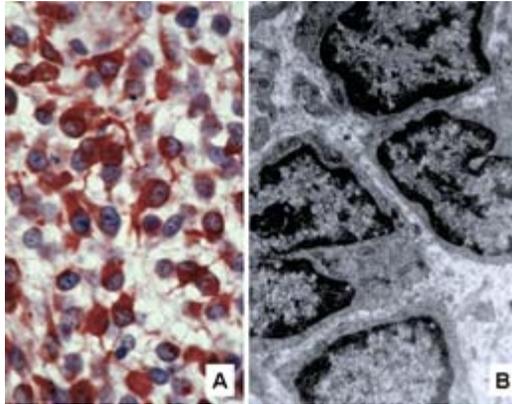


FIGURA 4. **A:** Positividad inmunohistoquímica al marcador neuroblástico NB-84 en las células de los tumores ENU-inducidos que se desarrollan a nivel de la base del cráneo. **B:** Estudio de microscopía electrónica que muestra el carácter indiferenciado de las células tumorales.

En el estudio ultraestructural de estas neoplasias se observó la existencia de al menos dos tipos celulares. Por un lado, existía un tipo celular que correspondía a las llamadas células de Schwann neoplásicas. Estas son células de núcleo oscuro, cuya cromatina se halla condensada formando un anillo en torno a la membrana nuclear y el citoplasma se presenta formando una serie de prolongaciones ondulantes. En el interior de estas células es posible observar, en algunas ocasiones, la presencia de figuras de mielina. El otro tipo celular encontrado estaba constituido por unas células pequeñas, de núcleo oscuro y redondeado generalmente dispuesto en posición central. La cromatina se hallaba condensada en la periferia nuclear. Estas células mostraban un citoplasma denso de escasa cuantía, que presentaba abundante RER, con ribosomas y polirribosomas libres, así como gran cantidad de mitocondrias de matriz densa, lisosomas primarios y ocasionales microtúbulos, mostrando un aspecto bastante indiferenciado, semejante al de los típicos neuroblastos (Figura 4B). Algunas de estas células además pueden mostrar prolongaciones citoplasmáticas, que indican su posible diferenciación neuronal.

Por último, entremezcladas con estos dos tipos de células, era posible observar la existencia de unas células pequeñas que mostraban un escaso citoplasma y una configuración nuclear mucho más irregular, conteniendo núcleos grandes con numerosas indentaciones y cuya cromatina se hallaba condensada en la periferia nuclear, que fueron interpretadas como células tumorales indiferenciadas con una morfología nuclear más irregular.

Estudio morfológico de los tumores con aspecto de oligodendroglioma

Estas neoplasias comienzan a desarrollarse aproximadamente a los 210 días de la vida del animal, localizándose siempre a nivel de la sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales. Muestran un aspecto macroscópico de tumores bien definidos, que con frecuencia presentan características hemorrágicas y focos de necrosis (Figura 5). En algunas ocasiones estos tumores desarrollan, al igual que los neurinomas del trigémino, grandes cavidades quísticas.

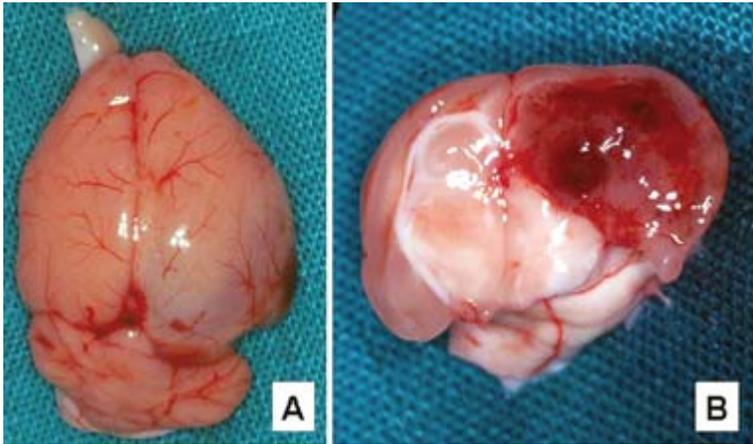


FIGURA 5. Aspecto macroscópico de un tumor cerebral experimental, inducido por exposición prenatal a ENU. A: El hemisferio cerebral derecho se encuentra hinchado por la presencia del tumor intraparenquimatoso.

B: Aspecto macroscópico del tumor.

Los estudios de microscopía óptica sobre estos tumores mostraron una serie de características histológicas, mediante las cuales estas neoplasias podrían ser clasificadas de acuerdo con las descripciones clásicamente admitidas en neurocarcinogénesis experimental, como «oligodendrogliomas-like». Los estudios histológicos revelan un patrón celular que muestra las características típicas de los oligodendrogliomas humanos, identificándose una población muy uniforme de células pequeñas de aspecto linfocitario, que muestran en posición central un núcleo pequeño y oscuro y un citoplasma claro y escaso. Estas células se hallan dispuestas en masas de elevada densidad celular. En estos tumores es frecuente encontrar un elevado número de figuras de mitosis. En estas neoplasias se pueden identificar un gran número de astrocitos fibrosos reactivos, que se encuentran atrapados entre las células tumorales y formando una barrera astrocitaria alrededor de la masa tumoral. Estos astrocitos, en ocasiones, pueden tener aspecto gemistocítico, con un citoplasma muy dilatado, eosinófilo.

En general son tumores muy vascularizados y es posible observar zonas de necrosis. Por otra parte, en estas neoplasias, es típico la formación de una barrera endotelial que delimita perfectamente la zona tumoral y en ocasiones se rompe dando lugar a pequeños focos de hemorragia.

En uno de estos «oligodendrogliomas-like» estudiados, existían zonas con una disposición celular que se correspondían con un patrón muy similar al ofrecido por los «ependimomas-like» descritos en la literatura, mostrando así una ordenación de las células en cordones o rosetas celulares en torno a una zona acelular, eosinófila de aspecto fibrilar, conformando unas estructuras análogas a las descritas por Borit en los pineocitomas humanos (rosetas de Borit), y a las estructuras acelulares observadas comúnmente en los neurocitomas centrales de la neuropatología humana. Es importante señalar el hecho de que en todos los animales en los cuales se desarrolló un tumor de este tipo, se podían encontrar además en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales formaciones neoplásicas que correspondían a los estadios de «proliferaciones iniciales neoplásicas» o «microtumores». Estos focos neoplásicos estaban constituidos por una población celular pequeña, isomorfa, de iguales características que las células tumorales indiferenciadas descritas anteriormente para los macrotumores

(Figura 6A). En estas formaciones también se pudo observar la existencia de astrocitos fibrosos reactivos alrededor de la formación tumoral y su evolución hacia auténticos tumores (Figura 6B) puede ser comprobada cuando se hace el estudio de animales sometidos a este modelo de neurocarcinogénesis en diferentes edades.

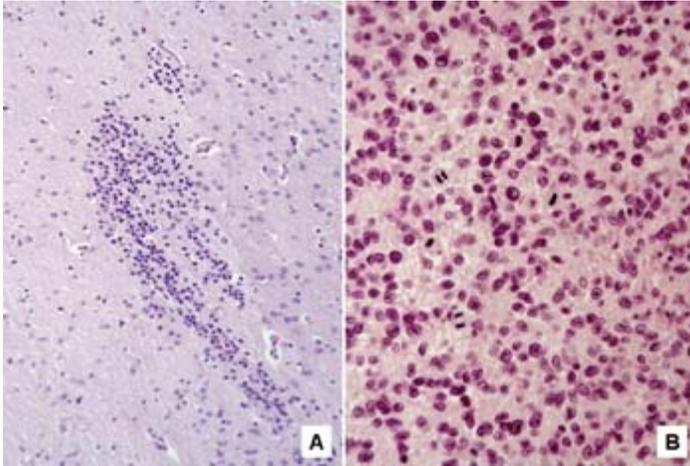


FIGURA 6. **A:** Aspecto histológico de un microtumor subcortical, fase inicial de estos tumores (H.E.). **B:** Estudio microscópico que muestra las células tumorales, de aspecto oligodendroglial, con figuras de mitosis (H.E.).

En los estudios ultraestructurales de estas neoplasias se puede identificar una población de células redondas, de aspecto indiferenciado, muy semejante a los neuroblastos. Estas células muestran un núcleo oscuro y redondeado, con un escaso citoplasma que contiene mucho RER y ribosomas libres. En algunas ocasiones las células tumorales se disponen en hilera.

Entre las células tumorales se pueden observar astrocitos atrapados maduros, que contienen en su citoplasma una gran cantidad de gliofilamentos. Los estudios ultraestructurales revelan que estas células no poseen las típicas características de los oligodendrocitos maduros, sino que muestran características típicas de células primitivas con escasos signos de diferenciación. Al igual que en los neuromas del trigémino, en algunas células se pueden observar pro-

longaciones celulares, lo que puede sugerir una posible diferenciación neuronal (Figura 7A).

Los estudios inmunohistoquímicos realizados sobre estos tumores ponen de manifiesto, al igual que los estudios de microscopía óptica y los estudios ultraestructurales, el carácter primitivo de las células que las componen.

Tanto las «proliferaciones neoplásicas iniciales» como los «microtumores», que existían simultáneamente a los tumores cerebrales, fueron negativos a todo tipo de marcadores inmunohistoquímicos, tanto de la línea glial como de la línea neuronal. Solamente en alguna ocasión dio positividad a la PGA los astrocitos reactivos que circundaban al tumor.

Sin embargo, las neoplasias ya desarrolladas mostraron positividad a marcadores tanto de la línea glial como de la línea neuronal. La vimentina fue positiva de forma clara en el 50% de los tumores. Además este marcador mostraba positividad en todos los astrocitos que circundaban al tumor. Existieron tres casos donde se dio una clara coexpresión en las células tumorales, para la PGA y la vimentina, hecho que apoya los datos obtenidos en los estudios ultraestructurales acerca del carácter primitivo de estas neoplasias. La proteína S-100 fue positiva, por lo general, en los astrocitos reactivos del tumor. Con respecto a los marcadores de la línea neuronal, la proteína de NF y la sinaptofisina mostraron también positividad en todos los casos, siendo de mayor grado la expresión de la sinaptofisina (Figura 7B).

En lo referente a los tumores que mostraban áreas con un patrón similar a los «ependimomas-like» de la literatura, se pudo demostrar que en estas áreas el patrón inmunohistoquímico fue similar al descrito previamente en las zonas que mostraban una típica apariencia de oligodendrogliomas, aunque ocasionalmente pudo apreciarse un patrón de positividad difuso, en el neuropilo tumoral, para la sinaptofisina (Figura 7C). En cuanto a los marcadores típicos de células astrogiales, la PGA se mostró positiva en los astrocitos hipertróficos reactivos que se encontraban en la sustancia blanca adyacente al tumor, y sólo en algunas ocasiones se halló positividad en pequeños grupos de células tumorales (Figura 7D).

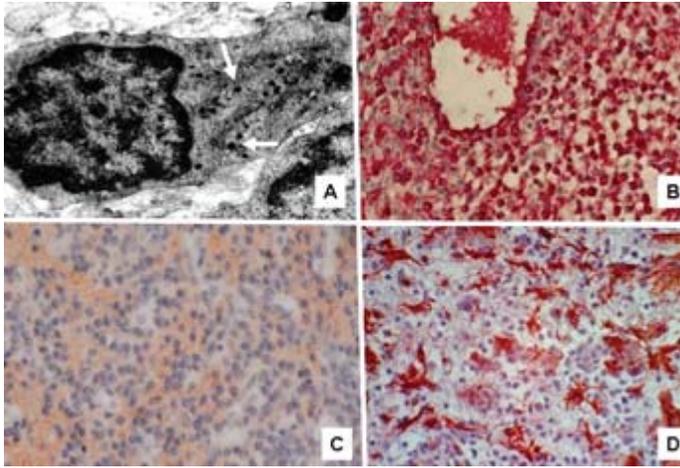


FIGURA 7. **A:** Aspecto de las células tumorales, al microscopio electrónico, mostrando gránulos densos intracitoplasmáticos (flechas) lo que sugiere diferenciación neuroblástica. **B:** Marcada positividad a la sinaptofisina en las células tumorales (tinción inmunohistoquímica). **C:** Positividad inmunohistoquímica a sinaptofisina en el neuropilo, con tendencia a la formación de estructuras rosetoides, análogas a las de los neurocitomas de la neuropatología humana. **D:** Positividad inmunohistoquímica a PGA en los astrocitos atrapados entre las células tumorales.

DISCUSIÓN

Tumores inducidos y período de latencia

Los estudios pioneros de Druckrey y colaboradores sobre el modelo de neurocarcinogénesis por ENU han sido confirmados posteriormente por otros autores (3, 11, 14).

En el presente trabajo hemos obtenido una serie de datos acerca del tiempo de latencia y de la naturaleza histológica de los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar. Así, con las condiciones experimentales utilizadas (inyección de 50 mg/kg de ENU intraperitoneal, en el día 17 de gestación), los tumores que primero se desarrollan son los llamados «Schwannomas malignos», generalmente localizados en la región del Ganglio de Gasser y del nervio trigémino. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cravioto y cols. (3). Estas neoplas-

sias suelen hacerse sintomáticas tras un período de latencia que oscila entre cuatro y siete meses, tras la exposición al carcinógeno y pueden extenderse por la base del cráneo e invadir ocasionalmente estructuras extracraneales. A partir de los ocho meses de edad del animal, por lo general, dejan de aparecer estos tumores, apareciendo entonces las neoplasias intracerebrales con características morfológicas de oligodendrogliomas. En la presente serie, la mayor parte de los tumores intracerebrales se hicieron sintomáticos entre los ocho y diez meses de edad de los animales.

En algunas ocasiones, al igual que otros autores (8, 9) hemos encontrado focos de «proliferaciones neoplásicas iniciales» localizadas en la sustancia blanca paraventricular, que coexistían con los macrotumores cerebrales. Estas lesiones tumorales estaban compuestas por células muy indiferenciadas e inclasificables histológicamente. Schiffer y cols. (20) afirman que estos focos de «proliferación neoplásica inicial» comienzan a aparecer en la sustancia blanca, aproximadamente a los treinta días de la vida del animal como simples focos de células hiperplásicas y representan solamente una etapa inicial del desarrollo de los tumores cerebrales.

Los tumores que se desarrollan a partir de estas «proliferaciones neoplásicas iniciales» pueden continuar por dos líneas diferentes de desarrollo, una línea astrogliar y una línea oligodendrogliar. Este doble curso de desarrollo corresponde con las observaciones de Lantos (17). Este autor señala que las zonas blanco para el ENU en el cerebro son las células primitivas de la región de la placa subependimaria y los oligodendrocitos.

Parece poco probable que el ENU tenga un efecto preferente sobre elementos neuroectodérmicos del Sistema Nervioso, del tipo de las células gliales y las células de Schwann, lo que estaría de acuerdo con las observaciones recogidas en la literatura acerca de que son estos elementos (células de Schwann y células gliales) los que van a encontrarse como constituyentes de los tumores inducidos por ENU.

En comparación con los datos ofrecidos en la literatura, nuestros resultados parecen mostrar una menor incidencia de tumores múltiples, hallazgo que se acepta como característico en el modelo experimental de neurocarcinogénesis por ENU (12). Por ejemplo, en los estudios realizados sobre ratas de la cepa Long-Evans, más del

30% de los animales desarrollan tumores múltiples tras la administración de una dosis única de ENU, cinco veces inferior a la utilizada por nosotros, administrada también en el día 17 de gestación (8, 9).

En cuanto al período de latencia de aparición de los tumores, parecen ser también ligeramente diferentes a los referidos en la literatura utilizando otros tipos de ratas, que pueden mostrar un tiempo mayor de inducción, aún utilizando dosis inferiores de ENU. Estas diferencias en cuanto al tanto por ciento de tumores desarrollados y su período de latencia entre las diferentes cepas de animales, e incluso dentro de una misma cepa, dependiendo de la edad, dificulta la comparación de resultados entre los diferentes laboratorios, acerca de la distribución y naturaleza de los tumores desarrollados después de la administración trasplacentaria de ENU. A pesar de ello, parece existir más o menos un acuerdo en cuanto a la secuencia de aparición de las diferentes transformaciones neoplásicas y de su período de latencia. Sin embargo no existe un acuerdo entre los diferentes autores con respecto a la naturaleza histológica de estas neoplasias, ni en cuanto a los criterios de clasificación. De hecho, parece ser aceptado que el modelo de neurocarcinogénesis por ENU desarrolla, en primer lugar, tumores del tipo schwannoma, y en segundo término, tumores clasificables como «gliomas-mixtos», en los cuales se señala un claro componente astrocitario. Le seguirían en frecuencia los tumores clasificables como «oligodendrogliomas». En comparación con las descripciones que existen en la literatura, llama la atención en nuestra serie, la ausencia de tumores con apariencia astrocitaria o ependimaria, e incluso la no existencia de tumores clasificables como glioblastomas (10, 13). Creemos, no obstante, que estas diferencias pueden ser debidas a las discrepancias en los criterios de clasificación (11, 14, 22). Nosotros hemos renunciado a clasificar como ependimomas, o como tumores mixtos, a algunos tumores con patrón rosetoide, en los que se reconocían áreas de aspecto oligodendroglioma como patrón predominante. Además, apoyamos las observaciones que clasifican los tumores inducidos por ENU, con patrón mixto de oligodendroglioma-ependimoma, como tumores primitivos muy indiferenciados, a pesar de su apariencia morfológica, ya que en nuestro único caso en que se reconoció un claro patrón ependimario, la microscopía electrónica no mostró estructuras propias de los ependimomas, mostrando sin

embargo, una expresión inmunohistoquímica análoga a la de otros tumores con un patrón puro de oligodendroglioma.

Posibilidad de diagnóstico *in vivo* de los tumores inducidos

En nuestra presente serie hemos obtenido claras evidencias de que los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar pueden ser detectados *in vivo* utilizando un aparato convencional de Resonancia Magnética. Con dicha técnica, y de forma característica, los tumores experimentales se muestran hipointensos en fase T1, hiperintensos en fase T2 y captan contraste paramagnético (gadolinio) de forma intensa y homogénea.

Aunque en nuestro material sólo se han detectado tumores con un tamaño suficiente para su observación macroscópica, es obvio que el diagnóstico *in vivo* que puede proporcionar la RM, va a permitirnos en el futuro aplicar a este modelo experimental diversos protocolos terapéuticos y constatar su posible eficacia sin tener que renunciar a líneas tumorales transplantables sobre animales singénicos.

Características morfológicas de los tumores tipo «neurinomas»

El término usado para describir este tipo de tumores ha sido el de «neurinoma» o «schwannoma maligno». Los estudios histológicos sobre los tumores, que se originan en el SNP, concretamente a nivel del nervio trigémino, parecen señalar que el principal tipo celular que componen estas neoplasias son las células de Schwann (7). Así, según afirman los estudios realizados por Cravioto y cols. (3), los tumores experimentales del SNP son histológica y ultraestructuralmente tumores de células de Schwann. En cuanto a los resultados histológicos obtenidos por nosotros en el estudio de los Schwannomas, tenemos que decir que nuestros datos coinciden con las descripciones histológicas que se han hecho hasta el momento (3, 18). Sin embargo, nuestros resultados ultraestructurales discrepan en parte de los obtenidos por otros autores, ya que nosotros hemos podido observar además de las descritas células de Schwann neoplá-

sicas, otro tipo celular, compuesto por elementos celulares con un aspecto bastante indiferenciado, muy semejante al de los típicos neuroblastos, incluso en algunas ocasiones se observan prolongaciones citoplasmáticas, que indican su posible diferenciación neuronal. Los estudios inmunohistoquímicos de la expresión de los diferentes marcadores (gliales y neuronales), en los schwannomas malignos, nos ha servido para apoyar los datos obtenidos mediante los estudios ultraestructurales, acerca del carácter neuroectodérmico primitivo de la mayor parte de las células que integran estas neoplasias.

Según Cravioto y cols. (3), los tumores inducidos por ENU, en el SNP, muestran una importante positividad a la proteína S-100, que es considerada como un marcador específico del Sistema Nervioso. La sinaptofisina fue aislada y caracterizada a partir de vesículas presinápticas en neuronas de cerebro bovino, y su presencia se utiliza para demostrar inmunohistoquímicamente, la diferenciación neuroendocrina de algunos tumores y para tumores neuroectodérmicos primitivos. La inmunorreactividad para la sinaptofisina de una importante población de células tumorales, en los tumores ENU-inducidos, permite interpretar estos supuestos schwannomas, como tumores neuroectodérmicos primitivos que muestran signos inmunohistoquímicos de diferenciación neuronal, y apoyar la hipótesis de Jones y cols. (11) acerca del carácter neuroblástico de estas neoplasias. El patrón de distribución de la PGA hallado por nosotros es muy similar al aportado por otros autores, no existiendo por lo general positividad para este marcador y sólo de un 50% en el caso de la vimentina.

Características morfológicas de los tumores tipo oligodendroglial

Las neoplasias con aspecto morfológico de oligodendrogliomas, desarrolladas en la sustancia blanca paraventricular, han sido los únicos tumores cerebrales obtenidos en nuestra serie. Estos datos no coinciden con los obtenidos por otros autores. Así, Lantos (17) distingue dos líneas de tumores diferentes que se pueden desarrollar en los hemisferios cerebrales: una línea astrogliar y una línea oligodendroglial. Nosotros hemos clasificado todas estas neoplasias como oligodendrogliomas, aunque ocasionalmente hallamos observado

áreas que según descripciones de la literatura, podrían haber justificado la clasificación de alguno de estos tumores comoependimomas. Estas neoplasias también se pueden desarrollar a nivel de la sustancia blanca de la médula espinal, generalmente a nivel dorsal y lumbar.

Algunos autores, basándose en estudios de microscopía electrónica, defienden el carácter indiferenciado de tumores supuestamenteependimarios y los definen como tumores neuroepiteliales primitivos con algunas características oligodendrogiales.

Al igual que ocurre con los schwannomas malignos, en el caso de los oligodendrogliomas, el carácter neuroectodérmico primitivo, sugerido por los estudios ultraestructurales, se ve apoyado por los estudios inmunohistoquímicos. La observación de que, desde el punto de vista inmunohistoquímico, las diferentes áreas de estos aparentes tumores mixtos expresan los mismos marcadores, apoya nuestro criterio de que están compuestos por una misma población de células tumorales, aún cuando dichas células pueden mostrar, en determinadas áreas, un patrón morfológico diferente del que es habitual en la mayor parte de los tumores clásicamente catalogados como de aspecto oligodendrogial. En cuanto a la interpretación de los hallazgos inmunohistoquímicos, existe una concordancia entre nuestros resultados y los de otros autores, con respecto a la expresión de la proteína S-100, PGA y vimentina. En todas las fases de crecimiento de las neoplasias por ENU existe un gran número de astrocitos que expresan positividad a la PGA. Estos astrocitos se encuentran en la periferia del tumor y en la región peritumoral. Nosotros creemos que la mayoría de los astrocitos que expresan positividad a la PGA, situados en los alrededores y en el interior del tumor, corresponden con astrocitos hipertróficos reactivos, pero sin embargo hemos podido observar grupos de células tumorales, que muestran positividad a la PGA, y curiosamente en muchas ocasiones esta positividad coincide con la positividad a la vimentina, es decir, existe una expresión de ambos marcadores, hecho que apoya el carácter indiferenciado de estas células, pues la coexpresión de la PGA y de la vimentina es un marcador del fenotipo astroglial inmaduro. Esta interpretación está en línea con el presente concepto que representa que la vimentina es el tipo más numeroso de filamentos intermedios de la astroglia inmadura, y es seguido por la PGA más tarde en el desarrollo. Sin embargo, otros autores afirman

que la positividad a la PGA sólo existe en los astrocitos hipertróficos reactivos que existen en los alrededores del tumor y nunca en las propias células tumorales.

Es importante destacar en nuestro estudio, la fuerte positividad que hemos obtenido en la mayor parte de los tumores para la sinaptofisina. Teniendo en cuenta que en la patología humana este marcador es útil para el reconocimiento de tumores neuroectodérmicos primitivos como el meduloblastoma e igualmente para el reconocimiento de tumores de carácter neuronal, es lógico admitir que la mayor parte de los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar pueden ser considerados como tumores neuroectodérmicos primitivos con posible diferenciación neuronal, independientemente de su apariencia morfológica. Esta conclusión concuerda con algunas de las clasificaciones previas de dichas neoplasias, tales como la de Jones y cols. (11), quienes clasifican como neuroblastomas a los tumores experimentales inducidos por ENU.

Similitudes de los tumores experimentales con los tumores humanos

Hoy en día se acepta en neuropatología humana que determinados tumores de naturaleza neuronal, tales como los llamados «neurocitosmas centrales», pueden presentar una falsa apariencia de oligodendrogliomas, siendo los estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales, los que ofrecen la posibilidad, la mayoría de las veces, de su correcta clasificación, ya que generalmente suelen ser mal diagnosticados como oligodendrogliomas en base a su aspecto histológico. Este caso es muy similar al ofrecido por los oligodendrogliomas intracerebrales desarrollados en la rata después de la administración de ENU, donde aún no existe un acuerdo entre los diferentes autores acerca de su clasificación. Se observa, por tanto, que una apariencia histológica oligodendrogliar no debe prejuzgar la naturaleza neuronal o glial de una determinada neoplasia, siendo esta consideración válida tanto para tumores humanos como para los tumores experimentales de nuestra serie, donde el patrón de marcaje inmunohistoquímico y las características ultraestructurales sugieren que, independientemente del aspecto histológico con la tinción convencional de H.E.,

dichas neoplasias pueden ser consideradas como tumores neuroectodérmicos primitivos con una clara tendencia a la diferenciación neuronal. También merece ser discutida la posible relación etiológica entre los tumores inducidos por ENU y los tumores cerebrales que acontecen en la clínica humana. Aunque no existen datos fiables acerca de los factores etiológicos que determinan el inicio de un tumor cerebral humano, considerándose la posibilidad de un mecanismo multifactorial, resulta interesante la apreciación de que el contacto con un carcinógeno, en la época intrauterina de la rata pueda dar lugar, varios meses después del nacimiento, al desarrollo neoplásico. Es más, si consideramos el ciclo biológico de los roedores, en el momento en que las neoplasias experimentales se hacen manifiestas (edad media de la vida de la rata) sería superponible a la edad de máxima incidencia de tumores cerebrales en el ser humano (edad adulta). Si algunos tipos de tumor cerebral humano podrían estar genéticamente determinados como consecuencia de alteraciones cromosómicas resultantes de una exposición a carcinógenos en el período prenatal, es una cuestión abierta, cuyo planteamiento puede ser válido ante las similitudes cronobiológicas y morfológicas entre los tumores cerebrales humanos y los tumores experimentales inducidos por nitrosoureas.

Caracterización e histogénesis de los tumores obtenidos

A la vista de los resultados obtenidos en nuestro presente estudio, cabe plantearse la exacta caracterización de los tumores experimentales inducidos por ENU, con los parámetros utilizados, y además, tratar de establecer su histogénesis. Resulta obvio que, al menos en nuestra serie, los tumores inducidos por ENU en la rata Wistar presentan características inmunohistoquímicas y de microscopía electrónica comunes, independientemente de su variable aspecto morfológico cuando se estudian con tinciones convencionales, como es la hematoxilina-eosina. Dichas características comunes nos llevan a interpretar estas neoplasias como tumores neuroectodérmicos primitivos, con capacidad para una diferenciación dual, aunque es obvio que la constante positividad a los marcadores neurales sugiere una mayor tendencia a la diferenciación neuronal. Esta interpretación es contraria a los supuestos previamente establecidos, ya que numero-

Los autores señalan la naturaleza glial de estos tumores y la excepcional rareza de tumores ENU-inducidos con características neurales. Es también en base a esta interpretación morfológica, que estos mismos autores emiten la hipótesis de que la célula diana para el desarrollo neoplásico sería un elemento glial indiferenciado, generalmente de la matriz subependimaria, lo que parecer también ser aceptado en base a las interpretaciones de Lantos (18) y de otros investigadores. Teniendo en cuenta nuestros presentes resultados, que muestran una doble diferenciación inmunohistoquímica de las células de los tumores cerebrales ENU-inducidos (expresión de marcadores gliales y neurales) podemos buscar, como elemento diana, un precursor común en la embriogénesis del Sistema Nervioso de los mamíferos, capaz de diferenciarse en elementos gliales y neurales. Esta célula precursora corresponde lógicamente al concepto de la célula indiferenciada de Schaper, elemento muy discutido en la literatura y que puede identificarse con el concepto de meduloblasto, defendido por la escuela americana de neuropatología y negado por la escuela española. En cualquier caso, creemos que la consideración de una célula precursora indiferenciada, como constituyente de los tumores neuroectodérmicos primitivos cobra mayor trascendencia si se tienen en cuenta en neuropatología humana, las ocasionales descripciones de tumores infantiles indiferenciados cuyas células pueden expresar igualmente marcadores gliales y neurales. Por otra parte, el hecho de que hayamos encontrado marcadas similitudes inmunohistoquímicas y ultraestructurales entre nuestros tumores experimentales tanto del Sistema Nervioso Central como del Sistema Nervioso Periférico, nos lleva a considerar una célula precursora común, para ambos tipos de neoplasias, lo que se ha visto apoyado en la literatura por las ocasionales descripciones de schwannomas experimentales con áreas de oligodendroglioma o la interpretación como neuroblastomas de gran parte de dichos schwannomas (11). Si aceptamos esta interpretación citogenética, deberíamos admitir igualmente que la célula indiferenciada de Schaper puede ser alterada en un momento determinado de la embriogénesis no sólo a nivel de la capa germinal subependimaria, sino igualmente a nivel de la cresta neural en formación, puesto que sólo de esta forma sería explicable la preferente aparición de tumores experimentales a nivel de los ganglios del Sistema Nervioso Periférico, constituidos a partir de células nerviosas de la cresta neural.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación, creemos oportuno hacer las siguientes consideraciones: 1. La RM es una técnica útil para el diagnóstico *in vivo* de los tumores cerebrales experimentales inducidos en roedores por ENU. 2. En la rata Wistar, con la técnica de H.E. y con los parámetros experimentales utilizados, la mayor parte de los tumores inducidos tienen aspectos histológicos de «schwannomas malignos» y «oligodendrogliomas». En ambos casos se puede encontrar una gran población de células que presentan características muy indiferenciadas. 3. Desde el punto de vista ultraestructural hemos constatado la presencia de células con aspecto neuroepitelial primitivo y este hecho, conjuntamente con la expresión antigénica de marcadores tanto de células gliales como de células neuronales sugiere el carácter primitivo de estas neoplasias y su capacidad de diferenciación dual. 4. La positividad a marcadores tales como la sinaptofisina y la proteína de los NF, tanto en los «tumores schwannianos» como en los oligodendrogliomas-like, sugiere una tendencia a la diferenciación neuronal de estas neoplasias, lo que se confirma además por las similitudes entre algunos tumores de apariencia oligodendroglial y los neurocitomas centrales de la neuropatología humana. 5. Por último creemos que este tipo de tumores, clasificados en base a los datos obtenidos en nuestro estudio como «neoplasias neuroectodérmicas indiferenciadas» pueden ser útiles para la realización de diversos ensayos terapéuticos que tengan como finalidad un mejor conocimiento de la biología y posibilidades de control de los tumores neuroectodérmicos primitivos humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) TOMATIS, L. y MOHR, E. (1973): Transplacental Carcinogenesis. *IARC Sci.* 4: 112-126, Lyon.
- (2) CRAVIOTO, H.; WEISS, J. F.; WEISS, E. DE C.; PALEKAR, L. y RANSOHOFF, J. (1972): Experimental neurinomas induced with nitrourea derivatives. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 31: 204-205.
- (3) CRAVIOTO, H.; WEISS, J. F.; WEISS, E. DE C.; GOEBEL, H. H. y RANSOHOFF, J. (1973): Biological characteristics of peripheral nerve tumors induced with ethylnitrosourea. *Acta Neuropathol.* 23: 265-280.

- (4) DELINGER, R. H; KOESTNER, A. y SWENBERG, J. A. (1973): An experimental model for selective production of neoplasms of the peripheral nervous system. *Acta Neuropathol.* 23: 219-228.
- (5) DRUCKREY, H.; IVANKOVIC, S. y PREUSSMANN, R. (1965): Selective induction of malignant tumors in the brain and spinal cord of rats with MNU. *Z. Krebsforsch* 66: 389-408.
- (6) DRUCKREY, H.; IVANKOVIC, S. y PREUSSMANN, R. (1966): Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after a single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. *Nature* 210: 1378-1379.
- (7) DRUCKREY, H.; LANDSCHÜTZ, C.; PREUSSMANN, R. e IVANKOVIC, S. (1970): The transplacental induction of malignant tumors of the nervous system. II. ENU in 10 genetically defines strains of rats. *Z. Krebsforsch* 73: 371-386.
- (8) GROSSI-PAOLETTI, E.; PAOLETTI, P.; PEZZOTTA, S.; SCHIFFER, D. y FABIANI, A. (1972): Tumors of the nervous system induced by ethylnitrosourea administered either intracerebrally or subcutaneously to newborn rats. Morphological and biochemical characteristics. *J. Neurosurg.* 37: 580-590.
- (9) GROSSI-PAOLETTI, E.; PAOLETTI, P.; PEZZOTTA, S.; SCHIFFER, D. y FABIANI, A. (1970): Experimental brain tumours induced in rats by nitrosourea derivatives. Part 2. Morphological aspects of nitrosoethylurea tumours obtained by transplacental induction. *J. Neurol.Sci.* 11: 573-581.
- (10) JÄNISCH, W. y SCHREIBER, D. (1977): Experimental tumors of the Central Nervous Ssystem. Bigner D. D. and Swenberg J. A. (Eds). Upjohn Co. Michigan.
- (11) JONES, E. L.; SEARLE, C. E. y SMITH, W. T. (1973): Tumours of the nervous system induced in rats by the neonatal administration of N-ethyl-N-nitrosourea. *J. Pathol.* 109: 123-139.
- (12) KLEIHUES, P.; ZÜLCH, K. J.; MATSUMOTO, S. y RADKE, U. (1970): Morphology of malignant gliomas induced in rabbits by systemic application of N-methyl-N-nitrosourea. *Z. Neurol.* 198: 65-78.
- (13) KLEIHUES, P.; LANTOS, P. L. y MAGEE, P. N. (1976): Chemical carcinogenesis in the nervous system. *Int. Rev. Exp. Path.* 15: 153-157.
- (14) KOESTNER, A.; SWENBERG, J. A. y WECHSLER, W. (1971): Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Pathol.* 63: 37-56.
- (15) KOESTNER, A.; SWENBERG, J. A. y WECHSLER, W. (1972): Experimental tumors of the nervous system induced by resorptive N-nitrosourea compounds. *Prog. Exp. Tumor Res.* 17: 9-30.
- (16) LANTOS, P. L. (1971): The effect of a single dose of N-ethyl-N-nitrosourea on the fine structure of the brain of the rat. *Experientia* 27: 1322-1323.
- (17) LANTOS, P. L. (1972): The fine structure of periventricular pleomorphic gliomas induced transplacentally by N-ethyl-N-nitrosoureas in BD-IX rats. With a note on their origin. *J. Neurol. Sci.* 17: 443-460.
- (18) LANTOS, P. L. (1980): Chemical induction of tumours in the nervous system. In: Brain Tumours. Scientific basis, clinical investigation and current therapy. Thomas D.G.T. and Graham D.I. Eds. Butterworth, London, pp. 85-108.

- (19) SCHIFFER, D.; FABIANI, A. y GROSSI-PAOLETTI, P. (1970): Experimental brain tumours induced in rats by nitrosourea derivatives. Part 1. Morphological aspects of methylnitrosourea tumours. *J. Neurol. Sci.* 11: 559-572.
- (20) SCHIFFER, D.; GIORDANA, M. T.; MAURO, A.; RACAGNI, G.; BRUNO, F.; PEZZOTTA, S. y PAOLETTI, P. (1980): Experimental brain tumors by transplacental ENU. *Acta Neuropathol.* 49: 117-122.
- (21) SCHIFFER, D.; GIORDANA, M. T.; PEZZOTTA, S.; LECHNER, C. y PAOLETTI, P. (1978): Cerebral tumors induced by transplacental ENU: Study of the different tumoral stages, particularly of early proliferations. *Acta Neuropathol.* 41: 27-31.
- (22) SWENBERG, J. A.; WECHSLER, W. y KOESTNER, A. (1972): The sequential development of transplacentally induced neuroectodermal tumors. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 31: 202-210.
- (23) WECHSLER, W. (1973): Transplacental Carcinogenesis. Tomatis, L. and Mohr, U. (eds.), p. 127. *IARC Sci. Publ. No. 4*, Lyon.
- (24) ZIMMERMAN, H. M. (1969): Brain tumors: their incidence and clasification in man and their experimental production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 159: 337-359.
- (25) LEAVER, D.; SWANN, P. F. y MAGEE, P. N. (1969): The induction of tumours in the rat by a single oral dose of N-nitrosomethylurea. *Br. J. Cancer* 23: 177-187.

————— *Artículo original* —————

Desarrollo, análisis y optimización de modelos celulares hepáticos para estudios de farmacotoxicología y terapia celular

Recibido el 29 de enero de 2008

A. BONORA-CENTELLES^{1,2}, R. JOVER¹⁻³, M. T. DONATO¹⁻³,
A. LAHOZ^{2,4}, E. PAREJA⁵, J. V. CASTELL^{1,3}, J. MIR⁵ y
M. J. GÓMEZ-LECHÓN^{1,2*}

¹ *Unidad de Hepatología Experimental. Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe.*

² *CIBERHEPAD, FIS, España.*

³ *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Valencia.*

⁴ *Unidad Mixta Analítica Hospital La Fe-Advancell.*

⁵ *Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático, Hospital Universitario La Fe.*

* **Autor para la correspondencia:**

M.^a José Gómez-Lechón.

Unidad de Hepatología Experimental. Centro de Investigación. Hospital La Fe.

Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia (Spain).

e-mail: gomez_mjo@gva.es

Tel.: +34 1973048

Fax: +34 1973018

ABREVIATURAS: ADMET, administración, distribución, metabolismo, excreción y transporte; **CYP o P450**, citocromo P450; **ADSC**, células madre derivadas de tejido adiposo; **BSA**, seroalbúminabovina; **DMEM**, Dulbecco's modified Eagle's medium; **SBF**, suero bovino fetal; **7-Aad**, 7-aminoactinomicina; **APC**, Alofocianina; **PE**, ficoeritrina; **FITC**, isocianato de fluoresceína; **EGF**, factor de crecimiento epidérmico; **FGF**, factor de crecimiento fibroblástico; **BMP**, proteínas morfogénicas de hueso; **HGF**, factor de crecimiento hepático; **OSM**, oncostatina M; **ITS**, insulina-transferrina-selenio; **MROD**, 7-metoxiresorufina O-demetilasa; **CH**, cumarina; **D4OH**, diclofenac 4-hidroxisilasa; **C6OH**, clorzoxazona 6-hidroxisilasa; **6bOHT**, 6b-hidroxitestosterona; **EROD**, 7-etoxiresorufina 7-hidroxisilasa; **BROD**, 7-benzoxiresorufina O-debenzilasa; **PN**, p-nitrofenol 4-hidroxisilasa; **HPLC**, cromatografía líquida de alta resolución; **MS**, espectrometría de masas; **ECOD**, e-etoxicumarina O-deetilasa; **HNF**, factor nuclear hepático; **PGC1a**, peroxisome proliferator activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha; **SRC**, Steroid receptor coactivator; **C/EBP**, CCAAT/Enhancer Binding Protein; **COUP TF**, Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor.

RESUMEN

El hígado juega un papel fundamental en el metabolismo de medicamentos y en el mantenimiento de la homeostasis del organismo y, por tanto los modelos celulares hepáticos desempeñan un papel clave para estudios fármaco-toxicológicos y más recientemente en el campo de la terapia celular. Sin embargo, la limitada disponibilidad de hepatocitos viables y funcionales, debido a la falta de tejido hepático, es la principal limitación para utilizar estos recursos celulares. El objetivo del presente trabajo se ha basado en el desarrollo y caracterización de modelos celulares hepáticos que puedan constituir una alternativa a los hepatocitos para este tipo de aplicaciones. Para ello se han abordado tres estrategias diferentes: 1) optimización del proceso de obtención de hepatocitos a partir de hígados enteros descartados para trasplante, determinando las condiciones adecuadas para el aislamiento y cultivo de hepatocitos; 2) caracterización funcional de las células del hepatoblastoma HepG2, y 3) desarrollo de un protocolo para inducir la diferenciación hepatogénica de células madre mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo (ADSC). Para conseguir un buen aprovechamiento de hígados descartados para trasplante resulta necesario optimizar los protocolos de aislamiento y criopreservación de hepatocitos. El estudio con células madre adultas se presenta como una alternativa muy válida para la obtención de hepatocitos-like viables y funcionalmente activos, útiles a corto plazo en estudios de fármaco-toxicología y en un futuro para terapia celular hepática. El uso de células madre abre un gran abanico de posibilidades, facilitando el establecimiento de un modelo celular diferenciado adulto con características que otros modelos celulares, como son el hepatoma humano HepG2, no presentan. No obstante, es necesario adquirir un mayor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que controlan la transdiferenciación a hepatocitos.

Palabras clave: Trasplante celular.—Esteatosis.—Hepatocitos humanos.—Hepatoblastomas.—Células madre.

SUMMARY

Development and optimization of hepatic cell models for pharmaco-toxicology and cell therapy research

Given the importance of the liver in the metabolism and maintenance of the homeostasis of the organism, many studies have been conducted in the area of toxicology and, more recently, in hepatic cellular therapy. However, the main drawback is the limited availability of viable and functional hepatocytes due to the scarcity of liver tissue. The purpose of this work was based on the development and characterization of hepatic cellular models to become an alternative to hepatocytes in toxicology studies and cellular therapy. To this end, three main objectives have been investigated: 1) to adopt a procedure of hepatocyte isolation from discarded organs for transplantation which determines the optimal conditions

for the isolation and culture of hepatocytes, 2) to characterize the cells from the hepatoblastome HepG2, and 3) to develop a hepatogenic differentiation protocol to induce the hepatic differentiation in adipose-derived stem cells (ADSC). In particular, the hepatogenic differentiation of stem cells opens a wide range of possibilities to facilitate the establishment of an adult differentiated cellular model useful for pharmaco-toxicological studies and for hepatic cellular therapy. The use of adult stem cells may allow the establishment of an adult cellular model with properties that others cellular models, like HepG2, do not show. However, it is necessary to optimise the isolation and cryopreservation procedures, as well as the differentiation protocols from adult stem cells and try to acquire a wide knowledge of the cellular and molecular mechanisms that control the transdifferentiation to hepatocytes.

Keywords: Cellular transplant.—Esteatosis.—Human hepatocytes.—Hepatoblastomes.—Stem cells.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un gran número de afectaciones hepáticas para las cuales el único tratamiento efectivo existente es el trasplante de órgano ortotópico. Teniendo en cuenta, que aproximadamente un 17,5% de la población mundial sufre alguna enfermedad hepática degenerativa (1), resulta evidente la urgente necesidad que existe de nuevas alternativas terapéuticas. La terapia celular se considera hoy en día una estrategia terapéutica de vanguardia complementaria al trasplante de órgano entero. Las ventajas objetivas que presenta el trasplante de hepatocitos frente al trasplante de órgano, lo convierten en una alternativa muy atractiva. La terapia celular hepática permitiría mantener las funciones hepáticas durante el periodo puente hasta la obtención de un órgano adecuado, o incluso conseguir la regeneración hepática en el caso del fallo hepático fulminante con la consiguiente recuperación de la función del órgano. Además, se trata de un método poco invasivo, puede efectuarse de manera semiprogramada, gracias al mantenimiento de las células en cultivo o criopreservadas, permite tratar a varios receptores a partir de un único donante (2), y la manipulación génica *ex vivo* seguido del trasplante autólogo, haciendo innecesaria la terapia inmunosupresora.

Una tarea clave en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es la caracterización, no sólo de sus propiedades farmacoló-

gicas, sino también la predicción de sus propiedades ADMET en el hombre (estabilidad y perfil metabólico, enzimas P450 involucrados, efecto inhibitor o inductor del fármaco sobre los enzimas P450, las posibles interacciones fármaco-fármaco y su toxicidad). El hígado es el órgano que posee mayor capacidad para biotransformar los xenobióticos en el organismo y, por ello, juega un papel esencial en el metabolismo de los fármacos. Sin embargo, los estudios de metabolismo que se realizan en animales no siempre son extrapolables al hombre, y por ello los modelos hepáticos humanos constituyen una herramienta esencial para obtener información predictiva sobre el metabolismo y la toxicidad de nuevos fármacos para el ser humano en etapas preclínicas muy tempranas de su desarrollo (3).

El éxito, tanto de la terapia celular como de los estudios de metabolismo y toxicidad de fármacos, está condicionado por la disponibilidad de células hepáticas viables y funcionales en número y calidad funcional suficientes. Teniendo en cuenta que se trata de cultivos no proliferantes, se requiere disponer de tejido hepático humano de manera continuada para aislar hepatocitos. Por tanto, en los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo para desarrollar modelos celulares hepáticos para superar la escasez de hepatocitos y constituir una alternativa, tanto para terapia celular como para estudios farmacotológicos.

El primer objetivo de este trabajo ha sido optimizar el proceso de aislamiento y cultivo de hepatocitos a partir de hígados enteros o lóbulos hepáticos descartados para trasplante y determinar las características idóneas del tejido hepático para este propósito. Para ello se ha investigado la influencia sobre el rendimiento del aislamiento y la calidad de los hepatocitos de factores tales como el tiempo de isquemia fría a que se ha sometido el tejido hepático utilizado, así como del impacto del grado de estasis del hígado, aspectos no estudiados de forma sistemática hasta ahora. Un segundo objetivo ha sido la caracterización funcional de las células de hepatoblastoma HepG2, investigado los mecanismos responsables de su desdiferenciación. Finalmente, en una búsqueda de fuentes celulares alternativas a los hepatocitos para terapia celular hepática y estudios de metabolismo y toxicidad de fármacos, se ha desarrollado un protocolo para inducir la diferenciación de ADSC hacia linaje hepático.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de tejido hepático

Los órganos descartados para trasplante (un total de cinco hígados, tres órganos enteros y dos lóbulos) fueron extraídos, transportados, caracterizados y preparados por la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital La Fe. Las biopsias de tejido hepático se obtuvieron de donantes cadáver durante el transcurso de una laparotomía terapéutica a partir de la cara anterior del segmento III de Couinaud. En ambos casos los hígados antes de la extracción fueron perfundidos con solución de preservación Celsior (TmTix-Sangstat, Lyon, Francia) y mantenidos a 4° C hasta el momento del aislamiento de hepatocitos. El grado de esteatosis se determinó por un examen patológico. Las muestras hepáticas destinadas a la preparación de microsomas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80° C hasta su uso.

Aislamiento de hepatocitos humanos a partir de biopsias hepáticas quirúrgicas y de órganos o lóbulos enteros

La obtención de hepatocitos a partir de biopsias se realizó mediante perfusión enzimática del tejido hepático, tal como ya se ha descrito en detalle previamente (4). El aislamiento de hepatocitos a partir de órganos o lóbulos enteros se realizó mediante la adaptación del procedimiento utilizado para biopsias hepáticas de pequeño tamaño (Figura 1).

Los hepatocitos se sembraron en placas recubiertas de una mezcla de fibronectina y colágeno (fibronectina 1 mg/100 mL, colágeno 3 mg/100 mL y BSA 10 mg/100 mL en medio DMEM), a una densidad de 8×10^4 células viables/cm². El medio utilizado fue Ham's F-12/Williams (1:1) (Gibco BRL, Paisley, UK) complementado con un 2% de suero de ternera (Gibco BRL, Paisley, UK), penicilina 50 mU/mL, estreptomocina 50 µg/mL, 0,2% de albúmina bovina sérica, insulina 10^{-8} M, transferrina 25 µg/mL, etanolamina 65,5 mM, ácido linoléico 7,2 mM, glucosa 17,5 mM, ácido ascórbico, 6,14 mM, y N-omega-nitro-L-arginina metiléster 0,64 mM. A partir de las 24 horas los cultivos se mantuvieron en un medio sin suero complementado con hor-

monas [dexametasona (Merck Pharma, Mollet del Valles, España) e insulina (Insulatard, Novo Nordisk Pharma, S. A., Dinamarca) 10^{-8} M].

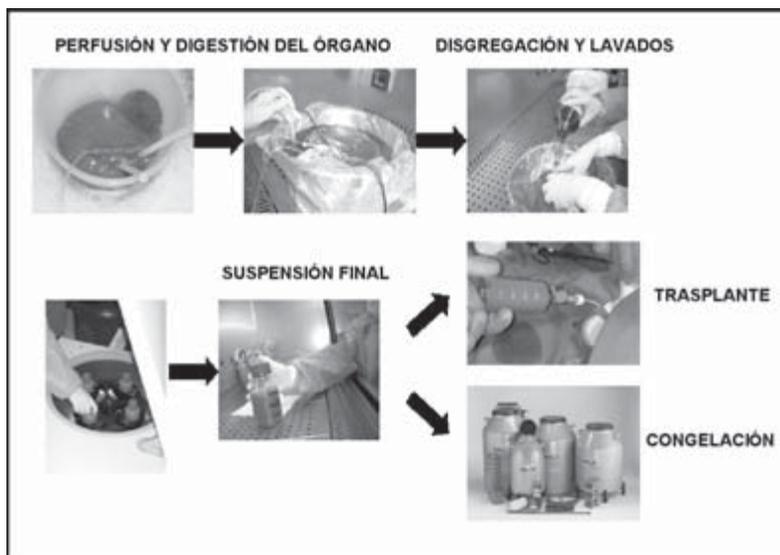


FIGURA 1.- *Esquema del protocolo de aislamiento de hepatocitos a partir de órganos o lóbulos enteros.*

Cultivo de células de hepatoma humano HepG2

Las células del hepatoblastoma humano HepG2 se han cultivado en medio de cultivo Ham's F-12/Leibovitz L-15 (1:1) complementado con SBF al 6%, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/mL, sulfato de estreptomina 50 mg/mL y bicarbonato sódico 2 g/100 mL. El subcultivo de las células se realizó mediante tratamiento con tripsina 0,25%-EDTA 0,01% (Biochrom AG, Berlín, Alemania).

Aislamiento y cultivo de células de tejido adiposo

El tejido adiposo se obtuvo de donantes sanos anónimos mediante liposucción asistida. El tejido adiposo obtenido de cada donante fue diseccionado en pequeños trozos y digerido con colagenasa I (1 mg/mL) (Sigma, Madrid, España). Las células se resuspendieron

en medio de cultivo DMEM (Gibco BRL, Paisley, UK) con 15% de suero humano y 50 mg/mL de gentamicina. Una vez las células alcanzaron la confluencia, se despegaron con tripsina-EDTA (0,25%/0,02%) y se sembraron bajo las mismas condiciones de cultivo a una densidad de 5×10^3 células/cm².

Caracterización de las células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADSC)

El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) tras marcar 1×10^6 células con sus respectivos anticuerpos conjugados. 7-AAD se utilizó para excluir las células no viables del análisis y las tinciones no específicas se realizaron según se ha descrito previamente (5). Los anticuerpos monoclonales contra antígenos humanos CD13-PE, CD34-APC, CD45-FITC, CD90-APC se obtuvieron de Becton Dickinson (Mountain View, CA) y CD105-PE de Serotec, Oxford, UK.

Protocolo para la diferenciación hepatogénica de las células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADSC)

Para conseguir la transdiferenciación de las células mesenquimales a linaje hepático se desarrolló un protocolo basado en un *acondicionamiento* de las células mediante el cultivo durante dos días con medio base (DMEM sin suero y gentamicina) complementado con EGF 20 ng/mL (Sigma, Madrid, España), FGFb y FGF4 10 ng/ml (Life Technologies, Barcelona, España) y BMP2 y BMP4 50 ng/ml (Sigma, Madrid, España). A continuación las células se mantuvieron durante siete días en el medio base pero complementado con HGF 20 ng/ml (PeproTech EC, Londres, UK), FGFs 10 ng/ml y nicotinamida 4,9 mM (Sigma, Madrid, España) (*Etapa 1*) y, finalmente (*Etapa 2*), las células se cultivaron entre 7-14 días en medio base complementado con OSM 20 ng/ml (PeproTech EC, Londres, UK), dexametasona 1 mM (Merck Pharma, Mollet del Vallés, España) e ITS premix (BD Biosciences, Madrid, España).

Evaluación de la actividad de los isoenzimas del P450 (CYP)

Las actividades CYP fueron determinadas en microsomas de tejido hepático (6). Para ello, 100 mg de proteína microsomal se incubó durante 15 minutos a 37° C en 300 mL de buffer fosfato 100 mM a pH 7,4, conteniendo un sistema de regeneración-NADPH (Cl_2Mg 5 mM, NADP^+ 1 mM, glucosa-6-fosfatasa 10 mM y glucosa-6-fosfatasa deshidrogenasa 0,3 U/mL) y el sustrato apropiado. Las concentraciones de sustratos para los diferentes isoenzimas del P450 evaluados fueron: 10 μM 7-metoxiresorufina (Molecular probes Europe BV, Leiden, Holanda) (MROD, CYP1A2), 50 μM cumarina (Sigma, St. Louis, MO, USA) (CH, CYP2A6), 200 μM diclofenac (Sigma, St. Louis, MO, USA) (D4OH, CYP2C9), 250 μM clorzoxazona (Sigma, St. Louis, MO, USA) (C6OH, CYP2E1) y 200 μM testosterona (Sigma, St. Louis, MO, USA) (6b-OHT, CYP3A4).

Los ensayos de actividad en cultivo primario de hepatocitos y células de hepatoma humano HepG2 se llevaron a cabo mediante la incubación de las monocapas celulares con sustratos específicos de cada uno de los isoenzimas del P450 [8 μM 7-etoxiresorufina (Roche, Mannheim, Alemania) (EROD; CYP1A1/2)], 10 μM 7-metoxiresorufina (MROD; CYP1A2), 50 μM cumarina (CH; CYP2A6), 15 μM 7-benzoxiresorufina (Roche, Mannheim, Alemania) (BROD; CYP2B6), 500 μM *p*-nitrofenol (Sigma, St. Louis, MO, USA) (PN; CYP2E1) y 250 μM testosterona (TEST; CYP3A4) (7). Las reacciones se pararon aspirando el medio de incubación y añadiendo una solución de β -glucuronidasa/arilsulfatasa (Roche, Mannheim, Alemania) durante dos horas a 37° C.

El contenido en proteína microsomal o celular fue determinado por el método de Lowry (8).

Finalmente, la evaluación de la actividad de los isoenzimas del P450 en los hepatocitos aislados a partir de órganos descartados para implante se llevó a cabo mediante la incubación durante 30 minutos a 37° C, de la suspensión celular ($1,25 \times 10^6$ células/mL) obtenida a partir del aislamiento de hepatocitos de órganos descartados para implante con diferentes sustratos [fenacetina (Ultrafine, Manchester, UK) 10 μM (CYP1A2), clorzoxazona 50 μM (CYP2E1), diclofenac 10 μM (CYP2C9), midazolam (Ultrafine, Manchester, UK) 5 μM (CYP3A4) y cumarina 5 μM (CYP2A6)]. Los metabolitos forma-

dos durante la incubación fueron cuantificados por HPLC/MS/MS (9) y referidos como pmoles de actividad obtenidos por minuto y por millón de células (cultivo primario).

Extracción de RNA y RT-PCR cuantitativa

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el kit comercial TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España). La transcripción reversa se llevó a cabo con la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (M-MLV, Gibco BRL, Paisley, UK). El cDNA obtenido se amplificó con un termociclador a tiempo real Roche (Lightcycler, Roche).

RESULTADOS

Influencia del tiempo de isquemia fría y la esteatosis en el rendimiento del proceso de aislamiento y la viabilidad de los hepatocitos

El estudio de la influencia del tiempo de isquemia fría en el proceso de aislamiento de los hepatocitos se realizó en 38 biopsias quirúrgicas obtenidas de hígados conservados en solución de Celsior con tiempos de isquemia fría comprendidos entre 1 y 17 horas utilizados para trasplante ortotópico. Tanto la viabilidad celular como el rendimiento presentaron un descenso de sus valores conforme aumentaba el tiempo de isquemia fría (Tabla 1).

TABLA 1. Efecto del tiempo de isquemia fría sobre la viabilidad y rendimiento celular

TIEMPO ISQUEMIA FRÍA (horas)	GRUPO (n)	VIABILIDAD (%)	RENDIMIENTO (10 ⁶ células/gr)
1-3	6	93,2 ± 5,6	9,5 ± 4,9
4-7	5	94,2 ± 5,8	12,9 ± 5,7
8-11	6	93,0 ± 9,5	10,5 ± 6,4
12-14	14	78,4 ± 12,5	7,7 ± 5,0
15-17	7	69,1 ± 30,8	6,6 ± 4,0

Para investigar el impacto de la esteatosis en el proceso de aislamiento de los hepatocitos, se utilizaron biopsias quirúrgicas obtenidas de 17 hígados humanos control no esteatóticos y 16 esteatóticos (esteatosis > 40%). Los resultados muestran un rendimiento y una viabilidad celular significativamente inferiores en los aislamientos de hepatocitos de hígados con esteatosis (Tabla 2). El número de preparaciones de hepatocitos que consiguió adaptarse con éxito al cultivo fue inferior en el caso de hígados con esteatosis (100% cultivos satisfactorios en el grupo control y 65% en hígados con esteatosis de grado variable; Tabla 2).

Optimización del aislamiento de hepatocitos a partir de órganos descartados para implante

Sobre la base de los resultados anteriores y la dilatada experiencia de nuestro laboratorio en el aislamiento de hepatocitos a partir de biopsias quirúrgicas (4) hemos tratado de optimizar el proceso de aislamiento de hepatocitos para su aplicación a un órgano entero (1,5-3,5 Kg) o un lóbulo completo (0,5-1 Kg). Se han realizado cinco aislamientos de hepatocitos, lo que nos ha permitido establecer y optimizar las condiciones y protocolos. Los órganos con mayores niveles de esteatosis (esteatosis \geq 40%) dieron como resultado un menor rendimiento celular en el proceso de aislamiento (Tabla 3). Los resultados muestran una tendencia de que las menores viabilidades obtenidas corresponden a los donantes de mayor edad (Tabla 3). En general el rendimiento del proceso de disgregación de hígado o lóbulos enteros es inferior al obtenido con biopsias quirúrgicas (Tabla 2), si bien es de destacar un mayor rendimiento en las muestras de menor peso (un lóbulo) (Tabla 3).

Influencia de la esteatosis en la actividad de enzimas de biotransformación en hepatocitos cultivados y en el hígado

Por una parte se investigó la influencia de la esteatosis en la capacidad biotransformadora de hepatocitos procedentes de biopsias quirúrgicas de hígados con esteatosis. Los niveles de actividad del P450 (ECOD; sustrato de varias isoformas del P450 y 6 β -OHT;

CYP3A4) en los cultivos de hepatocitos preparados a partir de biopsias hepáticas con esteatosis fueron inferiores, particularmente la actividad CYP3A4 de forma significativa (Tabla 2).

Por otra parte, se estudió la influencia de la esteatosis en la capacidad metabólica en microsomas preparados a partir de hígados humanos esteatóticos y no esteatóticos (Tabla 4). Para este fin se cuantificó la actividad ECOD y el resto de actividades se evaluaron como prueba selectiva para diferentes isoformas del CYP. Las preparaciones obtenidas a partir de hígados grasos muestran un descenso significativo del 85%, aproximadamente, para los valores de ECOD y del 56 y 30% para las actividades CYP1A2 y CYP3A4 respectivamente.

Ensayo rápido para realizar el control de calidad funcional de los hepatocitos aislados a partir de órganos descartados para implante

Para poder efectuar un control de calidad funcional de los hepatocitos recién aislados en un periodo de tiempo muy corto como criterio de aceptación o exclusión para ser utilizados para trasplante celular y/o criopreservación, se procedió a la incubación de una alícuota de la suspensión de hepatocitos recién obtenida con una mezcla de sustratos, permitiéndonos determinar simultáneamente la actividad de cinco de los isoenzimas más importantes del P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C9 y CYP2E1). Todas las muestras analizadas mostraron actividad para las diferentes isoformas estudiadas a niveles comparables a los hepatocitos obtenidos de biopsias quirúrgicas de hígados normales que constituyen el control de referencia (Tabla 5).

Caracterización funcional de las células de hepatoma humano HepG2

Se determinaron las actividades enzimáticas de diferentes isoformas del P450 en las células HepG2 y los resultados se compararon con las actividades de los cultivos primarios de hepatocitos humanos. Los niveles de actividad de los diferentes isoenzimas del P450

TABLA 2. Efecto de la esteatosis sobre la viabilidad, el rendimiento celular y la actividad biotransformadora en hepatocitos obtenidos de biopsias quirúrgicas

MUESTRA	SEXO (V/M)	EDAD (años)	VIABILIDAD (%)	RENDIMIENTO (10 ⁶ células/gr)	CULTIVOS SATISFACTORIOS	ECOD (pmol/mg/min)	6β-OHT (pmol/mg/min)
NO ESTEATOSIS (n = 17)	6/11	48 ± 19	94 ± 5	15,8 ± 9,5	100	22,1 ± 8,9	119,7 ± 56,7
ESTEATOSIS ^A (n = 16)	6/10	52 ± 14	82 ± 23	6,1 ± 5,0*	65	14,6 ± 12,4	54,9 ± 38,0*

ECOD, 7-etoxicumarina O-deetilación, 6β-OHT, 6-beta-hidroxitestosterona. A, esteatosis > 40%, confirmado por patólogo. *P < 0,05 con respecto al grupo no esteatósico.

Tabla 3. Aislamiento de hepatocitos a partir de órganos o lóbulos enteros

MUESTRA	SEXO	EDAD (años)	TIPO DE MUESTRA	T ISQUEMIA (h)	ESTEATOSIS (%)	PESO (gramos)	N.º HEPA-TOCITOS VIABLES	VIABILIDAD (%)	RENDIMIENTO (10 ⁶ células/gr)
1	M	80	Lóbulo izquierdo	12	< 30	350	1 × 10 ⁹	73	2,8 × 10 ⁶
2	M	65	Completo	16	40-50	3000	5 × 10 ⁹	85	1,6 × 10 ⁶
3	V	75	Completo	9	40	2200	2,2 × 10 ⁹	53	1 × 10 ⁶
4	M	69	Completo	13	30	1142	3 × 10 ⁹	85	2,6 × 10 ⁶
5	V	32	Lóbulo derecho	11	< 30	1200	3,2 × 10 ⁹	86	2,6 × 10 ⁶

observados en células HepG2 son significativamente menores a los obtenidos en cultivos primarios de hepatocitos, lo cual indica su limitada capacidad para biotransformar xenobióticos (Tabla 6).

TABLA 4. *Actividades de diferentes isoformas del P450 en microsomas preparados a partir de hígados humanos esteatósicos y no esteatósicos*

CYP	ACTIVIDAD	NO ESTEATOSIS	ESTEATOSIS ^A
VARIOS CYPs	ECOD	417 ± 240	66 ± 23
1A2	MROD	25 ± 15,7	10,9 ± 5*
2A6	CH	296 ± 164	370 ± 130
2C9	D4OH	1,8 ± 1	1,4 ± 0,4
2E1	C6OH	6,9 ± 5,8	5,7 ± 3
3A4	6βOHT	727 ± 403	360 ± 255*

Las actividades fueron determinadas en microsomas hepáticos y expresadas como pmoles por minuto y por miligramo de proteína. Los resultados son la media ± SD de diferentes preparaciones (esteatosis n = 9, no esteatosis n = 10). A, esteatosis > 40%, confirmado por patólogo. *P < 0,05 con respecto al grupo no esteatósico. ECOD, 7-etoxicumarina O-deetilación; MROD, 7-methoxyresorufina O-demetilasa; CH, cumarina; D4OH, diclofenac 4'-hidroxilación; C6OH, clorzoxazona 6-hidroxilación; OHT, hidroxitestosterona.

TABLA 5. *Actividad funcional de hepatocitos aislados a partir de órganos enteros descartados para implante*

MUESTRA	CYP3A4	CYP2C9	CYP2E1	CYP2A6	CYP1A2
1	0,695	16,74	0,732	0,78	21,85
2	3,8	22,2	31,3	4	3,6
3	13,2	86,4	–	32	4,7
4	21,4	101,4	95,03	31,48	4,97
5	31,84	195,6	29,01	13,56	24,1
Media ± SD	14,1 ± 12,7	84,4 ± 72,6	39 ± 39,8	16,4 ± 14,8	11,8 ± 10,2
HEPATOCITOS HUMANOS NORMALES (n = 5)	6 ± 2	52 ± 10,8	8 ± 4,8	18,9 ± 7,8	4,1 ± 3,3

Los resultados se expresan como pmol/min/millón células.

Mecanismos moleculares responsables de la pérdida de expresión de los enzimas del P450 en células HepG2

Con objeto de investigar los posibles mecanismos moleculares responsables de la reducción en los enzimas de biotransformación en células HepG2, se evaluó la expresión de factores de transcripción que controlan la expresión de genes hepáticos tales como HNF4 α , PGC1 α , HNF3, SRC, C/EBP β (10). El análisis de los niveles de mRNA mostró niveles inferiores a los obtenidos en cultivo primario de hepatocitos de la mayoría de los factores de transcripción analizados (COUP-TF gamma, SRC1, SRC2, C/EBP β , HNF3 γ), con excepción de los factores SMRT y HNF4 α (clave en el control de la expresión de genes hepáticos) (11), que muestran niveles de expresión iguales o superiores en el hepatoma humano HepG2 (Figura 2). El factor HNF4 α , aunque se expresa en las células HepG2, no es funcionalmente activo. Con el fin de determinar la causa de la falta de actividad de HNF4 α se realizó un análisis de los niveles de mRNA de sus coactivadores PGC1 α y SRC1. Los niveles de mRNA de PGC1 α y SRC1 son muy inferiores a los expresados en hígado humano y en cultivo de hepatocitos (Figura 3). Paralelamente se evaluó la expresión de diferentes isoformas del P450, observándose tan sólo niveles marginales de sus correspondientes mRNA en comparación con el hígado (Figura 3). Estos resultados sugieren que la falta de función de HNF4 α en células HepG2 podría explicarse por la baja expresión

TABLA 6. Actividad del citocromo P450 en cultivos de hepatocitos a las 24 horas y en hepatoma humano HepG2

CYP	ACTIVIDAD	HEPATOCITOS <i>n</i> = 6	HepG2 <i>n</i> = 5
1A1/2	EROD	4,5 \pm 2,0	0,9 \pm 0,5**
1A2	MROD	5,04 \pm 1,87	0,35 \pm 0,34**
2A6	CH	121 \pm 70	0,05 \pm 0,04**
2B6	BROD	2,46 \pm 1,95	0,28 \pm 0,26*
2E1	PNP	104 \pm 57	< 1
3A4	TEST	253 \pm 110	0,18 \pm 0,16**

Las actividades se dan en pmoles producidos por miligramo de proteína y por minuto. Los datos son la media \pm SD. **P* < 0,05 y ***P* < 0,01 con respecto a hepatocitos.

de sus coactivadores PGC1 α y SRC1, siendo probablemente necesarios mayores niveles de coactivadores para la correcta expresión en el hígado de genes CYP controlados por HNF4 α .

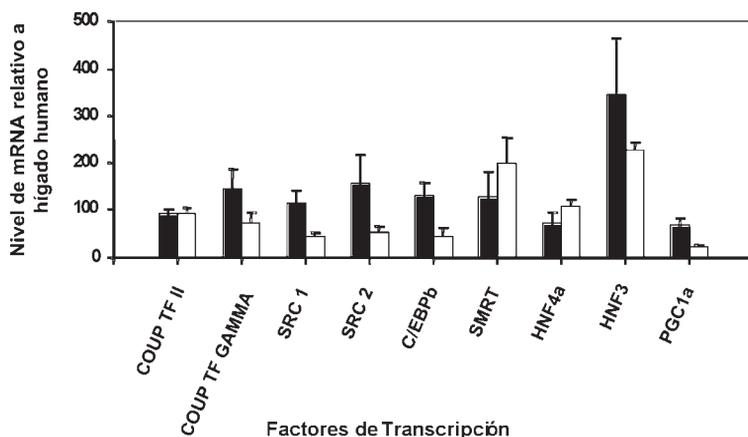


FIGURA 2. Niveles de expresión de diferentes factores de transcripción en hepatoma humano HepG2 y cultivo primario de hepatocitos. El RNA total fue purificado de cultivos de hepatocitos humanos de 24 horas (barras negras) y de células de hepatoma humano HepG2 (barras blancas). Los niveles específicos de mRNA de los diferentes factores de transcripción se determinaron por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores fueron normalizados respecto a los niveles de mRNA del gen ubicuo hPBGD. Las barras representan las medias \pm SD ($n \geq 3$). COUP TF, Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor; SRC, Steroid Receptor Coactivator; C/EBP β , CCAAT/Enhancer Binding Protein; SMRT, Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors; HNF, Hepatocyte nuclear factor; PGC1 α , Peroxisome proliferator activated receptor Gamma coactivator 1 alpha; hPBGD, human porphobilinogen deaminase.

Diferenciación hepatogénica de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo: una nueva fuente de hepatocitos

El análisis por citometría de flujo de marcadores de superficie celular determinó que la población celular de estudio está compuesta por un 95% de células CD105+, mostrando además la coexpresión del otro marcador mesenquimal CD90 (Thy1), en cambio son negativas para el marcador hematopoyético (CD45-).

Para determinar el perfil de expresión de genes de las ADSC diferenciadas a fenotipo hepático, se examinaron diferentes marcadores

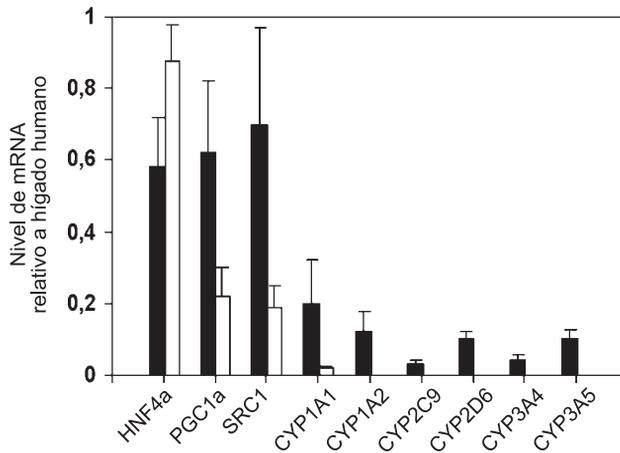


FIGURA 3. Niveles de expresión del factor de transcripción **HNF4 α** , sus coactivadores **PGC1 α** y **SRC1**, y diferentes isoformas del **CYP P450** en hepatoma humano HepG2 y cultivo primario de hepatocitos. El RNA total fue purificado de cultivos de hepatocitos de 24 horas (barras negras) y de células de hepatoma humano HepG2 (barras blancas). Los niveles específicos de mRNA de los diferentes factores de transcripción e isoformas del CYP P450 se determinaron por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores se expresan como niveles de mRNA relativos a hígado humano y fueron normalizados respecto al nivel de expresión (mRNA) del gen hPBGD. Las barras representan las medias \pm SD ($n \geq 3$). HNF4 α , Hepatocyte nuclear factor-4 alpha; PGC1 α , Peroxisome proliferator activated receptor Gamma coactivator 1 alpha; hPBGD, human porphobilinogen deaminase; CYP, citocromo P450.

hepáticos (albúmina, CYP3A4 y factores de transcripción abundantes en hígado) y no hepáticos (THY1) (Figura 4). Los niveles de mRNA del marcador mesenquimal THY1 descendieron drásticamente al finalizar el proceso de diferenciación, aproximándose a los valores obtenidos en hígado y HepG2 (Figura 4A). Por otra parte, examinamos la expresión del factor de transcripción HNF4 α y de su coactivador PGC1 α . Como muestra la Figura 4B, la expresión de ambos factores experimenta un incremento con el transcurso del proceso de diferenciación, siendo más significativo el incremento observado en PGC1 α . Los marcadores hepáticos específicos se expresan paralelamente. Así los niveles de CYP3A4, uno de los citocromos P450 más abundantes del hígado, y la albúmina aumentaron superando incluso los niveles observados en el hepatoma humano HepG2 (Figura 4C, 4D). Durante el proceso de diferenciación pudo apreciarse un significativo cambio morfológico, pasando de formas fibroblásticas en estado indiferencia-

do, a formas más poligonales, características del hepatocito maduro, tras el proceso de diferenciación (Figura 5).

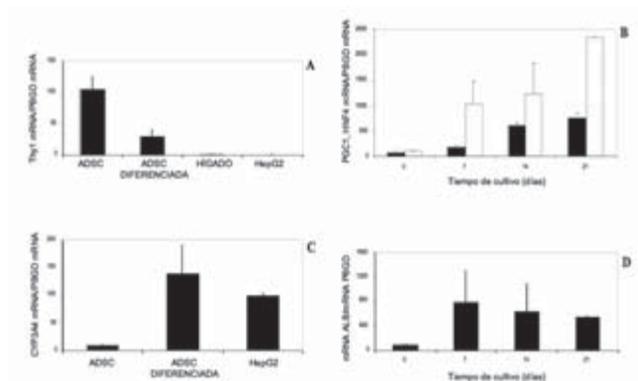


FIGURA 4. Análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión de mRNA de Thy1, CYP3A4, albúmina, HNF4 α y PGC1 α . Los niveles de expresión de Thy1 (A), CYP3A4 (C) fueron cuantificados por RT-PCR en ADSC a tiempo inicial del protocolo de diferenciación (ADSC desdiferenciadas) y al final del protocolo (ADSC diferenciadas). Los niveles de mRNA fueron comparados con los niveles expresados en hígado humano y hepatoma humano HepG2 y normalizados por hPBGD. (B) Niveles de expresión de HNF4 α (barras negras) y PGC1 α (barras blancas) determinados a diferentes tiempos durante el protocolo de diferenciación. (D) Niveles de expresión de albúmina determinados a diferentes tiempos del protocolo de diferenciación. Las barras representan las medias \pm SD ($n \geq 4$). Thy 1, CD90; CYP3A4, citocromo 3A4; HNF4 α , Hepatocyte nuclear factor-4 alpha; PGC1 α , Peroxisome proliferator activated receptor Gamma coactivator 1 alpha; hPBGD, human porphobilinogen deaminase.

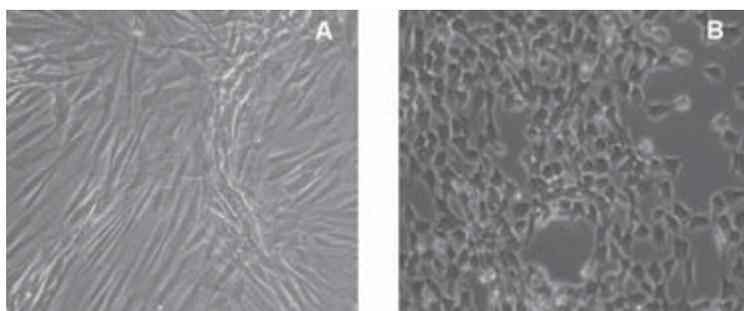


FIGURA 5. Morfología celular de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo. (A) Morfología celular a tiempo 0 del protocolo de diferenciación (ADSC desdiferenciadas). (B) Morfología celular al término del protocolo de diferenciación (ADSC diferenciadas). Magnificación 20X.

DISCUSIÓN

La posibilidad de disponer de hepatocitos humanos es cada vez más limitada, dada la escasez de tejido hepático útil para aislamiento de hepatocitos. Por tanto, la búsqueda de modelos hepáticos funcional y metabólicamente competentes, como alternativa a los hepatocitos humanos, es un objetivo prioritario para los estudios de metabolismo y toxicidad de nuevos fármacos y como fuente de células para terapia celular hepática. Esta necesidad ha promovido la investigación de diferentes fuentes de tejido hepático no aptas para trasplante ortotópico, como son los hígados con esteatosis (12) o de donantes en paro cardíaco, líneas celulares derivadas de hepatomas humanos, así como la transdiferenciación hepática de células progenitoras considerada hoy en día un recurso válido para la obtención de células de fenotipo hepático.

Los resultados de nuestro trabajo muestran que el tiempo de isquemia, así como la esteatosis hepática, son factores que ejercen una gran influencia sobre el proceso de aislamiento de los hepatocitos. Paralelo al aumento del tiempo de isquemia o del grado de esteatosis, tanto el rendimiento celular como la viabilidad celular y la capacidad biotransformadora de fármacos descienden significativamente (Tablas 1 y 2). Estos resultados sugieren que existe un límite de tiempo de isquemia fría del hígado para que el tejido hepático sea útil para aislamiento celular y una menor resistencia de los hepatocitos del hígado esteatósico al procedimiento de disgregación enzimática del tejido y el impacto negativo de la esteatosis sobre la funcionalidad celular.

En el aislamiento de hepatocitos a partir de órganos enteros, tanto la edad del donante, como el peso del órgano fueron determinantes. Las muestras de edades superiores a ochenta años presentan menor viabilidad y rendimiento del aislamiento. Cabe destacar un mayor rendimiento en las muestras de menor peso (un lóbulo), ello es debido seguramente a un mejor acceso y mayor distribución de las soluciones de perfusión en el tejido cuanto menor es su tamaño. La puesta a punto de un método analítico que permita determinar en un breve periodo de tiempo, la competencia metabólica de las células, como control de calidad funcional de los hepatocitos recién aislados (Tabla 5) es imprescindible para tomar decisiones en cuan-

to a su idoneidad para su aplicación clínica y/o para ser crioconservados. La variabilidad observada entre los distintos preparados de hepatocitos analizados es debida a la conocida variabilidad interindividual en el ser humano, debido al polimorfismo de algunos enzimas de biotransformación o a la influencia de factores externos (13, 14).

Un tercer objetivo planteado fue explorar la aplicabilidad de líneas celulares derivadas de hepatomas humanos ya existentes. Si bien su utilidad terapéutica es muy escasa, su utilidad como modelo celular para estudios farmacotológicos podría ser muy importante. Desafortunadamente tanto la actividad de los isoenzimas más importantes del P450 (Tabla 6) como los niveles mRNA (Figura 3) son bajos o indetectables si se comparan con los hepatocitos en cultivo. Los resultados presentados en este trabajo muestran una disminución de los factores de transcripción hepáticos, abundantes en el hígado, que controlan la transcripción de los diferentes isoenzimas del P450 (14-16), a excepción del factor HNF4 α que muestra elevados niveles de expresión en las células HepG2 (Figura 2). Sin embargo, HNF4 α no es funcionalmente activo en estas células, ya que sus coactivadores PGC1 α y SRC1 no se expresan adecuadamente. En la actualidad las células HepG2, como modelo celular hepático, presentan serias limitaciones para estudios de metabolismo de fármacos, así como herramienta para terapia celular y no constituyen una alternativa real a los hepatocitos (17).

La investigación con células madre constituye actualmente uno de los campos más fascinantes de la biología moderna. El potencial de diferenciación de estas células y su elevado grado de plasticidad las convierte en una herramienta altamente sofisticada para obtener de forma ilimitada recursos celulares de diferentes linajes. En el presente trabajo nos hemos planteado como uno de los objetivos más importantes el investigar la posibilidad de obtener células de fenotipo hepático a partir de células madre adultas derivadas de tejido adiposo (ADSC). El tejido adiposo presenta una serie de ventajas frente a otros tejidos utilizados con el mismo fin, como es la médula ósea (18), se puede aislar en gran cantidad con facilidad, con la mínima invasividad y molestia para el paciente y poseen mayor capacidad proliferativa. Aunque el número de estudios realizados sobre la potencial capacidad de las ADSC para diferenciarse a feno-

tipos hepáticos adultos es todavía muy reducido, los resultados son muy prometedores (18, 19). Para inducir la diferenciación hepatogénica de las ADSC, hemos tratado de reproducir el proceso de la diferenciación hepática durante el desarrollo embrionario *in vivo* (Figura 6). Para ello decidimos iniciar el protocolo de diferenciación con la incorporación de FGFs al medio base, que además de ser importantes mitógenos como el EGF, son responsables en parte del desarrollo hacia linajes hepáticos y no pancreáticos (20). FGFb y FGF4 actúan en las etapas iniciales del desarrollo hepático desde el mesodermo cardiaco, conduciendo a la formación de células progenitoras hepáticas (hepatoblastos) (21). Paralelamente a la señalización por FGFs desde el mesodermo cardiaco, BMPs actúan desde el septum transversal del mesénquima en la generación de células progenitoras hepáticas (22). Durante y después de los estadios medios de la hepatogénesis, las células mesenquimales adyacentes al primordio hepático secretan HGF dando soporte a los hepatocitos fetales (23). Posteriormente, las células madre hematopoyéticas producen OSM que, en presencia de glucocorticoides, no sólo promueve la diferenciación de las células hepáticas fetales y su maduración, sino que también evita la hematopoyesis embrionaria (24).

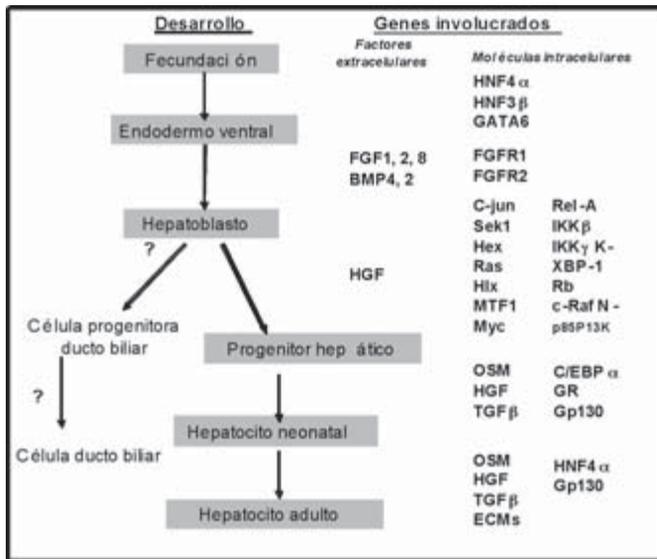


FIGURA 6. Moléculas extra- e intracelulares implicadas en el desarrollo hepático (adaptación ref. 25).

Partiendo de una población CD90+/CD105+, la caracterización funcional dio como resultado un aumento creciente de la expresión de marcadores hepáticos, tales como la albúmina y el CYP3A4, uno de los enzimas del P450 mayoritarios en el hígado, poniendo de manifiesto la capacidad biotransformadora de las ADSC diferenciadas. Paralelamente, se observó una disminución en la expresión del marcador mesenquimal Thy1 (Figura 4A). Los niveles de expresión de factores de transcripción típicamente hepáticos, HNF4 α y su co-activador PGC1 α , también experimentaron un incremento durante el proceso de diferenciación, lo cual explica una activa transcripción mediada por HNF4 α de genes hepáticos, tales como CYP3A4 (Figura 4C) y albúmina (Figura 4D).

Los resultados presentados en este trabajo muestran que ha sido posible optimizar el uso de los recursos de tejido hepático disponible para la obtención de hepatocitos e incrementar la disponibilidad de recursos celulares hepáticos funcionales para estudios fármaco-toxicológicos y terapia celular. Hemos conseguido delimitar las características que debe reunir el tejido hepático y optimizar el procedimiento de aislamiento de hepatocitos para conseguir un buen aprovechamiento del tejido hepático. Sin embargo, nos planteamos para el futuro inmediato el reto de establecer estrategias moleculares que permitan reducir el impacto negativo de la esteatosis en la preparación de hepatocitos aptos para el trasplante, así como de disponer de nuevos métodos de crioconservación de hepatocitos que permita realizar un uso programado de los recursos celulares existentes. Finalmente, hemos explorado el desarrollo de nuevas herramientas celulares basadas en el uso de células madre adultas de tejido adiposo. Aunque todavía en un estadio incipiente y con necesidad de perfeccionar el protocolo de diferenciación celular, es evidente que abre un gran abanico de posibilidades de cara al futuro para el establecimiento de un modelo celular hepático adulto diferenciado, con unas características que otros modelos celulares, como son el hepatoma humano HepG2, no presentan.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda prestada por la Fundación ALIVE y la Unión Europea (Proyectos LSHB-CT-2004-504761, LSHB-CT-2004-512051 y LSSB-CT-2005-037499).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BELLENTANI, S. y TRIBELLI, C. (2001): The spectrum of liver disease in the general population: lesson from the Dionysos study. *Physiol. Rev.* 35: 531-537.
- (2) FISHER, R. A. y STROM, S. C. (2006): Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation.* 82: 441-449.
- (3) LIN, J.; SAHAKIAN, D. C.; DE MORAIS, S. M.; XU, J. J.; POLZER, R. J. y WINTER, S. M. (2003): The role of absorption, distribution, metabolism, secretion and toxicity in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 1125-1154.
- (4) GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, T.; PONSODA, X.; FABRA, R.; TRULLENQUE, R. y CASTELL, J. V. (1997): Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research. In *Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Academic Press, London, pp. 129-153.
- (5) MIRABET, V.; VACA, P.; CARBONELL-UBEROS, F.; MONTERO, J. A.; DALMAU, M. J.; HORNERO, F.; LEQUERICA, J. L. y PIQUER, S. (2002): Ischaemic Heart disease: searching for therapeutical solutions. In: Phillips GO, eds. *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, 359-374.
- (6) DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; JIMÉNEZ, N.; PÉREZ, G.; SERRALTA, A.; MIR, J.; CASTELL, J. V. y GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (2006): Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts. *Drug metabolism and Dispositions.* 34: 1556-1562.
- (7) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. I. y RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- (8) GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, T.; JOVER, R.; RODRÍGUEZ, C.; PONSODA, X.; CLAISE, D.; CASTELL, J. V. y GUGUEN-GUILLOUZO, C. (2001): Expression and induction of a large set of drug metabolism enzymes by the highly differentiated human hematoma cell line BC2. *Eur. J. Biochem.* 268: 1448-1459.
- (9) LAHOZ, A.; DONATO, M. T.; PICAZO, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. y CASTELL, J. V. (2007): Determination of major human cytochrome P450s activities in 96-well plates using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Toxicol In Vitro* (in press).
- (10) COSTA, R. H.; KALINICHENKO, V. V.; HOLTERMAN, A. X. y WANG, X. (2003): Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology.* 38: 1331-1347.
- (11) MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, C. P.; JOVER, R.; DONATO, T.; CASTELL, J. V. y GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (2007): CYP3A4 regulation and expression in hepatocytes. *Curr. Drug. Metab.* 8: 185-195.

- (12) DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; JIMÉNEZ, N.; PÉREZ, G.; SERRALTA, A.; MIR, J.; CASTELL, J. V. y GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (2006): Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts. *Drug metabolism and Dispositions*. 34: 1556-1562.
- (13) GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; DONATO, T.; CASTELL, J. V. y JOVER, R. (2004): Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Current Drug. Metab.* 5: 443-462.
- (14) LEKSTROM-HIMES, J. y XANTHOPOULOS, K. G. (1998): Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273: 28545-28548.
- (15) LI, J.; NING, G. y DUNCAN, S. A. (2000): Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev.* 14: 464-474.
- (16) JOVER, R. (2004): Control génico de la expresión del citocromo P-450 en el hígado. En: *Citocromo P-450* (Cascales-Angosto, M. y Gómez-Lechón, M. J., Eds.), pp. 205-239. Realigraf, S. A. Press, Madrid, Spain.
- (17) GEBHARDT, R.; HENGSTLER, J. G.; MULLER, D.; GLOCKNER, R.; BUENNING, P.; LAUBE, B.; SCHMELZER, E.; ULLRICH, M.; UTESCH, D.; HEWITT, N.; RINGEL, M.; HILZ, B. R.; BADER, A.; LANGSCH, A.; KOOSE, T.; BURGER, H. J.; MAAS, J. y OESCH, F. (2003): New hepatocyte *in vitro* systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab. Rev.* 35: 145-213.
- (18) BANAS, A.; TERATANI, T.; YAMAMOTO, Y.; TOKUHARA, M.; TAKESHITA, F.; QUINN, G.; OKOCHI, H. y OCHIYA, T. (2007): Adipose Tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. 46: 219-228.
- (19) SEO, M. J.; SUH, S. Y.; BAE, Y. C. y JUNG, J. S. (2005): Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *BBRC*. 328: 258-264.
- (20) SCHWARTZ, R. E.; REYES, M.; KOODIE, L.; JIANG, Y.; BLACKSTAD, M. and LUND, T. (2002): Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 109: 1291-1302.
- (21) JUNG, J.; ZHENG, M.; GOLDFARB, M. and ZARET, K. S. (1999): Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*. 284: 1998-2003.
- (22) ROSSI, J. M.; DUNN, N. R.; HOGAN, L. M. and ZARET, K. S. (2001): Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes & Development*. 15: 1998-2009.
- (23) GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; CASTELL, J.; GUILLEN, I.; O'CONNOR, E.; NAKAMURA, T.; FABRA, R. and TRULLENQUE, R. (1995): Effects of hepatocyte growth factor on the growth and metabolism of human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*. 21: 1248-1254.
- (24) MIYAJIMA, A.; KINOSHITA, T.; TANAKA, M.; KAMIYA, A.; MUKOUYAMA, Y. and HARA, T. (2000): Role of oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokines & Growth Factors Reviews*. 11: 177-183.
- (25) HAYNESWORTH, S. E.; BABER, M. A. y CAPLAN, A. I. (1992): Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 13: 69-80.

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 pala-

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

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

B. Organización de los manuscritos

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

contener, en este orden, los siguientes apartados:

1. PORTADA

Título

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

Nombre de los autores

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

Palabras Clave

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

Información de contacto

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

Lista de Abreviaturas

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

2. PÁGINA DEL RESUMEN

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

3. SECCIONES DEL MANUSCRITO

• INTRODUCCIÓN

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

• MATERIAL Y MÉTODOS (PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES)

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

Experimentación en humanos

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

Experimentación animal

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

Fabricantes y proveedores

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

• RESULTADOS

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

• DISCUSIÓN

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

• AGRADECIMIENTOS

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

• BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

• TABLAS

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

• LEYENDAS DE FIGURA

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

• FIGURAS

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

Blanco y negro

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

Color

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

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

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

PERMISOS

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

REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

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

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

A. Editorial Policy

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

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

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

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

The journal publishes articles written in Spanish or English.

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

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

To submit the manuscript electronically as an attachment use the E-mail: edicion@ranf.com. 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.

Sesiones Científicas

13 de marzo

A las 19 horas, Mesa Redonda sobre: «La Ley 14/2007 de investigación biomédica: reflexiones científicas y éticas». Ponentes: Don Juan Ramón Lacadena Calero y don César Nombela Cano.

27 de marzo

A las 19 horas, Conferencia del Doctor Juan José Sanz, Departamento de Ecología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), titulada: «Cambio climático. Pasado, presente y futuro de una amenaza para la biodiversidad».

2 de abril

A las 19 horas, Conferencia del Excmo. Señor don Manuel Domínguez Carmona, Académico de Número de la RANF, titulada: «El cáncer de cérvix en la actualidad».

3 de abril

A las 19 horas, Conferencia del Doctor Salvador Cabrera, Universidad Austral de Chile, titulada: «¿Es posible mejorar los resultados del tratamiento del paciente VIH?» Presentado por el Excmo. Señor don Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

10 de abril

A las 19 horas, Conferencia del Excmo. Señor don Salvador Rivas Martínez, Académico de Número, que versó sobre: «Sinopsis de los bioclimas de América».

Noticias

El 24 de marzo falleció nuestro Académico Correspondiente, Doctor Miguel Deán, que fuera profesor de la Facultad de Farmacia de la UCM.

* * *

El 15 de abril se celebró en nuestra Sede la entrega de los Premios AEFLA 2007. El acto fue presidido por la Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excma. Señora doña M.^a Teresa Miras Portugal; el Secretario General de la misma, Excmo. Señor don Antonio Doadrio; el Presidente del Consejo General de COF, Ilmo. Señor don Pedro Capilla; así como por los Doctores José Félix Olalla, Presidente de AEFLA, y Enrique Ordieres, Presidente de CINFA.

* * *

La Fundación Abbott, en colaboración con la Real Academia Nacional de Farmacia, organizó el acto de presentación de la Guía de Indicación Farmacéutica y Criterios de Derivación al Médico en Síntomas Menores, una herramienta que tiene como objetivo aumentar la efectividad, la eficiencia, la calidad y la seguridad de la atención que reciben los usuarios de farmacia y, de esta manera, contribuir a la mejora de la calidad asistencial en la farmacia comunitaria. Este acto tuvo lugar el 22 de abril a las 19 horas en el Salón Amarillo (Salón de Actos) de la Real Academia Nacional de Farmacia.

* * *

El Doctor Mariano Turiel, Académico Correspondiente, publica dos interesantes artículos sobre «León Felipe, un poeta farmacéutico», y «El IV Centenario: Cervantes y la libertad», en nuestra sección de artículos on line.

* * *

La Fundación Ramón Areces concede unas interesantes becas postdoctorales y de ampliación de estudios en el extranjero para el curso 2008-2009. Consultar la web de la Fundación Ramón Areces para más información.

* * *

Un equipo de investigadores de Nueva York y Barcelona, dirigido por Nuestro Académico de Honor, Excmo. Señor don Joan Massagué, ha abierto nuevas vías para luchar contra la metástasis del cáncer de mama, la expansión por el organismo de células tumorales que causa el 90% de las muertes por esta enfermedad.

* * *

Nos comunican el fallecimiento, el 26 de abril, del Profesor Enrique Alcaraz Varó, coeditor de nuestro Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas. El Doctor Alcaraz era Catedrático en la Universidad de Alicante.

* * *

El Doctor Mariano Esteban Rodríguez, Académico de Número, ha sido nombrado Farmacéutico Ejemplar 2008, por la Junta Directiva de la Asociación de Antiguos Alumnos de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela. Esta distinción le fue entregada el 1 de mayo en el Ayuntamiento de Paredes de Nava (Palencia).

* * *

A nuestro Académico de Número, Excmo. Señor Don Julio Rodríguez Villanueva, le ha sido concedida por la Comunidad de Madrid, la Cruz de Honor de la sanidad madrileña en su categoría de Oro.

17 de abril

A las 19 horas, Sesión Necrológica en homenaje al Excmo. Señor don Eduardo Primo Yúfera, Académico de Honor de la RANF.

24 de abril

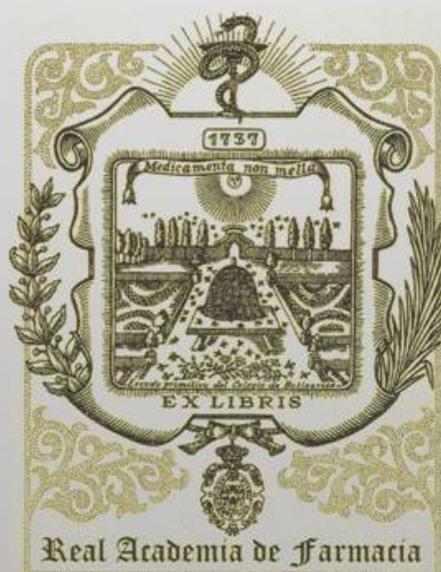
A las 19 horas, conferencia del Profesor Doctor Enrique Villar Ledesma, Académico Correspondiente, titulada: «El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Mecanismos moleculares de la interacción virus-célula. Generación de virus recombinantes con potencial uso terapéutico, provistos de actividad proapoptótica en células tumorales».

7 de mayo

A las 19 horas, conferencia de la Doctora Geesje M. Dalling-Thie, Laboratory of Experimental Vascular Medicine G1-113, AMC, Amsterdam, The Netherlands, titulada: «GPIHBP1: Una nueva proteína de las células endoteliales que afecta al metabolismo de los triglicéridos plasmáticos».

8 de mayo

A las 19 horas, Sesión Necrológica en homenaje al Excmo. Señor Don Gregorio Varela Mosquera, Académico de Número de la RANF, con la intervención de los Profesores Doctores: Don Salvador Zamora Navarro, Catedrático de Fisiología en la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia: «El Maestro»; Excmo. Señor Don Manuel Domínguez Carmona, Académico de Número de la RANF: «El Académico y comunicador de la ciencia»; y Excmo. Señor Don Bernabé Sanz Pérez, Académico de Número de la RANF: «El Investigador».



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
POLÍTICA SOCIAL Y DEPORTE

www.ranf.com

ISSN 1697-4271