

ANALES

DE LA

REAL ACADEMIA NACIONAL DE

FARMACIA



2008

VOLUMEN LXXIV

Núm. 3

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia
FARMACIA, 11 • 28004 MADRID

Fine tuning neuromodulation by adenosine and neuroprotection

Recibido el 14 de febrero de 2008

RIBEIRO, J. A.*

*Institute of Pharmacology and Neurosciences.
Faculty of Medicine and Unit of Neurosciences,
Institute of Molecular Medicine.
University of Lisboa.*

ABSTRACT

Adenosine fine tuning neuromodulation is a very subtle change, similar to what e.g., a pianist does, modulating a sound through insertion of another sound; so, modifying the characteristics of the previous sound. This is what adenosine does to modulate neurotransmitter actions. Adenosine neuromodulation is operated through high affinity inhibitory A_1 and excitatory A_{2A} receptors. These receptors have the particularity of interacting with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators as well as with adenosine transport systems. This modulation is involved in neuroprotection namely via adenosine A_1 receptors in neurotoxicity during hypoxia, reactive oxygen species insults either inhibiting NMDA receptors or as part of interleukin-6 neuroprotective effects. On the other hand A_{2A} receptors mainly trigger the action of several promoters of neuroprotection, e.g., BDNF and GDNF.

Key words: Adenosine receptors.—Neuromodulation.—Neuroprotection.

* **Contact address:**

Professor Joaquim A. Ribeiro.

Institute of Pharmacology and Neurosciences, Faculty of Medicine and Unit of Neurosciences, Institute of Molecular Medicine, University of Lisboa, 1649-028 Lisboa, Portugal.

Email: jaribeiro@fm.ul.pt

RESUMEN

Neuromodulación fina por adenosina y neuroprotección

La neuromodulación fina por adenosina supone un cambio muy sutil, similar al que, por ejemplo, realiza un pianista, modulando un sonido a través de la inserción de otro, modificando así las características del sonido previo. Esto es lo que hace la adenosina para modular las acciones de los neurotransmisores. La neuromodulación por adenosina se realiza a través de receptores de alta afinidad inhibitorios A₁ y excitatorios A₂. Estos receptores poseen la particularidad de interaccionar con receptores para otros neurotransmisores y neuromoduladores, así como con los sistemas de transporte de adenosina. Esta modulación está implicada en la neuroprotección vía receptores de adenosina A₁ en la neurotoxicidad producida durante la hipoxia, daños producidos por las especies reactivas del oxígeno inhibiendo los receptores NMDA o como parte de los efectos neuroprotectores de la interleukina-6. Por otro lado, los receptores A_{2A} principalmente desencadenan la acción de varios promotores de la neuroprotección, como el BDNF y el GDNF.

Palabras clave: Receptores de adenosina.—Neuromodulación.—Neuroprotección.

INTRODUCTION

At chemical synapses, neuromodulators exert a «**fine tuning**», a very subtle change, similar to what, for example, a pianist does, modulating a sound (the effect of a neurotransmitter) through insertion of another sound (the effect of a neuromodulator), so, modifying the characteristics of the previous sound. So far adenosine fills completely the criteria of a neuromodulator (see 26).

In this paper I shall discuss the potential of this neuromodulator as a neuroprotector, which also means, till certain point, to be involved in neuroregeneration and brain repair.

Knowing how neuroregeneration occurs it is possible to conceive processes of protecting the nervous system, in other words to induce and to develop neuroprotection. The cellular elements and the chemical neuromediators involved in brain insults act via interconnections between the cellular elements and their secretions; the immune system and the nervous system are highly regulated in normal physiology, which benefits the organism. When neuronal cells suffer insults the connections in the brain are deprived of

the local control over microcirculation and necessary oxygen, rendering membrane potentials useless to modulate neuronal function. The fact that chemical mediators are already part of normal physiology, whether during development or adulthood, means that their activity can be modified by specific agonists and antagonists to restore homeostasis or to promote the safe pathways that can lead to regeneration. During the past decades considerable experimental and clinical data have been accumulated regarding cellular and biochemical events associated with neuroprotection, neuroregeneration and brain repair.

Three situations related to neuroprotection will be discussed in the context of adenosine-related medicines as therapeutical potential agents. The points I shall emphasize are: first, the insults of neurons caused by hypoxia/ischemia, which is a typical situation that occurs during stroke; secondly, I will discuss the reactive oxygen species (ROS) as a way to induce lesions in neurons and its relation to neurodegenerative diseases and thirdly, how to enhance the putative neuroprotective actions contained in neurotrophic factors, such as e.g. the brain derived neurotrophic factor (BDNF) and the glial derived neurotrophic factor (GDNF).

Before I go into these aspects I would like to give you briefly some biographical notes about my research context that can explain *why a medical doctor graduated in 1965, who wishes to be a psychiatrist enters into basic neuroscience research*. In fact, when in 1957 I started my studies on Philosophy and in particular Psychology, I was fascinated by Perception and in particular Behaviour. Why that strange behaviour of the main character, Meursault of the Albert Camus novel «L'Etranger»? I decided to go into the medical school to become a Psychiatrist. It was indeed with great joy that in 1977 when the first edition of the book ***From Neuron to Brain*** by Stephen Kuffler and John Nichols appear, I read in the preface: «*We work mostly on the machinery that enables neurons to function. Students who become interested in the nervous system almost always tell us that their curiosity stems from a desire to understand perception, consciousness, behaviour, or other higher functions of the brain. Knowing of our preoccupation with the workings of isolated nerve cells or simple cell systems, they are frequently surprised that we ourselves started with similar motivations, and they are even more surprised that*

we have retained those interests. In fact, we believe we are working toward that goal (and in that respect probably we do not differ from most of our colleagues and predecessors). We hope, to show that we are pointed in the right direction».

However, when in 1964 I did the disciplines of psychiatry and neurology, I have an enormous deception, there was almost no help for psychiatric patients. Psychiatric hospitals were filled with «prisoners-like», more than patients. So, I decided to give up psychiatry. After spending almost four compulsory years as a Medical Doctor of the Portuguese Army, two of them in Mozambique, I started in 1970 my first studies on Neuropharmacology. The scientific question was: how brain interferes with autonomic responses? The idea was to relate the cardiotonic effects of ouabain on the brain, with its cardiovascular actions, in particular blood pressure (BP) and heart rate (HR). As HR is under the influence of acetylcholine (ACh) we also measured by bioassay ACh release (27).

This sort of experimental approach had many limitations resulting from being an *in vivo* investigation with many variables involved and also because it was not possible to measure chemically very tiny amounts of ACh. It was like being almost 2000 years back in the History of Pharmacology. Being in the Real Academia Nacional de Farmacia, I think it is appropriate to recall **Galen** (130-200 ac), and his **fluid theory** of cerebral ventricles and nerves as vessels to circulate fluids.

After two years of research under supervision of Fernando Peres-Gomes, he decided to send me to Edinburgh to learn about the most simple cholinergic synapse —the Neuromuscular Junction— as well as to learn about measuring electrophysiologically ACh. Knowing about this junction (synapse) one could start to know about central nervous system synapses and in consequence to know about brain functions and dysfunctions. This makes me fill closer to my initial interest —psychiatry—. Also my readings of Egas Moniz (*Nobel Prize*, 1949), who based upon Ramon y Cajal (*Nobel Prize*, 1906) observations, wrote in 1953: «...Os neurónios encadeam-se e as fibrilhas dos cilindraxis não se ligam em soldadura a outras células; formam contactos através dos botões de Held, de forma variada [...] Sobre esta noção anatómica, que devemos a Ramón y Cajal, concluí

que essas sinapses, repetidas em míriadas de células, são a base orgânica do pensamento. A vida psíquica normal depende do bom funcionamento sináptico; e *as perturbações mentais provêm do desarranjo das sinapses*», In «*Como consegui realizar a leucotomia prefrontal*». *Conferências Médicas Literárias VI*, strongly support my decision to go into basic research to study synapses.

Two other important reasons that encouraged my interests on the Neuromuscular Junction came from my readings of Claude Bernard, (1813-1878), one of my scientific heroes. In 1849 he wrote the important paper on «*Action physiologique des venins (curare)*», published at *C. R. Sceances Soc. Biol. Ses Fil.* 1: 90 where he states that «*Chez les animaux le système nerveux et musculaire met tous ces organes en sympathie ou en rapport les uns avec les autres*», and in the *Physiology Course at the Univ. of Paris in the Sommaire de la «Vingt et unième leçon, delivered on* 28 mai 1856, he wrote: “*le curare est sans action sur les organes actifs de la circulation, et il n'enlève pas au sang ses aptitudes physiologiques*”. —*Action du curare sur le système nerveux: il abolit les manifestations du système nerveux et laisse intact le système musculaire*—. *On peut prouver par là que la contractilité musculaire et l'excitabilité des nerfs moteurs sont deux propriétés distinctes*». The second important reason was the work by the Nobel prize winners, Bernard Katz, Ulf Von Euler and Julius Axelrod awarded jointly in 1970 for their discoveries concerning the humoral transmitters in the nerve terminals and the mechanism for their storage, release and inactivation. It happens that one of the scientific «dilet» sons of Bernard Katz was Bernard Ginsborg just moving in early seventies to the University of Edinburgh, where he was going to be my supervisor.

ADENOSINE AND THE NEUROMUSCULAR JUNCTION

In the late sixties Bernard Katz and Paul Fatt taught Bernard Ginsborg the secrets of Neuromuscular Transmission at the Univ Coll, Lond. When Bernard Ginsborg moved to Edinburgh he started to study the physiology and pharmacology of the Neuromuscular Junction, and together with his post-doc, David Hirst. They were the

first to describe that adenosine inhibits neurotransmitter release and this was done using as a synapse the Rat Neuromuscular Junction (12, 13). When I arrived in Edinburgh, Bernard Ginsborg asked me to continue this work in another model —the Frog Neuromuscular Junction— (32, 33), since in this model there is no margin of safety, making this nicotinic cholinergic synapse more similar to the central excitatory synapses, now known to be the glutamatergic synapses.

ADENOSINE AND THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM SYNAPSES

As described for its action on endplate potentials (EPPs), adenosine at the frog neuromuscular junction, inhibited the amplitude of the excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) recorded from the Guinea pig Olfactory cortex slices, as first described by Okada & Kuroda (22). This work has been followed by the work of Dunwiddie's group, Stone's group using rat hippocampal slices, as well as by my group, in several publications since 1985 (see list in PubMed), where it was described that the A₁-receptor inhibitory effects of adenosine and adenosine analogues on glutamatergic transmission, possess almost all characteristics of those previously observed using the frog neuromuscular junction as a model of synaptic transmission.

Endogenous Adenosine

Adenosine antagonism, adenosine uptake inhibition, adenosine deaminase, 5'-ecto-nucleotidase inhibition were used to manipulate and to recognize the role of endogenous adenosine (29). In parallel we came across with the existence of A_{2A} excitatory effects at the neuromuscular junction (29) and in the hippocampus, the first description was the effect of an A_{2A} agonist (CGS21680) on rat hippocampal glutamatergic synaptic transmission (35). This was further supported by *in situ* hybridization autoradiograms, which confirmed the co-expression of A₁ and A_{2A} in hippocampal brain slices. The relative importance of A_{2A} receptors *vis à vis* A₁ receptors in the hippocampus was shown in 1996 when A_{2A} receptors prove to

be more effective than A₁ receptors in high frequency stimulation (7), and in 2003 when it was demonstrated that A_{2A} receptors are more effective than A₁ receptors in aged than in young rats (see 31). It appears that whilst the most predominant action of extracellular adenosine in the hippocampus is A₁-receptor mediated inhibition of synaptic transmission, the less abundant A_{2A}-receptor are devoted to: prime, trigger or modulate the action and/or inactivation of other neuromodulators and, therefore, to fine-tune neuronal activity (37). Other interesting observations on A_{2A} effects include stimulation by A_{2A}-receptors of the carotid body arterial chemoreceptors and ventilation. Since hypoxia is the physiological stimuli of carotid body chemoreceptors, the finding that a substance, preferentially released by hypoxia-adenosine, stimulates ventilation seems to close a circle of understanding the mechanisms involved in hypoxic stimulation of ventilation (20, 21).

ADENOSINE AND NEUROPROTECTION

What means neuroprotection?

It is a collective therapeutic approach to provide neuronal survival. In a normal neuron the amount of O₂ supplied is according to the cell needs, ATP production fills the needs of the cell to make the pumps to work and pH is established around 7.0. When hypoxia occurs there is necrosis in some cells and in the *penumbra* involving necrosis, the cells enter into a process of apoptosis where it will be possible to rescue some of the cells that did not enter into the necrosis processes.

How could we protect nerve cells from insults?

By this I mean to protect neurons from ischemia and/or hypoxia, from trauma, from neurodegenerative diseases. What do all these situations have in common? The answer is the death of neurons. So the emergent question is how neurons are killed? Glutamate is now accepted to be the main «killer» of neurons after brain insults. Glutamate acts both as a primary excitatory neurotransmitter and a

potential neurotoxin within the mammalian brain. Experimental evidence suggests that hyperactivity of the glutamate NMDA-receptor mediated current system contributes to neuronal death. Also, this neural injury is followed by gliosis which has been linked to the severity of brain lesions. In this context, investigation of substances that can selectively inhibit the glutamate NMDA receptor subtype in humans, while also therapeutically controlling glial cell responses and/or triggering the release of neuroprotective factors from these cells following brain insults, would be of great help in neuroprotection. This has led to the application of pharmacological strategies to limit the lesions and subsequent neurological deficits. The research on pharmacological agents will help to promote functional rewiring of brain after injury in order to obtain neural repair and neurological rehabilitation.

So, the immediate question is: what occurs at a glutamatergic synapse during insults? The actual *consensus* is that too much glutamate is being released and the NMDA-R «till then silent» is opened and becomes too much permeable to Ca^{2+} ions. Because the cell suffers from energy supply i.e. there is no ATP available for the Ca^{2+} pumps to expel the excess of Ca^{2+} , the neurons die. According to this theory if one inhibits glutamate release during insults and/or inhibits NMDA-R activation one could save neurons from the deleterious effects of glutamate.

How one could inhibit glutamate release during insults?

It is well known that if one measures synaptic transmission activity (e.g EPSPs) from rat hippocampal slices, and hypoxia is applied for 90 minutes, this insult inhibits and eventually completely blocks synaptic transmission, an effect that is completely recovered when hypoxia is terminated. It is well established that the inhibitory neurotransmitter, gamma-amino-butyric acid (GABA), inhibits glutamatergic transmission in normoxic conditions but it does not work during hypoxia (see 19).

If GABA, the main inhibitory transmitter in the brain, is not apparently effective during hypoxia to control glutamate involvement in the hypoxia insult, the question one could ask is: which other

substances, also abundant in the brain, as GABA, will have the ability to inhibit glutamatergic transmission?

In the brain, besides the classical neurotransmitters, there are substances that behave as neuromodulators of neurotransmitters and even of neuromodulators themselves see e.g. (35). These substances, in contrast with classical neurotransmitters, are not contained in vesicles, are not released through exocytosis but through transporters, and can be released post-synaptically to act both pre- and post-synaptically on specific receptors. One of these substances intensively studied in the last 25 years is adenosine.

Adenosine exists in all cells, and is released from apparently all insulted cells, including neurons and glial cells. Once in the extracellular space, adenosine modifies cell functioning by operating G protein-coupled receptors.

Adenosine as a neuromodulator

Adenosine is indeed consensually recognised as a very important substance in the homeostasis of the cells of the nervous system, being in relation to cardio-protection once named «a signal of life» (11). It modulates the activity of the nervous system by acting pre-synaptically (by inhibiting or facilitating transmitter release), post-synaptically, and/or non-synaptically. The way adenosine is doing this is through activation of physiologically relevant high affinity adenosine receptors (A_1 , A_{2A}) as well as of a lower affinity receptors (A_{2B} , A_3), which might be relevant in pathological conditions (see 31). Besides affecting directly the neuronal cells, adenosine receptor activation also influences the action of other neurotransmitters as well as of other neuromediators. Because adenosine uses very subtle manners to participate in these interactions, it acts as a *fine tuner*, considering that in this way, adenosine is involved in a very sophisticated interplay between its own receptors and the receptors for other synaptic mediators. From these modulatory actions it is possible to anticipate potential therapeutic applications, especially when these actions are mediated by high-affinity adenosine A_{2A} receptors in regions where clear functions have been identified. The A_{2A} receptor is highly expressed in the striatopallidal GABAergic neurones and expressed in

lower levels in other brain regions. A_{2B} possess low levels of expression in the brain. A_3 has apparently intermediate levels of expression in the human cerebellum and hippocampus and low levels in most of the brain (31). The well known striatal A_{2A}/D_2 receptor interactions may offer new therapeutic leads for basal ganglia disorders, such as Parkinson's disease and Huntington's chorea, as well as for schizophrenia (31). Inhibition of D_2 receptors in the ventral striatum seems to be associated with the antipsychotic effect of neuroleptics, while inhibition of dopamine D_2 receptors in the dorsal striatum is related to their extrapyramidal side effects. In the periphery, the interaction of A_{2A} receptors with other receptors that regulate acetylcholine release from motor nerve terminals could reveal the importance of A_{2A} receptors when deficits in acetylcholine release occur (e.g. myasthenic syndromes). The excitatory effects of A_{2A} receptors on acetylcholine release might prove useful when developing cognitive enhancers that by increasing acetylcholine release could be of therapeutic interest in dementia (e.g. Alzheimer's disease). Since the adenosine A_1 receptors inhibit neurotransmitter release, and inhibit A_{2A} receptor functioning, one can also predict that adenosine-related medicines that combine adenosine A_1 receptor blockade with A_{2A} receptor activation will be useful in situations where an increase in neurotransmitter release is needed. There are also situations where A_{2A} receptor activation might prove to be excitotoxic (e.g. increase in glutamate release) and, therefore, A_{2A} antagonism will be needed (31).

It is worth noting that after several years of concentrating most of the adenosine research efforts on adenosine A_1 receptors, the adenosine A_{2A} prove to be a very promising receptor in terms of understanding the subtle ways used by this nucleoside to implement a harmonic and fine control of synaptic activity.

Although adenosine is not a neurotransmitter on its own, it shares via A_1 activation many properties attributed to the major inhibitory neurotransmitter —GABA, i.e. decreases excitability mediated by glutamate—. So GABA and adenosine constitute key molecules in the control of glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system (see above). Adenosine is able to functionally disconnect GABAergic interneurons by inhibiting their glutamatergic input, a process that might be particularly relevant under conditions of intense adenosine release, such as it happens during hypoxia. Thus,

although indirectly, adenosine inhibitory (A_1) receptors might control GABAergic functioning. Direct excitation of GABAergic nerve terminals by adenosine might occur through A_{2A} receptors (31).

Adenosine as a modulator of other neuromodulators

Besides its direct pre- and post-synaptic actions on neurons, adenosine is rich in nuances of priming, triggering and braking the action of several neurotransmitters and neuromodulators. Adenosine is also able to «synchronize» or «desynchronize» receptor activation for neuropeptides such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) and vasoactive intestinal peptide (VIP), nicotinic autofacilitatory receptors, NMDA receptors, metabotropic glutamate receptors, as well as adenosine own receptors (37). Also the inhibitory action of adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors on nitric oxide (NO) production and iNOS expression in glial cells (6) can constitute a partnership aiming neuronal protection after insults. Of particular importance is the recent finding by Chao (6) that TrkB neurotrophin receptors can be activated in the absence of neurotrophins, providing that A_{2A} receptors are activated. The authors emphasize that although there are suggestions proposing the use of neurotrophins in Alzheimer's dementia, amyotrophic lateral sclerosis and peripheral sensory neuropathy, it has been difficult to deal with delivery and pharmacokinetics of these molecules. Thus, the possibility of promoting trophic effects by manipulating the degree of activation of A_{2A} receptors, may prove highly relevant in neurodegenerative disorders where sustained actions on survival signalling pathways are needed.

Selective activation of adenosine A_{2A} instead of A_1 receptors

Adenosine A_1 and A_{2A} receptors can co-exist in the same nerve terminal (35). Evidence for this arrived from the observation that an A_1 receptor agonist acting pre-synaptically inhibits and an A_{2A} receptor agonist acting also presynaptically enhances the amplitude of endplate potentials recorded intracellularly from a single endplate, which in the case of the striated muscle receives input from only one

nerve ending. The coexistence of both subtypes of high affinity adenosine receptors prompted the question on how adenosine chooses to activate A_1 or A_{2A} receptors, and under which conditions does it discriminate between these receptors. It appears that instead of the classical view that endogenous adenosine activates A_1 receptors regardless of whether it is released as such or formed from adenine nucleotides, adenosine formed from adenine nucleotides acts preferentially on A_{2A} receptors, and adenosine released as such acts preferentially on A_1 receptors (9). This may result from different localization of A_1 and A_{2A} receptors in relation to adenosine release sites and ecto-5'-nucleotidase localization. An indication that burst-like adenosine formation from released adenine nucleotides might be, at least in part, responsible for its preferential action on A_{2A} receptors, is the finding that when motor nerve endings are stimulated at low frequency, i.e., under conditions where smaller amounts of adenine nucleotides are released, the ecto-5'-nucleotidase inhibitor, a,b-methylene ADP (AOPCP), enhances (31) rather than inhibits acetylcholine release. Indeed, the pattern of neuronal firing influences the pattern of purine release and extracellular formation, and in consequence, influences the way purines modulate synaptic transmission. High frequency stimulation favours ATP release, and adenosine formation, which preferentially activates adenosine A_{2A} receptors activation, whereas low frequency stimulation favours adenosine release, and preferential adenosine A_1 receptor activation (see 31).

Modulation of NMDA receptors

In the isolated rat hippocampal neurons, A_1 receptor activation inhibits NMDA receptor-mediated currents (34). In the hippocampus A_1 receptors are also inhibitory of glutamate release and A_{2A} -receptors facilitate glutamatergic synaptic transmission (31). Interestingly, the inhibitory action of A_1 receptor agonists on NMDA receptor mediated currents in hippocampal neurons is observed in a concentration range compatible with a tonic inhibitory action of adenosine. Due to the important role played by NMDA receptors in synaptic plasticity phenomena, as well as in neuronal injury after prolonged stimulation/depolarisation conditions, it is conceivable that the

ability of A₁ receptors to inhibit NMDA currents is the basis of the A₁ receptor mediated inhibition of synaptic plasticity (LTP and LTD) as well as contributes to A₁ receptor mediated neuroprotective actions (31).

To summarize this point I would like to stress that adenosine exerts pre-, post- and non-synaptic effects by acting on high affinity receptors: A₁ and A_{2A}. There are also low affinity receptors: A_{2B} and A₃, but so far their activation is not apparently related with neuromodulation with potential implications for neuroprotection.

Adenosine-Receptor interactions with Adenosine transporter

NECA activates adenosine transport in cultured chromaffin cells (8). This was the first work to making connection between adenosine receptors and adenosine transport. Recently (24), using hippocampal synaptosomes described the nature of this receptor, an A_{2A} receptor, which when activated enhances adenosine uptake, and that A_{2A} receptor activation enhances adenosine release. So, it appears that A_{2A} receptors regulate adenosine transporters influencing the extracellular availability of this nucleoside.

HYPOXIA RELEASES ADENOSINE

It is well established and consistent that after hypoxia/ischemia insults there is release of adenosine into the synaptic cleft. This adenosine is responsible for the inhibition of synaptic transmission during hypoxia, since the A₁-receptor antagonist, a xanthine derivative, DPCPX, attenuates this inhibitory effect of hypoxia by at least 50%. Therefore, the inhibitory effect of hypoxia is a consequence of A₁-receptor activation by huge amounts of adenosine being released (34). One interesting aspect in the adenosine effect is that if one tries to recover from hypoxia in the presence of the A₁ antagonist, DPCPX, the recovery is never complete as it happens during recovery without A₁ blockade. This suggests that adenosine is absolutely needed for complete recovery from hypoxia. This effect of adenosine is a consequence of pre-synaptic inhibition of glutamate

release and subsequent reduction of NMDA-receptor activation (34). So, adenosine A₁-receptor activation by released adenosine depresses hippocampal synaptic transmission during hypoxia but is a process that facilitates recovery upon re-oxygenation.

CEREBRAL ISCHEMIA AND TRAUMA

Cerebral ischemia leads to brain damage caused by pathogenetic mechanisms that are also activated by neurotrauma. These mechanisms include among others excitotoxicity, overproduction of free radicals, inflammation and apoptosis. Furthermore, cerebral ischemia and trauma both trigger similar auto-protective mechanisms including the production of heat shock proteins, anti-inflammatory cytokines and endogenous antioxidants. Neuroprotective therapy aims at minimizing the activation of toxic pathways and at enhancing the activity of endogenous neuroprotective mechanisms. According to (18), the similarities in the damage-producing changes in endogenous substances in the brain may imply that neuroprotective compounds found to be active against one of these conditions may indeed be also protective in the other.

Hypothermia

The use of hypothermia to treat various neurological emergencies, initially introduced into clinical practice in the 1940s and 1950s, had been considered without interest by the 1980s. However, in the early 1990s, there was a revival of its use in the treatment of severe traumatic brain injury. The success of mild hypothermia led to the broadening of its application to many other neurological emergencies. Mild hypothermia has been applied with varying degrees of success in many neurological emergencies, including traumatic brain injury, spinal cord injury, ischemic stroke, subarachnoid haemorrhage out-of-hospital cardiopulmonary arrest, hepatic encephalopathy, perinatal asphyxia (hypoxic-anoxic encephalopathy), and infantile viral encephalopathy. According to (15), there is no total consensus on the efficacy and safety of mild hypothermia though preliminary clinical studies have shown that mild hypothermia can be a feasible and

relatively safe treatment. Recently it has been shown *in vitro* patch clamp studies that in conditions of 32 °C, adenosine inhibits NMDA receptor currents in hypoxia suggesting that adenosine might exert neuroprotection during hypothermia (34).

In summary, during hypoxia the neuroprotection induced by adenosine operates both a decrease of neurotransmitter release via inhibition of pre-synaptic calcium entry by blocking calcium channels (28) and post-synaptically inhibiting calcium entry via inhibition of NMDA-receptors.

Finally I also would like to mention our recent observations on stimulation with interleukin-6 (IL-6), which increases A₁ receptor-mediated inhibition of synaptic transmission. In WT but not in IL6-KO mice, seizures induce adenosine A₁ receptor expression. These observations reinforce the role of adenosine as an anti-epileptic agent. IL-6-induced amplification of A₁ receptor function enhances the responses to readily released adenosine during hypoxia, enables neuronal rescue from glutamate-induced death, and protects animals from chemically induced convulsing seizures. Taken together, these results suggest that IL-6 minimizes the consequences of excitotoxic episodes on brain function through the enhancement of endogenous adenosinergic signaling (see 2).

REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)

During brain insults with xanthine-xanthine oxidase there is production of reactive oxygen species (ROS). It was described by Almeida et al (1) that the synaptic inhibition induced by ROS needs adenosine to completely recover in contrast with what happens in the presence of adenosine A₁ receptor blockade with DPCPX (1).

ENHANCEMENT OF NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF NEUROTROPHIC FACTORS

Neurotrophic factors have been shown to have potential therapeutic applications in neurodegenerative diseases, and nerve growth factor (NGF) is neuroprotective in models of excitotoxicity.

NGF administration, in the acute, post-traumatic period following fluid-percussion brain injury, apparently improves post-traumatic cognitive deficits (39) and a neurotrophic factor treatment following traumatic brain injury is neuroprotective (16). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has been shown to be neuroprotective in models of excitotoxicity, axotomy and cerebral ischemia. Blaha et al. (3) demonstrated the therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor following traumatic brain injury in the rat. Neurotrophic factors are involved in neuronal maturation during development, and protect neurons in experimental models of neurodegenerative diseases. However, because of the blood brain barrier it is very difficult to deliver these factors into the brain. A way to overcome this difficulty was implemented by (38) using trial infusions of nerve growth factor (NGF) in three patients with Alzheimer's disease. NGF was infused continuously through a neurosurgically implanted cannula into the lateral ventricles of the brain (38). However, technical difficulties discouraged the continuation of this therapy.

BDNF is a neurotrophin abundant in the brain and recently it has been shown that BDNF applied acutely facilitates synaptic transmission if, before its application one depolarises the preparation with potassium (4). Also in hippocampal synaptosomes BDNF facilitates potassium-evoked glutamate release providing synaptosomes have been previously depolarised by potassium (5).

Another group (17) showed that A_{2A} receptors induce phosphorylation of BDNF-TrkB-receptors. Since depolarisation enhances the release of adenosine our group (see 9) decided to investigate if activating A_{2A} receptors we could selectively facilitate BDNF actions on synaptic transmission. In fact with the activation of A_{2A} receptors with selective agonists or by increasing the adenosine production in the brain with adenosine kinase inhibitors (e.g. iodotubercidin), it is possible to induce facilitatory effects of BDNF on synaptic transmission in hippocampal slices (see Figure 1). In non- A_{2A} pre-conditioned slices there is no BDNF effect on synaptic transmission (9). It therefore appears to exist potential for the use of A_{2A} agonists or substances such as adenosine kinase inhibitors, which through peripheral administration could wake up «sleeping» neurotrophic factors in order to induce neuroprotection. This is also

true in ageing (10) where neuroprotection is hardly needed. There is a relationship between age-related changes in the density of TrkB receptors and adenosine A_{2A} receptors on what concerns BDNF-induced enhancement of synaptic transmission in the hippocampus (10). This should be taken into consideration whenever evaluating BDNF actions in nerve cells, and may prove relevant in the design of BDNF-based therapeutic strategies.

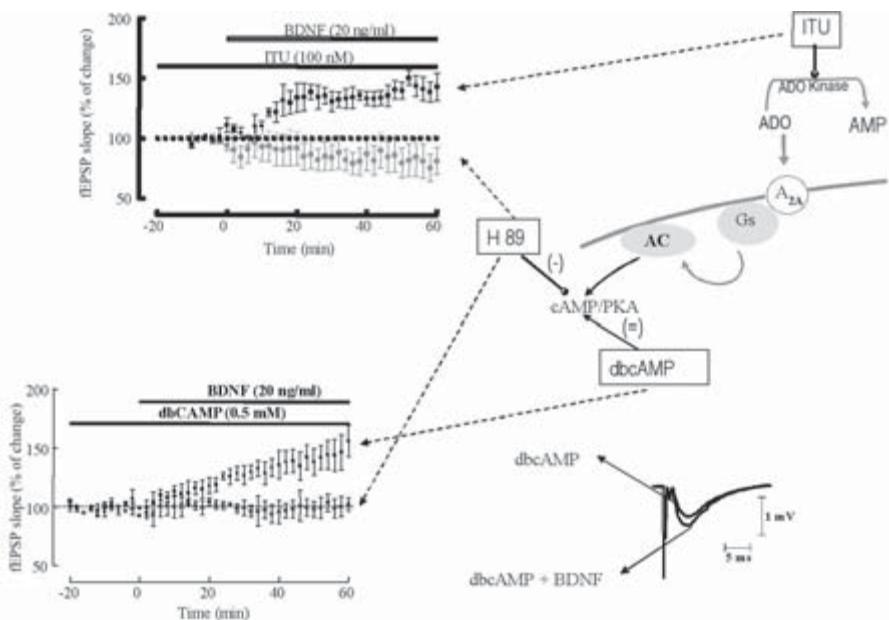


FIGURE 1. Mechanisms involved in the activation adenosine A_{2A}-receptors.
It is proposed an intracellular cascade involving the cyclic AMP/PKA and its potential relationship with the BDNF enhancement of synaptic transmission.

Also GDNF (14) in striatum promotes release of dopamine. GDNF has been pointed out as a potential therapeutic approach in the management of Parkinson's disease (25). So, the prevention of GDNF effect by A_{2A} receptor antagonism point towards the need of further studies on the consequences of long-term therapy with A_{2A} receptor blockers in neurodegenerative diseases where neurotrophic factors may play a beneficial role. One issue that should be explored in the future is the optimal time window for combined beneficial effects for GDNF and A_{2A} receptor agonists/antagonists. If, in the late stages

of neurodegenerative diseases, A_{2A} receptor antagonists can be advantageous, in the early stages, where an enhancement of neurotrophic factors should be highly desirable, A_{2A} receptor antagonists should be avoided in order to allow neurotrophic influences.

Perspectives to explore the potential use of adenosine to induce neuroprotection

By using A_{2A} agonists or adenosine kinase inhibitors (which induce the production of considerable amounts of endogenous adenosine) that cross blood brain barrier, it would be possible to promote the facilitation of BDNF or GDNF actions on synaptic transmission (see Figure 2).

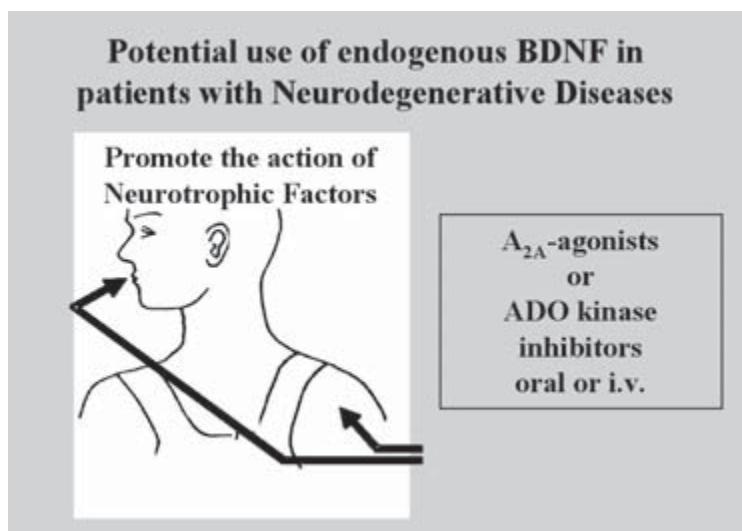


FIGURE 2. **Perspectives to explore the potential use of adenosine to induce neuroprotection.** By using A_{2A} agonists or adenosine kinase inhibitors (which induce the production of considerable amounts of endogenous adenosine) that cross blood brain barrier, it would be possible to promote the facilitation of BDNF on synaptic transmission.

CONCLUSIONS

1. Synaptic transmission during neuronal insults is under tight control of endogenous extracellular adenosine.
2. A₁-Receptor minimize the activation of toxic pathways e.g. inhibiting glutamate release, inhibiting NMDA receptor-mediated currents, and IL-6 facilitates A₁-Receptor inhibition, and A_{2A}-Receptor interplays with receptors for other neuromodulators via subtle modifications of fine tuning, «synchronizing» or «desynchronizing» receptor activation.
3. A_{2A}-Receptors enhance the activity of endogenous neuroprotective mechanisms e.g. the action of neurotrophic factors, which are devoted to protect neurons from lesions (e.g. BDNF, GDNF), so, by A_{2A} receptor activation one can overcome difficulties found with the use of neurotrophins in neurodegenerative disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

Laboratory research is currently supported by grants from Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Gulbenkian Foundation and European Union. I would like to acknowledge colleagues and collaborators with shared publications: Univ Lisboa (Ana M. Sebastião, Alexandre de Mendonça), Univ Coimbra (Rodrigo Cunha, João Malva), Univ Porto (Paulo Correia-de-Sá, Graça Lobo), Univ Edinburgh (Bernard Ginsborg, Jamieson Walker, Dany McQueen), Karolinska Inst (Bertil Fredholm), Univ Complutense, Madrid (María Teresa Miras-Portugal, Esmerilda Delicado), Baylor Coll Med, Houston (Peter Saggau), Univ Leipzig (Peter Illes), NIH (Sergi Ferré), Univ Groningen (Knut Biber), Univ Heidelberg (Ulrich Schwabe), Univ Frankfurt (Herbert Zimmerman), Univ Leiden (Ad Ijzerman), Univ Murcia (Jesús Hernández), Univ Florence (Felicità Pedata), Univ Seville (José María Delgado), and Post-docs: Luisa Lopes, Claudia Valente, Diana Cunha-Reis, and PhD students presently in the lab: Paula Luís; Natália Assaife-Lopes; Sandra Vaz; Maria José Diógenes; Catarina Gomes; Ana Rita Costenla; Catarina Fernandes; António Pinto-Duarte; Raquel Dias; Sofia Ferreira.

BIBLIOGRAPHY

- (1) ALMEIDA, C. G.; DE MENDONÇA, A.; CUNHA, R. A. & RIBEIRO, J. A. (2003): Adenosine promotes neuronal recovery from reactive oxygen species induced lesion in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lets.* 339: 127-130.
- (2) BIBER, K.; PINTO-DUARTE, A.; WITTENDORP, M. C.; DOLGA, A. M.; FERNANDES, C. C.; KUNZEL, J. V. F. D.; KEIJSER, J. N.; DEVRIES, R.; IJZERMAN, A. P.; RIBEIRO, J. A.; EISEL, U.; SEBASTIÃO, A. M. and BODDEKE, G. M. (2008): Interleukin-6 upregulates neuronal adenosine A1 receptors: implications for neuromodulation and neuroprotection. *Neuropsychopharmacology* advance online publication 7 November 2007; doi: 10.1038/sj.npp.1301612.
- (3) BLAHA, G. R.; RAGHUPATHI, R.; SAATMAN, K. E. & McINTOSH, T. K. (2000): Brain-derived neurotrophic factor administration after traumatic brain injury in the rat does not protect against behavioral or histological deficits. *Neuroscience*. 99: 483-493.
- (4) BOULANGER, L. & Poo, M. M. (1999): Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci.* 4: 346-351.
- (5) CANAS, N.; PEREIRA, I. T.; RIBEIRO, J. A. & SEBASTIÃO, A. M. (2004): Brain-derived neurotrophic factor facilitates glutamate and inhibits GABA release from hippocampal synaptosomes through different mechanisms. *Brain Res.* 1016: 72-78.
- (6) CHAO, M. V. (2003): Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 4: 299-309.
- (7) CORREIA-DE-SÁ, P.; TIMÓTEO, M. A. & RIBEIRO, J. A. (1996): Presynaptic A1-inhibitory/A2a-facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *J. Neurophysiol.* 76: 3910-3919.
- (8) DELICADO, E. G.; RODRIGUES, A.; SEN, R. P.; SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. (1990): Effect of N- ethylcarboxamidoadenosine (NECA) on adenosine transport in cultured chromaffin cells. *J. Neurochem.* 54: 1941-1946.
- (9) DIÓGENES, M. J.; FERNANDES, C. C.; SEBASTIÃO, A. M. & RIBEIRO, J. A. (2004): Activation of adenosine A2A receptor facilitates BDNF modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 24: 2905-2913.
- (10) DIÓGENES, M. J.; ASSAIFE-LOPES, N.; PINTO-DUARTE, A.; RIBEIRO, J. A. & SEBASTIÃO, A. M. (2007): Influence of age on BDNF modulation of hippocampal synaptic transmission: interplay with adenosine A_{2A} receptors. *Hippocampus*. 17: 577-585.
- (11) ENGLER, R. L. (1991): Adenosine. The signal of life? *Circulation*. 84: 951-954.
- (12) GINSBORG, B. L. & HIRST, G. D. (1971): Cyclic AMP, transmitter release and the effect of adenosine on neuromuscular transmission. *Nat. New Biol.* 232: 63-64.
- (13) GINSBORG, B. L. & HIRST, G. D. (1972): The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J. Physiol.* 224: 629-645.

- (14) GOMES, C. A. R. V.; VAZ, S. H.; RIBEIRO, J. A. & SEBASTIÃO, A. M. (2006): Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances dopamine release from striatal nerve endings in an adenosine A2A receptor dependent manner. *Brain Res.* 1113: 129-136.
- (15) INAMASU, J. & ICHIKIZAKI, K. (2002): Mild hypothermia in neurologic emergency: an update. *Ann. Emerg. Med.* 40: 220-230.
- (16) KIM, B. T.; RAO, V. L.; SAILOR, K. A.; BOWEN, K. K. & DEMPSEY, R. J. (2001): Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on hippocampal neurons after traumatic brain injury in rats. *J. Neurosurg.* 95: 674-679.
- (17) LEE, F. S. & CHAO, M. V. (2001): Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 3555-3560.
- (18) LEKER, R. R. & SHOHAMI, E. (2002): Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Rev.* 39: 55-73.
- (19) LUCCHI, R.; LATINI, S.; DE MENDONÇA, A.; SEBASTIÃO, A. M. & RIBEIRO, J. A. (1996): Adenosine by activating A1 receptors prevents GABA_A-mediated actions during hypoxia in the rat hippocampus. *Brain Res.* 732: 261-266.
- (20) McQUEEN, D. S. & RIBEIRO, J. A. (1981): Effect of adenosine on carotid body chemoreceptor activity in the cat. *Br. J. Pharmacol.* 74: 129-136.
- (21) MONTEIRO, E. C. & RIBEIRO, J. A. (1987): Ventilatory effects of adenosine mediated by carotid body chemoreceptors in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 335: 143-148.
- (22) OKADA, Y. & KURODA, Y. (1980): Inhibitory action of adenosine and adenosine analogs on neurotransmission in the olfactory cortex slice of guinea pig - structure-activity relationships. *Eur. J. Pharmacol.* 61: 137-146.
- (23) PATEL, N. K.; BUNNAGE, M.; PLAHA, P.; SVENSEN, C. N.; HEYWOOD, P. & GILL, S. S. (2005): Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. *Ann. Neurol.* 57: 298-302.
- (24) PINTO-DUARTE, A.; COELHO, J. E.; CUNHA, R. A.; RIBEIRO, J. A. & SEBASTIÃO, A. M. (2005): Adenosine A2A receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 93: 595-604.
- (25) QUIROZ, C.; GOMES, C.; PAK, A. C.; RIBEIRO, J. A.; GOLDBERG, S. R.; HOPE, B. T. & FERRÉ, S. (2006): Blockade of adenosine A2A receptors prevents protein phosphorylation in the striatum induced by cortical stimulation. *J. Neurosci.* 18: 10808-10812.
- (26) RIBEIRO, J. A. (1979): Purinergic modulation of transmitter release. *J. Theor. Biol.* 80: 259-270.
- (27) RIBEIRO, J. A. & PERES-GOMES, F. (1977): Acetylcholine release in cerebrospinal fluid by ouabain. *Neuropharmacology.* 16: 695-698.
- (28) RIBEIRO, J. A.; SÁ-ALMEIDA, A. M. & NAMORADO, J. M. (1979): Adenosine and adenosine triphosphate decrease ⁴⁵Ca uptake by synaptosomes stimulated by potassium. *Biochem. Pharmacol.* 28: 1297-1300.
- (29) RIBEIRO, J. A. & SEBASTIÃO, A. M. (1987): On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* 384: 571-585.

- (30) RIBEIRO, J. A. & SEBASTIÃO, A. M. (1986): Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A_3) adenosine receptor. *Prog. Neurobiol.* 26: 179-209.
- (31) RIBEIRO, J. A., SEBASTIÃO, A. M. & DE MENDONÇA, A. (2003): Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 68: 377-392.
- (32) RIBEIRO, J. A. & WALKER, J. (1975): The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.* 54: 213-218.
- (33) RIBEIRO, J. A. & WALKER, J. (1973): Action of adenosine triphosphate on endplate potentials recorded from muscle fibres of the rat-diaphragm and frog sartorius. *Br. J. Pharmacol.* 49: 724-725.
- (34) SEBASTIÃO, A. M.; DE MENDONÇA, A.; MOREIRA, T. & RIBEIRO, J. A. (2001): Activation of synaptic NMDA receptors by action potential-dependent release of transmitter during hypoxia impairs recovery of synaptic transmission upon reoxygenation. *J. Neurosci.* 21: 8564-8571.
- (35) SEBASTIÃO, A. M. & RIBEIRO, J. A. (1992): Evidence for the presence of excitatory A_2 adenosine receptors in the rat hippocampus. *Neurosci. Letts.* 138: 41-44.
- (36) SEBASTIÃO, A. M. & RIBEIRO, J. A. (1996): A_2 receptor mediated excitatory actions of adenosine in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 48: 167-189.
- (37) SEBASTIÃO, A. M. & RIBEIRO, J. A. (2000): Fine tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 341-346.
- (38) SEIGER, A.; NORDBERG, A.; VON HOLST, H.; BACKMAN, L.; EBENDAL, T.; ALAFUZZOFF, I.; AMBERLA, K.; HARTVIG, P.; HERLITZ, A.; LILJA, A., et al. (1993): Intracranial infusion of purified nerve growth factor to an Alzheimer patient: the first attempt of a possible future treatment strategy. *Behav. Brain Res.* 57: 255-261.
- (39) SINSON, G.; VODDI, M. & MCINTOSH, T. K. (1995): Nerve growth factor administration attenuates cognitive but not neurobehavioral motor dysfunction or hippocampal cell loss following fluid-percussion brain injury in rats. *J. Neurochem.* 65: 2209-2216.

Sesiones

Influencia de la sialilación y de la «pegilación» de la molécula de ciertos medicamentos en su actividad

Recibido el 6 de marzo de 2008

JOSÉ ANTONIO CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO *
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia
Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca

RESUMEN

Desde el esclarecimiento de la estructura del ácido *N*-acetilneuramínico por Klenk y Faillard en la década de 1950, el interés por el estudio de la composición y características de la cincuentena actualmente conocida de ácidos siálicos (mayoritariamente *N*-acilneuramínicos) ha ido en incesante aumento paralelamente con el hallazgo de sus diversas e importantísimas funciones biológicas.

En relación con el papel biológico del ácido siálico integrante de la molécula de la hormona eritropoyetina, se ha comprobado que la concentración del mismo determina la pervivencia (semi-vida) de ella en el plasma sanguíneo y, por tanto, la duración de la actividad biológica de esta hormona.

Además, a un incremento, artificialmente conseguido mediante técnicas recombinantes, del contenido de este ácido en la composición de dicha molécula corresponde una ampliación de la semi-vida de la hormona, que pasa a ser de unas ocho horas a una semana como mínimo; lo que constituye una enorme ventaja en la administración de tal fármaco a las personas que lo necesitan en tratamientos antianémicos (pacientes con trastornos renales, de SIDA o sometidos a quimioterapia).

Curiosamente, la actividad de la eritropoyetina carente de ácido siálico se mantiene en los ensayos *in vitro*. Pero no así en los *in vivo*.

Estudios paralelos, aunque no tan profundos, también han sido realizados con otras sialoglicoproteínas y con la enzima glucocerebrosidasa.

* Contacto:

José Antonio Cabezas Fernández del Campo.
Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Paseo Carmelitas, 43. Salamanca (España).

Otros datos se refieren a los agentes antianémicos obtenidos por incorporación en la molécula de derivados del polietilenglicol: «pegilación».

Palabras clave: Eritropoyetina.—EPO.—rHuEPO.—Ácido siálico.—Ácido *N*-acetilneuramínico.—Glucocerebrosidasa.—Pegilación.

ABSTRACT

Effect of the degree of sialilation of certain drugs on their activity

Since the elucidation of the structure of the *N*-acetylneuraminic acid by Klenk and Faillard in the 1950s, interest in the study of composition and characteristics of the about 50 sialic acids (mainly *N*-acylneuraminic acids) currently recognized has undergone an unceasing increase in parallel with the finding of their diverse and important functions.

Regarding the biological role of the sialic acid component of the erythropoietin hormone, it has been demonstrated that the concentration of this acid determines the half-life of the hormone in blood plasma and hence the duration of the activity of the hormone.

Furthermore, to an expansion of the half-life of the hormone, which passes from 8 hours to about one week, corresponds to an increase in the content of this acid in the composition of the hormone molecule (this increase being achieved by recombinant techniques). This expansion allows a remarkable advantage in the administration procedure of this drug to people who require it for their antianaemic treatment (renal disorders and immunodeficient patients as well as persons subjected to chemotherapy).

Curiously, the desialilated erythropoietin keeps its activity in *in vitro* but not in *in vivo* assays.

Parallel studies, although not as deep as these, have also been carried out with other sialoglycoproteins and with the cerebrosidase enzyme, as well as other polyethylene glycol (PEG) derivatives.

Key words: Erythropoietin.—EPO.—rHuEPO.—Sialic acid.—*N*-acetylneuraminic acid.—Glucocerebrosidase.—Pegylation.

1. INTRODUCCIÓN: HIPÓTESIS

1.^{a)} ¿Influye *per se* la molécula del ácido siálico (integrante de la fracción oligosacáridica del glicoconjungado), como constituyente de la composición de un medicamento de naturaleza glicoconjungada, en la actividad de éste?

2.^{a)} ¿Influye, no *per se*, sino indirectamente, pero eficazmente, prolongando la semi-vida de dicho medicamento?

3.^{a)} ¿Pueden coexistir ambas posibilidades?; (o sea, las hipótesis 1.^a y 2.^a).

4.^{a)} ¿Depende la actividad de la eritropoyetina (que es un sialoglicoconjugado) no de la molécula del ácido siálico *per se* sino de algún otro monosacárido también integrante de su fracción glicánica?

Recuérdense las características de los ácidos siálicos:

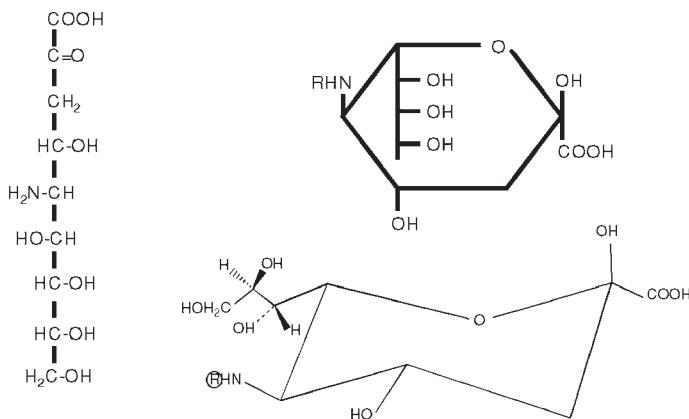
2. PECULIARIDADES DE LA MOLÉCULA DEL ÁCIDO NEURAMÍNICO (ESQUELETO DE LA MAYORÍA DE LOS ÁCIDOS SIÁLICOS)

- Es un monosacárido excepcional, con mayor número de átomos de carbono que todos los otros monosacáridos, resultante de la condensación de una molécula de ácido pirúvico con otra de manosamina.
- Es un ácido ónico (R-COO⁻), lo que le confiere una marcada polaridad.
- Es un polihidroxiácido.
- Es un derivado tipo cetosa (-C=O).
- Es un δ-aminoácido peculiar.
- Su estructura acíclica (Figura 1) se halla en equilibrio con la cíclica, siendo ésta la muy mayoritariamente predominante (1).

3. ÁCIDOS SIÁLICOS

3.1. Antecedentes históricos

- Ernest KLENK, en Colonia (Alemania), prosiguiendo sus estudios de la década de 1930, hacia 1941 identificó un nuevo compuesto a partir de cerebros de ciertos pacientes fallecidos por enfermedades del sistema nervioso, al que denominó

**Ácido *N*-acilneuramínico**

Ácido neuramínico

Neu5Ac ($R=-COCH_3$) Ácido *N*-acetilneuramínicoNeu5Gc ($R=-COCH_2OH$) Ácido *N*-glicolilneuramínico

FIGURA 1. Estructura (acíclica) del ácido neuramínico y cíclica de dos ácidos acilneuramínicos: el *N*-acetil- y el *N*-glicolilneuramínico.

Neuramin Säure (= ácido neuramínico), y le asignó una estructura que resultó ser inexacta (1, 2).

- Gunnar BLIX y colaboradores (Lars SVENNERHOLM y otros), en Uppsala (Suecia), hacia 1936, aislaron, a partir de la mucina submaxilar bovina, un compuesto que, erróneamente, consideraron como un disacárido, al que denominaron sialic acid o Sialin Säure (= ácido siálico), por encontrarse en la saliva (sialon, en griego) (1, 2).
- Alfred GOTTSCHALK, judío alemán residente en Canberra (Australia), sometió, hacia 1949, ciertas glicoproteínas a un tratamiento con virus de la gripe, obteniendo un producto —por acción de la RDE (*receptor destroying enzyme*, que es la sialidasa)— con propiedades muy similares a las de los compuestos aislados por Klenk y Blix (1, 2).
- KLENK y su discípulo Hans FAILLARD, hacia 1954, determinaron la estructura correcta de dicho compuesto (1, 2).
- BLIX, GOTTSCHALK y KLENK acordaron conjuntamente denominar neuraminic acid al esqueleto fundamental de nueve

átomos de carbono del mismo, cuyos derivados acilados (acetilados o glicolilados) —hoy sabemos que los hay también no acilados— se llamarían *sialic acids* (= *ácidos siálicos*). Su propuesta fue publicada en *Nature*, en 1957; pero no siempre ha sido seguida con fidelidad, especialmente por los virólogos no europeos (1-3).

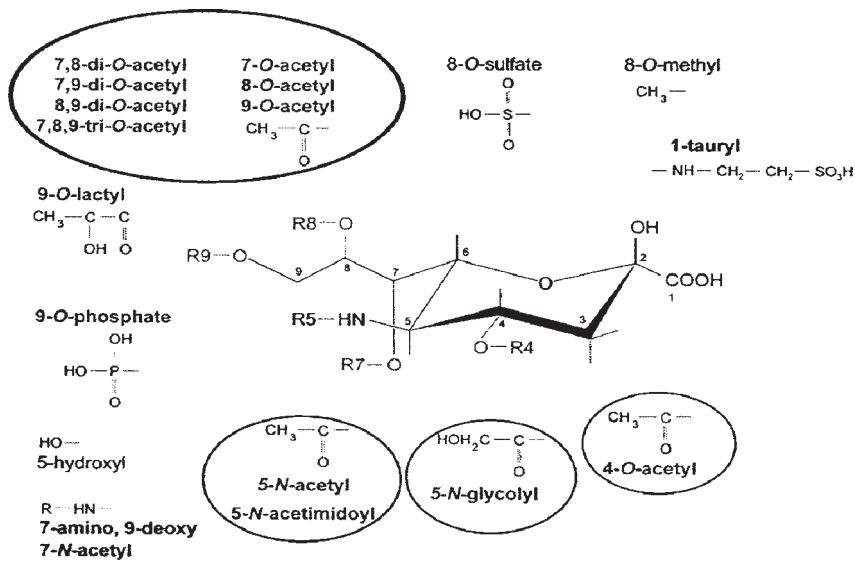
- FAILLARD y José A. CABEZAS, en Colonia, en 1962 separaron por primera vez, mediante cromatografía en capa fina, los ácidos *N*-acetil- y *N*-glicolilneuramínico cristalizados, procedentes de suero de ternera y de gallina (4). Cabezas, en 1965, en Colonia, puso a punto la separación de estos y otros ácidos siálicos mediante cromatografía en fase gaseosa (5).
- Leonard WARREN, en Filadelfia, logró la determinación de los ácidos siálicos en numerosos materiales biológicos mediante un método muy sensible puesto a punto por él, en la década de 1960. Roland SCHAUER, en Bochum y Kiel, siguiendo brillantemente las investigaciones de Klenk y Faillard, está consiguiendo la identificación de nuevos ácidos siálicos y profundizar en el conocimiento de sus funciones.

3.2. Estructura de ácidos siálicos naturales

Esquemáticamente la Figura 2 muestra dicha estructura, según Schauer (6).

3.3. Peculiaridades y funciones biológicas de los ácidos siálicos

- Se conoce actualmente la existencia de más de 50 estructuras de ácidos siálicos, hecho que no sucede con ningún otro monosacárido.
- Se sitúan en el extremo de las moléculas de las que forman parte.
- Sólo se hallan en:
 - Vertebrados.
 - Algunos invertebrados (como estrellas de mar).

FIGURA 2. *Ácidos siálicos existentes en la naturaleza* (6).

- Algunos tipos de bacterias y virus.
- No se han encontrado en vegetales.
- Se biosintetizan por la unión de hexosamina + piruvato.
- El derivado nucleotídico con el que se activan es el CMP, no el UDP o el GDP.
- Trabajos llevados a cabo principalmente por el Académico de la RANF, Profesor Roland Schauer, han puesto de manifiesto que los **ácidos siálicos** presentan «varias importantes e incluso diametralmente opuestas **funciones biológicas**», entre las que se hallan:
 - Las debidas a su carga negativa.
 - Su influencia sobre la estructura de macromoléculas.
 - Su protección frente a ataques enzimáticos.
 - Su influencia sobre la especificidad de antígenos.
 - Tener sitios de reconocimiento.
 - Poseer efecto anti-reconocimiento (efecto de enmascaramiento).

Puede deducirse que algunas funciones de los glicoconjungados están determinadas, al menos parcialmente, por participar en su composición los ácidos siálicos.

4. GLICOCONJUGADOS

4.1. Composición y estructura

Glicoconjungados —equivalente a *glycoconjugués* y a *glycoconjugates*— son aquellos compuestos resultantes de la unión fuerte (covalente) de una fracción glucídica (denominada *glicano*) y otro componente, que puede ser protídico o lipídico. En el primer caso se trata de las *glicoproteínas* (o *glicoproteídos*) (Figura 3), de los *glicopéptidos* o de los *péptidoglicanos*. Estos últimos compuestos contienen los *glicosaminoglicanos*, antes llamados *mucopolisacáridos* o *mucopolisacáridos ácidos*.

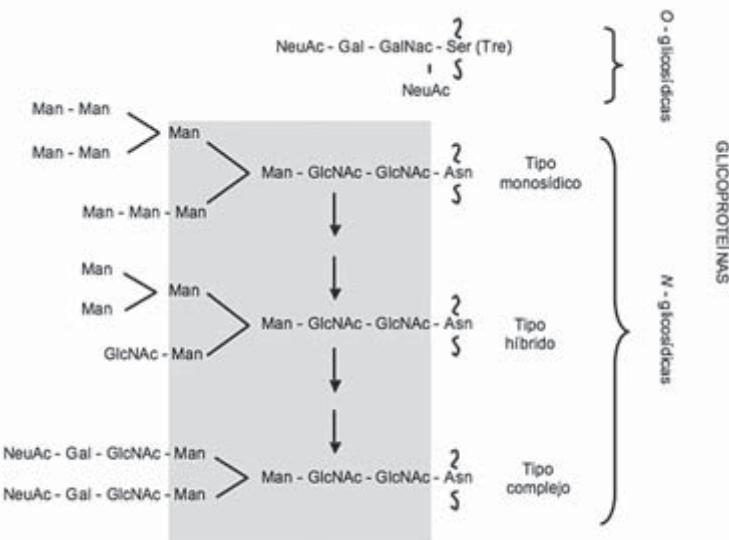


FIGURA 3. Estructura de O- y N-glicoproteínas con indicación de los tres tipos de éstas (9). NeuAc = Ácido N-acetilneuramínico; Gal = Galactosa; Man = Manosa; GlcNAc = N-acetylglucosamina; Ser = serina; Tre = Treonina; Asn = Asparagina.

En el caso de las glicoproteínas y glicopéptidos, las uniones pueden ser o bien del tipo *N*-glicosídico (que algunos denominan *N*-glucosílico) o del tipo *O*-glicosídico (paralelamente, *O*-glucosílico).

Si el enlace, fuerte, tiene lugar entre porción glicánica y lípido, se trata de los *glicolípidos*. Entre los *glicoesfingolípidos ácidos* destacan los *gangliósidos*.

Un tercer grupo de glicoconjungados, cuyo estudio se ha intensificado notablemente en la última década, comprende compuestos conteniendo *fosfatidilinositol* unido a lípidos fuertemente, que además se enlanzan (mediante etanolamina) a una porción peptídica, por lo que podrían considerarse como *glicolipoproteidos*, si bien este término se usa poco (7-10).

En el establecimiento de la estructura de glicoconjungados han sido muy importantes los trabajos de la escuela francesa del Professor Jean MONTREUIL, en Lille; y en el descubrimiento de los mecanismos de biosíntesis de las glicoproteínas han destacado, entre otros, el Premio Nobel Luis F. LELOIR (en Buenos Aires) y su discípulo Ranwell CAPUTTO (en Córdoba, Argentina).

La enorme complejidad estructural que se presenta en los glicoconjungados puede comprenderse fácilmente si se compara este aspecto con el de otras entidades moleculares como los *péptidos* o los *ácidos nucleicos*, por ejemplo. En éstos, cuatro aminoácidos o cuatro nucleótidos diferentes pueden originar únicamente 24 tetrameros distintos, mientras que cuatro monosacáridos diferentes pueden formar, hipotéticamente, hasta ¡36.000! tetrasacáridos distintos. Basta tomar en consideración para comprender esto el hecho de que pueden entrar en juego, en el caso de los glúcidos, factores como los siguientes:

- Naturaleza de los monosacáridos componentes.
- Tipos de enlace con la cadena peptídica.
- Tipos de enlace entre los monosacáridos y posición de dichos enlaces (ramificación).
- Anomerías α y β .
- Secuencia de la cadena glicánica (10).

El fenómeno de la *microheterogeneidad*, con la subsiguiente producción de microformas (o mejor, *glicoformas*), se debe al peculiar mecanismo de biosíntesis propio de los glicoconjungados.

Resumidamente:

- Proteínas diferentes producidas por la misma célula pueden contener *glicanos completamente distintos*.
- *Cada cadena polipeptídica* contiene frecuentemente *múltiples sitios de glicosilación*.
- *En cada sitio de glicosilación* puede hallarse una *estructura glicánica distinta* («*heterogeneidad de sitio*»).
- Dicha «*heterogeneidad de sitio*» tiene *composición definida y reproducible*, en condiciones constantes.
- Hay aspectos de la *glicosilación* que son *específicos* del tipo de célula (10).

4.2. Importancia y funciones

Los glicoconjungados tienen su importancia primordial en facetas estructurales y funcionales, por formar parte de:

- Membranas celulares (actuando de *receptores*).
- *Colágeno*.
- *Inmunoglobulinas*.
- *Hormonas* (tirotropina, gonadotropina, etc.).
- *Enzimas* (glicosidasas, proteasas, ribonucleasa B, glucosa-oxidasa, etc.).
- Factores de coagulación (*fibrinógeno*).
- Agentes de protección y *lubricación* (*mucinas*).
- Con actividad antivírica (*interferón γ*).
- Con *actividad transportadora* (de Fe^{2+} , la transferrina).
- Promotores de la liberación de linfocitos (*interleucina 2*).
- *Anticongelantes* en peces de la Antártida (glicoproteínas).

- Relacionados con el funcionamiento del *sistema nervioso (gangliosidos)*.
- *Lectinas*.

El Premio Nobel francés François JACOB señalaba que «los glúcidos representan la tercera dimensión en la biología celular» (10).

Estrictamente, hay que recordar que resulta aún difícil distinguir cuál es la parte que corresponde en esas funciones biológicas al componente glicánico y cuál al glicoconjungado en su conjunto. En 1993, Ajit VARKI, eminente especialista de Estados Unidos, destacó que en relación con el «papel biológico de los oligosacáridos: todas las teorías son correctas», «pudiéndose encontrar excepciones a todas ellas». Y lo resume así:

- 1.º) «Es difícil predecir *a priori* las funciones de los oligosacáridos de un glicoconjungado.
- 2.º) La misma secuencia oligosacáridica puede mediar diferentes funciones en sitios distintos dentro del mismo organismo, o en diferentes momentos de su ontogenia.
- 3.º) Los papeles biológicos específicos y cruciales de los oligosacáridos actúan frecuentemente mediados por secuencias oligosacáridicas inusuales, por la presencia inusual de secuencias terminales comunes, o por ulteriores modificaciones de los propios monosacáridos (11)».

Se ha confirmado la importancia metabólica fisiológica y asimismo patológica de los glicoconjungados, desde que se descubrió que:

- Son antígenos de la superficie celular, y su estructura o posición en la membrana pueden ser modificadas en células transformadas y en las cancerosas.
- Son sitios receptores de virus.
- Desempeñan un papel importante en la adhesión y en el reconocimiento intercelular.
- Actúan en la conformación de las cadenas peptídicas.
- Los grupos glicánicos regulan la salida de proteínas al exterior de las células y regulan el catabolismo por el hígado de

las proteínas circulantes, y el tiempo de vida de proteínas y células. En relación con este punto, véase lo siguiente:

4.3. Influencia del grado de sialilación de las glicoproteínas en su pervivencia en la circulación sanguínea

Exceptuada la transferrina, la concentración a la que permanecen en el plasma (*survival*) otras glicoproteínas (que contienen también ácidos siálicos en su composición) disminuye notablemente cuando se les elimina el ácido siálico.

Experimentos en conejos así lo demostraron ya en la década de 1970 para la ceruloplasmina (que se mantiene, si es intacta, en un 95% durante 70 minutos y, en cambio, si es desialilada baja a un 20% a los 15 minutos de su introducción). Análogamente ocurre con la *asialo- α_2 -macroglobulina*, la *asialotiroglobulina* y la *asialohaptoglobulina* (aunque en éstas no tan intensamente como con la *asialoceruloplasmina*), mientras que la *asialofetuina* y el *asialo-orosomucoide* desciden en su concentración plasmática con mayor intensidad aún que la *asialoceruloplasmina* (12, 13).

Ello es debido a que la molécula de galactosa de las glicoproteínas es un «determinante críptico» de su catabolismo (13). Este fenómeno se halla estrechamente relacionado con la expresión del receptor de las asialoglicoproteínas (14). En este sentido, resulta particularmente significativo el caso de la antes mencionada ceruloplasmina (marcada con Cu-64), que se mantiene en el suero, si es intacta (o sea, *sialilada*) casi en el 100% todavía a los 25 minutos de su inyección en conejos, mientras que, desprovista del ácido siálico, desciende enormemente su concentración sérica ya a los 12 minutos (Figura 4), coincidiendo con la situación de la *galactosa* como residuo terminal de la molécula.

La causa radica en que los hepatocitos, responsables de la extracción de las moléculas circulantes, captan rápida e intensamente la galactosa, mientras que lo hacen muy débilmente con el ácido siálico o con la *N-acetilglucosamina* (si ésta se halla por sucesiva degradación del glicoconjunto en la posición terminal de éste expuesta a la captación) (15).

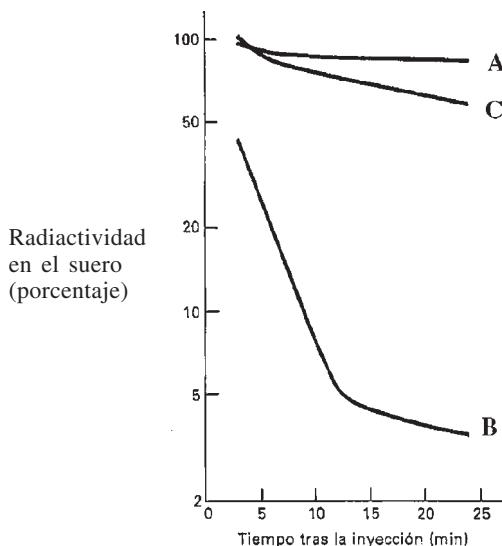


FIGURA 4. *Desaparición en suero de $[^{64}\text{Cu}]$ ceruloplasmina de conejo nativa y modificada, inyectada en el sistema circulatorio de conejos.*

A) Ceruloplasmina: proteína sérica normal con el oligosacárido completo, con ácido siálico expuesto. B) Asialoceruloplasmina: proteína sin el ácido siálico y con galactosa expuesta. C) Asialoagalactoceruloplasmina: proteína sin galactosa ni ácido siálico, con N-acetilglucosamina expuesta.

5. ERITROPOYETINAS (Hu-EPO)

5.1. Composición y estructura

La eritropoyetina humana (Hu-EPO), hormona principalmente producida por el riñón en el ser humano adulto, es llevada a la médula ósea por la circulación sanguínea. Una vez obtenida a partir de grandes cantidades de orina de pacientes de anemia aplásica (*urine human EPO = uHu-EPO*), se ha purificado y caracterizado bioquímicamente, deduciéndose que se trata de una glicoproteína mayoritariamente tetraantenaria (o sea, con cuatro cadenas glicánicas), con un alto contenido glucídico, portadora de uniones —NH— y O-glicosídicas (10). Su composición es la siguiente (Figura 5) (16).

Como puede verse en la Figura 5, la eritropoyetina humana contiene tres cadenas glicánicas del tipo *N*-glicosídico y una de tipo

O-glicosídico, con un porcentaje glucídico del 40% en el que se integran hasta 14 moléculas de ácido N-acetilneuramínico, siendo su masa molecular de unos 30.400 dalton.

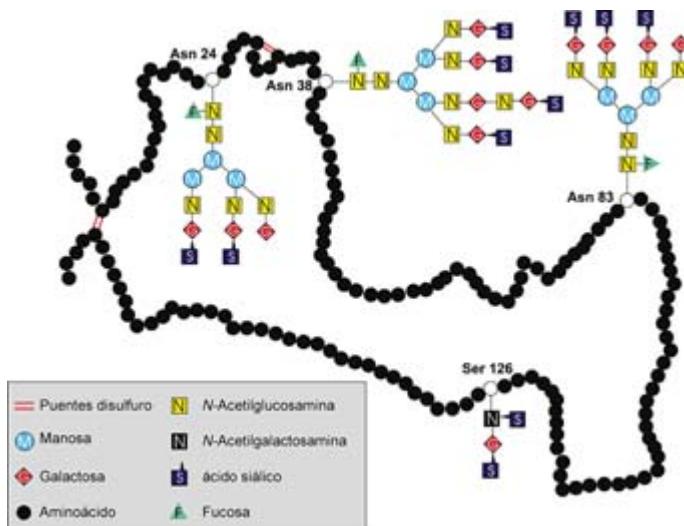


FIGURA 5. *Eritropoyetina humana (Hu-EPO)* (16).

«El producto resultante de la actividad del gen de la EPO es una cadena polipeptídica conteniendo 193 aminoácidos, que sufre modificaciones» (17), tales como: glicosilación, formación de dos enlaces disulfuro, eliminación de 27 aminoácidos de carácter hidrofóbico y de la arginina del extremo C-terminal, quedando constituida finalmente por 165 aminoácidos. Las tres cadenas glicánicas (las más voluminosas) se unen por enlace N-glicosídico en las posiciones 24, 38 y 83; y la de enlace O-glicosídico a la serina de la posición 126.

La obtención de EPO por tecnología recombinante es difícil, puesto que es necesario atender no sólo a las síntesis de la secuencia protídica correcta —que puede quedar parcialmente modificada— sino a la de la fracción glicánica, produciéndose diversas glicoformas, generalmente no todas ellas activas.

Por ejemplo, si la estructura conseguida es biantenaria en vez de tetraantennaria, la actividad biológica es notablemente menor. Para lograr la estructura biológicamente activa es necesario efectuar,

mediante enzimas adecuadas, glicosilaciones y desglicosilaciones (un resumen sobre esta técnica es fácilmente accesible) (18).

Así se ha conseguido la obtención de eritropoyetinas recombinantes (rHuEPO) como «Aranesp®» («darbepoetin alfa») y «Epogen», patentadas por «Angen», entre las llamadas «NESP» (= *Novel Erythropoiesis Stimulating Protein*), que constan de seis cadenas glicánicas (cinco *N*-glicosídicas y una *O*-glicosídica), alcanzándose un porcentaje glucídico del 51% del que forman parte hasta 22 residuos de ácido siálico, siendo la masa molecular del conjunto 35.500 dalton. Aunque se han fabricado cuatro eritropoyetinas recombinantes (alfa, beta, delta y omega), se han comercializado únicamente las dos primeras (17).

5.2. Diferencias en la semi-vida de las eritropoyetinas con distinto grado de sialilación, y diferencias en su actividad según la vía de administración; aspectos económicos

El descenso en la concentración sérica de la eritropoyetina rHuEPO —con sólo cuatro cadenas glicánicas (tres *N*-glicosídicas y una *O*-glicosídica) y ≤ 14 residuos de ácido siálico— es notablemente mayor que el experimentado por la eritropoyetina que contiene seis cadenas glicánicas (cinco *N*-glicosídicas y una *O*-glicosídica) y ≥ 22 residuos de ácido siálico (19).

En cuanto a las diferencias que para una misma eritropoyetina (la hipersialilada) pueden presentarse a causa de la distinta vía de administración. Por vía intravenosa se produce un lento descenso gradual de dicha concentración sérica, mientras que por vía subcutánea el nivel asciende rápidamente, y se mantiene incluso más de una semana (19). La ventaja de la administración subcutánea sobre el uso de la modalidad intravenosa se incrementa al tener en cuenta que los escasos riesgos de autoinmunización que pueden presentarse son menores con la primera (17).

El interés por la utilización de la eritropoyetina recombinante hipersialilada se ha incrementado, dadas sus indudables ventajas, al ser ampliamente utilizada por: *a)* pacientes necesitados de diálisis renal, incapacitados para biosintetizar esta hormona; *b)* personas

sometidas a tratamientos quimioterápicos que presenten esta deficiencia; c) pacientes de SIDA. Además, recuérdese que en competiciones ciclistas internacionales se ha usado ilícitamente como agente estimulante de la producción de eritrocitos que favorecen un mayor rendimiento físico (fueron famosos los casos de «Juanito» Muelegg, en 2002, y Rasmussen, en 2007, portadores temporalmente del maillot amarillo).

Así se explica que las ventas de Aranesp® hayan pasado desde aproximadamente 500 millones de \$ (EE.UU.) en el año 2002, a 1.400 en el 2003, a 2.500 en el 2004, superando los 3.500 en el 2005, frente a otros productos competidores (20).

5.3. Causas de la diversidad en la bioactividad de las eritropoyetinas

Por ser la EPO «el primer medicamento producido en células heterólogas de mamíferos [...] es un modelo excelente para investigar los papeles que cumplen las cadenas glucídicas en las glicoproteínas, puesto que su gen y sus múltiples glicoformas están disponibles, así como los bioensayos sensibles para su examen» (21). Se ha deducido que la parte interior del componente glicánico (*core*), formada por tres residuos de manosa (véanse las Figuras 3 y 5) constituye «el mínimo requerimiento para que la HuEPO exprese su actividad biológica completa» (21).

Además, según se apuntó anteriormente, «la eritropoyetina desialilada es eliminada de la circulación (*cleared*) con extrema rapidez, en cuestión de minutos. [...] Se ha comprobado que existe una relación directa entre la proporción de glúcidos contenido ácido siálico, la semi-vida sérica [de la EPO] y su actividad biológica» (19).

Cabe preguntarse: ¿Son debidas estas diferencias en la bioactividad a causa de la desaparición por depuración (= «aclaramiento» = *clearance*) en el suero de la EPO motivada ésta por su distinta afinidad con respecto a los receptores?

Según Egrie *et al.* (22) el «aclaramiento» o depuración «es el determinante primario de la bioactividad *in vivo* [ya que] las isoformas que tienen pocos ácidos siálicos presentan mayor afinidad hacia el

receptor, pero semi-vida sérica más baja. En contraste, las isoformas que tienen un contenido más elevado en ácido siálico muestran afinidad más baja para el receptor y semi-vida más larga». (La hipótesis segunda del comienzo de la presente publicación quedaría así comprobada; pero no quedan excluidas las restantes.)

Modulando la vectorización de la eritropoyetina desde el riñón a la médula ósea, que es el órgano diana de esta hormona, sus componentes «siálicos pueden funcionar como un contador de tiempo (*timer*)» (21) en su disponibilidad. Tales «componentes glucídicos de la HuEPO no son una simple decoración sino que tienen realmente funciones fisiológicas como las de un sistema de liberación de un fármaco» (21). Se los ha comparado también con un escudo protector en el transporte de dicha hormona.

Sin embargo, existen otros aspectos que deben ser también analizados.

5.4. ¿Es la misma o es diferente la semi-vida de la eritropoyetina en los ensayos *in vivo* e *in vitro*? ¿De qué monosacáridos depende dicha semi-vida?

Téngase en cuenta que los ensayos *in vivo* se suelen hacer midiendo la incorporación de Fe-59 en eritroblastos de ratones policitémicos, mientras que los *in vitro* se efectúan según diversos procedimientos entre los cuales uno consiste en determinar la incorporación de Fe-59 en células cultivadas de médula ósea (21).

Así como en los ensayos *in vivo* se halla una relación directa entre la semi-vida de la eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO), producida en células de mamíferos, y su contenido en ácido siálico, «la eritropoyetina humana desialilada, obtenida a partir de orina (uHuEPO), y la eritropoyetina recombinante (rHuEPO) escasamente sialilada, pierden su actividad *in vivo*; pero la mantienen o incluso la incrementan *in vitro*» (21).

Asimismo, según Ueda y Sasaki (21), «la actividad biológica de la eritropoyetina humana (HuEPO) aumenta *in vitro*, por la acción de la sialidasa, la galactosidasa y la β -N-acetilhexosaminidasa; pero la eliminación adicional de cadenas glucídicas por la acción de α - y

β-manosidasa disminuye la actividad. Finalmente, la eliminación de todas las cadenas glucídicas de la HuEPO unidas a la asparragina [...] produce pérdida casi completa de actividad» (21).

Se deduce, pues, que además de ser indispensable para la actividad de la EPO (incluso *in vitro*) el mantenimiento del núcleo («core») de los tres restos de moléculas de manosa (según antes se apuntó), lo es también el de las *N*-acetilglucosaminas contiguas a la asparragina de la cadena peptídica (véanse Figuras 3 y 5). Por el contrario, la pérdida de los residuos de ácido siálico, de los de galactosa unidos a éstos, y de *N*-acetilglucosamina enlazados a galactosa —todos ellos situados periféricamente— no disminuiría la actividad *in vitro*, sino que la aumentaría. Por tanto, como continuación de lo relativo a la segunda hipótesis aquí planteada (matizando de si se trata de la actividad *in vivo* o *in vitro*), pueden ser contestadas las preguntas de las hipótesis primera y tercera, y considerar afirmativamente la cuarta.

Independientemente de todo lo anterior, Erbayraktar *et al.* (23) han dado a conocer un aspecto peculiar relativo a una «asialoeritropoyetina [rHuEPO], originada por desialización enzimática total [la cual] es totalmente neuroprotectora» *in vivo*, actuando como «una citocina protectora de tejidos, espasmos vasculares, apoptosis, y respuestas inflamatorias».

6. OTRAS SIALOGLICOPROTEÍNAS QUE HAN SIDO HIPERSIALILADAS O SON SUSCEPTIBLES DE SERLO; Y GLUCOCEREBROSIDASA

De modo paralelo a lo indicado para la eritropoyetina y con objeto de mejorar la eficacia terapéutica, se ha conseguido enmascarar residuos de galactosa terminal mediante hipersialilación, en la molécula de las siguientes sialoglicoproteínas: **asparraginasa, hormona luteinizante y leptina**. De este modo se ha incrementado su respectiva semi-vida y se ha reducido la inmunogenicidad de tan importantes agentes (24).

Parece ser que aún no se han realizado modificaciones estructurales similares en otras sialoglicoproteínas asimismo muy interesantes; pero resulta fácil aceptar que ello será factible oportunamente.

Entre ellas: biomarcadores de carcinomas (**α -fetoproteína** humana, **osteopontina** y **CD44**); glicoproteínas de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (la **GP 120**); las que actúan como receptores de proteínas del parásito causante de la malaria, *Plasmodium falciparum* (**glicoforinas A y C**); la **hormona foliculoestimulante**; o **anticuerpos** como la **IgG** (24).

Por último, otro glicoconjunto de gran interés es la enzima **glucocerebrosidasa** (= glicosilceramida, EC 3.2.1.62), que libera el resto glucídico de la *N*-acilesfingosina, y es destinada a tratar pacientes de la enfermedad de Gaucher (que son deficitarios de ella). Aunque en este caso no es una sialoglicoproteína, para su obtención o transformación con finalidad terapéutica se han seguido procedimientos análogos a los antes indicados.

Se ha usado la enzima procedente de la placenta humana asegurándose de que iría a su sitio diana. Para ello, se la modifica convenientemente por acción de otras glicosidasas hasta conseguir que pueda ser dirigida a las células reticuloendoteliales (mediante el reconocimiento del extremo de manosa por dichas células). Pero resulta más rentable obtener glucocerebrosidasa por técnicas recombinantes, incorporando en ella el componente de manosa adecuado. Ya en 1998 unas 1.700 personas de todo el mundo se habían beneficiado de este tratamiento, que ha sido el primero perteneciente a «terapia por reemplazamiento de enzima».

7. INFLUENCIA DE LA «PEGILACIÓN» DE CIERTOS FÁRMACOS EN SU ACTIVIDAD

No solamente la mayor concentración del ácido siálico (*N*-acetilneranímico) componente de un glicoconjunto puede incrementar la semi-vida de éste y, por ello, su actividad biológica sino que el aumento de tamaño molecular de ciertas proteínas obtenido mediante enlace covalente con polietilenglicol (PEG) —por unión de éste al grupo amino de la proteína (= «pegilación»)— puede lograr el mismo efecto (24).

Así se ha conseguido para enzimas como la asparraginasa (empleada en el tratamiento de la leucemia) (25), y la adenosindesami-

nasa (relacionada con casos de infecciones recurrentes) (26) o para el interferón α (27), entre otros agentes.

El incremento del tamaño molecular del compuesto modificado de este modo determina un descenso en la velocidad de filtración glomerular (24), además de una disminución de la proteólisis de la proteína en cuestión, por enmascaramiento de los sitios de su degradación (27).

Sin embargo, la «pegilación» tiene inconvenientes tales como el de producir isoformas (análogamente a lo que sucedía con la sialilación) pero otros, más graves, como el de originar productos derivados difíciles de ser completamente catabolizados, al ser polímeros sintéticos, a diferencia de los ácidos siálicos, que son metabolitos ordinarios (24).

Manteniendo la misma composición y estructura de la eritropoyetina humana (rHuEPO) —con las mismas cadenas glicánicas y contenido de ácido siálico (con sólo 14 residuos de éste)—, pero incorporando a dicha molécula una cadena polimérica mediante el **ácido succinimilbutanóico-metoxipolietenglicol**, se ha logrado el «primer activador continuo del receptor de la eritropoyetina» (*Continuous Erythropoietin Receptor Activator*, C.E.R.A.) (28).

Se trata de un nuevo agente antianémico que difiere por su composición, tamaño molecular (61.000 dalton), mecanismo de acción y prolongada vida media —ésta con sólo una administración mensual— respecto a todos los anteriores. De él existe actualmente menos bibliografía que de otros fármacos usados como antianémicos.

AGRADECIMIENTOS

Al Académico Profesor Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, por facilitar publicaciones acerca de la eritropoyetina.

A don Manuel Tirado, de esta Real Academia, por la transcripción del texto.

A la Real Academia Nacional de Farmacia, mediante cuyo asesoramiento (solicitado por la Fundación Juan March) dicha Fundación concedió al autor sendas becas para trabajar en Colonia durante nueve meses (en 1962), bajo la dirección de los Profesores E. Klenk

y H. Faillard, y durante seis meses (en 1966), al lado del Profesor L. Warren, en Filadelfia.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CABEZAS, J. A. (1961): Acides sialiques: Leur Signification Biochimique. *Le Pharm. Biol.* 2: 9-19.
- (2) CABEZAS, J. A. (1968): Estudio de los ácidos siálicos en diversos materiales biológicos (*discurso de incorporación como Académico Correspondiente de la Real Acad. Farm.*). *An. Real Acad. Farm.* 24: 154-172.
- (3) BLIX, C.; GOTTSCHALK, A. and KLENK, E. (1957): Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* 179: 1088.
- (4) FAILLARD, H. and CABEZAS, J. A. (1963): Isolierung von *N*-Acetyl- und *N*-Glykolyl-neuraminsäure aus Kälber und Hühnerserum. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 333: 266-271.
- (5) CABEZAS, J. A. (1965): Neuraminic acid. - IV. Gas-Liquid Chromatography of *N*-Acetyl- and *N*-Glycolylneuraminic Acids. *Rev. Esp. Fisiol.* 21: 125-130.
- (6) SCHAUER, R. (2007): *The diversity of sialic acids in their interplay with lectins in Glycobiology* (C. Sanson and O. Markman, eds.), Scion Publishing Limited, p. 137.
- (7) CABEZAS, J. A. (1993): Glicobiología: Antecedentes y evolución de su contenido. *Discurso de apertura del curso 1993-94*, Universidad de Salamanca, 1-102.
- (8) CABEZAS, J. A. (1995): Glicoconjungados: Algunos aspectos bioquímicos y farmacéuticos. *An. Real Acad. Farm.* 61: 177-188.
- (9) CABEZAS, J. A. (1995): Glicoconjungados: Su participación en funciones de los seres vivos. *Mundo Científico*. 159: 634-659.
- (10) CABEZAS, J. A. (2000): Glicociencia: Glicobiología, Glicopatología, Glicoterapéutica, Glico(bio)tecnología. *Instituto de España*, Madrid: 1-54.
- (11) VARKI, A. (1993): Biological roles of oligosaccharides: all the theories are corrects. *Glycobiology*. 3: 97-130.
- (12) MORELL, A. G.; [...] and ASHWELL, G. (1971): The Role of Sialic Acid in Determining the Survival of Glycoproteins in the Circulation. *J. Biol. Chem.* 246: 1461-1467.
- (13) ASHWELL, G. and MORELL, A. G. (1971): Galactose: A Cryptic Determinant of Glycoprotein Catabolism, en *Glycoproteins of Blood Cells & Plasma* (G. A. Jamieson, ed.), Lippincott Company, Philadelphia, 173-189.
- (14) WEISS, O. and ASHWELL, G. (1989): Ligand-induced Modulation of the Hepatic Receptor for Asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 264: 11572-11574.
- (15) ASHWELL, G. and MORELL, A. G. (1974): En *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 41: 99-128.
- (16) SCHLAGS, W. et al. (2002): Two-dimensional electrophoresis of recombinant human-erythropoietin: A future method for the European Pharmacopoeia. *Proteomics*. 2: 679-682.

- (17) STOAN, I. *et al.* (2007): New alternatives for erythropoietin therapy in chronic renal failure. *Central Europ. J. Medicine* 2: 361-378.
- (18) STIEGLER, G.; KRESSE, G. B. and BUCKEL, P. (1997): Biotecnología de fármacos. *Inv. Ciencia*. 254: 55-57.
- (19) MACDOUGALL, I. C. (2000): Novel Erythropoiesis Stimulating Protein. *Seminars in Nephrology*. 20: 315-381.
- (20) MELNIKOU, F. (2006): Anaemia therapics. *Nature Reviews*. 5: 627.
- (21) TAKEUCH, M. and KOBATA, A. (1991): Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*. 1: 337-346.
- (22) EGRIE, J. C. *et al.* (1993): The role of the carbohydrate on the biological activity of erythropoietin. *Glyconjugate J.* 10: 263.
- (23) ERBAYRAKTAR, S. *et al.* (2003): Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 644-6746.
- (24) BYRNE, B.; DONOHE, G. C. and O'KENNEDY, R. (2007): Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today*. 12: 319-326.
- (25) GRAHAM, M. L. (2003): Pegaspargase: a review of clinical studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 1293-1302.
- (26) LEVY, Y. *et al.* (1988): Adenosine deaminase deficiency with late onset of recurrent infections: response to treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *J. Pediatr.* 113: 312-221.
- (27) HARRIS, J. M. and CHESS, R. B. (2003): Effect of pegylation on phamaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 214-221.
- (28) MACDOUGALL, I. C. *et al.* (2006): Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenons and Subcutaneous Continuos Erythropoietin Receptor Activator (C.E.R.A.) in Patients with Chronic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, Sept 13 (doi: 10.2215).

— *Artículo original* —

Papel de la proteína S6K1 en el balance supervivencia/muerte celular en el hígado

Recibido el 26 de marzo de 2008

ÁGUEDA GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ *, JAVIER ALBA y
ÁNGELA M. VALVERDE *

Instituto de Investigaciones Biomédicas «Alberto Sols» (CSIC/UAM)

RESUMEN

La ruta mTOR/S6K1 controla diferentes funciones celulares entre las que se encuentran la proliferación y el crecimiento de la masa celular. La insulina, IGF-I y EGF son factores de supervivencia de los hepatocitos. En las rutas de señalización mediadas por sus receptores, todos ellos de la superfamilia tirosina quinasa, la proteína S6K1 resulta activada. El objetivo de este trabajo ha sido investigar si la deficiencia en S6K1 tiene consecuencias en el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular en el hígado. Para ello, hemos generado líneas

* **Información de contacto:**

Águeda González-Rodríguez.

Dirección: Instituto de Investigaciones Biomédicas «Alberto Sols» (CSIC/UAM).

C/ Arturo Duperier, 4 - 28029 Madrid.

Telf.: 91 585 44 98.

Fax: 91 585 44 01.

Email: aguedagr@iib.uam.es

Ángela M. Valverde.

Dirección: Instituto de Investigaciones Biomédicas «Alberto Sols» (CSIC/UAM).

C/ Arturo Duperier, 4 - 28029 Madrid.

Telf.: 91 585 44 97.

Fax: 91 585 44 01.

Email: avalverde@iib.uam.es

Abreviaturas: SF, suero fetal; TNF, factor de necrosis tumoral; Con A, concanavamina A.

celulares de hepatocitos inmortalizados a partir de hígados de ratones neonatos de genotipo salvaje ($S6K1^{+/+}$) y deficientes en $S6K1$ ($S6K1^{-/-}$). Dichas células se han sometido a dos protocolos de inducción de muerte celular por apoptosis: activación de receptores de muerte (TNFR y Fas) y retirada de factores tróficos del medio de cultivo. Nuestros resultados indican que la falta de $S6K1$ confiere protección frente a la apoptosis inducida por activación de receptores de muerte. Este fenómeno se debe a que la expresión de la proteína pro-apoptótica Bid está disminuida, la caspasa-8 no se activa y no se produce la degradación de FLIP ni truncamiento de Bid en respuesta a TNF y Jo2. De hecho, la falta de $S6K1$ protege del daño hepático fulminante producido por la inyección de concanavalina A. Asimismo, la pérdida de $S6K1$ en los hepatocitos evita la apoptosis inducida por la retirada de factores tróficos. Esto es debido a que en ausencia de $S6K1$ no se inicia la retroalimentación negativa mediada por la actividad serina quinasa de esta proteína y, en consecuencia, los hepatocitos $S6K1^{-/-}$ mantienen activada la ruta IRS-1/PI3-quinasa que conduce a la activación de las quinasas Akt y ERK que mantienen la supervivencia celular. Nuestros resultados sugieren que la resistencia de los hepatocitos deficientes en $S6K1$ a la muerte celular por apoptosis podría explicar la resistencia a los compuestos inhibidores de mTOR en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como el hepatocarcinoma.

Palabras clave: Apoptosis.—Hepatocito.—TNF.—Retirada de suero.—Daño hepático.

ABSTRACT

Role of S6K1 in the balance between survival and cell death in the liver

The mTOR/S6K1 signaling pathway controls proliferation and cell growth. Insulin, IGF-I, EGF are trophic factors that elicit survival effects in hepatocytes. These molecules activate mTOR/S6K1 by acting through tyrosine kinase receptors. The aim of this study was to investigate whether $S6K1$ deficiency alters the balance survival/cell death in hepatocytes. For this goal, we have generated immortalized hepatocyte cell lines from neonatal wild-type and $S6K1^{-/-}$ deficient mice. Apoptosis has been induced in these cells by activating the death receptor pathway or, alternatively, by growth factors deprivation. Our results indicate that the lack of $S6K1$ in hepatocytes protects from apoptosis induced by the activation of death receptors (TNFR and Fas). In fact, in $S6K1^{-/-}$ hepatocytes the pro-apoptotic protein Bid is down-regulated and its active proteolytic fragment is absent in response to TNF or Jo2. Moreover, neither caspase-8 is activated nor FLIP is degraded upon TNF or Jo2 treatment. In vivo, $S6K1$ -deficient mice are protected against Concanavalin A-induced hepatic failure. Deprivation of growth factors induces apoptosis in wild-type, but not in $S6K1^{-/-}$ hepatocytes. This is due to the lack of the negative feed-back that increases IRS-1 serine phosphorylation and inhibits PI3-kinase/Akt and MAPK survival molecular pathways. Consequently, there is a sustained activation of Akt and MAPK in the absence of trophic factors and $S6K1^{-/-}$.

deficient hepatocytes are protected from apoptosis. The molecular mechanisms by which S6K1 deficiency protects hepatocytes from apoptosis could be related with the resistance of some mTOR inhibitors in cancer therapies.

Keywords: Apoptosis.—Hepatocyte.—TNF.—Serum withdrawal.—Hepatic failure.

INTRODUCCIÓN

El balance supervivencia/muerte celular en el hígado es necesario para evitar un crecimiento anormal del mismo que desemboque en diferentes patologías, como daño hepático, fibrosis o cáncer. Un desequilibrio entre las señales pro y antiapoptóticas intracelulares conlleva, a través de distintos mecanismos, a la activación de rutas de señalización que dan lugar a la muerte celular por apoptosis del hepatocito (1). Los estímulos proapoptóticos activan la muerte celular a través de dos vías fundamentales y convergentes: la vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial. La insulina, IGF-I y EGF son factores de supervivencia de los hepatocitos y su señalización vía PI3K/Akt representa una ruta principal de supervivencia asociada a la resistencia frente a la apoptosis y a la aparición de células malignas con fenotipo transformante. Uno de los sustratos de la ruta PI3K/Akt es mTOR. La ruta mTOR/S6K1 controla diferentes funciones celulares entre las que se encuentran la proliferación y el crecimiento de la masa celular (2).

La importancia de la proteína S6K1 en las rutas de señalización que conducen al mantenimiento de la supervivencia celular y de la homeostasis glucídica del organismo se ha puesto de manifiesto tras la generación de ratones deficientes para esta proteína (3). Los ratones nulos para S6K1 son aproximadamente un 20% más pequeños al nacer. Este efecto es más notable en fases tempranas del desarrollo. Estos resultados indican un papel esencial del S6K1 en el crecimiento celular (4, 5).

La inhibición de mTOR se considera a día de hoy una diana terapéutica frente a distintos tipos de patologías tumorales (6-8). Así, compuestos como la rapamicina y derivados, potentes inhibidores de mTOR, se encuentran en fases II y III de ensayos clínicos. Sin embargo, la aparición de resistencias a dichos fármacos ha puesto

de manifiesto mecanismos moleculares desconocidos hasta ahora. Uno de ellos, que implica a S6K1, se ha descrito en líneas celulares de cancer de pulmón. Estos autores describen que la inhibición de mTOR por rapamicina pone en marcha una ruta de supervivencia mediada por Akt. En síntesis, la activación de la ruta mTOR/S6K1 conlleva a la fosforilación en residuos serina (Ser307, Ser636) de IRS-1. Estas fosforilaciones en serina inhiben las fosforilaciones en tirosina que son las responsables de la asociación y activación de la ruta PI3K/Akt (9).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo de este trabajo ha sido investigar el efecto de la pérdida de S6K1 sobre la supervivencia celular de los hepatocitos como mecanismo molecular de potencial interés en la carcinogénesis hepática. Nuestros estudios se han realizado *in vitro* en modelos celulares e *in vivo* en modelos murinos modificados genéticamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo primario de hepatocitos neonatales

Para el cultivo primario de hepatocitos neonatales se utilizaron ratones neonatos de 3-5 días de vida de genotipo salvaje ($S6K1^{+/+}$) y deficientes en S6K1 ($S6K1^{-/-}$). El protocolo de cultivo se describe detalladamente en Fabregat y col., 1989 (10). En los estudios donde se experimenta con animales, se asegura 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 1985).

Inmortalización de los hepatocitos neonatales

Una vez establecidos los hepatocitos neonatales en cultivo primario, éstos se mantuvieron en medio MEM 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino hasta alcanzar el 60-70% de confluencia. En este momento, el cultivo se infectó con partículas virales que

expresaban la proteína viral LTag. Transcurridas 48-72 horas se retiró el medio que contenía las partículas virales y las células infectadas se seleccionaron mediante el cultivo en medio DMEM supplementado con 10% de suero fetal bovino y con el antibiótico puromicina (1 µg/ml). Transcurridos quince días en cultivo en estas condiciones, se caracterizaron genotípica y fenotípicamente los hepatocitos inmortalizados (11).

Caracterización de los hepatocitos neonatales inmortalizados por inmunofluorescencia y microscopía confocal

Los hepatocitos inmortalizados S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} se cultivaron en placas de cultivo que contenían cristales de vidrio. Una vez alcanzado el 60-80% de confluencia, se fijaron las células y se incubaron con los anticuerpos primarios anti-albúmina, anti-carbamol fosfato sintetasa (CPS) y anti-vimentina (VIM) seguido de incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (FITC-conjugated sheep anti-mouse y Cy3-conjugated gota anti-rabbit). El análisis de inmunofluorescencia se realizó en un microscopio confocal MRC-1024 (Bio-Rad) adaptado a un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 300.

Análisis de la expresión de proteínas mediante Western blot

Se ha seguido el protocolo descrito por Valverde y col., 2004 (12).

Determinación del porcentaje de células apoptóticas

Una vez finalizado el tratamiento con los estímulos apoptóticos, las células se recogieron mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 5 minutos a 4° C. El porcentaje de células apoptóticas se determinó fijando las células con etanol al 70% seguido de incubación con RNAsa A y ioduro de propidio (0,1% en PBS).

Determinación de las actividades caspasa-3 y caspasa-8

Las actividades caspasa-8 y 3 se determinaron por un método fluorimétrico siguiendo el protocolo descrito por González-Rodríguez y col., 2007 (13).

RT-PCR

Una vez sintetizado el cDNA (kit High-capacity archive kit de Applied Biosistem); la PCR se realizó con Power SYBR green PCR mastermix en el servicio de secuenciación del IIB. El programa realizado fue el Standard 10 minutos a 95° C y (15 segundos a 95° C; 1 minuto a 60° C) en 40 ciclos. Además, el ensayo se realizó con una curva de disociación a 90° C, 15 segundos. Los oligonucleótidos utilizados fueron: Bid sense: CTT GGT TAG AAA CGA GAT GGA CTG A y Bid antisense: TGT TCT CTG GGA CCT GTC TTC AG.

Inducción de daño hepático fulminante *in vivo*

Ratones de genotipos salvaje y deficientes en S6K1 fueron inyectados con Concanavalina A (25 mg/Kg peso) disuelta en PBS a través de la vena de la cola (14). Transcurridas 8 horas, se sacrificaron los animales y se extrajo el hígado.

Análisis histológico

Los hígados de ratón fueron fijados con paraformaldehído por perfusión del animal previa hepatectomía. Dichos hígados, tras ser extirpados, fueron incluidos en parafina, cortados con un espesor de 4 micras y teñidos con eosina-hematoxilina; el análisis histológico se realizó por microscopia óptica.

Análisis estadístico

Las representaciones gráficas se elaboraron utilizando los valores medios \pm los errores estándar de las medias (SEM). Las diferencias significativas se determinaron mediante el test *t de student*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las líneas celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}

Para realizar este estudio, hemos generado líneas celulares a partir del hígado de ratones S6K1^{+/+} (genotipo salvaje) y S6K1^{-/-} (deficientes en S6K1) de 3 a 5 días de vida post-natal. Estos ratones proceden de una colonia que se encuentra en el «Genome Research Institute» (University of Cincinnati, U.S.A.), del laboratorio de Sara Kozma y George Thomas, con los que hemos realizado una colaboración. En primer lugar, se inmortalizaron los hepatocitos primarios obtenidos en cultivo mediante una infección con el vector retroviral que expresa la proteína antígeno T largo del virus SV40 (AgT) (11). Los hepatocitos infectados se seleccionaron en medio suplementado con puromicina (0,5 µg/ml) y se obtuvieron diversos clones a partir de los hepatocitos supervivientes. A partir de este momento trabajamos con dos clones de células S6K1^{+/+} y cuatro clones de células S6K1^{-/-}.

A continuación, caracterizamos los clones seleccionados mediante el análisis de la expresión endógena de proteínas marcadoras de los hepatocitos como albúmina (ALB: proteína plasmática secretada exclusivamente por estas células), citoqueratina 18 (CK18: proteína de citoesqueleto marcadora de células epiteliales parenquimatosas) y carbamoil fosfato sintasa (CPS: marcador del ciclo de la urea) por inmunofluorescencia y microscopía confocal (Figura 1A). Por otro lado, comprobamos que las células no emiten fluorescencia cuando se ponen en contacto con el anticuerpo anti-vimentina y se visualizan en el microscopio confocal. Esto indica que no hay contaminación de fibroblastos ya que la vimentina es un marcador del citoesqueleto que no se expresa en células parenquimáticas pero es un marcador positivo para células mesenquimales.

En paralelo, analizamos lisados celulares procedentes de cada una de las líneas de hepatocitos inmortalizados por Western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce S6K1 (Figura 1B).

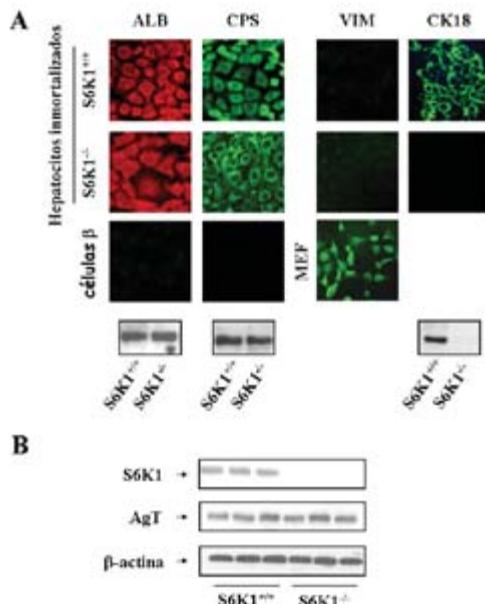


FIGURA 1. Caracterización de los hepatocitos inmortalizados S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-}.
A. Análisis por inmunofluorescencia de albúmina (ALB), carbamoil fosfato sintasa (CPS), citoqueratina 18 (CK18) y vimentina (VIM) de los hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} en condiciones de crecimiento. Como control negativo de ALB y CPS, usamos células β y, como control positivo de VIM, fibroblastos. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de S6K1, AgT y β -actina, como control de carga.

Para investigar si la falta de S6K1 altera la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas, preparamos extractos de hígado de ratones neonatales y adultos procedentes de ratones de ambos genotipos y lisados de las líneas de hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} y, a continuación, analizamos la expresión endógena de proteínas pro y antiapoptóticas mediante Western blot.

Los niveles de las proteínas antiapoptóticas Bcl-x_L y Flip, así como los de las proteínas proapoptóticas Bim, FADD, Fas-L y Foxo-1 permanecen sin cambios significativas en su expresión (resultados no mostrados). Bid es la única proteína proapoptótica que muestra un

cambio significativo al comparar los extractos de tejido y los lisados celulares $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$, indicando que la delección de $S6K1$ conlleva una disminución en el contenido de Bid (Figura 2). Para confirmar este resultado, medimos los niveles de ARN mensajero de Bid y comprobamos que, tanto en los hígados como en los hepatocitos carentes de $S6K1$, los niveles de ARN mensajero están disminuidos significativamente en comparación con su control. A la vista

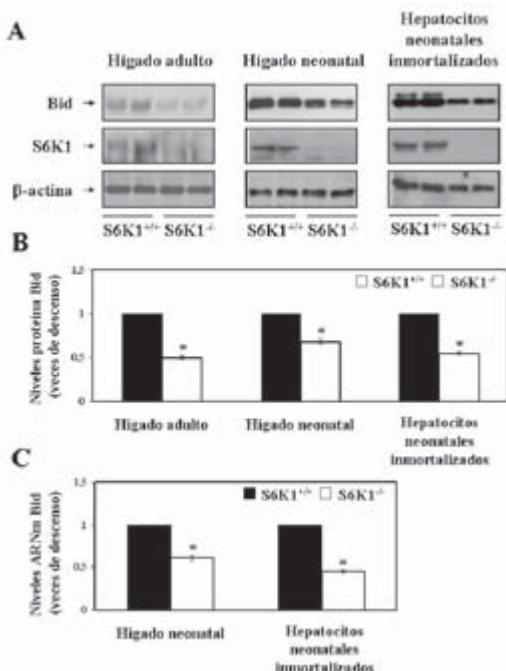


FIGURA 2. Expresión endógena de proteínas anti y proapoptóticas en hepatocitos inmortalizados e hígados de neonatos de ratón $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$.

A. Análisis por Western blot de la expresión de Bid, S6K1 y β-actina, como control de carga, en lisados celulares de las dos líneas celulares y extractos hepáticos procedentes de ratones neonatales y adultos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$.

B. La gráfica representa los datos cuantitativos de las densitometrías correspondientes a cinco experimentos independientes y los resultados se expresan con respecto al control y son valores medios \pm SE de los cinco experimentos. * $p < 0,05$. **C.** Niveles de ARNm de Bid de hepatocitos neonatales inmortalizados e hígados neonatales $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$. La gráfica representa los datos cuantitativos correspondientes a tres experimentos independientes y los resultados se expresan con respecto al control y son valores medios \pm SE de los tres experimentos. * $p < 0,05$.

de los resultados, nos planteamos la posibilidad de la existencia de un efecto directo o indirecto de la proteína S6K1 sobre la expresión de la proteína proapoptótica Bid.

Estudio de la apoptosis inducida por la activación de receptores de muerte

A partir de este momento trabajamos únicamente con líneas celulares inmortalizadas de hepatocitos de ratón neonato $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$.

Para realizar el estudio de la apoptosis inducida por la activación de receptores de muerte, estimulamos las células por un lado con TNF α (30 ng/ml) y actinomicina D (0,2 μ g/ml) y por otro con Jo2 (2 μ g/ml), un anticuerpo agonista del receptor de muerte FAS, y transcurridas 16 horas analizamos diferentes parámetros indicadores de la apoptosis celular. En primer lugar, realizamos el estudio diferencial de la activación de la apoptosis a través de estímulos de la vía de receptores de muerte en los hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ analizando la morfología celular tras el tratamiento con los distintos estímulos que activan esta ruta apoptótica. Los hepatocitos $S6K1^{+/+}$ adquieren una morfología típica de las células apoptóticas tras someterlos a los estímulos ya citados y, por el contrario, los hepatocitos carentes en $S6K1$ no cambian su apariencia tras la estimulación (Figura 3A). Al determinar la morfología nuclear antes y después de la estimulación mediante tinción con DAPI, observamos que no aparecen o aparecen de forma muy puntual cuerpos apoptóticos en los hepatocitos deficientes en $S6K1$ (Figura 3B).

A continuación, medimos el porcentaje de células apoptóticas (con contenido de ADN inferior a 2N) en las mismas condiciones experimentales. Al analizar por citometría de flujo el porcentaje de células apoptóticas, encontramos que las células $S6K1^{+/+}$ son sensibles a la apoptosis inducida con ligandos de receptores de muerte, ya que al ser estimuladas con TNF α en presencia de Actinomicina D, el porcentaje de células con contenido de ADN inferior a 2N aumenta siete veces con respecto a su control no inducido. De la misma manera, tras la estimulación con Jo2 observamos un aumento en este porcentaje de tres veces con respecto al control no estimulado.

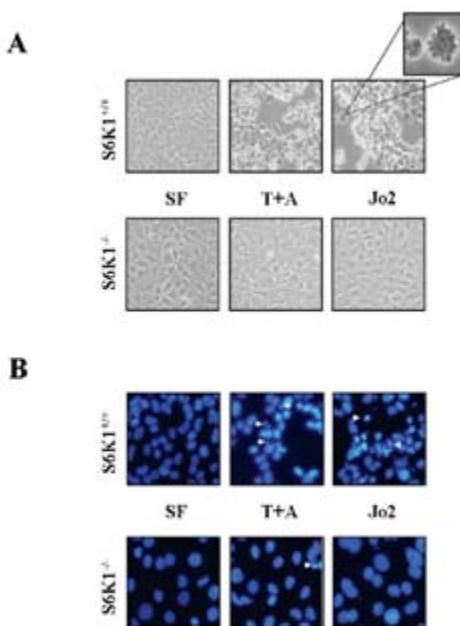


FIGURA 3. Morfología celular y nuclear de los hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras el tratamiento con ligandos de receptores de muerte. Imágenes representativas de campos celulares realizadas por microscopía de contraste de fases (A) o por microscopía de fluorescencia, tras la tinción de DAPI (B) de hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras ser estimulados con $TNF\alpha +$ actinomicina D (T+A) y Jo2 durante 16 horas en comparación con su control (SF). Las flechas indican la formación de cuerpos apoptóticos.

Sin embargo, no ocurre así con los hepatocitos carentes de S6K1, que no se ven afectados por estos estímulos proapoptóticos con respecto a las células controles (Figura 4A).

La apoptosis indica, por definición, que se trata de un proceso de muerte celular dependiente de caspasas. Por tanto, analizamos la variación de los niveles de actividad caspasa-3 y 8 en los hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente. Las células de genotipo salvaje presentan un aumento significativo de actividad caspasa-3 y caspasa-8 ante estos estímulos apoptóticos. Sin embargo, los hepatocitos $S6K1^{-/-}$ permanecen sin alterar los niveles de actividad de dichas caspasas (Figura 4B). Para corroborar los ensayos fluorimétricos de actividad caspasa, analizamos los niveles de expresión de los fragmentos activos tanto de

la caspasa-3 como de la caspasa-8 mediante Western blot. En ambos casos, observamos que en los hepatocitos S6K1^{+/+} aparecen los fragmentos activos de estas caspasas tras el tratamiento con TNF α en presencia de Actinomicina D y con Jo2, y que no ocurría así con los hepatocitos deficientes en S6K1.

A continuación, analizamos los niveles de expresión de otras proteínas implicadas en la ruta apoptótica mediada por receptores de muerte. La activación de Bid se produce como consecuencia de su proteólisis debido a la activación de la caspasa-8. En consecuencia, aparece un fragmento truncado de Bid (tBid) de 15 KDa con gran actividad proapoptótica. Como ocurría anteriormente, los niveles de expresión de Bid están disminuidos en los hepatocitos S6K1^{-/-} comparado con los hepatocitos S6K1^{+/+}. A la hora de analizar tBid, observamos que en los hepatocitos de genotipo salvaje aparece un aumento en los niveles de expresión de tBid ante el estímulo de muerte. Sin embargo, no ocurre lo mismo en las células S6K1^{-/-}, donde tBid no aparece tras el tratamiento (Figura 4C). Finalmente, estudiamos posibles cambios en Bcl-x_L en las mismas condiciones experimentales. En los hepatocitos de genotipo salvaje, los niveles de Bcl-x_L disminuyen significativamente tras el tratamiento con TNF α en presencia de Actinomicina D y con Jo2. Sin embargo, la expresión de Bcl-x_L no se modifica tras la inducción de apoptosis en los hepatocitos deficientes en S6K1.

Nuestros resultados indican que la falta de S6K1 tiene como consecuencia una menor expresión de Bid. Esto conlleva la ausencia de su forma activa. Asimismo, la inducción de la apoptosis no provoca activación de la caspasa-8. Paralelamente, se mantienen los niveles de Bcl-x_L ante dichos estímulos apoptóticos. Por tanto, podríamos decir que en los hepatocitos deficientes en S6K1 existe un balance a favor de las proteínas antiapoptóticas frente a las proteínas proapoptóticas.

Estudio de la apoptosis inducida por la deprivación de factores tróficos

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que la deprivación de factores tróficos inducía muerte celular por apoptosis

en los hepatocitos inmortalizados (12, 13). Por ello, analizamos el efecto de la pérdida de S6K1 sobre la apoptosis inducida por la retirada de factores de crecimiento del medio de cultivo durante diferentes tiempos.

Al analizar el porcentaje de células apoptóticas que aparecen tras la retirada de suero, encontramos que los hepatocitos de genotipo salvaje son sensibles a la apoptosis inducida de esta manera. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los hepatocitos carentes en S6K1, los cuales, a pesar de mostrar un pequeño aumento de 1,5 veces en sus niveles de células con contenido de ADN inferior a 2N, no es comparable con el aumento tan significativo de los hepatocitos controles (Figura 5A). A continuación, medimos la actividad de la caspasa-3 por un ensayo fluorimétrico y demostramos que aumenta tras la retirada de suero en las células S6K1^{+/+}, pero esto no ocurre en los hepatocitos deficientes en S6K1 (Figura 5B).

Al analizar la expresión de otras proteínas, encontramos inducción de la proteína proapoptótica Bim en los hepatocitos S6K1^{+/+} cultivados en ausencia de suero durante 8 y 16 horas. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, la expresión de Bim se mantiene muy baja en los hepatocitos S6K1^{-/-}, prácticamente en los mismos niveles que en presencia de suero (10% de suero fetal). Asimismo, la proteína antiapoptótica Bcl-x_L se modula tras la retirada de suero. En ausencia de suero durante 8 y 16 horas, disminuyen los niveles de expresión de Bcl-x_L en los hepatocitos de genotipo salvaje. Sin embargo, de la misma forma que ocurre con Bim, la falta de S6K1 en los hepatocitos mantiene la expresión de Bcl-x_L en niveles semejantes que las células controles (Figura 5C).

Estudio de las rutas de supervivencia activadas por factores de crecimiento

A la vista de la marcada resistencia a la apoptosis de los hepatocitos carentes de S6K1, nos planteamos la posibilidad de que se pudieran mantener activadas las rutas de supervivencia en ausencia de suero. Para comprobar esta hipótesis, determinamos los niveles de fosforilación de Akt y MAPK, dos proteínas clave en las rutas de supervivencia de los hepatocitos (15).

Los niveles de fosforilación de MAPK y Akt disminuyen conforme avanza el tiempo de retirada de suero en las células controles. Sin embargo, los hepatocitos $S6K1^{-/-}$ mantienen los niveles de fosforilación de ambas proteínas a pesar de la deprivación de suero (Figura 6A).

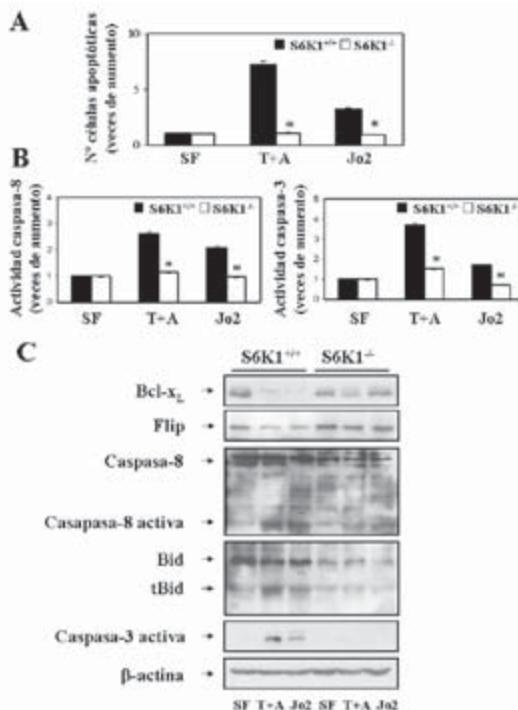


FIGURA 4. Análisis de la apoptosis en hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras el tratamiento con ligandos de receptores de muerte. **A.** Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en lisados de hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras el tratamiento con $TN\alpha$ + actinomicina D (T+A) y Jo2 durante 16 horas. En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios ± SE de cinco experimentos independientes. * $p < 0,05$. **B.** Análisis de la actividad enzimática de caspasa-3 y 8 en lisados de hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras el tratamiento con $TN\alpha$ + actinomicina D (T+A) y Jo2 durante 16 horas. En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios ± SE de cinco experimentos independientes. * $p < 0,05$. **C.** Análisis por Western blot de la expresión de Bcl-x_L, Flip, Bid, caspase-8, del fragmento activo de caspasa-3 y β-actina, como control de carga, en los lisados de hepatocitos $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tratados como se describe en B.

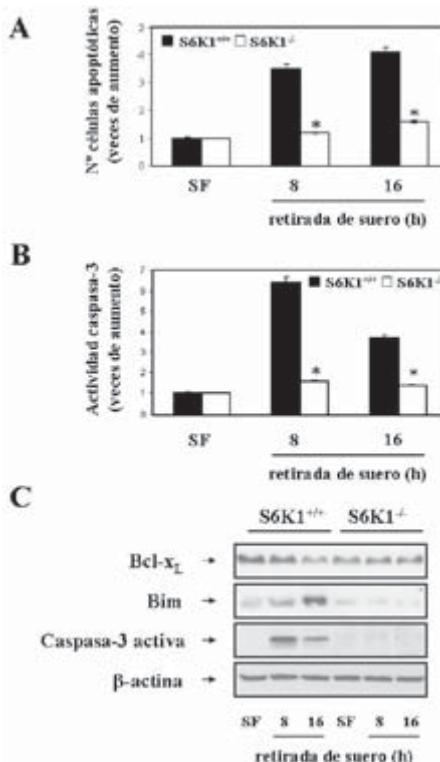


FIGURA 5. Análisis de la apoptosis en hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero. **A.** Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en lisados de hepatocitos S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero. En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios ± SE de cinco experimentos independientes. * p < 0,05. **B.** Análisis de la actividad caspasa-3 y acumulación de su fragmento activo por Western blot en lisados celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero. En la gráfica, los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios ± SE de cinco experimentos independientes. * p < 0,05. **C.** Análisis por Western blot de la expresión Bcl-x_L, Bim y β-actina, como control de carga, en lisados celulares S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la retirada de suero.

Una vez comprobado que los niveles de fosforilación y, por tanto, de activación de estos dos miembros importantes de las rutas de supervivencia no se pierden a pesar de la falta de factores tróficos, investigamos el comportamiento de los hepatocitos deficientes en S6K1 ante el mismo estímulo de muerte al inhibir ambas rutas de supervivencia. Para realizar este experimento utilizamos dos inhibi-

dores que impiden la activación de Akt y MAPK. Estos inhibidores son LY294002 (inhibe la PI3K) a una dosis 40 μ M y PD098059 (inhibe MEK) a una dosis de 20 μ M.

En los hepatocitos $S6K1^{-/-}$ el porcentaje de células apoptóticas aumenta dos veces después del tratamiento con PD o LY conjuntamente con retirada de suero. Además, la incubación de estas células con LY y PD de manera simultánea produjo un efecto sinérgico, alcanzándose un aumento de cuatro veces en este porcentaje (Figura 6B). Este dato resulta muy similar al número de células apoptóticas que aparecen con el tratamiento único de la retirada de suero en los hepatocitos de genotipo salvaje.

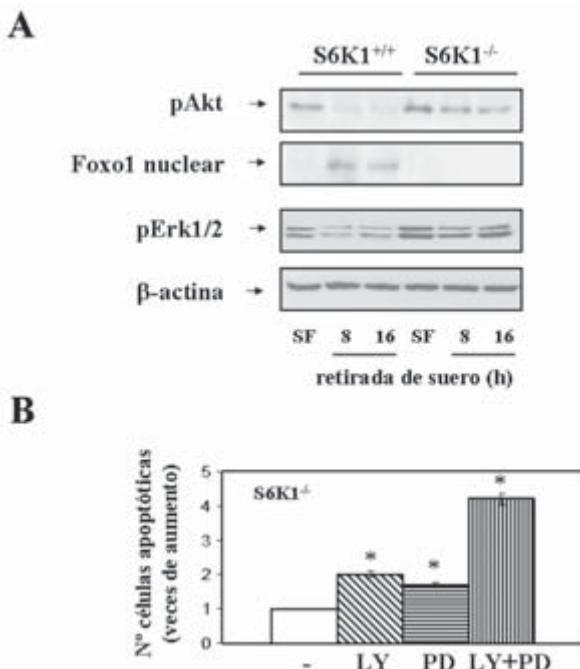


FIGURA 6. *Medida de la activación de Akt y MAPK tras la retirada de suero.*

A. Análisis por Western blot de la fosforilación de Akt, MAPK y β -actina, como control de carga, en lisados celulares $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras la retirada de suero.
B. Análisis por citometría de flujo del ciclo celular en lisados celulares $S6K1^{+/+}$ y $S6K1^{-/-}$ tras 16 horas de retirada de suero en presencia de LY, PD y de LY + PD. En la gráfica, los resultados se expresan con respecto al control mantenido con suero y son valores medios \pm SE de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

Aproximación *in vivo* de un daño hepático fulminante producido por el tóxico concanavalina A: papel protector de la deficiencia en S6K1

Para comprobar los resultados obtenidos *in vitro*, analizamos el efecto de la falta de S6K1 frente a un daño hepático fulminante producido por el tóxico concanavalina A (ConA). Ésta es una glicoproteína perteneciente a las lectinas que se obtiene de la planta *Canavalia ensiformis* y presenta una gran afinidad por el seno hepático, provocando daños en el hígado a través de la activación de los linfocitos T (16).

El protocolo seguido para realizar estos experimentos fue el siguiente: se inyecta PBS 1X (controles) o 25 mg/Kg de ConA disuelta en PBS a través de la vena de la cola (14) a ratones de genotipo salvaje y deficientes en S6K1. Transcurridas ocho horas, los animales se sacrifican. Con los hígados procedentes de ratones controles y ratones inyectados con el tóxico, se preparan cortes en parafina y extractos de proteínas para el posterior análisis de parámetros indicadores de muerte celular.

En la Figura 7A se muestran cortes de hígados de ratones S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} controles e inyectados con concanavalina A. Los hígados controles de ambos genotipos mostraron una histología de aspecto normal, al igual que los cortes de hígados procedentes de ratones deficientes en S6K1 inyectados con ConA. Sin embargo, en los cortes de hígados de genotipo salvaje inyectados con ConA aparece una intensa congestión vascular y esteatosis multivacuolar hepatocitaria, signos claros de un fuerte daño hepático. Asimismo, los niveles de actividad caspasa-3 aumentan cinco veces tras el tratamiento con ConA en los hígados de genotipo salvaje. Sin embargo, en hígados deficientes en S6K1 es prácticamente despreciable la variación de la actividad de caspasa-3 frente a su control sin inyectar. A continuación, analizamos el truncamiento de Bid. Tras el tratamiento con ConA, detectamos el fragmento activo de Bid en los hígados S6K1^{+/+} pero no en los hígados S6K1^{-/-} (Figura 7B).

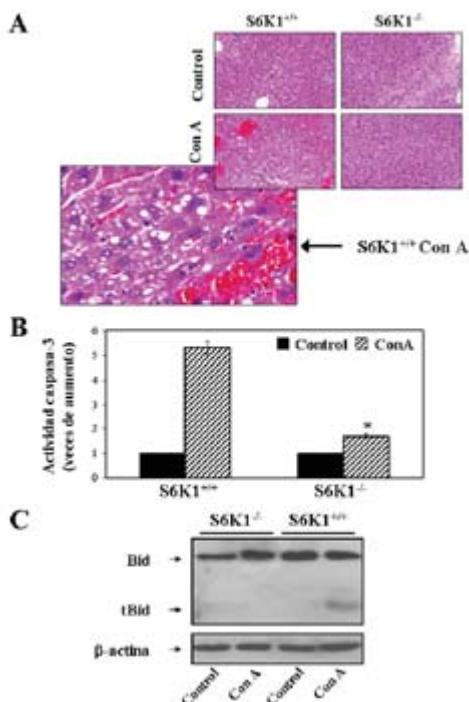


FIGURA 7. Análisis de la apoptosis en hígados de ratones S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la inyección con PBS 1X o ConA. A. Los cortes de hígados se tiñeron con hematoxilina-eosina a un aumento de: 4x (arriba) 60x (abajo). B. Análisis de la actividad caspasa-3 en extractos de hígados S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la inyección de Concanavalina A. En la gráfica los resultados se expresan con respecto al control inyectado con PBS 1X y son valores medios ± SE de tres experimentos independientes. * p < 0,05. C. Análisis por Western blot del truncamiento de Bid en extractos de hígados S6K1^{+/+} y S6K1^{-/-} tras la inyección de Concanavalina A.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por un proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC/BFU 200501615) y por el CIBERDEM.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HENGARTNER, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776.
- (2) KIM, S. K. and NOVAK, R. F. (2007): The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol. Ther.* 113 (1): 88-120.
- (3) UM, S. H.; FRIGERIO, F.; WATANABE, M.; PICARD, F.; JOAQUIN, M.; STICKER, M.; FUMAGALLI, S.; ALLEGRENI, P. R.; KOZMA, S. C.; AUWERX, J. and THOMAS, G. (2004): Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. 431 (7005): 200-205.
- (4) PENDE, M.; KOZMA, S. C.; JAQUET, M.; OORSCHOT, V.; BURCELIN, R.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; KLUMPERMAN, J.; THORENS, B. and THOMAS, G. (2000): Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*. 408 (6815): 994-997.
- (5) VOLAREVIC, S. and THOMAS, G. (2001): Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 65: 101-127.
- (6) ZHANG, J. F.; LIU, J. J.; LU, M. Q.; CAI, C. J.; YANG, Y.; LI, H.; XU, C. and CHEN, G. H. (2007): Rapamycin inhibits cell growth by induction of apoptosis on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Transpl. Immunol.* 17 (3): 162-168.
- (7) KIM, S. K. and NOVAK, R. F. (2007): The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol. Ther.* 113 (1): 88-120.
- (8) EVERSON, G. T. (2006): Everolimus and mTOR inhibitors in liver transplantation: opening the «box». *Liver. Transpl.* 12 (11): 1571-1573.
- (9) SUN, S. Y.; ROSENBERG, L. M.; WANG, X.; ZHOU, Z.; YUE, P.; FU, H. and KHURI, F. R. (2005): Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res.* 65 (16): 7052-7058.
- (10) FABREGAT, I.; LORENZO, M. and BENITO, M. (1989): Precocious induction of malic enzyme by nutritional and hormonal factors in rat foetal hepatocyte primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161 (3): 1028-1034.
- (11) VALVERDE, A. M.; BURKS, D. J.; FABREGAT, I.; FISHER, T. L.; CARRETERO, O. J.; WHITE, M. F. and BENITO, M. (2003): Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. *Diabetes*. 52 (9): 2239-2248.
- (12) VALVERDE, A. M.; FABREGAT, I.; BURKS, D. J.; WHITE, M. F. and BENITO, M. (2004): IRS-2 mediates the antiapoptotic effect of insulin in neonatal hepatocytes. *Hepatology*. 40 (6): 1285-1294.
- (13) GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, A.; ESCRIBANO, O.; ALBA, J.; RONDINONE, C. M.; BENITO, M. and VALVERDE, A. M. (2007): Levels of protein tyrosine phosphatase 1B determine susceptibility to apoptosis in serum-deprived hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 212 (1): 76-88.
- (14) CHANG, C. P.; YANG, M. C.; LIU, H. S.; LIN, Y. S. and LEI, H. Y. (2007): Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine *in situ* hepatoma model. *Hepatology*. 45 (2): 286-296.

- (15) MURATA, M.; KOJIMA, T.; YAMAMOTO, T.; Go, M.; TAKANO, K.; OSANAI, M.; CHIBA, H. and SAWADA, N. (2005): Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp. Cell. Res.* 310 (1): 140-151.
- (16) GANTNER, F.; KUSTERS, S.; WENDEL, A.; HATZELMANN, A.; SCHUDT, C. and TIEGS, G. (1997): Protection from T cell-mediated murine liver failure by phosphodiesterase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280 (1): 53-60.

————— *Artículo original* ———

Aplicación de la Topología Molecular en la búsqueda de nuevos agentes activos frente a Leishmania

Recibido el 28 de febrero de 2008

GARCÍA-DOMÉNECH, R.*; DOMINGO-PUIG, C.;
ESTEVE-MARTÍNEZ, M. A.; SCHMITT, J.; VERA-MARTÍNEZ, J.;
CHINDEMI, A. L.; GÁLVEZ, J.

*Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.
Universitat de Valencia*

RESUMEN

Se ha desarrollado un modelo topológico-matemático encaminado a buscar nuevos compuestos derivados del 3,5 dinitrobenceno sulfonamida y/o benzamida activos frente a Leishmania. Utilizando el análisis lineal discriminante y el análisis de regresión multilineal se ha obtenido un modelo capaz de identificar la actividad del 90% de los compuestos estudiados. Tras realizar un barrido virtual se proponen nuevas estructuras potencialmente activas frente a *L. donovani*.

Palabras clave: Leishmania.—Análisis lineal discriminante.—Análisis de regresión multilineal.—Índices topológicos.

* **Información de contacto:**

Ramón García Doménech.

Departamento de Química Física, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia.

Avda. V. A. Estellés, s/n. 46100 Burjassot (Valencia).

Telf.: 96 354 42 91. Fax: 96 354 48 92.

email: ramon.garcia@uv.es

ABSTRACT**Application of the Molecular Topology in the search of new agents actives against Leishmania**

A topological-mathematical model has been arranged to search for new derivatives of 3,5-dinitrobenzene sulphonamide and/or benzamide, active against *L. donovani*. By using linear discriminant analysis as well as multilinear regression, a model capable to identify the activity of 90% of the analyzed compounds has been achieved. After carrying out a virtual screening based upon such a model, new structures potentially active against the parasite are proposed.

Key words: Leishmania.—Linear discriminant análisis.—Multilinear regresión análisis.—Topological descriptors.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Leishmania*. Ésta se transmite a través de la picadura de dípteros de la subfamilia *Phlebotominae*. Los principales reservorios son animales, tanto silvestres como domésticos, pero el ser humano también constituye un importante reservorio para algunas especies de *Leishmania* (*L. donovani*, *L. tropica*) (1).

Existen cuatro formas principales de leishmaniasis: cutánea, cutánea difusa, mucocutánea y la forma visceral. Esta última, llamada *kala azar*, es la más patógena y se caracteriza por una inflamación de hígado y bazo, acompañada de otros síntomas como fiebre, pérdida de peso y anemia. Sin tratamiento es fatal en el 100% de los casos (2).

La enfermedad es endémica en 88 países de cuatro continentes. En la actualidad, representa un auténtico problema de salud pública, con una prevalencia global de 12 millones de casos y una incidencia anual de 1,5-2 millones de casos (1-1,5 millones la forma cutánea y 500.000 la visceral) (3). Además la incidencia aumenta debido a los movimientos migratorios de las zonas rurales a las industrializadas y el consecuente hacinamiento en los suburbios de las grandes ciudades. La leishmaniasis está considerada por la OMS como una de las enfermedades olvidadas que ha entrado dentro del programa TDR (*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*). Esta enfermedad afecta a la gente más pobre del planeta (4).

Los tratamientos utilizados hasta el momento están basados en los antimoniales pentavalentes como fármacos de primera línea y el isotianato de pentamidina y anfotericina B como fármacos de segunda elección. Pero ya se han descrito resistencias (tanto en la forma cutánea como en la visceral) a los antimoniales pentavalentes. Además el tratamiento se complica cuando la leishmaniasis aparece asociada al VIH o a inmunosupresión. También hay que remarcar que estos medicamentos son tóxicos y tienen muchos efectos secundarios (5). La miltefosina oral ha demostrado efectividad en el tratamiento de la leishmaniasis visceral, sin embargo, no reporta ninguna eficacia contra la forma cutánea (6).

Por todas estas razones, la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos contra la lucha de esta enfermedad es urgente.

En la búsqueda de relaciones cuantitativas estructura-actividad, la topología molecular se ha convertido en la actualidad en una herramienta muy útil para caracterizar estructuralmente a una molécula. Basándose en el método de Conectividad Molecular (7), el cual fue iniciado por Randic (8) y posteriormente desarrollado y descrito por Kier y Hall (9), es posible identificar diferentes niveles estructurales de una molécula a través de unos valores numéricos denominados índices de conectividad. Para ello, cada molécula se asimila a un grafo en donde cada vértice representa a un átomo y cada eje a las conexiones existentes entre ellos. A partir del grafo, se construye la matriz topológica cuyos elementos adquieren valores nulos o no en función de las conexiones existentes entre dichos elementos en el grafo. El tratamiento posterior de la matriz topológica conduce a los índices de conectividad que caracterizan a ese grafo de una manera rápida y sencilla. Estos descriptores se han utilizado con éxito en la búsqueda, selección y diseño de nuevos compuestos activos en diferentes áreas terapéuticas y en el antiparasitario en particular (10-13).

En este trabajo nos centraremos en la actividad de varias dinitro-bencenosulfonamidas, compuestos derivados del herbicida orizalina, ya que su eficiencia contra leishmania ha sido demostrada previamente, inhibiendo la polimerización de tubulina en parásitos purificados y deteniendo su crecimiento en las fases G2/M del ciclo celular (14).

El estudio consiste en la utilización conjunta del análisis lineal discriminante y la regresión multilineal para desarrollar un modelo topológico matemático capaz de identificar la actividad frente a

L. donovani y aplicarlo en la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente activos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Compuestos estudiados

Se eligió para este estudio un grupo de 57 compuestos [37 de ellos derivados de la 3,5 dinitrobenceno sulfonamida y 20 seleccionados de la base Maybridge Organics Compounds (15)] recogidos en el trabajo publicado por Karl A. Werbovetz (14). La Tabla 1 recoge la estructura química y la actividad antiparasitaria frente a *L. donovani* en términos de concentración inhibitoria 50, IC_{50} (mM) para cada compuesto (la numeración seguida es la misma que aparece en el trabajo).

Descriptores topológicos utilizados

Los índices topológicos empleados en el presente trabajo fueron los siguientes:

Índices de conectividad de Kier y Hall (7)

Los índices de conectividad ${}^m\chi_t$ corresponden en cada caso a la suma:

$${}^m\chi_t = \sum_{j=1}^{{}^n m} {}^m S_j$$

para todos los subgrafos de tipo t y orden m :

donde ${}^n m$ es el número de subgrafos de tipo t y orden m . Los términos ${}^m S_j$ representan el inverso de la raíz cuadrada del producto de las valencias de los vértices que constituyen ese subgrafo.

$${}^m S_j = \left[\prod_{i=1}^{m+1} (\delta_i) \right]^{-1/2}$$

donde j define a un subgrafo en particular y δ_i representa la valencia topológica de cada vértice (número de ejes que confluyen en ese vértice).

Calculamos índices de conectividad χ_i hasta orden 4 (subgrafos formados por cuatro ejes o aristas) y tipos path (subgrafos en los que las valencias de sus vértices son menores o iguales a 2), cluster (subgrafos que contienen sólo vértices con valencias 1, 3 y/o 4) y path-cluster (contienen vértices con valencias 1, 2, 3 y/o 4).

Los vértices representando a átomos distintos al carbono se identifican con una valencia $\delta^v = Z^v - H$, siendo Z^v el número de electrones de valencia del átomo objeto de estudio, y H el número de hidrógenos unidos a ese átomo, obteniéndose índices tipo ${}^m\chi_i^v$.

Otros descriptores que se han utilizado en este trabajo y que derivan de los anteriores son ${}^mD_i = {}^m\chi_i - {}^m\chi_i^v$ y ${}^mC_i = {}^m\chi_i / {}^m\chi_i^v$.

Índices de carga (16)

Desarrollados en nuestra Unidad de Investigación, evalúan la transferencia de carga entre pares de átomos así como la transferencia global de carga intramolecular. Se definen los índices G_k y J_k como:

$$G_k = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N |c_{ij}| \delta(k, d_{ij}) \quad \text{y} \quad J_k = G_k / (N-1)$$

donde:

N: Número de vértices (átomos diferentes al hidrógeno).

d_{ij} : Elementos de la matriz de distancia topológica.

δ : delta de Kronecker.

$c_{ij} = m_{ij} - m_{ji}$ y $M = A \times Q$, siendo:

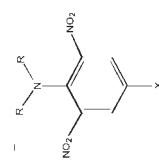
A: Matriz de adyacencia de vértices o de conectividad.

Q: Matriz coulombica: Para $i <> j$, $q_{ij} = 1/d_{ij}^2$ y $q_{ii} = 0$.

Así, G_k representa la suma de todos los términos c_{ij} para cada par de vértices i y j separados a una distancia topológica k. En este trabajo $k < 6$.

Los índices de carga de valencia G_k^v y J_k^v se calculan siguiendo el procedimiento anterior usando una matriz modificada A' en cuya diagonal se introduce la electronegatividad de los heteroátomos.

TABLA 1. Estructura química de los compuestos estudiados y resultados de predicción de la actividad frente a *L. donovani* obtenidos para cada compuesto



Compuesto	<i>R</i>	<i>X</i>	<i>CI</i> ₅₀ <i>exp</i> ^a	<i>FD</i> ^b	<i>logCI</i> ₅₀ <i>exp</i> ^a	<i>logCI</i> ₅₀ <i>calc</i> ^c	Clasif.
Grupo de entrenamiento activo (<i>CI</i>₅₀ < 20 μM)							
46		0,5	0,87	-0,301	0,776	A	
48		2,3	5,23	0,362	0,751	A	
33	n-propil	-	2,5	3,09	0,398	0,837	A
11	n-butil		2,6	3,66	0,415	0,913	A

TABLA 1. Estructura química de los compuestos estudiados y resultados de predicción de la actividad frente a *L. donovani* obtenidos para cada compuesto (cont.)

Compuesto	R	X	$CJ_{50}exp^a$	FD^b	$logCI_{50}exp^a$	$logCI_{50}calc^c$	Clasif.
02	n-propil		3,7	5,72	0,568	0,479	A
01	n-propil		5	1,42	0,699	1,069	I
32	n-propil		5	4,55	0,699	1,095	I
17	n-propil		5,5	3,53	0,740	0,837	A
12	n-butil		5,6	4,69	0,748	0,928	A
23	n-butil		5,7	5,29	0,756	0,719	A
30	n-propil		8,1	2,69	0,909	0,973	A
36	n-pentil		9	2,9	0,954	0,943	A

TABLA 1. Estructura química de los compuestos estudiados y resultados de predicción de la actividad frente a *L. donovani* obtenidos para cada compuesto (cont.)

Compuesto	R	X	$CI_{50}exp^a$	FD^b	$logCI_{50}exp^a$	$logCI_{50}calc^c$	Clasif.
35	n-etyl		11	1,32	1,041	1,063	I
37	n-hexil		12	3,83	1,079	0,880	A
16	n-propil		13	3,34	1,114	1,012	I
26	n-butil		20	1,82	1,301	1,078	I
Grupo de entrenamiento inactivo ($CI_{50} > 20 \mu\text{M}$)							
04	n-propil		21	-6,38	1,322	1,375	I
44			25	-3,34	1,398	1,416	I
05	n-propil		27	-7,46	1,431	1,569	I
15	n-propil		32	2,88	1,505	1,129	I
29	n-propil		32	1,83	1,505	1,262	I

TABLA 1. Estructura química de los compuestos estudiados y resultados de predicción de la actividad frente a L. donovani obtenidos para cada compuesto (cont.)

Compuesto	R	X	$CI_{50}exp^a$	FD^b	$logCI_{50}exp^a$	$logCI_{50}calc^c$	Clasif.
45			32	-5,88	1,505	2,004	I
54			37	-5,93	1,568	1,993	I
55			39	-4,74	1,591	1,729	I
09	n-propil		43	-3,97	1,633	1,526	I
19	n-propil	$\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	43	-1,21	1,633	1,442	I
22			43	-6,71	1,633	1,778	I
08	n-propil	$\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	50	-1,89	1,699	1,396	I
10	n-propil		50	-1,22	1,699	2,046	I

TABLA 1. Estructura química de los compuestos estudiados y resultados de predicción de la actividad frente a *L. donovani* obtenidos para cada compuesto (cont.)

Compuesto	R	X	$CI_{50}exp^a$	FD^b	$logCI_{50}exp^a$	$logCI_{50}calc^c$	Clasif.
06	n-propil	$\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	54	-3,25	1,732	1,365	I
07	n-propil	$\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	55	-6,14	1,740	1,598	I
03	n-propil		60	1,35	1,778	1,098	I
Oryzalin	n-propil		65	-0,7	1,813	1,425	I
43			66	-4,05	1,819	1,844	I
24	H, n-propil	SO_2NH_2	67	-1,28	1,826	2,100	I
25	n-etil	SO_2NH_2	69	-0,48	1,839	1,718	I
53			80	-3,34	1,903	1,847	I
27			90	-9,36	1,954	2,347	I
57			98	-3,17	1,991	1,460	I
13	n-propil	$\text{C}\equiv\text{N}$	>100	-4,55	>2,000	1,528	I

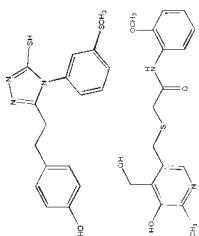
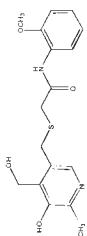
TABLA 1. Estructura química de los compuestos estudiados y resultados de predicción de la actividad frente a *L. donovani* obtenidos para cada compuesto (cont.)

Compuesto	R	X	$CI_{50}exp^a$	FD^b	$logCI_{50}exp^a$	$logCI_{50}calc^c$	Clasif.
14	n-propil		>100	-1,45	>2,000	1,711	I
34	n-propil		>100	-0,25	>2,000	1,383	I
38			>100	-7,15	>2,000	1,929	I
39			>100	-1,28	>2,000	1,805	I
40			>100	-4,54	>2,000	2,114	I
49			>100	-3,31	>2,000	1,800	I
50			>100	-3,05	>2,000	1,696	I

TABLA 1. Estructura química de los compuestos estudiados y resultados de predicción de la actividad frente a *L. donovani* obtenidos para cada compuesto (cont.)

Compuesto	R	X	$CI_{50}exp^a$	FD^b	$logCI_{50}exp^a$	$logCI_{50}calc^c$	Clasif.
51		>100	-8,57	>2,000	2,215	1	
Grupo test inactivo ($CI_{50} > 20\mu M$)							
42			21	-9,01	1,322	1,442	I
31	n-propil		23	3,68	1,362	0,956	A
20	n-propil	$\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	26	-0,58	1,415	1,526	I
21	n-propil		47	-8,72	1,672	1,782	I
18	n-propil	$\text{SO}_2\text{N}((\text{CH}_2)_3\text{CH}_3)_2$	48	-3,39	1,681	1,591	I
56			60	-9,48	1,778	1,900	I
41			72	-14,41	1,857	1,900	I

TABLA 1. Estructura química de los compuestos estudiados y resultados de predicción de la actividad frente a *L. donovani* obtenidos para cada compuesto (cont.)

Compuesto	R	X	$CI_{50}exp^a$	FD^b	$logCI_{50}exp^a$	$logCI_{50}calc^c$	Clasif.
28	n-propil	CONH ₂	76	-3,23	1,881	1,839	I
47			>100	-9,33	>2,000	1,606	I
52			>100	-8,90	>2,000	2,373	I

^a Valores de CI_{50} (μM) obtenidos en la referencia (6).

^b Valores de la función discriminante, **Eq. 1**.

^c Valores de predicción de $logCI_{50}$, **Eq. 2**.

Otros descriptores utilizados en este trabajo fueron:

N = número de vértices del grafo.

W = número de Wiener (17).

PR_i = pares de ramificaciones en el grafo separados por una distancia i.

En total se han utilizado 62 índices topológicos y para su cálculo el programa DESMOL11 (18).

Tratamiento informático

Análisis de regresión multilineal

El estudio de regresión multilineal lo hemos realizado con ayuda del programa BMDP 9R (19), utilizando los índices topológicos como variables independientes y la concentración inhibitoria-50 (CI₅₀) en su transformación logarítmica, logCI₅₀, como variable dependiente. El estudio estadístico de la función seleccionada se hace atendiendo al número de casos utilizados N, el coeficiente de correlación R, el error estándar de estimación, EEE, el valor F de Fischer y la significación estadística p.

La validación de la función de predicción seleccionada se ha realizado con la ayuda de un test externo.

Análisis lineal discriminante

La búsqueda de un modelo topológico-matemático capaz de identificar a un compuesto con actividad frente a leishmania se ha realizado con la ayuda del análisis lineal discriminante, ALD. Mediante esta técnica es posible obtener funciones lineales capaces de clasificar los compuestos estudiados en categorías o grupos (20). En nuestro caso, el ALD se ha aplicado a un amplio grupo de compuestos con actividad frente a *L. donovani*, siendo la CI₅₀, la propiedad utilizada para distribuir a cada compuesto en el grupo activo o inactivo. Con ayuda del paquete estadístico BMDP 7M el programa selecciona los

índices a incorporar en la función discriminante sobre la base del valor de F de Fisher-Snedecor, y el criterio de clasificación seguido es la distancia de Mahalanobis. La calidad de la función discriminante obtenida se evalúa a través del parámetro de Wilks, λ , y con la ayuda de un test externo.

Diagramas de distribución de la actividad farmacológica, DDAF

Una vez obtenidas las funciones discriminantes, es interesante realizar el correspondiente diagrama DDAF para cada una de ellas. Estos gráficos son útiles para determinar el intervalo de la función discriminante en el que la expectancia, E, o probabilidad de encontrar compuestos activos es máxima (21). Los DDAF son histogramas en los que en ordenadas aparece la expectancia E y en abcisas el valor de la función discriminante, FD. Para un intervalo arbitrario de FD, se puede definir la expectancia de actividad, Ea, como: $Ea = a/(i+1)$ en donde a e i representan el número de compuestos activos (o inactivos) en dicho intervalo dividido por el número total de compuestos activos (o inactivos). De forma similar se puede definir la expectancia de inactividad, Ei, como: $Ei = i/(a+1)$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda de un modelo topológico-matemático útil para predecir la actividad frente a *L. donovani* del grupo de compuestos, objeto de estudio, se realizó en dos etapas:

- Etapa 1. Seleccionar una función discriminante con el objetivo de clasificar y diferenciar los compuestos activos de los claramente inactivos.
- Etapa 2. Seleccionar una función topológica de predicción de la actividad en términos de CI_{50} .

Ambas funciones formarían el modelo matemático capaz de identificar y predecir la actividad de cada uno de los compuestos estudiados y servir de plataforma para la búsqueda de nuevos compuestos activos.

Para obtener la función discriminante, aplicamos el ALD a un grupo de entrenamiento formado por todos los compuestos activos (con valores de $CI_{50} < 20 \mu M$) y, aproximadamente el 80% del resto de los compuestos catalogados como inactivos ($CI_{50} > 20 \mu M$). El 20% restante de compuestos inactivos se utilizará como grupo test externo para validar la función discriminante seleccionada.

La función discriminante elegida, FD, fue:

$$FD = -7,74 - 5,32 \chi_{pc}^4 - 0,542 G_1^v + 5,11 G_3 + 5,16 G_4^v + 18,52 J_2^v - 141,58 J_3^v + 2,51 D_c^3 \quad \text{Eq. 1}$$

$$N = 48 \quad F = 8,97 \quad \lambda(\text{Wilks' lambda}) = 0,389$$

En base a esta función, un compuesto será clasificado con potencial actividad frente a leishmania si $FD > 0$. En cualquier otro caso se consideraría inactivo. La matriz de clasificación obtenida es muy significativa: el 100% de los compuestos activos son clasificados correctamente, así como el 90,6% del grupo inactivo (29 de 32 compuestos) lo que representa en su conjunto un 93,8% de clasificación correcta.

Los índices topológicos que aparecen en la **Eq. 1** evalúan por una parte el grado de ramificación de la molécula (χ_{pc}^4 , D_c^3) y por otra la distribución intramolecular de carga (G_1^v , G_3 , G_4^v , J_2^v , J_3^v).

La Tabla 1, columna 5, recoge los valores de FD obtenidos para cada compuesto de la serie de entrenamiento.

Una forma sencilla de evaluar la calidad de la función discriminante seleccionada consiste en aplicarla a un grupo test externo. En nuestro caso disponemos de diez compuestos no utilizados en el análisis discriminante, seleccionados de forma aleatoria y todos ellos con valores de $CI_{50} > 20 \mu M$. La Tabla 1, columna 5, recoge los resultados obtenidos para cada compuesto. Como puede observarse, todos los compuestos, excepto el **31** son clasificados correctamente como inactivos ($FD < 0$), lo que representa un porcentaje de acierto del 90%.

La Figura 1 muestra el diagrama de distribución de la actividad antileishmanial obtenido con la función discriminante FD. Las barras negras y blancas corresponden con el grupo activo e inactivo, respectivamente. Como puede observarse, los compuestos activos se reagru-

pan preferentemente dentro del intervalo de FD comprendido entre 0,5 y 7. De tal manera que la máxima probabilidad de encontrar un compuesto activo debe mostrar un valor de FD dentro de ese intervalo.

Con la finalidad de poder predecir el valor de la actividad frente a *L. donovani* para cada compuesto estudiado, realizamos un análisis de regresión multilínea usando los descriptores topológicos como variables independientes y la CI_{50} en su transformación logarítmica $\text{Log}CI_{50}$ como variable dependiente. Utilizamos la misma serie de entrenamiento que para el ALD. Los compuestos con valores de $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ se les ha asignado un valor de $\text{log}CI_{50} = 2.000$. Lógicamente es una aproximación que habrá que considerar al evaluar la función de predicción que se obtenga.

La función seleccionada, **Eq. 2**, fue:

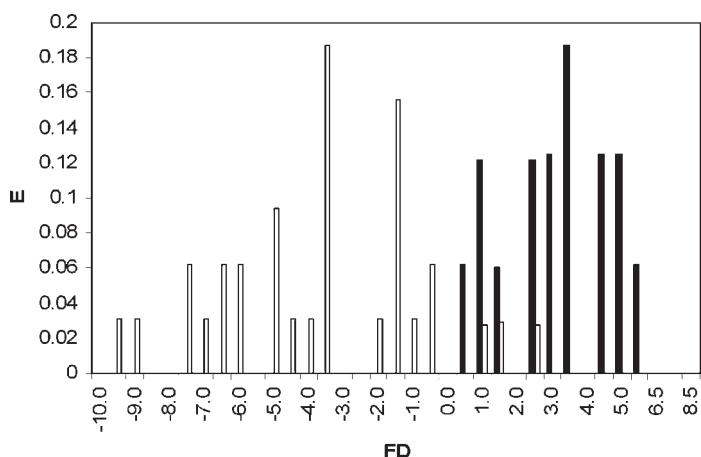


FIGURA 1. *Diagrama de distribución de la actividad frente a L. donovani obtenido a partir de la función de discriminación seleccionada FD, Eq. 1* (las barras negras representan al grupo activo y las blancas al grupo inactivo).

$$\text{Log } CI_{50} = 13,32 + 0,814 \chi_p + 1,381 G_3^v - 32,16 J_3^v + 0,0018W - 0,717N + 0,332PR1 - 0,263PR2$$

$$N = 48 \quad R = 0,806 \quad EEE = 0,366 \quad F = 10,6 \quad p < 0,0001$$

La Tabla 1 y la Figura 2 recogen los valores de predicción obtenidos a partir de la **Eq. 2** para cada compuesto. Si nos fijamos en la serie de entrenamiento (compuestos representados con puntos blancos en

la Figura 2), aproximadamente el 75% de los compuestos presentan residuales inferiores a $\pm 1\text{EEE}$. El compuesto con un valor residual más alto, es precisamente el más activo de la serie estudiada, **46**. El ALD clasifica a este compuesto como activo. Teniendo en cuenta la aproximación apuntada anteriormente en relación con los compuestos con $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{M}$ podemos considerar aceptable la predicción de la propiedad objeto de estudio. La mayoría de los compuestos más activos, $\text{CI}_{50} < 10 \mu\text{M}$, presentan $\text{LogCI}_{50\text{calc}} < 1.000$. Por otra parte, todos los compuestos tomados como inactivos, $\text{CI}_{50} > 20 \mu\text{M}$, muestran valores de $\text{LogCI}_{50\text{calc}} > 1.000$. En base a estos datos, la función de predicción seleccionada, **Eq. 2**, nos permitirá seleccionar un compuesto con probabilidad de ser activo siempre que el $\text{logCI}_{50\text{cal c}} < 1.000$.

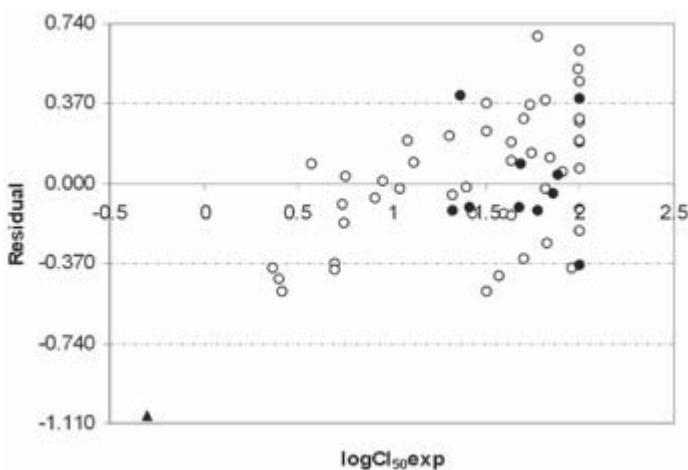


FIGURA 2. *Representación gráfica del residual obtenido para cada compuesto a partir de la Eq. 2 frente al valor experimental, $\text{logCI}_{50\text{exp}}$.*

La validación de la **Eq. 2** se hizo a través del test externo. Los resultados de predicción del test están reflejados al final de la Tabla 1. Al tratarse de un grupo de compuestos inactivos, todos, excepto el compuesto **31**, presentan valores de $\text{logCI}_{50\text{calc}} < 1.000$. Los residuales de los compuestos del grupo test son inferiores a $\pm 1\text{EEE}$ o próximos a $\pm 1\text{EEE}$ (ver Figura 2, compuestos representados por puntos negros).

En base a los resultados obtenidos del análisis lineal discriminante y de la regresión multilineal, se puede establecer un modelo topológico para la búsqueda y selección de nuevos agentes activos frente

a *L. donovani* el formado por dos funciones, FD y LogCI₅₀ (**Eqs. 1 y 2**) y que cumpla la siguiente condición:

Si FD > 0,5 y FD < 7 y logCI₅₀ < 1.000, el compuesto será seleccionado con teórica actividad frente a *L. donovani*. En cualquier otro caso el compuesto será clasificado como inactivo.

La Tabla 1, última columna, muestra la clasificación de actividad obtenida para cada compuesto estudiado siguiendo del modelo topológico seleccionado. Para el grupo de entrenamiento, el porcentaje de acierto de predicción de actividad antileishmanial es del 90% (43 de 48 compuestos correctamente clasificados). Todos los compuestos inactivos son clasificados como inactivos. Para el grupo test externo, la predicción correcta es del 90% (9 de 10 compuestos correctamente clasificados).

Por último realizamos una búsqueda de nuevos compuestos activos con la ayuda de la base Scifinder Scholar (22) y el modelo topológico seleccionado. Se trata de buscar derivados de 3,5 dinitro benzeno sulfonamidas y/o benzamidas. La Tabla 2 recoge algunos de los resultados obtenidos. De los compuestos cuya actividad frente a *L. donovani* se describe en la bibliografía (23), los inactivos son reconocidos por el modelo (compuestos 908843-65-2, 908843-73-2, 908843-57-2, 908843-76-5 y 908843-77-6) y buena parte de los activos (compuestos 908843-67-4, 908843-72-1, 902778-99-8). Otros compuestos no evaluados frente a *L. donovani* son reconocidos como teóricamente activos por el modelo topológico. Algunos de ellos poseen actividad antifúngica (compuestos 62745-75-9, 71112-25-9) (24, 25).

Los resultados obtenidos en esta investigación nos animan a seguir trabajando en este campo al abrirse una vía para la búsqueda de nuevos compuestos activos frente a *L. donovani* con la ayuda de la topología molecular.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad (proyecto SAF2005-PI052128) y el Master Internacional en Enfermedades Parasitarias Tropicales (Universitat de Valencia).

TABLA 2. Screening molecular realizado con la base SciFinder Scholar para la selección de nuevos compuestos teóricamente activos frente a *L. donovani* derivados de 3,5 dinitro benceno sulfonamidas y/o benzamidas

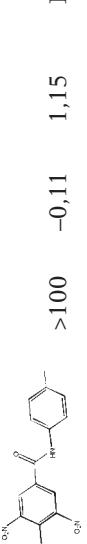
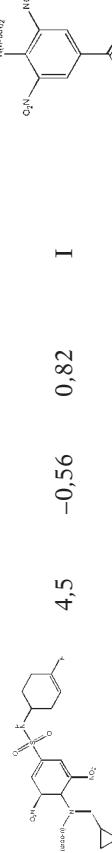
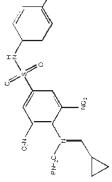
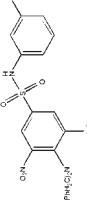
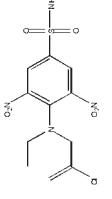
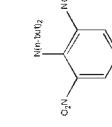
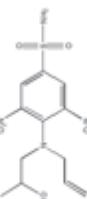
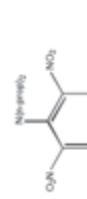
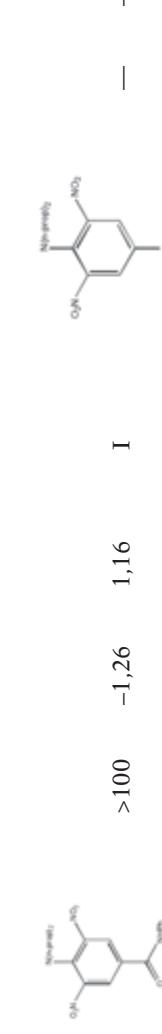
Compuesto ^a	CI_{50}^b	FD^c	$\log CI_{50}^d$	Clasif.	Compuesto ^a	CI_{50}^b	FD^c	$\log CI_{50}^d$	Clasif.
908843-67-4	2,8	5,76	0,72	A		>100	-0,11	1,15	I
908843-70-9	4,5	-0,56	0,82	I		>100	1,12	1,02	I
908843-72-1	8,4	2,44	0,50	A		—	0,78	0,98	A
908843-73-0	6,9	8,96	0,29	I		>100	2,20	1,05	I
908843-77-6	8,4	2,44	0,50	A		—	0,78	0,98	A
908843-79-2	2,8	5,76	0,72	A		>100	-0,11	1,15	I

TABLA 2. Screening molecular realizado con la base SciFinder Scholar para la selección de nuevos compuestos teóricamente activos frente a *L. donovani* derivados de 3,5 dinitro benceno sulfonamidas y/o benzamidas (cont.)

Compuesto ^a	CI_{50}^b	FD^c	$\log CI_{50}^d$	Clasif.	Compuesto ^a	CI_{50}^b	FD^c	$\log CI_{50}^d$	Clasif.	
902778-99-8	9,3	4,69	0,93	A		—	—	1,98	0,96	A
908843-65-2	73	1,57	1,34	I		—	—	0,32	0,85	A
908610-42-1	908610-42-1	—	—	—		—	—	—	—	
71112-25-9	—	—	—	—		—	—	—	—	
908843-73-2	>100	-1,26	1,16	I		—	—	-2,54	1,41	I
					Trifluralin					

^a Estructura y número de referencia.

^b Valores de CI_{50} (μM) obtenidos en la referencia (23).

^c Valores de la función discriminante, **Eq. 1**.

^d Valores de la función discriminante, **Eq. 2**.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) CHENG, C. (1986): *General Parasitology*, pp. 121-127. Academic Press College Division. Orlando.
- (2) LEISHMANIASIS. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>
- (3) WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. WHO 2002 (44); 77: 365-372.
- (4) WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. WHO 2002 (25); 77: 205-212.
- (5) HIDE, G.; MOTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. and HOLMES, P. H. (1997): *Trypanosomiasis and leishmaniasis, biology and control*. Chemotherapy of Human Leishmaniasis and Trypanosomiasis (Simon L. Croft, J. A. Urbina and Reto Brun), pp. 245-257. CAB International. Wallingford, UK.
- (6) BRENDLE, J. J.; OUTLAW, A.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R. and WERBOVETZ, K. A. (2002): Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(3): 797-807.
- (7) KIER, L. B. and HALL, L. H. (1986): *Molecular Connectivity in Structure-Activity Analysis*. Research Studies Press, Letchworth, UK.
- (8) RANDIC, M. (1975): On characterization of molecular branching. *J. Am. Chem. Soc.* 97: 6609-6615.
- (9) KIER, L. B.; MURRAY, W. J.; RANDIC, M. and HALL, L. H. (1976): Molecular Connectivity V: Connectivity Series concept applied to density. *J. Pharm. Sci.* 65: 1226-1230.
- (10) GALVEZ, J.; GARCÍA-DOMÉNECH, R.; DE JULIÁN-ORTIZ, J. V. and SOLER, R. (1995): Topological Approach to Drug Design. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 35(5): 938.
- (11) MAHMOUDI, N.; DE JULIÁN-ORTIZ, J. V.; CICERÓN, L.; GALVEZ, J.; MAZIER, D.; DANIS, M.; DEROUIN, F. and GARCÍA-DOMÉNECH, R. (2006): Identification of new anti-malarial drugs by linear discriminant analysis and topological virtual screening. *J. Antimicrob. Chemother.* 57(3): 489-497.
- (12) GOZALBES, R.; BRUN-PASCAUD, M.; GARCÍA-DOMÉNECH, R.; GALVEZ, J.; GIRARD, P. M.; DOUCET, J. P. and DEROUIN, F. (2000): Anti-Toxoplasma activities of 24 quinolones and fluoroquinolones in vitro: prediction of activity by molecular topology and virtual computational techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(10): 2771-2776.
- (13) DE JULIÁN-ORTIZ, J. V.; GALVEZ, J.; MUÑOZ-COLLADO, C.; GARCÍA-DOMÉNECH, R. and GIMENO-CARDONA, C. (1999): Virtual Combinatorial Syntheses and Computational Screening of New Potential Anti-Herpes Compounds. *J. Med. Chem.* 42(17): 3308-3314.
- (14) DELFÍN, D. A.; BHATTACHARJEE, A. K.; YAKOVICH, A. J. and WERBOVETZ, K. A. (2006): Activity of and Initial Mechanistic Studies on a Novel Antileishmanial Agent Identified through in Silico Pharmacophore Development and Database Searching. *J. Med. Chem.* 49: 4196-4207.
- (15) DATA BASE: Maybridge Organics Compounds, <http://www.maybridge.com>
- (16) GÁLVEZ, J.; GARCÍA-DOMÉNECH, R.; SALABERT, M. T. and SOLER, R. (1994): Charge Indices. New topological descriptors. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 34: 520-525.

- (17) WIENER, H. (1947): Structural determination of Paraffin boiling points. *J. Am. Soc.* 69: 17-20.
- (18) DESMOL11 SOFTWARE; Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular. Facultad de Farmacia, Universitat de València.
- (19) DIXON, W. J. (1990): BMDP Statistical Software. University of California, Berkeley.
- (20) FURNIVAL, G. M., WILSON, R. W. (1974): Regressions by leaps and bounds. *Technometrics* 16: 499-511.
- (21) GÁLVEZ, J.; GARCÍA-DOMÉNECH, R.; DE GREGORIO-ALAPONT, C.; DE JULIÁN-ORTIZ, J. V. and POPA, L. (1996): Pharmacological distribution diagrams: a tool for the new drug design. *J. Mol. Graph. Model.* 14: 272-276.
- (22) DATA BASE: SCIFINDER SCHOLAR. <http://www.cas.org/support/academic/sf/index.html>
- (23) GEORGE, T. G.; JOHNSAMUEL, J.; DELFÍN, D. A.; YAKOVICH, A.; MUKHERJEE, M.; PHELPS, M. A.; DALTON, J. T.; SACKETT, D. L.; KAISER, M.; BRUND, R. and WERBOVETZA, K. A. (2006): Antikinetoplastid antimitotic activity and metabolic stability of dinitroaniline sulfonamides and benzamides. *Bioorg. Med. Chem.* 14: 5699-5710.
- (24) BECK, J. R. and YAHNER, J. A. (1977): *Fungicides containing 2,6-dinitroaniline derivatives*. Ger. Offen. 22 pp.
- (25) BECK, J. R. and GAJEWSKI, R. P. (1979): *Fungicidal and herbicidal methods*. U.S. 11 pp.

————— *Artículo original* ———

Influencia de la temperatura sobre las curvas de calibración en IRMA de IGF I. Interpretación mediante dos modelos no excluyentes

Recibido el 22 de marzo de 2008

PERIS CONEJERO, T.¹; OLIVARES PALLEROLS, R.¹ y
MORENO FRIGOLS, J. L.^{1, 2*}

¹Servicio de Radioisótopos.

Hospital Clínico Universitario de Valencia.

²Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.
Universidad de Valencia.

RESUMEN

Se estudia la influencia de la temperatura sobre las gráficas de calibración utilizadas en la determinación analítica de IGF I mediante IRMA. Los resultados se analizan mediante la ecuación de los cuatro parámetros y una modificación de la isoterma B.E.T. Tales ecuaciones corresponden, respectivamente, a los modelos de interacción ligando (antígeno)-receptor (anticuerpo) y adsorción del antígeno sobre la pared del tubo recubierta de anticuerpo. Los ajustes a ambas ecuaciones son satisfactorios con algunas ventajas para el modelo de absorción que lo hacen preferible en cuanto a la interpretación de los resultados. Se determinan también los parámetros termodinámicos para la disociación del inmunocomplejo.

Palabras clave: Ecuación cuatro parámetros.—Isoterma B.E.T.—Reacción antígeno-anticuerpo.

*** Correspondencia:**

Doctor José Luis Moreno Frigols.

Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia.

Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot (Valencia).

email: Jose.L.Moreno@uv.es

ABSTRACT**Influence of the temperature on calibration curves of IGF I in IRMA.
Interpretation by two models non excluding**

The influence of temperature on the calibration graphs used in the analytical determination of IGF I by IRMA has been studied. The results were analyzed using the equation of the four parameters and a modification of the isotherm BET. Such equations correspond, respectively, to the models of interaction ligand (antigen)-receiver (antibody) and adsorption antigen on the wall of the tube coated antibody. The adjustments to both equations are satisfactory with some advantages for the adsorption model that make it preferable in the interpretation of results. It also determine thermodynamic parameters for the immunocomplex dissociation.

Keywords: Four parameters equation.—B.E.T. isotherm.—Antigen-antibody reaction.

INTRODUCCIÓN

El Radioinmunoanálisis (RIA) fue diseñado por Yallow y Berson (1) como consecuencia de la necesidad de desarrollar métodos capaces de combinar la sensibilidad de las técnicas radioquímicas con la selectividad de las inmunológicas. Esta técnica mide la concentración de diversas sustancias en fluidos biológicos, basándose en la competición de un antígeno presente en la muestra (analito) con otro antígeno marcado radiactivamente (trazador) por unirse a un anticuerpo. La determinación se realiza a través de gráficas de calibración que representan la radiactividad unida al anticuerpo frente a concentraciones conocidas del analito. Tales gráficas son siempre decrecientes (una radiactividad alta indica una concentración baja, y viceversa), lo cual es una característica de la técnica que en principio puede chocar con la mentalidad de los analistas acostumbrados a trabajar sobre gráficas crecientes (Ley de Lambert-Beer y similares). Con este motivo, Miles y Hales (2) presentaron algunas consideraciones críticas que constituyen el punto de arranque de la modificación conocida como Análisis Inmuno Radiométrico (IRMA). En ella se hace reaccionar el antígeno presente en la muestra (analito) con un anticuerpo generalmente inmovilizado, y con un segundo anticuerpo marcado radiactivamente (trazador). A continuación se mide la radiactividad del complejo anticuerpo inmovilizado-antí-

geno-anticuerpo marcado («sandwich»), que, lógicamente, aumenta con la concentración de antígeno. Como puede verse, la diferencia fundamental entre RIA e IRMA consiste en que el trazador radiactivo es el antígeno en el primero y el anticuerpo en el segundo, con el resultado ya señalado de que las gráficas de calibración son decrecientes en el primer caso y crecientes en el segundo. Dichas gráficas necesitan un método de ajuste de cuya bondad depende la exactitud del valor de la concentración problema.

La **Ec. 1** puede justificarse a partir del modelo teórico de interacción ligando-receptor y se llama Ecuación de los Cuatro Parámetros (3):

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

Los términos de esta ecuación representan:

x: Concentración de una muestra.

y: Radiactividad correspondiente a dicha muestra.

A: Valor de y para x = 0 (Blanco).

D: Valor de y para x muy grande.

C: Valor de x para el que $y = (A+D)/2$.

La **Ec. 2** se dedujo en principio para describir los procesos de quimisorción y fisisorción de gases sobre sólidos (4), y es conocida como isoterma B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller):

$$\frac{(P)/(V \cdot (P^0 - P))}{C} = \frac{1}{V_m \cdot C} + \left(\frac{C-1}{V_m \cdot C} \right) \cdot \frac{P}{P^0} \quad \text{Ec. 2}$$

Los términos de esta ecuación representan:

P: Presión del gas.

P^0 : Presión de saturación del gas.

V: Cantidad gas adsorbido expresada como volumen.

V_m : Máximo volumen de gas que satura la capa quimisorbida directamente sobre la superficie del sólido.

C: Constante de equilibrio para la quimisorción de la capa adsorbida directamente sobre la superficie del sólido.

OBJETIVO

En trabajos anteriores (5-10) hemos estudiado la influencia de algunos factores fisicoquímicos sobre la cinética de las reacciones implicadas en las técnicas inmunoanalíticas, así como una justificación teórica de la ecuación de cuatro parámetros (11). En este caso pretendemos analizar la influencia de la temperatura sobre las gráficas de calibración obtenidas en el caso concreto de la IGF I, tratando de utilizar **Ec. 1** y **Ec. 2** para justificar y asignar un sentido fisicoquímico a las variaciones encontradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

1. Tubos recubiertos de anticuerpos frente a IGF-I.
2. Disoluciones patrones de IGF-I.
3. Disolución de anticuerpos frente a IGF-I marcados con ^{125}I .

Todos los reactivos usados estaban incluidos en el kit IGF-I IRMA DSL 2800 suministrado por DSL.

Instrumentos

LKB Gammamaster Automatic Gamma Counter.

Procedimiento Experimental

A cada tubo recubierto se añadieron 50 μL de disolución patrón y 200 μL de anticuerpo marcado, y se dejaron en reposo durante dos horas en baño termostático a distintas temperaturas. Transcurrido este tiempo, los tubos se lavaron y se midió su actividad en el contador.

Análisis de los resultados

Se usó el programa Statistica (Copyright © StatSoft, Inc., 1993) con ecuaciones específicas para regresión no lineal. Para la elección entre diferentes ecuaciones se usa el GraphPad Software Quick Calcs (12), que utiliza el Corrected Akaike's Information Criterion (AIC_c), expresado como $AIC_c = N \cdot \ln(SS/N) + 2 \cdot P + 2 \cdot P \cdot (P+1)/(N-P-1)$ donde N es el número de puntos, SS la suma de cuadrados de residuales, y P el número de parámetros en la ecuación, debiendo elegirse el modelo que dé un AIC_c más bajo. También se utiliza el ANOVA (F test).

RESULTADOS

Los resultados se muestran en la Figura 1.

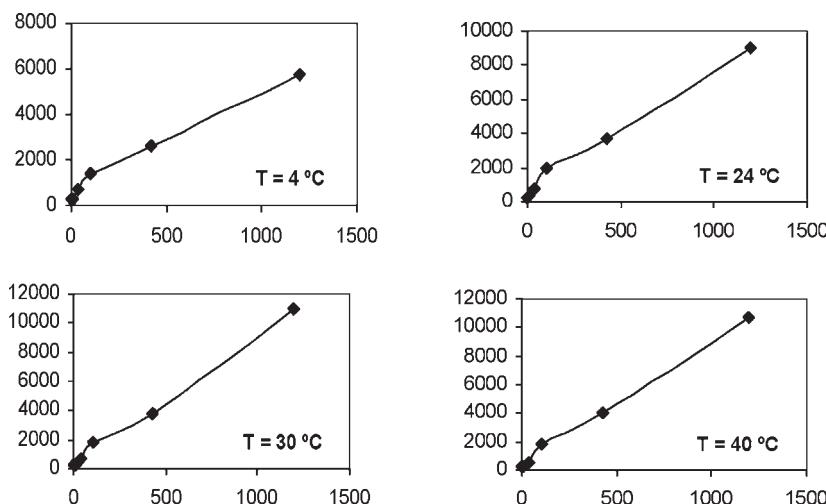


FIGURA 1. *Gráficas de calibración para el IRMA de IGF I a las cuatro temperaturas estudiadas.*

DISCUSIÓN

La forma de las gráficas recuerda la de las isotermas tipo II de la clasificación de Brunauer, que se ajustan a la ecuación conocida como isoterma B.E.T. (**Ec. 2**). La unión del antígeno libre en disolución sobre el anticuerpo inmovilizado en la pared del tubo es un proceso comparable a la adsorción, por lo que puede establecerse un paralelismo entre ambos fenómenos. Sustituyendo en **Ec. 2** los términos expuestos en la columna izquierda de la Tabla 1 por los de la columna derecha y reordenando, se obtiene:

$$y = y_m \cdot S \cdot x / ((S-x) \cdot (K \cdot S + (1-K) \cdot x)) \quad (\text{Ecuación B.E.T. modificada}) \quad \text{Ec. 3}$$

TABLA 1. *Paralelismo entre los términos de Ec. 2. y Ec. 3*

$(P)/(V(P^0-P)) = 1/V_m C + ((C-1)/V_m C)(P/P^0)$ (Ec. 2)	$y = y_m \cdot S \cdot x / ((S-x) \cdot (K \cdot S + (1-K) \cdot x))$ (Ec. 3)
P = Presión del gas.	x = Concentración del antígeno.
P^0 = Presión de saturación del gas.	S = Concentración de saturación (solubilidad) del antígeno.
V = Cantidad gas adsorbido expresada como volumen.	y = Cantidad de antígeno unido al tubo expresada como actividad (cpm).
V = Máxima cantidad de gas que satura la capa quimisorbida directamente sobre la superficie del sólido.	y_m = Máxima cantidad de antígeno que satura los sitios de unión de mayor afinidad en el anticuerpo (cpm).
C = Constante de equilibrio para la quimisorción de la capa adsorbida directamente sobre la superficie del sólido.	K' = Constante de equilibrio para la formación del inmunocomplejo radiactivo.
	K = 1/K' = Constante de equilibrio para la disociación del inmunocomplejo radiactivo.

Según puede verse en la Tabla 2, los resultados se ajustan razonablemente bien a la ecuación de cuatro parámetros (**Ec. 1**).

TABLA 2. Ajustes de los resultados para Ec. 1. y Ec. 3.

T(K)	$y = D + (A-D)/(1+(x/C)^B)$ (Ec. 1)					$y = y_m \cdot S \cdot x / ((S-x) \cdot (K \cdot S + (1-K) \cdot x))$ (Ec. 3)			
	A	B	C	D	r	y_m	S	K	r
277	246	0,732	640643	546563	0,997	2384	2014	0,042	0,999
297	333	0,820	442856	1111632	0,997	3417	1895	0,051	0,999
303	454	1,062	300024	3700846	0,997	3528	1744	0,070	1,000
313	280	0,930	355630	2064825	0,997	3997	1868	0,085	0,999

El parámetro A (**Ec. 1**) es aparentemente independiente de la temperatura, lo cual era de esperar, ya que dicho parámetro representa la actividad unida inespecíficamente al tubo. B se relaciona con el exponente de la ecuación de Hill (13), y se mantiene en todos los casos en valores próximos a uno, lo cual indica que la unión del antígeno al anticuerpo presenta un bajo grado de cooperatividad con una cierta tendencia a aumentar con la temperatura. Se observa también una disminución de C con la temperatura, que puede explicarse porque dicho parámetro contiene el valor de la constante de equilibrio para la formación del inmunocomplejo. Ello indica que tal formación es un proceso exotérmico. D representa la máxima cantidad unida, y también aumenta con la temperatura, lo cual puede explicarse admitiendo que la reacción no había llegado al equilibrio a temperaturas bajas a causa de su mayor lentitud.

De los ajustes para la **Ec. 3** se observa un aumento de y_m que se explica admitiendo que tal parámetro representa aquí la máxima cantidad adsorbida sobre los sitios de mayor afinidad. Ello es concordante con el aumento de la cooperatividad señalado anteriormente. La solubilidad permanece razonablemente constante con un valor promedio de $S = 1880$ ng/mL, $SD = 111$ ng/mL (5,9%). K representa, en este caso, la constante de equilibrio para la disociación del inmunocomplejo, y se observa que aumenta con la temperatura, lo cual nos indica que dicho proceso es endotérmico, hecho concordante con el carácter exotérmico señalado anteriormente para su

formación. Ello es lógico, pues la ruptura de los enlaces necesita, por lo general, un aporte energético. Los valores de K se ajustan a: $K = 35,8 \cdot \exp(-1899/T)$ con una desviación cuadrática media de

TABLA 3. *Parámetros termodinámicos para la disociación del inmunocomplejo formado por la IGF-I sobre la pared de un tubo recubierto de anticuerpo*

T (K)	ΔG^0 (J/mol)	ΔH^0 (J/mol)	ΔS^0 (J/K·mol)
277	7275	15781	21,7
297	7345	15781	20,0
303	6689	15781	21,8
313	6406	15781	22,0

$5 \cdot 10^{-3}$ ($\approx 10\%$). Los valores de ΔG^0 , ΔH^0 y ΔS^0 para la disociación del inmunocomplejo radiactivo se expresan en la Tabla 3.

El valor relativamente alto de ΔG^0 , que corresponde a los valores bajos de K mostrados en la Tabla 3, indica que el inmunocomplejo es apreciablemente estable. La variación de entropía es positiva, como corresponde a un proceso en el que aumenta el desorden del sistema y aparentemente independiente de la temperatura, con un valor medio de $\Delta S^0 = 21,4$ J/K·mol, SD = 0,9 J/K·mol (4,2%).

CONCLUSIÓN GENERAL

Los modelos teóricos de interacción ligando-receptor, que se plasma en la ecuación de los cuatro parámetros (**Ec. 1**) y quimisorción-fisisorción, que da lugar a la isoterma B.E.T. modificada (**Ec. 3**), son dos aproximaciones alternativas y compatibles para explicar la influencia de la temperatura sobre las gráficas de calibración obtenidas en el IRMA de IGF-I. A nuestro juicio, en este caso el modelo de adsorción presenta tres ventajas significativas:

- Es más simple, pues la **Ec. 3** contiene solamente tres parámetros frente a los cuatro de la **Ec. 1**.

- No obstante su mayor simplicidad, los ajustes a **Ec. 3** son mejores (coeficientes de correlación más altos) que los correspondientes a **Ec. 1**.
- El significado físico de la **Ec. 3** es más claro que el de la **Ec. 1**.

Desde el punto de vista práctico, puede decirse que la temperatura más ventajosa para la realización de la técnica es la de 30° C, por ser la que proporciona una mayor rapidez en la obtención de resultados. No es recomendable operar a 40° C, pues los resultados parecen indicar alguna degradación de los reactivos a esta temperatura.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) YALOW, R. S. and BERSON, S. A. (1970): General aspects of radioimmunoassay procedures. En: *In vitro procedures with radioisotopes in medicine*. 455-482. Viena.
- (2) MILES, L. E. M. and HALES, C. N. (1970): Immunoradiometric assay procedures: New developments. En: *In vitro procedures with radioisotopes in medicine*. 483-490. Viena.
- (3) CHAN, D. W. (1987): *Immunoassay: A Practical Guide*. Academic Press, Inc., 129-147.
- (4) WALLBORK, S. C. and GRANT, D. J. W. (1987): Interfase gas-líquido, en *Química Física para estudiantes de Farmacia y Biología*. Edición española 1987 (Editorial Alhambra, Madrid), pp. 412-415.
- (5) OLIVAS ARROYO, C. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2001): Influence of viscosity and ionic strength on the reaction kinetics of aldosterone and androstendione and their specific antibodies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26: 547-562.
- (6) GARCÍA GÓMEZ, J.; PORCAR PONS, M. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Some kinetic aspects in the immunoradiometric assay of insulin-like growth factor binding protein-3. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 307-315.
- (7) GARCÍA GÓMEZ, J. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Kinetics and equilibrium in the immunoradiometric assay (IRMA) of Thyroglobuline. *J. Immunoassay & Immunochemistry*. 23(3): 347-367.
- (8) OLIVAS ARROYO, C.; DUART DUART, M. J. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2002): Kinetics and equilibrium in insulin radioimmunoassay. *J. Immunoassay & Immunochemistry*. 23(4): 407-428.
- (9) GARCÍA GÓMEZ, J.; PORCAR PONS, M. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2004): Kinetics aspects in the immunoradiometric assay (IRMA) of human Interleukin-1b (Il-1b). *Chemistry: An Indian Journal*. 1(6): 451-457.

- (10) DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T. and MORENO FRIGOLS, J. L. (2007): The influence of reactant concentration and reaction medium ionic strength, viscosity, and temperature in the immunocomplex substitution reaction in the radioimmunoassay of aldosterone. *Labmedicine*. 38(1) 29-34 y 61-63.
- (11) DÍEZ MONTORO, R.; SALABERT SALVADOR, M. T. y MORENO FRIGOLS, J. L. (2007): Modelo general y cuatro ecuaciones para el ajuste de curvas de calibración en RIA. Comparación de resultados. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 73: 65-86.
- (12) MOTULSKY, H. J. and CRISTOPoulos, A. (2003): Fitting models to biological data using lineal and nonlineal regression. In *A practical guide to curve fitting*. GraphPad Software Inc: San Diego CA, www.graphpad.com
- (13) VAN HOLDE, K. (1979): Unión altamente cooperativa. En: *Bioquímica Física*, edición española (Ed. Alambra, Madrid), pp. 78-80.

— *Artículo original* —

**Common mechanism of recognition
and binding of the complementary molecules,
carbohydrate-lectin, in the verticillium disease
of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*
cultivated mushrooms**

Recibido el 15 de abril de 2008

AMELIA PÉREZ CABO and CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA*
Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid

ABSTRACT

The carbohydrate-lectin interaction between the isolated glucogalactomannan of *Verticillium fungicola* cell walls, and lectins, either from *Agaricus bisporus* or *Pleurotus ostreatus* fruit bodies, was compared in order to establish the molecular mechanism of the «dry bubble» or verticillium disease exhibited in the commercial cultures of both edible mushrooms. This interaction between complementary molecules, «target molecules», appears to be due to the terminal galactose linked at (1-4) to the (1-6) mannose bone of the *V. fungicola* glucogalactomannan molecule.

Key words: «Dry bubble».—Verticillium disease.—*Verticillium fungicola* glucogalactomannan.—*Agaricus bisporus* lectin.—*Pleurotus ostreatus* lectin.

* Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC.
Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid (Spain).
Telf.: +34918373112. Fax: +34-915360432
E-mail: cgm@cib.csic.es

RESUMEN

Mecanismo común de reconocimiento y unión de las moléculas complementarias, carbohidrato-lectina, en la verticiliosis de las setas cultivadas *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*

Se compara la interacción carbohidrato-lectina entre el glucogalactomanano aislado de las paredes celulares de *Verticillium fungicola* y las lectinas de los carpóforos de *Agaricus bisporus* o de *Pleurotus ostreatus*, para establecer el mecanismo molecular de la «mole seca» o verticiliosis de los cultivos comerciales de ambas setas comestibles. La interacción entre las moléculas complementarias, «moléculas diana», parece ser debida a la galactosa terminal unida en (1-4) al esqueleto de manosa unido en (1-6) de la molécula del glucogalactomanano de *V. fungicola*.

Palabras clave: «Mole seca».—Verticiliosis.—Glucogalactomanano de *Verticillium fungicola*.—Lectina de *Agaricus bisporus*.—Lectina de *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUCTION

Verticillium fungicola (Preuss) Hassebrauk var. *fungicola* is a mycoparasite that causes dry bubbles, stipe blow-out and necrotic lesions («dry bubble» or verticillium disease) in the commercial cultures of white button mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (1, 2), the losses in the yield having been estimated at several hundred million dollars. Control of the disease has been partially achieved by the use of fungicides as well as cultural and sanitary practices, but resistance to the most effective chemical (prochloraz) is increasing (3). Therefore, to develop alternative strategies for its control, it has been necessary to elucidate the nature of the interaction between the mycoparasite and its host. Recently studies carried out in this laboratory have demonstrated by different approaches: i) agglutination of *V. fungicola* germinated spores by an *A. bisporus* extract from fruit body cell walls; ii) immunofluorescence microscopy of *A. bisporus* hyphae from fruit bodies and vegetative mycelia pretreated with purified *V. fungicola* cell wall glucogalactomannan (4), and iii) by hemagglutination experiments carried out with an *A. bisporus* fruit body glycoprotein lectin in the presence and absence of the same *V. fungicola* glucogalactomannan, that a specific recognition step is involved in this mycosis (5) before the development of the external symptoms of the disease. This mechanism of specific

recognition between complementary molecules, lectin-carbohydrate, which are present on both the host and the mycoparasite, is similar to those described in many other parasitic and symbiotic fungi (6-9).

On the other hand, *P. ostreatus* (Jacq.: Fries) Kumm fruit bodies (oyster mushrooms) have also been described presenting the «dry bubble» disease in their commercial cultures (10). For this reason, parallel studies were carried out on in order to purify and characterize another similar lectin in this fungus (11, 12). So the aim of the present work is to confirm that the same mechanism of recognition and binding of carbohydrate-lectin is the previous step to the mycosis symptoms development in both mushrooms, and to establish a common molecular basis between the complementary molecules, glucogalactomannan-lectin, in this verticillium disease.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and culture conditions

Fruit bodies of *Agaricus bisporus* (commercial strain Fungisem H 25) and *Pleurotus ostreatus* (commercial strain Amycel 3000) were grown in the CIES (Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, Quintanar del Rey, Cuenca, Spain). *Verticillium fungicola* var. *fungicola* (CBS 992.69) was grown on Raper medium (13).

Preparation of *V. fungicola* cell wall glucogalactomannan

The preparation of *V. fungicola* cell walls and the fractionation and purification procedure for obtaining the glucogalactomannan were performed as reported in earlier studies (14).

Purification, characterization and carbohydrate specificity of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins

The purification of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins from their corresponding mushrooms were carried out by ammonium sulfate

precipitation and ion-exchange chromatography and their respective characterizations performed as previously described (5, 12). Hemagglutination inhibition procedure was used for comparative carbohydrate specificity determination of both lectins (5).

RESULTS AND DISCUSSION

A. bisporus and *P. ostreatus* lectins purified and characterized as previously reported (5, 12) have shown that both molecules are structurally distinct glycoproteins, the former constituting a tetramer and the latter being dimeric in nature, accounting their respective monomer molecular masses for 16014 m/z and 44270 m/z. Comparison of the sugar binding specificities of the two lectins studied by hemagglutination inhibition assays is exhibited in Table I. Most of the neutral sugars tested had no effect, except for the galactose at different concentration in each case. N-acetylgalactosamine also showed a distinct degree of the hemagglutination inhibition, being more significant with the *P. ostreatus* lectin. However purified *V. fungicola* glucogalactomannan behaved rather similarly against both lectins, and was even a little more effective when the same glucogalactomannan was isolated from cell walls of phrochloraz-Mn pretreated *V. fungicola* mycelium. This effect can be explained by the increase of the terminal galactose residues of the molecule caused by the fungicide (14).

The carbohydrate-protein interaction appears to be due to the terminal galactose linked at (1-4) to the (1-6) mannose bone of the *V. fungicola* glucogalactomannan molecule (5) in which, the importance of the similar position of the axial C-3 and C-4 hydroxyl groups of the monosaccharide linked to the galactose molecule was previously demonstrated by conformational analysis (15). The fact that this glucogalactomannan behaves as a specific complementary molecule for both lectins could explain the same mechanism of recognition and binding of such specific molecules —«target molecules»— in this disease, as well as the absence of verticillium disease on the *A. bisporus* vegetative mycelial phase due to the lack of lectin (5).

TABLE I. Comparative inhibition of hemagglutinating activity of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins by specific carbohydrates

	Carbohydrates	Carbohydrate concentration (mmol/L)							PBS
		1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	
<i>A. bisporus</i> lectin	Galactose	+	+	+	+	+	+	±	+
	N-acetyl galactosamine	+	+	+	+	-	-	-	+
	Glucogalactomannan [*]	+	+	-	-	-	-	-	+
	Glucogalactomannan+F ^{**}	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. ostreatus</i> lectin	Galactose	+	+	+	+	-	-	-	+
	N-acetyl galactosamine	+	-	-	-	-	-	-	+
	Glucogalactomannan [*]	+	+	-	-	-	-	-	+
	Glucogalactomannan+F ^{**}	+	+	-	-	-	-	-	+

^{*}glucogalactomannan of *V. fungicola*; ^{**}glucogalactomannan of *V. fungicola* treated with the fungicide prochloraz-Mn;
+, hemagglutination positive; -, hemagglutination negative; ±, 200 mmol.L⁻¹.

All these results suggest possible alternative strategies to overcome the verticillium disease without the routinary use of fungicides as could be, the production of *A. bisporus* and *P. ostreatus* genetically lectin transformants, or the use of analogous molecules to the *V. fungicola* glucogalactomannan ligand which can be recognized by the carbohydrate-binding site(s) of each lectin.

This report may be the first establishing a close relationship between the verticillium disease in *A. bisporus* and *P. ostreatus* fruit bodies, demonstrating that the glucogalactomannan of *V. fungicola* cell walls and a lectin from each mushroom behave as the «target molecules» initiators of the subsequent molecular signaling which, successively, will produce the respective «dry bubble» disease with the necrosis of the fruit bodies. The present studies suggest that the same glucogalactomannan-lectin interaction may occur in the *V. fungicola* mycoparasitism described in the «hot mushroom» *Agaricus bitorquis* also commercially grown (16) and, although up to now it has not been described the presence of any lectin in these fruit bodies, it presumably may exist.

Moreover, this article also suggests that other important verticillium wilt diseases described in several crop plants (olive, cotton etc.) could exhibit a rather similar mechanism of recognition and binding between determined cell wall polysaccharides from *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, etc. (17) and their specific complementary plant lectins, as the necessary step for the development of their corresponding mycosis processes. Further studies are required to prove whether this is a common phenomenon in the strategy of *Verticillium* infections or if it occurred only in the cases previously reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, AGL 2001-1885 and REN 2002-00660) and the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (188/CH-51) for financial support, and the Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES) for supplying the *A. bisporus* and *P. ostreatus* fruit bodies.

BIBLIOGRAPHY

- (1) SINDEN, J. W. (1971): Ecological control of pathogens and weed moulds in mushroom culture. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9: 411-432.
- (2) FLETCHER, J. T. (1981): The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Mushroom Sci.* 11: 597-604.
- (3) GEA, F. J.; NAVARRO, M. J. and TELLO, J. C. (2005): Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese *in vitro*. *Mycol. Res.* 109: 741-745.
- (4) CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M.; BERNARDO, D.; AHRAZEM, O. and GARCÍA MENDOZA, C. (2000): Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* 46: 101-109.
- (5) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. and GARCÍA MENDOZA, C. (2004): Verticillium disease or «dry bubble» of cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan. *Can. J. Microbiol.* 50: 729-735.
- (6) NORDBRING-HERTZ, B. and MATTIASSEN, B. (1979): Action of a nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microorganism interaction. *Nature*. 281: 477-479.
- (7) BARAK, R.; ELAD, Y.; MIRELMAN, D. and CHET, I. (1985): Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 75: 458-462.
- (8) INBAR, J. and CHET, I. (1994): A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. *Microbiology*. 140: 651-657.
- (9) INBAR, J. and CHET, I. (1996): The role of lectins in recognition and adhesion of mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408: 229-321.
- (10) MARLOWE, A. and ROMAINE, C. P. (1982): Dry bubble of oyster mushroom caused by *Verticillium fungicola*. *Plant Dis.* 66: 859-860.
- (11) KAWAGISHI, H.; SUZUKI, H.; WATANABE, H.; NAKAMURA, H.; SEKIGUCHI, T.; MURATA, T.; USUI, T.; SUGIYAMA, K.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; ITO, K.; HASIMOTO, Y.; OHNISHI-KAMEYAMA, M. and NAGATA, T. (2000): A lectin from a edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Biochim. Biophys. Acta*. 1474: 299-308.
- (12) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A. and GARCÍA MENDOZA, C. (2006): *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan-binding of the lectin from the *Pleurotus ostreatus* fruit bodies. In: *Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes VI* (Pisabarro, A. G. and Ramirez, L., Eds.), pp. 207-212. Universidad Pública de Navarra, Spain.
- (13) RAPER, C. A.; RAPER, J. R. and MILLER, R. E. (1972): Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*. 64: 1088-1117.
- (14) BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M.; PÉREZ CABO, A.; GEA ALEGRÍA, F. J. and GARCÍA MENDOZA, C. (2002): Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell wall structure of *Verticillium fungicola*. *Int. Microbiol.* 5: 121-125.

- (15) IRAZOQUI, F. J.; VIDES, M. A. and NORES, G. A. (1999): Structural requirements of carbohydrates to bind *Agaricus bisporus* lectin. *Glycobiol.* 9: 59-64.
- (16) GEA, F. J.; TELLO, J. C. and NAVARRO, M. J. (2003): Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *fungicola* on *Agaricus bitorquis* mushroom crops in Spain. *J. Phytopathol.* 151: 98-100.
- (17) AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; JIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. and BERNABÉ, M. (2006): Structural elucidation of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of *Plectosphaerella cucumerina* and *Verticillium* spp. *Carbohydr. Res.* 341: 246-252.

— *Artículo original* —

**Common mechanism of recognition
and binding of the complementary molecules,
carbohydrate-lectin, in the verticillium disease
of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*
cultivated mushrooms**

Recibido el 15 de abril de 2008

AMELIA PÉREZ CABO and CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA*
Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid

ABSTRACT

The carbohydrate-lectin interaction between the isolated glucogalactomannan of *Verticillium fungicola* cell walls, and lectins, either from *Agaricus bisporus* or *Pleurotus ostreatus* fruit bodies, was compared in order to establish the molecular mechanism of the «dry bubble» or verticillium disease exhibited in the commercial cultures of both edible mushrooms. This interaction between complementary molecules, «target molecules», appears to be due to the terminal galactose linked at (1-4) to the (1-6) mannose bone of the *V. fungicola* glucogalactomannan molecule.

Key words: «Dry bubble».—Verticillium disease.—*Verticillium fungicola* glucogalactomannan.—*Agaricus bisporus* lectin.—*Pleurotus ostreatus* lectin.

* Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC.
Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid (Spain).
Telf.: +34918373112. Fax: +34-915360432
E-mail: cgm@cib.csic.es

RESUMEN

Mecanismo común de reconocimiento y unión de las moléculas complementarias, carbohidrato-lectina, en la verticiliosis de las setas cultivadas *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*

Se compara la interacción carbohidrato-lectina entre el glucogalactomanano aislado de las paredes celulares de *Verticillium fungicola* y las lectinas de los carpóforos de *Agaricus bisporus* o de *Pleurotus ostreatus*, para establecer el mecanismo molecular de la «mole seca» o verticiliosis de los cultivos comerciales de ambas setas comestibles. La interacción entre las moléculas complementarias, «moléculas diana», parece ser debida a la galactosa terminal unida en (1-4) al esqueleto de manosa unido en (1-6) de la molécula del glucogalactomanano de *V. fungicola*.

Palabras clave: «Mole seca».—Verticiliosis.—Glucogalactomanano de *Verticillium fungicola*.—Lectina de *Agaricus bisporus*.—Lectina de *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUCTION

Verticillium fungicola (Preuss) Hassebrauk var. *fungicola* is a mycoparasite that causes dry bubbles, stipe blow-out and necrotic lesions («dry bubble» or verticillium disease) in the commercial cultures of white button mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach (1, 2), the losses in the yield having been estimated at several hundred million dollars. Control of the disease has been partially achieved by the use of fungicides as well as cultural and sanitary practices, but resistance to the most effective chemical (prochloraz) is increasing (3). Therefore, to develop alternative strategies for its control, it has been necessary to elucidate the nature of the interaction between the mycoparasite and its host. Recently studies carried out in this laboratory have demonstrated by different approaches: i) agglutination of *V. fungicola* germinated spores by an *A. bisporus* extract from fruit body cell walls; ii) immunofluorescence microscopy of *A. bisporus* hyphae from fruit bodies and vegetative mycelia pretreated with purified *V. fungicola* cell wall glucogalactomannan (4), and iii) by hemagglutination experiments carried out with an *A. bisporus* fruit body glycoprotein lectin in the presence and absence of the same *V. fungicola* glucogalactomannan, that a specific recognition step is involved in this mycosis (5) before the development of the external symptoms of the disease. This mechanism of specific

recognition between complementary molecules, lectin-carbohydrate, which are present on both the host and the mycoparasite, is similar to those described in many other parasitic and symbiotic fungi (6-9).

On the other hand, *P. ostreatus* (Jacq.: Fries) Kumm fruit bodies (oyster mushrooms) have also been described presenting the «dry bubble» disease in their commercial cultures (10). For this reason, parallel studies were carried out on in order to purify and characterize another similar lectin in this fungus (11, 12). So the aim of the present work is to confirm that the same mechanism of recognition and binding of carbohydrate-lectin is the previous step to the mycosis symptoms development in both mushrooms, and to establish a common molecular basis between the complementary molecules, glucogalactomannan-lectin, in this verticillium disease.

MATERIALS AND METHODS

Organisms and culture conditions

Fruit bodies of *Agaricus bisporus* (commercial strain Fungisem H 25) and *Pleurotus ostreatus* (commercial strain Amycel 3000) were grown in the CIES (Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, Quintanar del Rey, Cuenca, Spain). *Verticillium fungicola* var. *fungicola* (CBS 992.69) was grown on Raper medium (13).

Preparation of *V. fungicola* cell wall glucogalactomannan

The preparation of *V. fungicola* cell walls and the fractionation and purification procedure for obtaining the glucogalactomannan were performed as reported in earlier studies (14).

Purification, characterization and carbohydrate specificity of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins

The purification of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins from their corresponding mushrooms were carried out by ammonium sulfate

precipitation and ion-exchange chromatography and their respective characterizations performed as previously described (5, 12). Hemagglutination inhibition procedure was used for comparative carbohydrate specificity determination of both lectins (5).

RESULTS AND DISCUSSION

A. bisporus and *P. ostreatus* lectins purified and characterized as previously reported (5, 12) have shown that both molecules are structurally distinct glycoproteins, the former constituting a tetramer and the latter being dimeric in nature, accounting their respective monomer molecular masses for 16014 m/z and 44270 m/z. Comparison of the sugar binding specificities of the two lectins studied by hemagglutination inhibition assays is exhibited in Table I. Most of the neutral sugars tested had no effect, except for the galactose at different concentration in each case. N-acetylgalactosamine also showed a distinct degree of the hemagglutination inhibition, being more significant with the *P. ostreatus* lectin. However purified *V. fungicola* glucogalactomannan behaved rather similarly against both lectins, and was even a little more effective when the same glucogalactomannan was isolated from cell walls of phrochloraz-Mn pretreated *V. fungicola* mycelium. This effect can be explained by the increase of the terminal galactose residues of the molecule caused by the fungicide (14).

The carbohydrate-protein interaction appears to be due to the terminal galactose linked at (1-4) to the (1-6) mannose bone of the *V. fungicola* glucogalactomannan molecule (5) in which, the importance of the similar position of the axial C-3 and C-4 hydroxyl groups of the monosaccharide linked to the galactose molecule was previously demonstrated by conformational analysis (15). The fact that this glucogalactomannan behaves as a specific complementary molecule for both lectins could explain the same mechanism of recognition and binding of such specific molecules —«target molecules»— in this disease, as well as the absence of verticillium disease on the *A. bisporus* vegetative mycelial phase due to the lack of lectin (5).

TABLE I. Comparative inhibition of hemagglutinating activity of *A. bisporus* and *P. ostreatus* lectins by specific carbohydrates

	Carbohydrates	Carbohydrate concentration (mmol/L)							PBS
		1,56	3,12	6,25	12,5	25	50	100	
<i>A. bisporus</i> lectin	Galactose	+	+	+	+	+	+	+	±
	N-acetyl galactosamine	+	+	+	+	+	–	–	+
	Glucogalactomannan [*]	+	+	–	–	–	–	–	+
	Glucogalactomannan+F ^{**}	+	–	–	–	–	–	–	+
<i>P. ostreatus</i> lectin	Galactose	+	+	+	–	–	–	–	+
	N-acetyl galactosamine	+	–	–	–	–	–	–	+
	Glucogalactomannan [*]	+	+	–	–	–	–	–	+
	Glucogalactomannan+F ^{**}	+	+	–	–	–	–	–	+

^{*}glucogalactomannan of *V. fungicola*; ^{**}glucogalactomannan of *V. fungicola* treated with the fungicide prochloraz-Mn;
+, hemagglutination positive; –, hemagglutination negative; ±, 200 mmol.L⁻¹.

All these results suggest possible alternative strategies to overcome the verticillium disease without the routinary use of fungicides as could be, the production of *A. bisporus* and *P. ostreatus* genetically lectin transformants, or the use of analogous molecules to the *V. fungicola* glucogalactomannan ligand which can be recognized by the carbohydrate-binding site(s) of each lectin.

This report may be the first establishing a close relationship between the verticillium disease in *A. bisporus* and *P. ostreatus* fruit bodies, demonstrating that the glucogalactomannan of *V. fungicola* cell walls and a lectin from each mushroom behave as the «target molecules» initiators of the subsequent molecular signaling which, successively, will produce the respective «dry bubble» disease with the necrosis of the fruit bodies. The present studies suggest that the same glucogalactomannan-lectin interaction may occur in the *V. fungicola* mycoparasitism described in the «hot mushroom» *Agaricus bitorquis* also commercially grown (16) and, although up to now it has not been described the presence of any lectin in these fruit bodies, it presumably may exist.

Moreover, this article also suggests that other important verticillium wilt diseases described in several crop plants (olive, cotton etc.) could exhibit a rather similar mechanism of recognition and binding between determined cell wall polysaccharides from *V. albo-atrum*, *V. dahliae*, etc. (17) and their specific complementary plant lectins, as the necessary step for the development of their corresponding mycosis processes. Further studies are required to prove whether this is a common phenomenon in the strategy of *Verticillium* infections or if it occurred only in the cases previously reported.

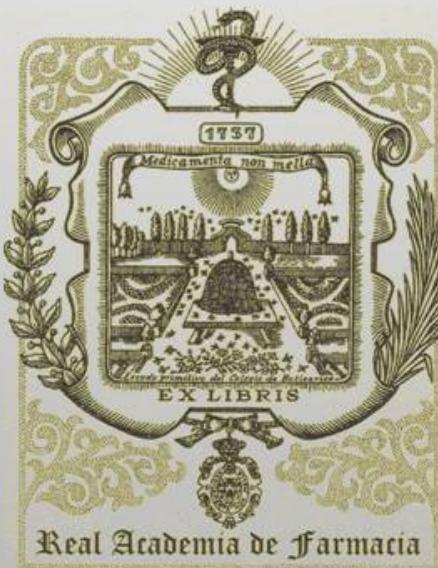
ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT, AGL 2001-1885 and REN 2002-00660) and the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (188/CH-51) for financial support, and the Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón (CIES) for supplying the *A. bisporus* and *P. ostreatus* fruit bodies.

BIBLIOGRAPHY

- (1) SINDEN, J. W. (1971): Ecological control of pathogens and weed moulds in mushroom culture. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9: 411-432.
- (2) FLETCHER, J. T. (1981): The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Mushroom Sci.* 11: 597-604.
- (3) GEA, F. J.; NAVARRO, M. J. and TELLO, J. C. (2005): Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese *in vitro*. *Mycol. Res.* 109: 741-745.
- (4) CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M.; BERNARDO, D.; AHRAZEM, O. and GARCÍA MENDOZA, C. (2000): Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* 46: 101-109.
- (5) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. and GARCÍA MENDOZA, C. (2004): Verticillium disease or «dry bubble» of cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan. *Can. J. Microbiol.* 50: 729-735.
- (6) NORDBRING-HERTZ, B. and MATTIASSEN, B. (1979): Action of a nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microorganism interaction. *Nature*. 281: 477-479.
- (7) BARAK, R.; ELAD, Y.; MIRELMAN, D. and CHET, I. (1985): Lectins: a possible basis for specific recognition in the interaction of *Trichoderma* and *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 75: 458-462.
- (8) INBAR, J. and CHET, I. (1994): A newly isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. *Microbiology*. 140: 651-657.
- (9) INBAR, J. and CHET, I. (1996): The role of lectins in recognition and adhesion of mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408: 229-321.
- (10) MARLOWE, A. and ROMAINE, C. P. (1982): Dry bubble of oyster mushroom caused by *Verticillium fungicola*. *Plant Dis.* 66: 859-860.
- (11) KAWAGISHI, H.; SUZUKI, H.; WATANABE, H.; NAKAMURA, H.; SEKIGUCHI, T.; MURATA, T.; USUI, T.; SUGIYAMA, K.; SUGANUMA, H.; INAKUMA, T.; ITO, K.; HASIMOTO, Y.; OHNISHI-KAMEYAMA, M. and NAGATA, T. (2000): A lectin from a edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Biochim. Biophys. Acta*. 1474: 299-308.
- (12) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A. and GARCÍA MENDOZA, C. (2006): *Verticillium fungicola* cell wall glucogalactomannan-binding of the lectin from the *Pleurotus ostreatus* fruit bodies. In: *Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes VI* (Pisabarro, A. G. and Ramirez, L., Eds.), pp. 207-212. Universidad Pública de Navarra, Spain.
- (13) RAPER, C. A.; RAPER, J. R. and MILLER, R. E. (1972): Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*. 64: 1088-1117.
- (14) BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M.; PÉREZ CABO, A.; GEA ALEGRÍA, F. J. and GARCÍA MENDOZA, C. (2002): Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell wall structure of *Verticillium fungicola*. *Int. Microbiol.* 5: 121-125.

- (15) IRAZOQUI, F. J.; VIDES, M. A. and NORES, G. A. (1999): Structural requirements of carbohydrates to bind *Agaricus bisporus* lectin. *Glycobiol.* 9: 59-64.
- (16) GEA, F. J.; TELLO, J. C. and NAVARRO, M. J. (2003): Occurrence of *Verticillium fungicola* var. *fungicola* on *Agaricus bitorquis* mushroom crops in Spain. *J. Phytopathol.* 151: 98-100.
- (17) AHRAZEM, O.; PRIETO, A.; JIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; LEAL, J. A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. and BERNABÉ, M. (2006): Structural elucidation of fungal polysaccharides isolated from the cell wall of *Plectosphaerella cucumerina* and *Verticillium* spp. *Carbohydr. Res.* 341: 246-252.



Real Academia de Farmacia



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
POLÍTICA SOCIAL Y DEPORTE

www.ranf.com

ISSN 1697-4271