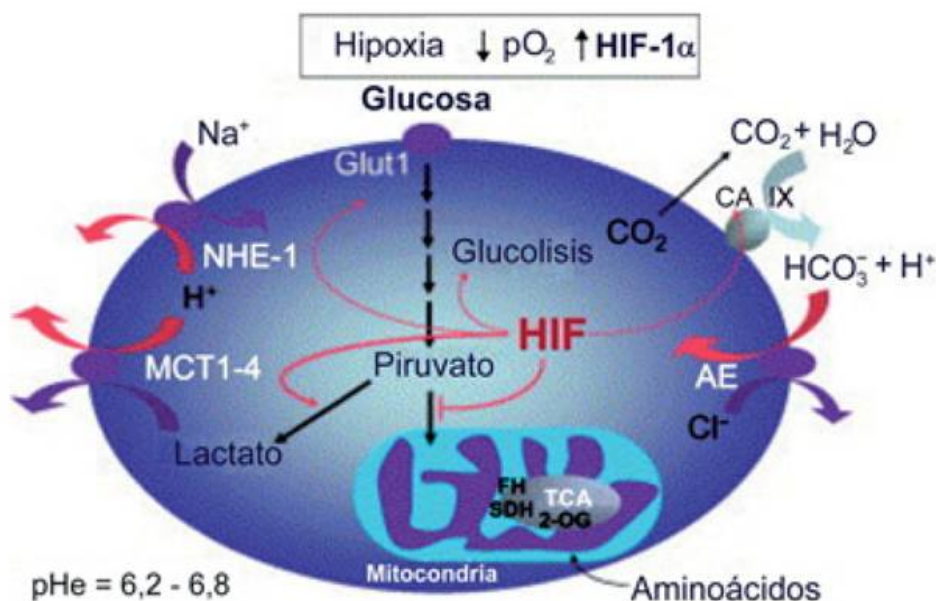




RANF

An. R. Acad. Nac. Farm.
Vol. 76. n. 3 2010
ISSN 1697-4271
Publicación electrónica
trimestral



Hipoxia y cáncer

Consuelo Boticario Boticario¹ y María Cascales Angosto^{2*}

¹ Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

² Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Recibido el 16 de septiembre de 2010.

RESUMEN

La hipoxia o deficiencia en el aporte de oxígeno a los tejidos, caracteriza una serie de situaciones fisiopatológicas, incluido el cáncer. El medio hipóxico activa una cascada señalizadora que induce o reprime la transcripción de muchos genes implicados en la angiogénesis, la metástasis, el metabolismo de la glucosa y la supervivencia/muerte celular. El responsable de esta respuesta es un factor de transcripción heterodimérico, el factor inducible por hipoxia (HIF-1), que consiste en una subunidad alfa, sensible al oxígeno (HIF- α) y una subunidad constitutiva beta (HIF- β), que facilita la adaptación a la privación de oxígeno. El HIF es un regulador positivo del crecimiento tumoral y su inhibición produce la supresión tumoral. En muestras tumorales de pacientes, el HIF se encuentra elevado, elevación que se relaciona con mal pronóstico. La identificación de nuevas moléculas dirigidas a la terapia del cáncer, está dando énfasis a las moléculas pequeñas para inhibir eficientemente las vías señalizadoras alteradas en el cáncer.

Palabras clave: Hipoxia; Factor inducible por hipoxia; HIF-1; Terapia del cáncer.

ABSTRACT

Hypoxia and cancer

Hypoxia or deficient oxygen supply to tissues characterize a serie of pathological situations, included cancer. Hypoxic environment activates a signaling cascade that induces or represses the transcription of a multitute of genes involved in angiogenesis, metastasis, glucose metabolism and cell surviving. The responsible of the hypoxia-induced transcriptional response is the hypoxia-inducible factor (HIF-1), an heterodimeric transcription factor, consisting of an oxygen-sensitive alpha subunit (HIF- α), and a constitutive beta subunit (HIF- β), that facilitate both oxygen deprivation. HIF pathway is a positive regulator of tumor growth as its inhibition often results in tumor suppression. In clinical tumor samples, HIF is found elevated and correlates with poor patient prognosis in a variety of cancers. The identification of novel molecules targets for cancer therapy, has led to a shift in drug development, with more emphasis on small molecules that can efficiently inhibit the signaling pathways deregulated in cancer.

Key words: Hypoxia; Hypoxia inducible factor; HIF-1; Cancer therapy.

1. INTRODUCCIÓN

El suministro adecuado de oxígeno a los tejidos es esencial para el mantenimiento de la función y fisiología de las células de mamíferos. La deficiencia en este suministro caracteriza aquellas situaciones fisiopatológicas en las cuales existe insuficiente flujo sanguíneo para proporcionar la oxigenación necesaria (Figura 1). El medio hipóxico activa una cascada señalizadora que promueve la inducción o represión de la transcripción de una multitud de genes implicados en eventos tales como la angiogénesis (neo-vascularización), metabolismo de la glucosa y supervivencia/muerte celular, etc. La clave de esta respuesta a la hipoxia se encuentra en un factor de transcripcion, el factor inducible por hipoxia (HIF). Este factor se sobreexpresa en gran cantidad de cánceres mediante mecanismos dependientes e independientes de la hipoxia y su expresión se asocia con un mal pronóstico en los pacientes.

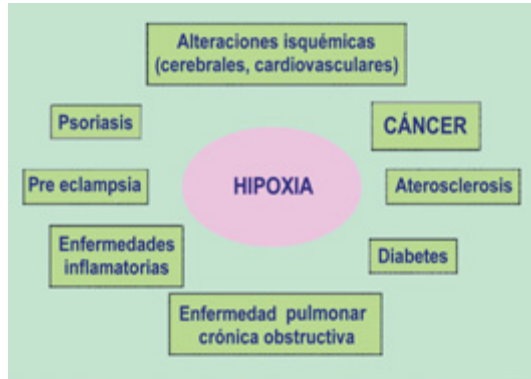


Figura 1. Fisiopatología de la hipoxia. La hipoxia o presión parcial de oxígeno baja (pO_2), originada por vascularización defectuosa es una característica de una serie de enfermedades (1).

El HIF es un factor de transcripción α/β -heterodimérico que regula la adaptación celular a la falta de oxígeno. Los niveles bajos de oxígeno son una característica de los tumores sólidos y las respuestas a la hipoxia contribuyen sustancialmente al fenotipo maligno. La transcripción de genes inducida por hipoxia promueve la angiogénesis, invasión, metástasis, desdiferenciación y aumento en el metabolismo glucolítico. Estos efectos están mediados, al menos en parte, por genes cuya expresión se activa por el factor inducible por hipoxia (HIF). El HIF funciona como un heterodímero que comprende una subunidad α lábil, que depende del oxígeno, y una subunidad β estable no dependiente del oxígeno, también denominada ARNT (transportador nuclear del receptor de hidrocarburos).

El HIF funciona cuando el nivel de oxígeno en los tejidos es bajo y no funciona cuando dicho nivel se eleva. Ciertas condiciones fisiopatológicas, tales como la isquemia y el cáncer muestran baja oxigenación local tisular debida a vasculatura defectuosa o insuficiente. Las células tumorales muy proliferativas forman rápidamente masas, que al estar localizadas lejos de los vasos sanguíneos, no alcanzan el aporte necesario de oxígeno y nutrientes. En tales condiciones el HIF se activa y, a su vez, activa o reprime la expresión de una amplia variedad de genes que inician la formación de nuevos vasos sanguíneos y modifican el metabolismo, estableciendo así las condiciones favora-

bles para el desarrollo de la masa tumoral y su proliferación. La modulación de los genes estimulados por el HIF, implicados en el metabolismo tumoral y en el control del pH intracelular, puede ser también de gran utilidad en la terapia del cáncer. Sin embargo, antes de intentar profundizar en la aplicación clínica es esencial poseer mayor conocimiento básico de las vías señalizadoras, de los mecanismos moleculares que regulan el HIF y de las consecuencias biológicas de su acción en el metabolismo tumoral, crecimiento e invasión (1, 2).

2. ESTRUCTURA DEL HIF-1

Los estudios sobre el elemento de respuesta a la hipoxia del gen de la eritropoyetina condujeron a Semenza y Wang, en 1992 (3), al descubrimiento del HIF-1 y en 1995 (4) a su aislamiento y purificación. La HIF-1 humana es una proteína compuesta por dos subunidades hHIF-1 α y hHIF-1 β (ARNT). La estructura de cada subunidad se muestra en la Figura 2.

La estructura muestra dos proteínas HIF bHLH-PAS implicadas en la respuesta a la hipoxia que poseen motivos bHLH y PAS, necesarios para la dimerización, cuya región básica es la que proporciona la unión específica al HRE (elemento de respuesta a la hipoxia), en la secuencia de reconocimiento 5 T/A/G-CGTGH-3 (Figura 2) (4). La presencia de un sitio de unión al DNA para HIF-1 es necesaria, pero no suficiente, para dirigir la expresión de genes en respuesta a la hipoxia, lo que sugiere que el HIF-1 ha de interactuar con otros factores de transcrip-

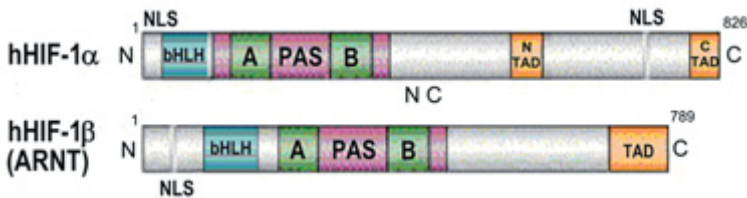


Figura 2. Estructura de las dos subunidades que forman el factor inducible por hipoxia humano (HIF-1). Los motivos bHLH y PAS son esenciales para la dimerización y unión al DNA. bHLH, dominio básico hélice-vuelta-hélice; PAS (PerANRT-Sim) dominio con repeticiones A y B. NLS, señales de localización nuclear; TAD, dominios de transactivación (modificado de (4)).

ción que se unan al DNA en sitios adyacentes. PAS es un dominio Per-Arnt-Sim con sus repeticiones A y B, que se encuentra en ambas subunidades. TAD, el dominio de transactivación, se encuentra en ambas subunidades en el extremo C-terminal, pero la subunidad hHIF-1 α , posee otro dominio N-TAD más cercano al terminal N. Esta bicefalia en el dominio TAD no es corriente entre los factores de transcripción. El C-TAD del HIF-1 α es el lugar de hidroxilación de la asparagina por el factor inhibidor del HIF (FIH), que inhibe la actividad transcripcional de esta subunidad. Ambas subunidades poseen también motivos NLS o señales de localización nuclear en el terminal N, y el hHIF-1 α , posee otro NLS cercano al C terminal.

3. HOMEOSTASIS DEL ÓXIGENO

El HIF es el principal factor implicado en las respuestas adaptativas a cambios en la oxigenación de los tejidos. Es un α/β heterodímero que consiste en una subunidad, HIF-1 β , expresada constitutivamente y otra subunidad, HIF-1 α , cuya expresión se encuentra enormemente regulada. La expresión de esta última la determina el ritmo de su síntesis y degradación. La síntesis del HIF-1 α está regulada por mecanismos independientes del oxígeno, mientras que su degradación se regula principalmente por mecanismos que dependen del oxígeno. Hasta la fecha se han identificado más de 100 genes cuya expresión se activa por el HIF.

Son de importancia relevante para el cáncer, cuatro grupos de genes cuya expresión se induce por el HIF-1 y codifican las siguientes proteínas: factores angiogénicos, transportadores de la glucosa y enzimas glucolíticos, factores de supervivencia y factores de invasividad.

La expresión de varios de los genes objetivo de HIF-1, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (*vegf*), se induce por hipoxia en la mayoría de tipos celulares. Sin embargo, para la mayoría de los genes objetivo de HIF-1, la expresión se induce por hipoxia de manera específica al tipo celular. Como la actividad del HIF-1 se induce por hipoxia en casi todos los tipos celulares, está claro que el HIF-1 por sí solo, no puede explicar la expresión génica específica, más bien, es la interacción funcional del HIF-1 con otros factores de transcripción lo que determina el subgrupo de genes objetivo de HIF-1 que se

activa en cualquier célula hipóxica particular. El HIF-1 puede ser considerado como un mensajero que se traslada al núcleo para activar la respuesta a la hipoxia a nivel transcripcional. Los detalles de esta respuesta están determinados por la programación del pasado (desarrollo) y el presente (fisiología) de cada célula. Quizás del 1 al 5% de todos los genes humanos se expresan en respuesta a hipoxia en uno o más tipos celulares de manera dependiente del HIF-1. La heterogeneidad en la expresión de dichos genes se observa incluso entre líneas celulares que han derivado de cánceres del mismo tipo histológico. Similares hallazgos se han descrito para la expresión génica dependiente de p53. Un factor adicional es la existencia de la proteína relacionada HIF-2 α , que puede también dimerizar con HIF-1 β . Los heterodímeros que contienen HIF-1 α y HIF-2 α tienen especificidades diferentes que se solapan, con respecto a inductores fisiológicos y a la activación de genes. Una tercera proteína relacionada es la HIF-3 α , que parece funcionar inhibiendo la HIF-1 α (1, 2).

4. REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL HIF-1 α

Los organismos aeróbicos están constantemente obligados a consumir oxígeno. Cuantas más células están presentes en un tejido más oxígeno se necesita. Cuando una célula se divide y da lugar a dos células hijas, el consumo de oxígeno se eleva, por tanto no sorprende que las vías principales que transducen señales proliferativas y de supervivencia a partir de receptores de factores de crecimiento, también han de inducir la expresión de HIF-1 α como estrategia para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno. Las células proliferantes expresan el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que estimula la angiogénesis con el objeto de proporcionar la perfusión adicional requerida para mantener la oxigenación de un número mayor de células. Además las células proliferantes para generar ATP utilizan la ruta glucolítica en lugar del metabolismo oxidativo. La inducción de la angiogénesis y la glucólisis, paralela con la proliferación celular, está mediada en parte por activación de la síntesis del HIF-1. La elevación del HIF-1 en respuesta al estímulo de receptores de factores de crecimiento, difiere de la elevación del HIF-1 α en respuesta a la hipoxia en dos aspectos importantes. Primero, mientras la hipoxia eleva HIF-1 α en todos los tipos celulares, el estímulo mediante factores de crecimiento

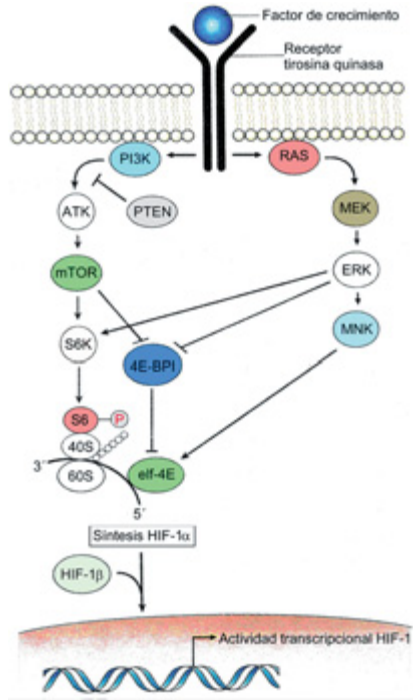


Figura 3. Regulación de la síntesis de la proteína HIF-1 α . La unión de un factor de crecimiento al receptor tirosina quinasa activa las vías fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). PI3K, a su vez, activa la serina/treonina quinasa (ATK) y mTOR. En la vía MAPK, la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), se activa por la quinasa MAP/ERK (MEK). ERK, a su vez, activa MNK. ERK y mTOR fosforilan la p70S6 quinasa (S6K), que fosforila a la proteína ribosómica S6, y a la proteína de unión al factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E (eIF-4E), (4E-BP1). La unión de 4E-BP1 a eIF-4E inactiva a la última, al inhibir la traducción dependiente de mRNA. La fosforilación de 4E-BP1 previene su unión a eIF-4E y estimula su actividad directamente. El efecto de la señalización por el factor de crecimiento se refleja en un incremento en el ritmo al cual un subgrupo de mRNA en la célula, incluyendo HIF-1 α mRNA, se traduce en proteínas (modificado de (5)).

induce la expresión de HIF-1 α de manera específica del tipo celular. Segundo, mientras la hipoxia se asocia con la menor degradación del HIF-1 α , los factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas señalizadoras estimulan la síntesis de HIF-1 α vía activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) o de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Figura 3) (5). Estudios con células de cáncer de

mama (MCF-7) estimuladas con heregulina mostraron un incremento en la síntesis de HIF-1 α , que fue inhibida por tratamiento con rapamicina, un antibiótico macrolido que inhibe el objetivo en mamíferos de la rapamicina quinasa (mTOR), que funciona más allá de la PI3K y la AKT (6). El efecto de la heregulina estuvo mediado vía la región 5 - no traducida del mRNA HIF-1 α . Los objetivos conocidos para la fosforilación por mTOR son reguladores de la síntesis proteica (Figura 3). No obstante, no se sabe si la fosforilación de estas proteínas por mTOR es necesaria o suficiente para el incremento de la síntesis de HIF-1 α . La traducción de varias docenas de diferentes mRNA está regulada por esta vía. Las secuencias específicas en la región 5 - no traducida, puede determinar el grado al cual la traducción de cualquier mRNA puede modularse por mTOR (2, 5).

La expresión de la proteína HIF-1 α es muy sensible a cambios en su ritmo de síntesis debido a su vida media extremadamente corta en condiciones no hipóxicas. Además de los efectos sobre la síntesis de HIF-1 α , se ha demostrado que la activación de la vía señalizadora RAF-MEK-ERK estimula la función del dominio de transactivación de HIF-1 α . Este efecto se debe, al menos en parte, a la fosforilación por ERK del coactivador p300, con el cual interaccionan los dominios de transactivación. A diferencia de la hipoxia, que induce la estabilidad y actividad transcripcional de HIF-1 α en todos los tipos celulares, la regulación de la actividad HIF-1 por señalización por factores de crecimiento es específica de la célula. Por ejemplo, en células MCF-7, la heregulina induce la síntesis proteica de HIF-1 α , pero no induce la función del dominio de transactivación, mientras que el tratamiento de células de cáncer de próstata (PC-3) con rapamicina inhibe la estabilidad y la función del dominio de transactivación del HIF-1 α . Las mutaciones oncogénicas que activan las vías de transducción de señales, inducen la actividad de HIF-1 α por varios mecanismos.

Las mutaciones de pérdida de función en genes supresores de tumores se asocian con mayor actividad del HIF-1. La pérdida de la función VHL origina una elevación notable en la actividad HIF-1 en condiciones no hipóxicas, debido a la alteración en la ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma del HIF-1 α y HIF-2 α . Aunque la regulación, dependiente del O₂, de la transactivación está todavía intacta, HIF-1 puede llegar a ser limitante en condiciones de sobreexpresión de HIF-1 α y HIF-2 α , que conducirían a un incremento en HIF-1

transcripcionalmente activo, en condiciones no hipóxicas, en células carentes de VHL. Para algunos otros oncogenes y genes supresores de tumores, la mutación no solo tiene un efecto marcado en la progresión al cáncer, sino también sobre la actividad del HIF-1. Algunos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento insulínico 2 (IGF2) y el factor transformante del crecimiento alfa ($TGF\alpha$), son también genes objetivo de HIF-1. La unión de estos factores a sus receptores -el receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1R) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), respectivamente- activan vías de transducción de señales que conducen a la expresión del HIF-1 α y a la proliferación y supervivencia celulares. Por tanto, el HIF-1 contribuye a las vías de señalización autocrinas que son cruciales para la progresión al cáncer. Los mecanismos que conducen a los elevados niveles de HIF-1 α han sido esclarecidos mediante experimentos en líneas celulares cancerosas y se han complementado con demostraciones inmunohistoquímicas de sobreexpresión del HIF-1 α en biopsias de cáncer humano (2).

5. CAMBIOS POST-TRADUCCIONALES EN EL HIF-1 α

La señalización vía factor inducible por hipoxia 1 α requiere múltiples modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones son las que regulan la vida media del HIF-1 α y van a mediar su desestabilización y degradación. Entre estos cambios post-traduccionales cabe citar: las prolina hidroxilasas, la unión a la proteína VHL, la hidroxilación de la asparragina, la acetilación de la lisina y la acción de las quinasas (7).

Dos prolina hidroxilasas (PH) dependientes de oxígeno, que hidroxilan la subunidad alfa del heterodímero HIF α/β , determinan su estabilidad y actividad. La hidroxilación de los residuos de prolina en el dominio de degradación, dependiente de oxígeno (ODDD) del HIF-1 (prolinas 402 y 564 del HIF-1 α humano), señala la unión del HIF-1 α a un complejo ubiquitina ligasa E3 que contiene la proteína von Hippel-Lindau (VHL) (Figura 4). VHL junto con un grupo de proteínas, elongina B elongina C, Cul 2 y Rbx-1, regula la vida media de HIF-1 α en células bien oxigenadas. La interacción del HIF-1 α con VHL se acelera por acetilación del residuo lisina en 532, mediante una acetil transferasa (ARD1). La eliminación del HIF-1 α ocurre median-

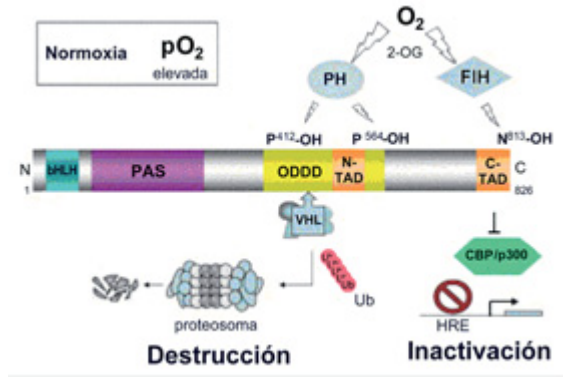


Figura 4. La hidroxilación es la clave de la regulación del HIF- α . En condiciones normóxicas (niveles elevados de pO₂) la prolin hidroxilasa (PH) y el factor inhibidor de HIF-1 (FIH) son activos. Estas dioxigenasas usan oxígeno y 2-oxoglutarato (2-OG), para hidroxilar dos residuos prolina situados en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) y un residuo asparragina en el dominio de activación transcripcional C-terminal (C-TAD). La hidroxilación de las prolinas señala la unión a la proteína Von Hippel-Lindau (VHL), que contiene el complejo ubiquitina ligasa E3 que ubiquitina al HIF-1 α marcándolo para su destrucción por el proteosoma. La hidroxilación del residuo asparragina promueve la interacción con un co-activador el CBP/p300 que modula la respuesta del HIF-1 α (modificado de (2)).

te la ubiquitinación post traduccional y posterior reconocimiento por la maquinaria destructora del proteosoma (Figura 4). Así que, en presencia de oxígeno y pocos minutos después de su síntesis, la subunidad HIF-1 α sufre hidroxilaciones, se ubiquitina y se degrada por el proteosoma (2, 8, 9).

Las mutaciones en el gen *vhl*, que conducen a la pérdida de su función, se asocian con el carcinoma de células renales (RCC) y con la enfermedad VHL, un síndrome familiar. El HIF-1 α es, por tanto, estable y activo en estas patologías e induce la transcripción de genes cuyos productos actúan promoviendo la vascularización en los tumores. Estas observaciones dan buena cuenta de la estrecha conexión existente entre HIF, angiogénesis y tumorigénesis (10, 11).

La PH, de la que existen tres isoformas, se regula a varios niveles. La concentración de oxígeno, no solo determina la actividad PH sino también su expresión, ya que los genes *phd2* y *phd3*, pero no *phd1*, se regulan por hipoxia/HIF (12). Esta regulación *feedback* asegura la rá-

vida intervención cuando la concentración de oxígeno se restablece a un nivel elevado. Al igual que ocurre con el HIF-1 α , la PH está sometida a la degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma, pero por diferentes ubiquitina E3 ligasas, Siah1 y Siah2, las cuales a su vez, se regulan también por el HIF (13). Además de oxígeno elevado, las PH requieren 2-oxoglutarato (2-OG) como cosustrato y ascorbato y Fe²⁺ como cofactores. El 2-OG es un metabolito del ciclo tricarboxílico (TCA), cuya concentración está regulada por el propio ciclo TCA. Para añadir otro nivel de complejidad, el succinato producido por la reacción hidroxilasa y por el ciclo TCA, actúa como inhibidor. Es interesante destacar que las mutaciones en enzimas del ciclo TCA, tales como la succinato deshidrogenasa (SDH) y la fumarato hidratasa o fumarasa (FH), se encuentran conectadas con la tumorigénesis (12). Tanto la SDH como la FH se han identificado como supresores de tumores y la pérdida de su función por mutaciones, conduce a la acumulación de succinato y fumarato, respectivamente. En estas condiciones el HIF-1 α es estable y el HIF-1 activa o reprime genes.

Si por cualquier razón el flujo de eventos que conduce a la destrucción del HIF-1 α no se completara o fuera defectuoso, y alguna proteína HIF-1 α escapara de la degradación, la actividad HIF-1 α sería, no obstante, inhibida por otra hidroxilasa dependiente de oxígeno, denominada factor inhibidor del HIF-1 (FIH). La hidroxilación por este enzima se verifica en un residuo asparragina (813), situado en el dominio de activación transcripcional, que se encuentra en el terminal C (C-TAD) de la subunidad HIF-1 α , con la inhibición resultante de la interacción con las proteínas de unión (CBP) a los coactivadores transcripcionales (CREB) y p300. Así que, las células han desarrollado un mecanismo adicional en el caso de malfuncionamiento de la PH, aunque esto puede reflejar también un mecanismo para la inducción selectiva de genes. En presencia de bajos niveles de oxígeno (hipoxia), o en condiciones de elevadas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (14), estos enzimas no funcionan y el HIF-1 α es estable y tiene la capacidad de translocarse al núcleo donde interacciona con la subunidad beta que, se expresa de manera constitutiva no influenciada por la concentración de oxígeno. El complejo α/β HIF se une entonces a los elementos responsables de la hipoxia (HRE) de los genes cuya transcripción va a ser regulada. Cada vez son más los genes identificados, y se ha demostrado que al menos 70

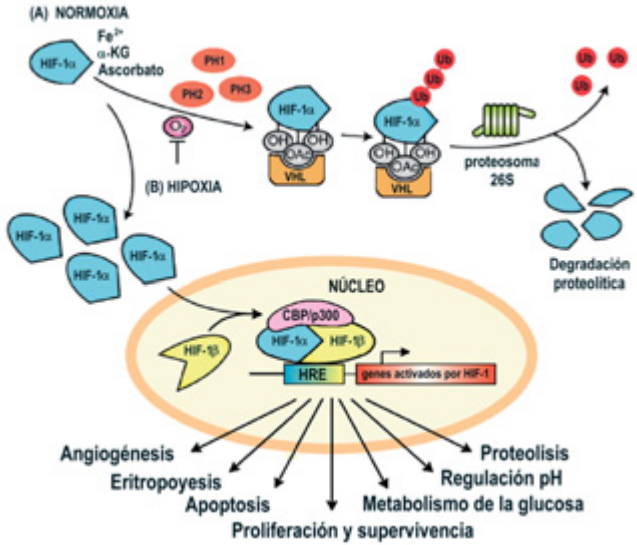


Figura 5. Regulación de la actividad de la HIF-1 α por hidroxilación de las prolinas catalizada por las PH. (A) En las condiciones de normoxia la PH hidroxila los residuos de prolina 402 y 504. Esta hidroxilación causa la unión del HIF-1 α al supresor tumoral VHL (Von-Hipel-Lindau) y promueve la ubiquitinación del HIF-1 α y su degradación por el proteosoma. (B) En condiciones de hipoxia HIF-1 α se estabiliza, se trasloca al núcleo donde heterodimeriza con HIF-1 β y se une al HRE donde activa la expresión de genes implicados en la angiogénesis, eritropoyesis, apoptosis, proliferación y supervivencia, proteolisis, regulación del pH y metabolismo de la glucosa (modificado de (12)).

son activados por el complejo HIF. Los más investigados son aquellos implicados en la angiogénesis, vasodilatación, eritropoyesis, metabolismo anaeróbico de la glucosa, apoptosis proliferación y supervivencia (Figura 5), pero también interesan los genes implicados en otras funciones como la inflamación y diferenciación en el desarrollo embrionario. Aunque el HIF aumenta la actividad transcripcional de la mayoría de genes, también puede reprimir la transcripción de otros, mediante mecanismos aún poco estudiados. HIF-1 α se encontraría en situación estable, se traslocaría al núcleo, donde al formar complejo con el HIF-1 β y unirse al HRE, realizaría su misión de activar/reprimir genes.

6. SELECTIVIDAD DE LA INDUCCIÓN DE GENES DEPENDIENTES DE HIF

El factor HIF puede inducir selectivamente diferentes genes mediante dos mecanismos que dependen: (a) de la isoforma o (b) del dominio de activación transcripcional (TAD) (2).

6.1. Selectividad dependiente de la isoforma

La subunidad HIF- α existe en células humanas como tres isoformas expresadas por *locus* individuales. Existe gran similitud en las secuencias proteicas de HIF-1 α y HIF-2 α (total, 48%; bHLH, 85%; PAS-A, 68%; PAS-B, 73%) y ambas están sometidas a la misma regulación post traduccional. La menos estudiada es la HIF-3 α , que parece jugar un papel dominante negativo en la respuesta hipóxica. Según datos consultados parece que HIF-1 α y HIF-2 α pueden ser selectivos en los genes que inducen o reprimen. Por ejemplo, el gen que codifica la anhidrasa carbónica 9, se induce predominantemente por la subunidad HIF-1 α , mientras que el de la HIF prolina hidroxilasa 3 (*phd3*) se induce por HIF-1 α y HIF-2 α . El que ciertos genes sean inducidos por una u otra subunidad o la especificidad del tipo celular con expresión dominante de una u otra es algo todavía no esclarecido (12).

6.2. Selectividad dependiente de la activación transcripcional

Ambos HIF-1 α and HIF-2 α poseen dos dominios de activación transcripcional (TAD). Esta característica bicéfala no es corriente en los factores de transcripción; la mayoría de ellos tiene solo un TAD. Los TAD NH₂ y COOH-terminales: N-TAD y C-TAD del HIF-1 α humano no presentan más que un 20% de similitud en la secuencia proteica, mientras que la secuencia proteica N-TAD de HIF-2 α y HIF-3 α comparten un 60% de identidad con la HIF-1 α humana, respectivamente. La HIF-1 α C-TAD humana está bien conservada cuando se compara con la HIF-2 α C-TAD humana (más del 70%). Además, ambos dominios N-TAD y C-TAD muestran elevada conservación de la secuencia proteica entre las especies (más del 90%). Como se mencionó anteriormente, la actividad transcripcional de HIF se inhibe por la

hidroxilación del residuo asparragina del dominio C-TAD por la FIH. Así que, la modulación del nivel de expresión, hacia arriba o hacia abajo, de la FIH conduce respectivamente a afianzar o eliminar la actividad C-TAD. Con este procedimiento se ha demostrado la existencia de dos grupos de genes, inhibidos o no inhibidos por FIH y conducidos respectivamente por el C-TAD (con o sin el N-TAD) o el N-TAD. Dado que los dos sensores del oxígeno la PH y la FIH tienen diferente K_m para el oxígeno, y que la PH requiere para su actividad mayor concentración de oxígeno que la FIH, se ha postulado que en áreas cercanas a los vasos sanguíneos, donde las células están más oxigenadas, la PH estará activa lo que ocasionará la completa degradación del HIF-1 α . Una caída en la presión de oxígeno inactivará primero a la PH, lo que origina la estabilización del HIF-1 α , no obstante con el mantenimiento de la actividad C-TAD, la FIH continuará activa (Figura 6). Con una posterior caída en oxígeno, la inhibición total de los dos sensores, conllevará a la estabilización completa de HIF-1 α y a una total liberación de C-TAD, capacitándole para interactuar con los cofactores (2, 16).

Así que, la liberación de C-TAD se producirá solo en condiciones de severa hipoxia cuando la FIH se inhiba totalmente. Por tanto, la expresión de genes dependientes de N-TAD y C-TAD o N/C-TAD estará mediada por el gradiente del oxígeno en los tejidos. En condiciones suaves de hipoxia se expresarán los genes dependientes solo de N-TAD. Por el contrario en hipoxia severa se llegará a la total activación de los genes sensibles a la familia de C-TAD o N/C-TAD.

7. METABOLISMO TUMORAL EN HIPOXIA

La estabilización y activación de HIF tiene efectos profundos sobre el metabolismo, en particular sobre la utilización de la glucosa (glucolisis) y la síntesis proteica. Esto, a su vez, repercute en el destino celular que conduce a la supervivencia o muerte celular y posible metástasis.

La glucosa se metaboliza siguiendo una cadena de reacciones que van, desde el transporte de la glucosa, glucolisis, ciclo tricarbóxico y fosforilación oxidativa (Figura 7). La última etapa, la fosforilación oxidativa en la mitocondria es la vía principal que utiliza la célula

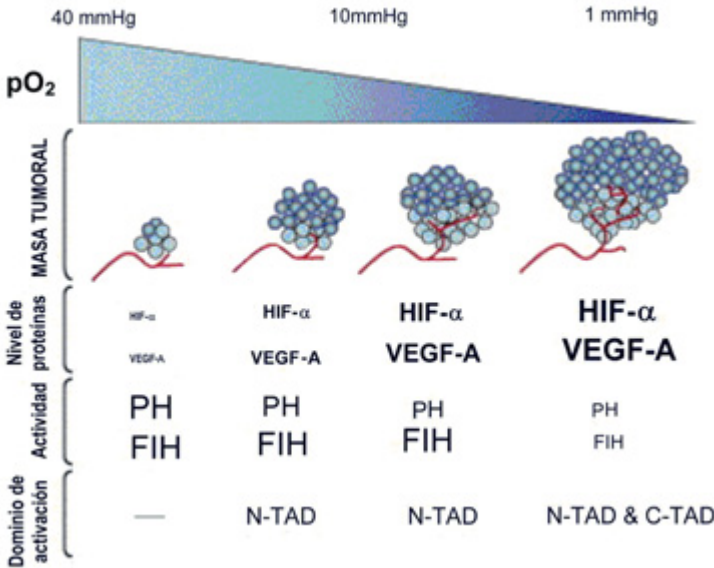


Figura 6. Selectividad del dominio de activación transcripcional de la transcripción dependiente de HIF. La pO_2 cae progresivamente en tanto en cuanto el tumor se distancia de los vasos sanguíneos y la masa tumoral se expande. Se detecta una elevación paralela en el nivel de HIF-1 α estable y en el efector VEGF-A. Las prolinas hidroxilasas (PH) son más sensibles a una caída en pO_2 que el factor inhibidor del HIF-1 (FIH), como se sugiere por la determinación in vitro de las K_m . Así que las PH se inhiben antes que las FIH cuando disminuye el oxígeno. A concentración moderada de oxígeno se acumulará algún HIF-1 α estable, pero los genes dependientes de su C-TAD no se inducirán totalmente debido a la restricción impuesta por la actividad FIH. Sin embargo, los genes que requieren solo N-TAD serán inducidos. Una posterior caída en pO_2 prevendrá la hidroxilación por FIH y eliminará la inhibición de C-TAD permitiendo la unión del co-activador transcripcional CBP/p300, condiciones en las que HIF-1 conseguirá la completa actividad funcional (modificado de (2)).

para generar ATP, y es dependiente del oxígeno. Por tanto, las células hipóxicas han de encontrar una vía alternativa para obtener suficiente ATP para sobrevivir. La glucólisis citoplasmática también produce ATP, pero 18 veces menos. Aumentando el ritmo de incorporación de glucosa y de la glucólisis, mediante la activación mediada por HIF de la expresión de los transportadores de la glucosa y enzimas de la vía glucolítica citoplasmática, las células hipóxicas elevan el suministro de ATP. De esta manera, la glucólisis en las células hipóxicas compensa la menor producción de ATP debida a la menor fosforilación oxi-

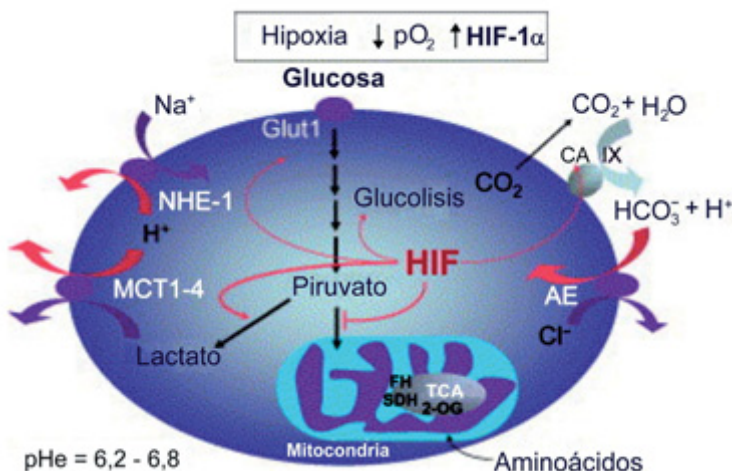


Figura 7. Metabolismo tumoral en hipoxia. Las células tumorales responden al medio hipóxico elevando la expresión de transportadores de glucosa Glut1 y enzimas de la glucólisis. En células normales, el piruvato generado en la glucólisis se metaboliza mediante el ciclo tricarbóxico (TCA) y la fosforilación oxidativa, muy eficiente en la producción de energía. Sin embargo, en condiciones hipóxicas el piruvato se convierte en lactato debido a la limitación de la fosforilación oxidativa. Como esta opción es menos eficiente en la producción de energía, las células tumorales lo compensan incrementando la incorporación y el metabolismo de la glucosa. La acumulación de lactato contribuye a la acidosis, característica de los tumores. Para mantener el equilibrio entre el pH extra e intracelular, el lactato tiene que salir de la célula vía el transportador H⁺/lactato monocarboxilato (MCT1-4), mientras que el H⁺ sale por intercambiador activable por factor de crecimiento y sensible al amilórido Na⁺/H⁺ (NHE-1). El CO₂ generado se convierte en ácido carbónico por el ectoenzima unido a membrana la anhidrasa carbónica (CA) IX o XII y el HCO₃⁻, una base débil, se incorpora a la célula por transportadores dependientes de Na⁺ e independientes de HCO₃⁻ lo que consigue elevar el pH intracelular. El co-sustrato 2-oxoglutarato (2-OG) requerido para la actividad de las hidroxilasas PH y FIH se genera en el ciclo TCA. El catabolismo de los aminoácidos es también una fuente de 2OG. La producción de succinato o fumarato por enzimas de ciclo TCA, succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarato hidratasa o fumarasa (FH) conduce a la inhibición “feedback” de estas hidrolasas (modificado de (2)).

dativa en la mitocondria. El elevado ritmo de incorporación de la glucosa en tumores puede visualizarse utilizando la tomografía de emisión de positrones (PET) después de la inyección a los pacientes de glucosa radioactiva no metabolizable [fluor-18] 2-desoxi-2-fluoro-d-glucosa, detectando su acumulación en tumores sólidos, lo cual es

predictivo de tumores agresivos. Se sabe que los tumores tienen una elevada tasa de glucolisis, incluso cuando la concentración de oxígeno es favorable para la fosforilación oxidativa (2, 17).

En el *metabolismo glucolítico*, una molécula de glucosa se convierte en dos de piruvato y se generan dos moléculas de ATP y NADH. El NADH se utiliza para reducir el piruvato a lactato. En el *metabolismo oxidativo*, el piruvato, derivado de la glucosa, entra en la mitocondria y en el ciclo TCA se convierte en acetil Coenzima A y CO₂. El NADH y el FADH₂ generado en este proceso proporcionan electrones a los citocromos de la cadena respiratoria y por último al oxígeno, generando ATP. La oxidación completa de una molécula de glucosa origina 36 moléculas de ATP.

No obstante, oncogenes tales como *c-myc* y *akt*, que se consideran implicados en la proliferación y supervivencia celular en cáncer, activan también el metabolismo glucolítico citoplasmático y pueden actuar en concierto con el HIF. Otra conexión interesante entre cáncer y disfunción mitocondrial se demostró con el hallazgo que la última etapa de la cadena electrónica mitocondrial concerniente a la citocromo c oxidasa, depende de p53 (2).

Otra característica de los tumores, reconocida desde hace tiempo, es su *bajo pH intersticial*. Las células tumorales producen principalmente dos ácidos: ácido láctico y ácido carbónico, resultantes del metabolismo de la glucosa. El piruvato producido en la glucolisis en células hipóxicas, en lugar de entrar en el ciclo TCA, se reduce a ácido láctico (18). Esta reacción está promovida también por el HIF mediante la activación del gen que codifica la lactato deshidrogenasa A y mediante la restricción de la actividad piruvato deshidrogenada. El número de H⁺ producidos por molécula de ATP es seis veces mayor en la glucolisis anaerobia que en la glucolisis-ciclo TCA-fosforilación oxidativa. Por consiguiente, la concentración tisular de CO₂ se eleva así como los H⁺ que generan y son tamponados con bicarbonato. Para mantener la homeostasis del pH las células tienen que recurrir a la acción de una serie de bombas, intercambiadores y transportadores (Figura 7). La familia de proteínas transportadoras de monocarboxilato (MCT) excretan lactato y H⁺, mientras que el intercambiador Na⁺/H⁺, que se activa por factores de crecimiento y es sensible al amilórido (NHE-1), intercambia el H⁺ intracelular por el Na⁺ extracelular.

Las anhidrasas carbónicas (CA) son ectoenzimas unidos a membranas, que se inducen por hipoxia. Las CA IX y CA XII, transforman rápidamente el CO_2 , que se difunde a través de la membrana, a ácido carbónico. Los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dependientes e independientes de Na^+ (AE) contribuyen a la alcalización del pH intracelular. De esta manera, una sobrecarga en la salida de la célula de los ácidos láctico y carbónico llevará a una bajada en el pH extracelular (acidosis). La modulación de la acidosis tumoral en fibroblastos transformados por Ras, por disminución de la expresión de los genes *nhe1* o *pgi* (fosfogluco isomerasa, enzima de la ruta glucolítica), ha mostrado tener capacidad de inhibir la tumorigénesis. La expresión y actividad del NHE-1 y la expresión de la isoforma MCT4 se regulan por hipoxia y la CA IX es uno de los productos genéticos más intensamente inducidos por HIF (2).

Los suministros de oxígeno y nutrientes van siempre unidos, ya que ambos son transportados a los tejidos por el sistema vascular, y las limitaciones de uno (hipoxia) o de los otros (escasez de nutrientes), origina la inhibición de la vía mTOR, que controla la síntesis proteica y el crecimiento. La activación de mTOR se verifica en presencia de factores de crecimiento, hormonas, aminoácidos y componentes extracelulares, a través de vías señalizadoras tales como las Ras/ERK y PI3K/Akt que convergen en el complejo TSC1/2 anterior a mTOR. Por otro lado, la represión de mTOR en hipoxia, ocurre directamente mediante la activación del complejo TSC1/2, que depende, a su vez, de activación de la proteína REDDI/RTP801, dependiente de HIF. Hay que destacar que las mutaciones en el supresor tumoral TSC1/2 conducen a la esclerosis tuberosa compleja (TSC), un síndrome caracterizado por la formación de tumores benignos denominados hamartomas. TSC1/2 se regula también por el gen supresor tumoral *pten* (*fosfatasa y tensina*), cuando las mutaciones de pérdida de función en *pten* originan acumulación del HIF-1 α posiblemente vía activation de mTOR. Una conexión reguladora entre hipoxia y metabolismo tumoral puede existir a través de la estabilización de HIF-1 α inducida por mTOR. La hipoxia y la escasez de nutrientes inhiben la clásica traducción cap-dependiente, pero el mRNA que contienen los sitios de entrada del ribosoma interno (IRES), puede todavía ser traducido. Ambos HIF-1 α y su gen objetivo *vegf-A* contienen secuencias tales, que en condiciones de estrés, mantienen la inducción de la angiogénesis (2).

La respuesta metabólica de las células a la *hipoxia* y a la *escasez de nutrientes* es una estrategia que permite a las células adaptarse y sobrevivir, pero cuando las condiciones se vuelven extremas hay que buscar otras tácticas. La última en supervivencia es la macroautofagia, un mecanismo en el cual las células se alimentan de si mismas para enfrentarse a la falta de nutrientes. La macroautofagia comprende la degradación del grueso de las proteínas celulares por un sistema lisosómico/vacuolar. Sorprende que la macroautofagia esté regulada por la vía PI3K/Akt/mTOR. Este proceso es de gran importancia para la tumorigénesis por la implicación del objetivo genético proapoptótico del HIF, la proteína 2 que interacciona con *Bcl-2/adenovirus E1B* (BNIP3). Además, la muerte celular mediada por BNIP3, requiere la eliminación de factores de crecimiento, acidosis o privación de glucosa. Así que, dependiendo de la intensidad y duración de la exposición de las células al estrés hipóxico y su respuesta metabólica, las células pueden seguir la vía de la supervivencia o de la muerte (2).

La hipoxia y la acidosis tumoral resultante pueden influenciar no solo la tumorigénesis sino también la *metástasis*. La metastasis implica la alteración de la unión célula-célula y de los contactos célula-matriz, que promueven la migración celular a través de las membranas basales y del estroma de los tejidos, hacia la circulación sanguínea y el sistema linfático. Un número importante de proteínas implicadas en la metástasis se inducen por HIF: vimentina, fibronectina, queratinas 14, 18, 19, metaloproteinasas de la matriz 2, catepsina D y el receptor de la uroquinasa activadora del plasminógeno. El microambiente ácido de los tumores puede modular la actividad de las proteasas y se han encontrado concentraciones elevadas de lactato que se relacionaron con la incidencia de metástasis. También, la E-cadherina, que juega un papel clave en la adhesión celular y la transición epitelio mesenquima, está reprimida por la activación de HIF en células de cáncer renal. La represión ocurre mediante la estabilización y activación del factor nuclear Snail. El producto de gen objetivo de HIF, la lisina oxidasa 2, induce un cambio conformacional en Snail, que conduce a su parcial estabilidad por represión de la expresión de la E-cadherina y así la invasión se conecta con la hipoxia/HIF en células de carcinoma renal. Ciertos factores que promueven la migración celular son también genes objetivo del HIF tales como el *factor*

de motilidad autocrina (que codifica la fosfoglucoasa isomerasa), el protooncogen que codifica el receptor tirosina quinasa c-MET y el receptor de citoquinas CXCR4.

8. HIF-1 EN LA TERAPIA DEL CÁNCER

El HIF-1 juega un papel clave en la reprogramación del metabolismo en el cáncer al activar los genes que codifican los transportadores de la glucosa y los enzimas glucolíticos, que incorporan la glucosa y la convierten en lactato; la piruvato deshidrogenasa quinasa 1, que desvía el piruvato fuera de la mitocondria; y el BNIP3 que desencadena la autofagia selectiva mitocondrial. El desvío del metabolismo oxidativo hacia metabolismo glucolítico, es lo que permite el mantenimiento de la homeostasis redox y la supervivencia celular en condiciones de hipoxia prolongada (19, 20).

La hipoxia intratumoral se ha considerado una fuerza que conduce a la progresión tumoral con pronóstico negativo en los pacientes. El descubrimiento de los HIF, que median las respuestas transcripcionales a los cambios en la concentración de oxígeno, ha renovado el interés por descubrir y desarrollar terapias dirigidas en base al microambiente hipóxico tumoral. Las células cancerosas están expuestas a un gradiente de oxígeno que fluctua en tiempo y espacio, el cual desencadena la activación de vías de supervivencia que no se inducen normalmente en tejidos normales y que pueden ser potencialmente dirigidos para propósitos terapéuticos (21, 22).

9. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS INHIBIDORES DEL HIF-1 α

Un gran número de agentes que inhiben la expresión y actividad del HIF-1, pueden proporcionar medios útiles para su desarrollo clínico (Figura 8). De acuerdo con su mecanismo de acción estos inhibidores del HIF pueden ser clasificados como agentes que modulan lo siguiente: expresión del mRNA del HIF-1 α , traducción del HIF-1 α , degradación del HIF-1 α , unión al DNA del HIF-1 α y actividad transcripcional del HIF-1 α (23, 24).

9.1. Inhibidores de la expresión del HIF-1 α mRNA

El acúmulo del HIF-1 α se controla principalmente a nivel de su síntesis o degradación y la mayor parte de los inhibidores, identificados hasta la fecha, de la actividad del HIF-1 α se dirigen a estas vías. Sin embargo, parece ser que en condiciones de hipoxia la concentración del HIF-1 α mRNA puede ser un factor limitante que afecte la traducción de la proteína (25) y se cree que moléculas pequeñas inhibitoras pueden afectar la expresión del HIF-1 mRNA y como consecuencia la traducción del HIF-1. Un hecho interesante que puede añadir especificidad a la inhibición del HIF-1 α es el uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos al HIF-1 α (EZN-2698) (26). El EZN-2698 es muy específico y se une al HIF-1 α mRNA con elevada afinidad causando la inhibición de su expresión y por consiguiente la reducción de la concentración de HIF-1 α , tanto *in vitro* como *in vivo*. El tratamiento con EZN-2698 *in vitro* inhibió el crecimiento de células tumorales, inhibió la expresión

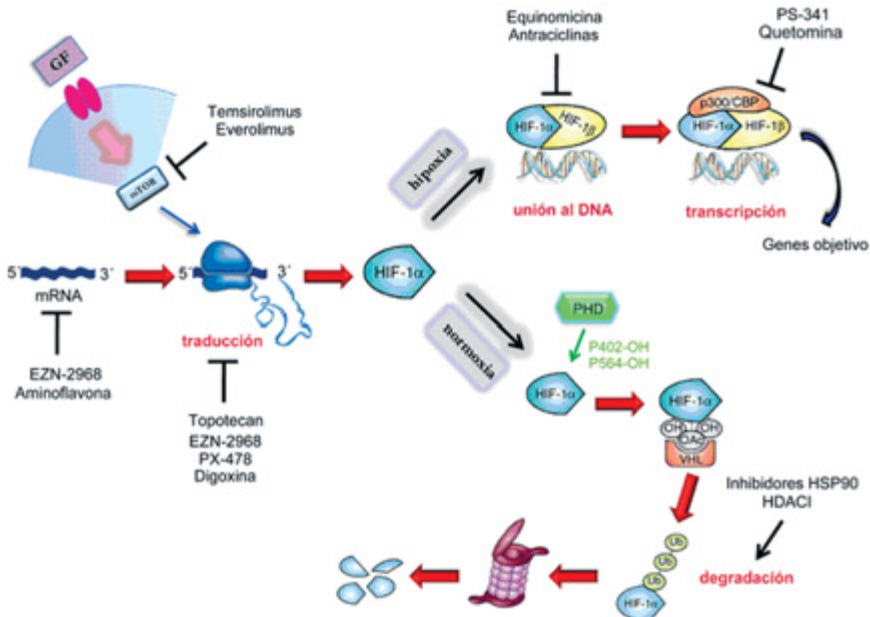


Figura 8. Mecanismos de acción propuestos de los inhibidores del HIF-1 (modificado de (21)).

de los genes objetivo del HIF-1 α y alteró la capacidad de las células HUVEC de formar tubos. La administración de EZN-2968 *in vivo* disminuyó la concentración del HIF-1 α endógeno y la del VEGF mRNA en hígado de ratón normal y mostró actividad antitumoral en modelos trasplantados de cáncer humano de próstata (DU145). Resultados preliminares en pruebas clínicas en fase I en pacientes con tumores sólidos avanzados indican que el EZN-2968 puede administrarse sin efectos adversos y que su actividad se ha observado en un paciente con carcinoma metastático renal (RCC). Sin embargo, se requieren más estudios que aseguren la limitación de los oligonucleótidos antisentido sobre los tejidos tumorales.

Otro agente que parece afectar la expresión del HIF-1 α mRNA es la aminoflavona (AF), un ligando del receptor aril-hidrocarburo (AhR), que se encuentra en la actualidad en la fase I de las pruebas clínicas en pacientes con cáncer metastático. Como el AhR dimeriza con el HIF-1 α , ha sido interesante probar si la activación farmacológica de la vía AhR usando AF, podía afectar la concentración del HIF-1 α . Estos estudios han demostrado que la AF inhibe la acumulación del HIF-1 α , pero de una manera independiente del AhR. El mecanismo propuesto, aunque no el exacto de la inhibición del HIF-1 por la AF es la modulación de la expresión del HIF-1 α mRNA (21).

9.2. Inhibidores de la traducción de la proteína HIF-1 α

Aunque son todavía poco conocidos los mecanismos implicados en la regulación de la hipoxia sobre la traducción del HIF-1 α , diversos agentes se han descrito que pueden afectar la síntesis de la proteína HIF-1 α . Uno de los primeros agentes descritos es el topotecan, un agente quimioterapéutico aprobado por la FDA, usado en la actualidad como terapia de segunda línea en pacientes con cáncer de células pequeñas o cáncer de ovario. El topotecan es un análogo de la camptotecina que inhibe la topoisomerasa I al inducir la formación de complejos estables Top1-DNA, los cuales en el caso de replicación del DNA generan roturas en la doble cadena y citotoxicidad. Hay que destacar que el topotecan inhibe la traducción del HIF-1 α por un mecanismo dependiente de Top1, pero independiente de la lesión al DNA, lo que sugiere que la citotoxicidad y la inhibición del HIF-1 α están mecanísticamente separadas (27). Además, la administración diaria

de dosis bajas de topotecan en un modelo de ratón con trasplante de glioma, inhibió la expresión de la proteína HIF-1 α , la angiogénesis y el crecimiento tumoral. La administración diaria de topotecan en combinación con el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab, ejerce actividad antitumoral sinérgica en modelos de trasplantes, lo que proporciona una prueba para el desarrollo clínico de esta estrategia combinatoria (28). Un estudio piloto en el que se administre topotecan a diario por vía oral a pacientes con cáncer metastático refractario proporcionaría evidencia de si este agente es capaz de afectar la señalización de HIF-1 en tejido tumoral. La capacidad de inhibir la traducción de HIF-1 α parece estar compartida por todos los agentes que inhiben Top1. Como el topotecan tiene una vida media corta, cuando se administra a pacientes, es lógico pensar que otros inhibidores de la topoisomerasa I con farmacocinéticas más favorables pueden ser más idóneos para la supresión crónica de la vía HIF-1. En este aspecto un agente interesante es el EZN-2208, una forma PEGilada de SN38, el componente activo CPT-11 (Irinotecan Pfitzer, New York, NY, USA; Yakult Honsha, Tokyo, Japan), que se caracteriza por mejorar la farmacocinética y por una notable actividad antitumoral en modelos pre-clínicos de tumores humanos sólidos y linfomas, incluyendo tumores resistentes CPT-11. La actividad de EZN-2208 ha sido demostrada en tumores refractarios CPT-11, por su capacidad de inhibir la acumulación del HIF-1 α , actuando así sobre el microambiente del tumor más que sobre las células cancerosas (29). El EZN-2208 se encuentra en pruebas clínicas en fase I y II en estudios en combinación. Los glucósidos cardiacos son otra clase de agentes que afectan la traducción HIF-1 α . En particular la digoxina se ha identificado como un inhibidor potente de la actividad del HIF-1 (30), porque inhibe la traducción del HIF-1 α por un mecanismo independiente de mTOR y mostró actividad antitumoral en modelos trasplantados. Así que, la digoxina, utilizada para el tratamiento del fallo cardiaco y arritmias, se está analizando en una fase I de pruebas clínicas como potencial agente anticáncer. De acuerdo con estos resultados, el fraccionamiento de un extracto con solvente orgánico de la planta *Crossosoma bigelovii* llevó al descubrimiento de un nuevo glucósido, la estrofantidina que también inhibió la actividad transcripcional de HIF-1 (31). Otro inhibidor del HIF-1, que se encuentra en fase I de pruebas clínicas en pacientes con cáncer metastático avanzado, es el PX-478. Este agente mostró actividad antitumoral notable en una variedad de mo-

delos trasplantados con tumores humanos, la cual parece relacionarse con niveles de expresión del HIF-1 α (32). El PX-478 inhibió la expresión de HIF-1 α de manera independiente de pVHL y p53. La inhibición ocurre a muchos niveles, ya que se han propuesto tres mecanismos que pueden contribuir a aminorar la acumulación del HIF-1 α . También se ha sugerido que el PX-478 inhibe la desubiquitinación del HIF-1 α , lo que conlleva mayor degradación del HIF-1 α poliubiquitinado, reducción de la expresión del HIF-1 α mRNA que afecta la traducción del HIF-1 α (33). Una vía señalizadora, implicada en la inducción de la traducción de HIF-1 α , dependiente de factores de crecimiento es mTOR. Sin embargo, mTOR y la síntesis global de proteínas se inhiben en casos de hipoxia severa, y por esto, la contribución de estas vías a la traducción del HIF-1 α bajo hipoxia se conoce aún muy poco (34). Varios inhibidores de mTOR, como el temsirolimus y el everolimus, agentes aprobados por el FDA para el tratamiento del cáncer renal, inhiben la actividad del HIF-1 α . Las pruebas clínicas han demostrado la eficacia de estos agentes en el tratamiento del RCC. En un estudio clínico de fase III, el temsirolimus administrado como único agente, mejoró significativamente la supervivencia total de pacientes con RCC avanzado y mal pronóstico, comparado con el tratamiento con IFN α (35). La administración de everolimus a pacientes con RCC metastático, que progresó después de terapias dirigidas al VEGF, prolongó la supervivencia frente al placebo en una prueba clínica de la fase III randomizada (36). Están en curso ensayos clínicos para evaluar el potencial de los inhibidores de mTOR como agentes únicos o en combinación, para el tratamiento de otros cánceres sólidos. Si la inhibición del HIF-1 α puede contribuir a la actividad terapéutica de esta clase de agentes en otros cánceres que el renal, es algo que tiene que ser establecido.

9.3. Inhibidores que afectan la vía de degradación del HIF-1 α

La estabilidad del HIF-1 α resulta afectada por su interacción con la Hsp90 (heat shock protein 90), ya que en presencia de inhibidores de la Hsp90, el HIF-1 α sufre degradación por el proteosoma, independiente del VHL (37). Esto es debido a que el heterodímero HIF-1 no puede adquirir su propia conformación y fracasa al reclutar los cofactores requeridos para su actividad transcripcional. El desarrollo de

los inhibidores de la Hsp90 se inició con el descubrimiento del producto natural la geldanamicina, un antibiótico benzoquinona ansamícinica que inhibe la Hsp90 compitiendo con el sitio de unión al ATP. La geldanamicina induce la degradación del HIF-1 α en varias líneas celulares, en condiciones tanto hipóxicas como normóxicas (38). Los primeros inhibidores de la Hsp90 que entraron en pruebas clínicas fueron los 17-AAG y 17-DMAG y en la actualidad un gran número de inhibidores de la Hsp90 de segunda generación están en pruebas clínicas como agentes anticáncer. Sin embargo, dado al rango de proteínas que pueden ser afectadas por la inhibición de la Hsp90, es difícil determinar hasta que grado su actividad antitumoral puede relacionarse con la inhibición del HIF, más aún en ausencia de prueba clínica que asegure los efectos específicos de la inhibición de la Hsp90 sobre las vías señalizadoras del HIF-1. Los inhibidores de la histona desacetilasa se han implicado también en la regulación de la actividad del HIF-1 por varios mecanismos potenciales, que incluyen la inducción de la degradación del HIF-1 α y la regulación de la actividad transcripcional del HIF-1 (39). Aunque permanece controvertido un papel directo de la acetilación en la regulación del HIF-1 α , evidencias recientes indican que la sirtuina 1 (Sirt1), una desacetilasa sensible a los cambios redox, estimula selectivamente la actividad del HIF-2 α durante la hipoxia. Los inhibidores de la histona desacetilasa se están evaluando en tumores sólidos como agentes únicos o en combinación.

9.4. Inhibidores de la unión del HIF-1-DNA

La inhibición de la unión HIF-1-DNA al elemento responsable de la hipoxia (HRE), un paso requerido para la inducción de la transcripción, es un mecanismo potencial mediante el cual las moléculas pequeñas pueden inhibir la actividad del HIF. La evidencia de que este mecanismo puede inhibir la actividad transcripcional del HIF-1 fueron conseguidas por identificación de la equinomicina, un péptido cíclico de la familia de los antibióticos de la quinoxalina, aislado originalmente del *Streptomyces echinatus*, el cual se une al DNA de una manera específica. El desarrollo clínico de la equinomicina se inició en los últimos ochenta, después de amplias pruebas como agente citotóxico en fases I-II, que fracasaron (21, 40).

Se ha observado que las antraciclinas, agentes quimioterapéuticos efectivos para el tratamiento de una amplia variedad de cánceres, inhiben la actividad HIF-1 al ejercer su actividad citotóxica por mecanismos que incluyen la intercalación en el DNA. Recientes evidencias indican que la doxorubicina (DXR) y la daunorubicina (DNR) inhiben la actividad transcripcional del HIF-1 α por bloqueo de su unión a la secuencia HRE. La administración de DXR o DNR a ratones trasplantados con cáncer de próstata humano, inhibió significativamente el crecimiento tumoral y la vascularización, a la vez que disminuyó las células angiogénicas circulantes. La movilización de estas células en la sangre estuvo mediada por los genes, inducidos por el HIF-1, que codificaban citoquinas pro-angiogénicas, cuya transcripción fue inhibida selectivamente en ratones tratados con antraciclinas. Esto demuestra que las antraciclinas pueden ejercer actividad antitumoral al inhibir la actividad del HIF-1 y la angiogénesis y que la inhibición del HIF-1 puede ser uno de los mecanismos potenciales que contribuyen a la actividad de la quimioterapia metronómica (21, 41).

9.5. Inhibidores de la actividad transcripcional del HIF-1 α

La quetomina se identificó originalmente como un inhibidor de la actividad transcripcional del HIF-1 al interferir la interacción del HIF-1 α con el co-activador p300. Sin embargo, debido a su toxicidad, el desarrollo de este fármaco no ha tenido el éxito deseado. La inhibición del proteosoma conduce al acúmulo normóxico del HIF-1 α . Paradójicamente, el HIF-1 α que se acumula cuando se bloquea el proteosoma es transcripcionalmente inactivo. El Bortezomib (PS-341) es un inhibidor del proteosoma, aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple, pacientes con linfoma y en pacientes que han sufrido al menos una terapia previa. La actividad antitumoral del bortezomib puede relacionarse con su capacidad para reprimir la actividad transcripcional del HIF-1 α (42). A concentraciones nanomolares el bortezomib fue capaz de alterar la interacción con p300-HIF-1 α al intensificar la unión del FIH al HIF-1 α (43). La FIH es una dioxigenasa que hidroxila la asparragina 803 en el dominio de transactivación C-terminal del HIF-1 α , previniendo así el reclutamiento del co-activador p300. Es un hecho que las concentraciones de bortezomib capaces de inhibir la actividad del HIF-1 α son mucho más

bajas que las requeridas para alterar la función del proteosoma, lo que hace pensar que el mecanismo de inhibición del HIF por el bortezomib es independiente de la inhibición del proteosoma (21).

10. CONCLUSIONES

El conocimiento de la biología del HIF-1 y de la regulación del HIF-1 α ha experimentado una notable expansión en los últimos años. El bloqueo molecular de la actividad del HIF-1, cuando se dispone de suficiente oxígeno, implica una cascada de eventos inducidos por enzimas, entre los que se incluye las hidroxilaciones de la prolina y la asparragina, y la ubiquitinación que elimina la subunidad HIF-1 α . En caso de hipoxia estos eventos mediados por enzimas, se inhiben y el HIF-1 activo puede promover la transcripción de multitud de genes, cuya expresión puede ser beneficiosa o perjudicial para el organismo dependiendo de su estado fisiopatológico. El desarrollo de planteamientos farmacológicos que inhiban al HIF puede proporcionar estrategias terapéuticas contra el cáncer. La inhibición farmacológica de las vías inducidas por hipoxia está siendo validada en pruebas clínicas por determinados agentes que puedan ser utilizados por sí solos o en estrategias combinatorias.

11. AGRADECIMIENTOS

A Adoración Urrea Salazar por la colaboración prestada en la preparación del manuscrito, en la realización del ajuste electrónico de las figuras y en la búsqueda de bibliografía.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Boticario, C. & Cascales, M. (2008) Factor inducible por hipoxia (HIF-1) y cáncer. En: Innovaciones en cáncer. Editoras Boticario, C. & Cascales, M. UNED. Madrid pp 391-414.
2. Brahimi-Horn, C. & Pouyssegur, J. (2007) Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease. *Biochem. Pharmacol.* 73: 450-457.
3. Semenza, G. L. & Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds the human erythropoietin gene at enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5447-5454.

4. Wang, G. L. & Semenza, G. L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270: 1230-1237.
5. Semenza, G. L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 3: 721-732.
6. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol. Med.* 11: 353-361.
7. Brahimi-Horn, C., Mazure, N. & Pouyssegur, J. (2005) Signaling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell. Signal.* 17: 1-9.
8. Schofield, C. J. & Ratcliffe, P. J. (2005) Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 617-626.
9. Kaelin, Jr. W. G. (2003) The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14: 2703-2711.
10. Coleman, M. L. & Ratcliffe, P. J. (2010) Angiogenesis escape from hypoxia. *Nature Med.* 15: 491-493.
11. Maxwell, P. H. (2005) The HIF pathway in cancer. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 16: 523-530.
12. Aprelikova, O., Chandramouli, G. V., Wood, M. *et al.* (2004) Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J. Cell. Biochem.* 92: 491-501.
13. Nakayama, K., Frew, I. J., Hagensen, M. *et al.* (2004) Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell.* 117: 941-952.
14. Pouyssegur, J. & Mechta-Grigoriou, F. (2006) Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol. Chem.* 387: 1337-1346.
15. Brahimi-Horn, C. & Pouyssegur, J. (2009) HIF at a glance. *J. Cell. Sci.* 122: 1055-1057.
16. Manalo, D. J., Rowan, T., Lavoie, L. *et al.* (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* 105: 659-669.
17. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. (2004) Why do cancers have high anaerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer.* 4: 891-899.
18. Walenta, S. & Mueller-Klieser, V. F. (2004) Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin. Radiat. Oncol.* 14: 267-274.
19. Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H. *et al.* (2000) Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60: 7075-7083.
20. Semenza, G. L. (2010) HIF-1 upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20: 51-56.
21. Onnis, B., Rapisarda, A. & Melillo, G. (2009) Development of HIF1 inhibitors for cancer therapy. *J. Cell Mol. Med.* 13: 2780-2786.
22. Brown, J. M. & Wilson, W. R. (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer.* 4: 437-447.
23. Melillo, G. (2006) Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol. Cancer Res.* 4: 601-605.
24. Giaccia, A., Siim, B. G. & Johnson, R. S. (2003) HIF-1 as a target for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 803-811.
25. Young, R. M., Wang, S. J., Gordan, J. D. *et al.* (2008) Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosomal entry site-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 283: 16309-16319.

26. Greenberger, L. M., Horak, I. D., Filpula, D. *et al.* (2008) A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor alpha EZN.2968 inhibits tumor cell growth. *Mol. Cancer Ther.* 7: 3598-3608.
27. Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Sordet, O. *et al.* (2004) Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor alpha protein accumulation, angiogenesis and tumor growth by topotecan in US51-HRE glioblastoma xenografts. *Cancer Res.* 64: 6845-6848.
28. Rapisarda, A., Hollingshead, M., Uranchimeg, B., *et al.* (2009) Increased anti-tumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol. Cancer Ther.* 8: 1867-1877.
29. Sapra, P., Zhao, H., Mehlig, M. *et al.* (2008) Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11 refractory model. *Clin. Cancer Res.* 14: 1888-1896.
30. Zhang, H., Qian, D. Z., Tan, Y. S. *et al.* (2008) Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-alpha synthesis and block tumor growth. *PNAS.* 105: 19579-19586.
31. Klausmeyer, P., Zhou, Q., Scudiero, D. A. *et al.* (2009) Cytotoxic and HIF-alpha inhibitory compounds from *Cromosoma bigelovii*. *J. Natl. Prod.* 72: 805-812.
32. Welsh, S., Williams, R., Kirkpatrick, L. *et al.* (2004) Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478 an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Cancer Ther.* 3: 233-244.
33. Koh, M. Y., Spibak-Kroizman, T., Venturini, S. *et al.* (2008) Molecular mechanisms for the activity of PX-478, an antitumor inhibitor of the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol. Cancer Ther.* 7: 90-100.
34. Wouters, B. G. & Koritzinski, M. (2008) Hypoxia signaling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nature Rev. Cancer.* 8: 851-864.
35. Motzer, R. J., Bacik, J., Murphy, B. A. *et al.* (2002) Interferon-alpha as a comparative treatment for clinical trials and new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 20: 289-296.
36. Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S. *et al.* (2008) Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet.* 372: 449-456.
37. Neckers, L. (2007) Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J. Biosci.* 32: 517-530.
38. Isaacs, J. S., Jung, Y. J., Mimnaugh, E. G. *et al.* (2002) HSP90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia inducible factor-1alpha-degradative pathway. *J. Biol. Chem.* 277: 29936-29944.
39. Ellis, L., Hammers, H. & Pili, R. (2009) Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett.* 280: 145-153.
40. Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G. *et al.* (2005) Echinomicin, a small molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA binding activity. *Cancer Res.* 65: 9047-9055.
41. Lee, K., Qian, D. Z., Rey, S. *et al.* (2009) Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *PNAS.* 106: 2353-2358.

42. Richardson, P. G., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) Bortezomib (PS-341): a novel, first in class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control*. 10: 361-369.
43. Shin, D. H., Chun, Y. S., Lee, D. S. *et al.* (2008) Bortezomib inhibits tumor adaptation to hypoxia by stimulating the FIH-mediated repression of hypoxia inducible factor-1. *Blood*. 111: 3131-3136.

***Información de Contacto:**

Dra. María Cascales Angosto

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Email: mcascales@insde.es

Abreviaturas: **ARNT**, transportador del receptor nuclear de hidrocarburos; **bHLH**, básico-hélice-vuelta-hélice (*basic-helix-loop-helix*); **BNIP3**, proteína 3 que interacciona con Bcl-2/adenovirus E1B de 19kDa; **CITED**, CBP/p300 interacting transactivator with ED-rich tail 2; **CBP**, proteína que se une a CREB; **4E-BP1**, proteína de unión al elf-4E; **elf-4E**, factor eucariótico de iniciación de la traducción 4E; **Epo**, eritropoyetina; **FIH**, factor que inhibe a HIF-1; **FH**, fumarato hidratasa (fumarasa); **HIF**, factor inducible por hipoxia; **HO-1**, hemo oxigenasa; **HRE**, elemento de respuesta a hipoxia; **HSP**, heat shock protein; **iNOS-2**, óxido nítrico sintasa 2 inducible; **IRES**, sitio de entrada al interior del ribosoma; **mTOR**, objetivo de la rapamicina en mamíferos; **NHE1**, intercambiador Na⁺/H⁺ (*Na⁺/H⁺ exchanger*); **2-OG**, 2-oxoglutarato; **ODDD**, dominio dependiente de la degradación del oxígeno; **PAS**, Per-Arnt-Sim; **PGI**, fosfoglucosa isomerasa; **PTEN**, fosfatasa y tensina; **PH**, prolina hidroxilasa; **SDH**, succinato dehidrogenasa; **TAD**, dominio de activación transcripcional; **TCA**, ácido tricarbóxico; **VEGF**, factor de crecimiento vascular endotelial; **VHL**, von Hippel-Lindau, proteína supresora.

Antitumoral activity of oncolytic vaccinia virus expressing the interferon-induced ds-RNA dependent protein kinase PKR

María Ángeles García^{1,2}, Magdalena Krupa¹, Mariano Esteban¹

¹ Departamento de Biología Molecular y Celular, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

² Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental Alejandro Otero, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, 18100 Armilla, Granada.

Recibido el 8 de junio de 2010.

ABSTRACT

Tumour cells generally become more susceptible to virus infection than normal cells due, in part, to a deficient interferon (IFN)-induced antiviral pathway. One of the key IFN-induced enzymes with potent antiviral action is the ds-RNA dependent protein kinase PKR, that once activated blocks protein synthesis, triggers apoptosis and prevents cell growth. Among viruses, vaccinia virus (VACV) lacking selected viral genes or armed with cytokines or tumour specific antigens has been used in preclinical and clinical studies as a therapeutic agent against different tumours. Here we showed in a mouse model of aggressive cancer by subcutaneous inoculation with prostate TRAMP-C1 cells, that a VACV recombinant expressing low levels of human PKR (VV-PKR) and lacking thymidine kinase (TK), is capable of reducing tumour burden when administered by a systemic route in immunocompetent C57/BL6 mice. In addition, expression of PKR was found to attenuate the virus, thus ensuring safety. A catalytically inactive enzyme PKR with a point mutation (K296R) induced similar oncolytic activity as the control virus lacking TK. These find-

ings suggest that VACV recombinants expressing PKR are candidate vectors against cancer cells.

Keywords: Protein kinase PKR; recombinant vaccinia virus; oncolytic activity; prostate tumours; mouse model.

RESUMEN

Actividad oncolítica del virus vaccinia que expresa la proteína quinasa PKR inducida por los interferones y dependiente de RNA bicatenario.

Las células tumorales son generalmente mas susceptibles a la infección viral que las células normales debido, en parte, a tener deficiencias en el sistema de señalización por los interferones (IFN). Uno de los enzimas clave inducidos por IFN es la proteína quinasa PKR dependiente de RNA bicatenario, que una vez activada fosforila el factor de iniciación eIF-2 alfa lo que conlleva a una inhibición generalizada en la síntesis de proteínas, inducción de la apoptosis y prevención del crecimiento celular. Como agente terapéutico frente a distintos tumores se está utilizando en preclínica y clínica el virus vaccinia que carece de ciertos genes virales, expresa ciertas citoquinas o antígenos tumorales. En esta investigación demostramos en un modelo agresivo de cáncer en ratón por inoculación ex vivo de células tumorales de próstata TRAMP-C1, que se reduce el crecimiento tumoral tras la infección a ratones inmunocompetentes C57/BL6 por vía sistémica de un virus recombinante de vaccinia que expresa bajos niveles de PKR. Además, la expresión de PKR conduce a la atenuación del virus en los tejidos. Un mutante catalíticamente inactivo de PKR produce niveles similares de actividad oncolítica, pero con replicación viral en tejidos. Estos resultados indican que vectores recombinants de vaccinia que expresan PKR son candidatos como vectores para luchar contra tumores.

Palabras Clave: Proteína quinasa PKR; virus vaccinia recombinante; actividad oncolítica; tumor de próstata; modelo ratón.

1. INTRODUCTION

Cancer is a multi-faceted process by which cells are sequentially transformed, lose cell growth control, develop tumours at specific sites and cells spread to different tissues leading to metastasis. Different strategies to fight cancer are used in the clinic, from surgery to chemotherapy, immune-therapy and more recently, although experimentally, through the use of viral vectors with the ability to destroy tumour cells. This therapeutic strategy uses oncolytic viral vectors with preference for replication in tumour cells, causing cell destruction (1). Vaccinia virus has a strong oncolytic effect due to its fast replication cycle and a high innate tropism to cancer tissue (2). Tumour targeting can be further improved by deleting vaccinia virus genes that are necessary for replication in normal cells but not in cancer cells. For example, deletions of either thymidine kinase (TK), vaccinia virus growth factor (VGF), or both have been shown to reduce pathogenicity compared to wild-type virus (3, 4). To enhance antitumor potency, oncolytic vaccinia viruses can be armed with therapeutic transgenes, such as immunostimulatory factors or suicide genes. The clinical data obtained thus far with the oncolytic poxvirus vectors shows that intratumoral injection and replication lead to reproducible delivery of the virus to systemic metastasis through the bloodstream with tumour necrosis; however, hurdles remain. Neutralizing response to the virus vector, nature of the inflammatory response required for tumour regression and limited application to locally advanced tumours, are among obstacles to be solved. Thus, development of poxvirus vectors with improved oncolytic characteristics are needed.

To search for novel viral vectors with enhanced oncolytic activity, we have taken advantage of a property of cancer cells, which frequently lose their ability to produce or respond to interferons (IFN). These molecules play critical roles in host defence against viral infections, control of cell growth and immune modulation (5). The poor response of tumour cells to IFN make these cells more prone to viral infection, hence forming the basis by which oncolytic viruses are used to destroy tumour cells as they replicate to a better extent in tumour cells than in normal cells. Among the proteins induced by IFN with antiviral importance is the ds-RNA dependent protein kinase PKR, an en-

zyme that when activated by dsRNA is autophosphorylated leading to phosphorylation of the alpha subunit of the eukaryotic initiation factor eIF-2 (eIF2 α) and, in turn, to inhibition of protein synthesis, induction of apoptosis and cell death (for review of PKR see (6)). Since PKR induction is dependent on sensitivity of the cells to IFN, we reasoned that a VACV vector expressing PKR should infect and destroy better cancer cells than normal cells, as the latter have a fully active IFN system. Thus, in this investigation we have explored the oncolytic ability of a VACV recombinant expressing low levels of PKR (referred to as VV-PKR) in cultured tumour cells and in a mouse model after subcutaneous inoculation of prostate tumour cells (TRAMP-C1). The use of a viral recombinant expressing low levels of PKR is because high levels of expression of PKR prevent virus growth (7, 8). Our findings showed that VV-PKR replicate in cultured tumour cells, but when inoculated in subcutaneous TRAMP-C1 tumour-bearing mice causes reduction of tumour burden in spite of restricted virus growth.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cells and viruses

TRAMP-C1 murine prostate cancer cell line obtained from American Type Culture Collection was maintained in DMEM with 10% foetal calf serum (FCS) and antibiotics. Cells reaching 95% confluence were shortly trypsinized, and harvested with serum-containing medium. The cells were washed and resuspended in serum-free complete medium at concentration of 5×10^6 viable cells in 1 ml. Half-million TRAMP-C1 cells in 100 μ l were implanted subcutaneously into the right flank. Tumour volume was estimated using the formula: $m_1^2 \times m_2 \times 0.5236$, where m_1 and m_2 represented the short and long diameter of the tumour, respectively. Tumours were measured using a digital calliper twice weekly until day 55 post-implantation or until the tumour burden has met the humane endpoint. Tumours that could not be measured with calliper but were found to infiltrate surrounding tissues at the necropsy were assigned as immeasurable. Tumour-free status was assigned to mice that at the necropsy have shown lack of residual tumour tissue at the implantation site.

The Western Reserve strain of vaccinia virus was used to generate the recombinant viruses expressing the WT and the human mutant PKR proteins. The recombinant genes were inserted in the TK locus of viral genome. PKR expression is regulated by the lac I repressor gene that is under the control of VACV early-late promoter p7.5. The mutant PKR, K296R has lost the catalytic activity of PKR due to substitution of the lysine 296 by arginine. The mutant VACV viruses expressing PKR (VV-PKR), its inactive mutant form (VV-K296R) and luciferase (VVLUC) have been previously described (9, 10). Viruses were grown in monkey BSC-40 cells and purified by sucrose gradients.

TRAMP-C1 cells grown in 12-well plates were infected at low 0.01 pfu/cell or high 5 pfu/cell virus multiplicities. Following virus adsorption for 60 min at 37 °C, the inoculum was removed and cells incubated with fresh DMEM containing 2% FCS at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. At different times postinfection, cells were collected by scraping and used either for Western blot or virus titration. At 24 h postinfection (hpi), infected cells were lysed in Laemmli buffer, cell extracts fractionated by 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot using rabbit polyclonal anti-vaccinia serum, anti-PKR or anti-phospho PKR. Virus yields were determined by plaque formation at 48 hpi in monkey BSC-40 cells after staining with 1% crystal violet in 2% ethanol.

2.2. Evaluation of virus pathogenicity

Mice C57/BL6, four per group, were inoculated at days 0 and 3 with a dose of 5×10^7 pfu per mouse with different viral recombinants, VVLUC, VV-K296R or VV-PKR, by either intraperitoneal or intranasal routes. Mice were weighed daily and signs of illness were scored. Virus was titrated from homogenates of spleen and lung of each mouse at different days post-infection by a plaque assay in monkey BSC-40 cells.

2.3. Evaluation of oncolytic activity

Male mice C57/BL6 seven weeks old, 10 animals per group, were injected by subcutaneous route with 1×10^6 of TRAMP-C1 of mouse prostate cancer cells. At the median tumour volume of 75 to 100 mm³

(30 days post-inoculation), mice were injected by intraperitoneal route with 5×10^7 pfu of vaccinia virus VVPKR, VVLUC, VVK296R, or saline PBS. Virus inoculation by i.p was performed twice in animals with developed tumours, giving the virus at times 0 and after 3 days. Tumours were measured every 3-4 days using digital calliper.

3. RESULTS

3.1. VACV recombinants with PKR under control of the lac I operator/repressor system induced PKR in tumour prostate cancer cells

We have previously described a VACV recombinant expressing PKR (VV-PKR) under control of the inducible lac I operator/repressor system (9, 11); scheme in Figure 1A). Briefly, when cultured cells are infected with VV-PKR in the presence but not in the absence of IPTG, PKR is produced at high levels and this leads to its own phosphorylation triggered by the viral dsRNA produced during infection from symmetrical transcription, followed by phosphorylation of eIF-2 alpha and in turn, inhibition of protein synthesis, activation of caspases, induction of apoptosis and cell death (6, 12). However, we noted that when tumour cells TRAMP-C1 are infected with VV-PKR in the absence of IPTG there low levels of PKR are produced when compared to the infection in the presence of IPTG (Figure 1B). Similar observation was found when TRAMP-C1 cells were infected with the mutant form of PKR (K296R), in which case the presence of IPTG markedly increased the levels of PKR (Figure 1B). As expected, high levels of PKR produced in the presence of IPTG correlated with phosphorylation of eIF-2 α , while low levels of PKR in the absence of IPTG induced lower eIF2 α phosphorylation. This was not observed when the catalitically inactive mutant form of PKR (K296R) was synthesized (Figure 1B). As determined by Western blot with antibodies against vaccinia proteins, the accumulation of viral proteins was not impaired in TRAMP-C1 cells infected with VV-PKR in the absence of IPTG, while it was blocked when IPTG was present (Figure 1C). Moreover, virus yields were similar in cells infected with the control virus VV-LUC, a virus expressing luciferase marker in the TK locus, as in cells infected with VV-PKR in the absence of IPTG (Figure 1D),

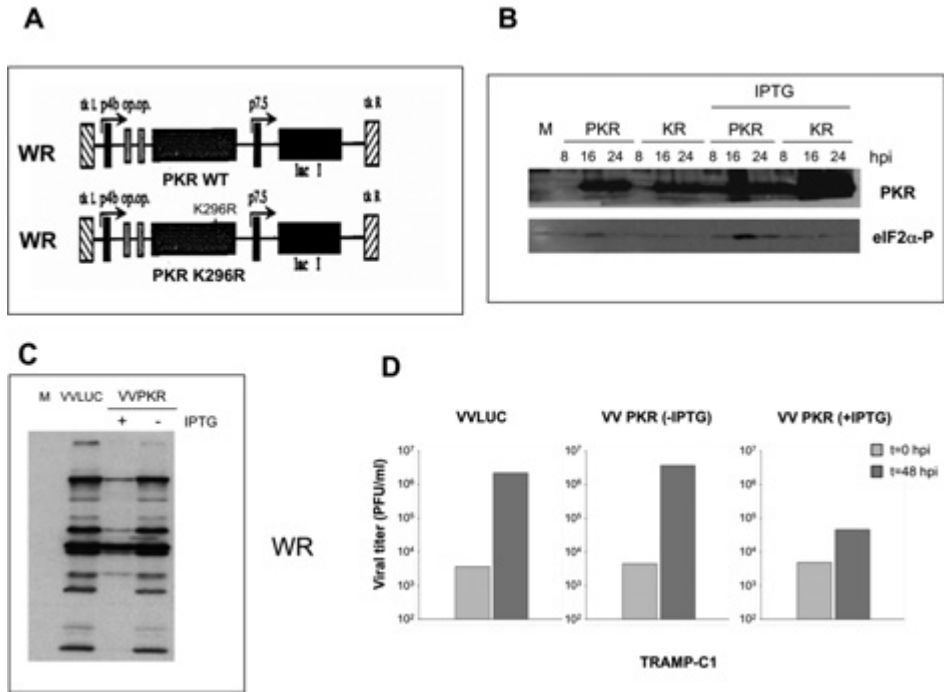


Figure 1. Characteristics of vaccinia virus recombinant vectors expressing PKR.
A. Scheme of the recombinant vaccinia virus vectors. The Western Reserve strain of vaccinia virus was used to generate the recombinant viruses expressing the human wild type (WT) and the mutant PKR proteins. The recombinant genes were inserted in the TK locus of viral genome. PKR expression is regulated by the lac I repressor gene that is under the control of VV early-late promoter p7.5. The mutant PKR, K296R has lost the catalytic activity of PKR due to substitution of the lysine 296 by arginine. **B.** TRAMP-C1 cells were infected with 5 pfu/cell of vaccinia virus recombinants VV-PKR and VV-K296R in presence or absence of the inducer IPTG (5 mM). The PKR expression and PKR catalytic activity was analyzed at different time post-infection using specific antibodies against total PKR and the phosphorylated form of eIF2α. **C.** TRAMP-C1 cells were infected with 5 pfu/cell of vaccinia virus recombinants VVLUC and VV-PKR in presence or absence of the inducer IPTG (5 mM). The vaccinia virus proteins at 24 hpi were detected using specific polyclonal antibody to VACV proteins. **D.** TRAMP-C1 cells were infected with 0.001 pfu/cell of vaccinia virus recombinants VVLUC and VVPKR in presence or absence of the inducer IPTG (5 mM). Virus yields were measured at 0 and 48 hpi after titration by plaque assay in monkey BSC-40 cells.

while in the presence of IPTG virus yields were inhibited. Induction of PKR in TRAMP-C1 cells infected with VV-PKR could be due to leakiness of the promoter or as a result of the viral infection.

The above findings establish that VV-PKR can be used as a vector to produce low levels of PKR in tumour TRAMP-C1 cells.

3.2. Attenuation of VV-PKR in infected mice

To evaluate whether low level expression of PKR could be biologically active leading to virus attenuation, we performed pathogenicity studies in mice, by measuring survival, virus titration in tissues and humoral immune responses to the virus. Thus C57/BL6 mice, 4 animals per group, were injected either by intraperitoneal (i.p.) or intranasal (i.n.) routes with 5×10^7 plaque forming units (pfu) of either VV-LUC, VV-PKR and VV-PKR(K296R) or with a solution of PBS. Several signs of viral illness, like ruffled fur, rigidity, lack of activity and mortality were evaluated with time of infection. As shown in Figure 2A, i.n. inoculation of VV-LUC results in severe illness and the animals had to be sacrificed by day 6 due to the loss of 30% of their body weight, while animals that received VV-PKR recovered the weight loss by day 7 after viral infection. Animals inoculated with VV-PKR(K296R) behaved similarly as VV-LUC (not shown). The signs of illness correlated well with virus abundance in lung tissues, with about 5 log reduction at day 3 in mice inoculated i.n. with VV-PKR in comparison with VV-Luc (Figure 2A, lower panel). When animals were inoculated with the different viruses by i.p. routes, VV-Luc or VV-PKR(K296R) induced weight loss while infection with VV-PKR did not (Figure 2B); this correlated with lower virus titers in the spleen compared with animals administered with VV-LUC or VV-PKR(K296R) (Figure 2B, lower panel). To provide further support for reduced replication of VV-PKR in mice, we evaluated by ELISA the antibody response against the viral recombinants at 30 days after i.p. inoculation with the different viruses. As expected, VV-PKR induced lower antibodies against VACV antigens than either VV-LUC or VV-PKR(K296R) (Figure 3). The findings of Figures 2 and 3 establish that VV-PKR is attenuated in mice when inoculated by i.n. or i.p. routes and induces low levels of antibodies against the virus vector.

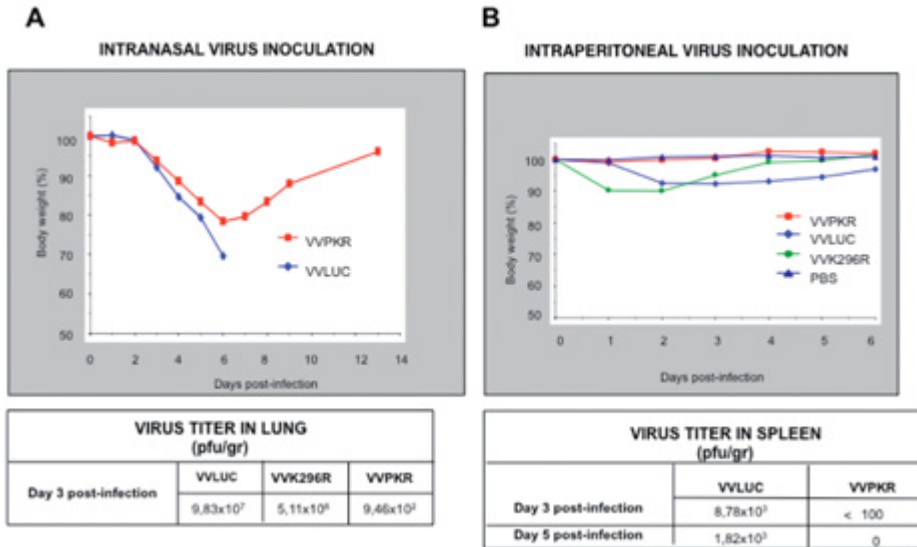


Figure 2. VV-PKR shows reduced pathogenicity in comparison to VVLUC and VV-K296R in C57/BL6 mice. **A.** Mice C57/BL6, four per group, were inoculated with 5×10^7 pfu per mouse of VVLUC or VV-PKR by intranasal route. Mice were weighed daily. Virus was titrated in lungs at third day post-infection. **B.** Mice C57/BL6, four per group, were inoculated with 5×10^7 pfu per mouse with VVLUC, VV-K296R, VV-PKR or PBS by intraperitoneal route at days 0 and 3. Mice were weighed daily. Virus was titrated in spleen at third and fifth days post-infection. Mean values titers are shown.

3.3. Systemic inoculation of VV-PKR in mice with transplantable prostate cancer cells reduces tumour burden

Next we wanted to define if VV-PKR could be used as an oncolytic vector. Thus, C57/BL6 mice were inoculated by subcutaneous route with TRAMP-C1 prostate tumour cells and when the tumour median volume reached 75 to 100 mm³, 10 mice per group were injected by i.p. route with 5×10^7 pfu of different VACV vectors: VV-LUC, VV-PKR and its mutant VV-PKR(K296R), or control PBS. Virus was inoculated twice with the same dose, three days apart. Tumour size was recorded every 3-4 days using a digital caliper. As shown in Figure 4, the tumour size was reduced in mice inoculated with the three viral

vectors, although there was a trend of slightly higher tumour reduction in mice inoculated with the viral vectors expressing PKR. The virus titers at the tumour site remain elevated in animals inoculated with VV-Luc compared to animals inoculated with VV-PKR. At day 5 after the administration of two doses of virus by i.p. inoculation, the mean virus titers in 3 mice were 3.9×10^6 pfu/gr tissue in the tumours of VV-LUC compared to less than 10^2 in VV-PKR.

Previously, it has been shown that virus lacking TK improves the oncolytic activity of VACV (3). Our results showing that VV-PKR exhibits reduced replication in tissues compared to either VV-LUC or VV-PKR(K296R), together with the fact that tumours were reduced similarly by VV-PKR as for the other two vectors, indicate that VV-PKR is a self-limited replication vector with oncolytic activity.

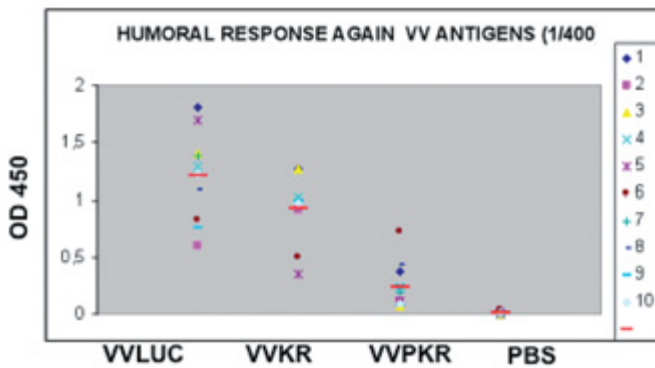


Figure 3. Antibody response against different VACV recombinants. Detection of antibodies against vaccinia virus (by ELISA) in serum obtained 23 days post-infection from mice, four per group, inoculated i.p. twice (days 0 and 3) with 5×10^7 pfu per mouse of each recombinant viruses VVLUC, VV-PKR, VV-K296R or PBS. 96-well plates were fixed with $1 \mu\text{g/well}$ of soluble cell extract from VACV-infected BSC-40 cells. A single serum dilution of 1:400 was used for all samples. Absorbance of serum dilution from each mouse is shown.

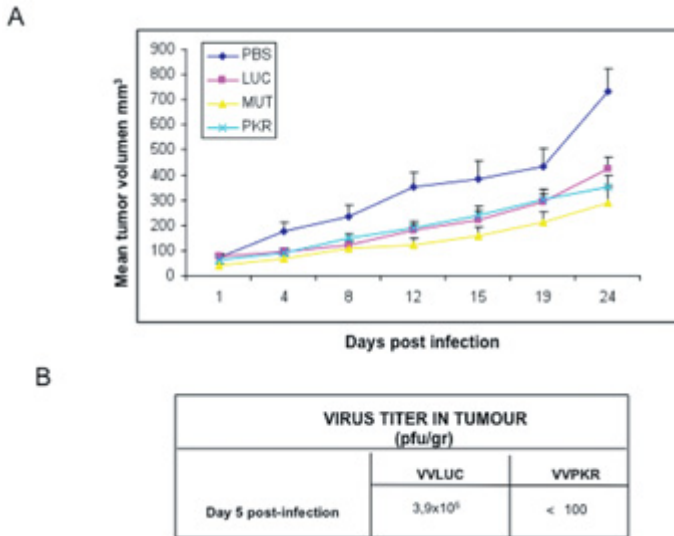


Figure 4. Diminished TRAMP-C1 tumour growth in C57/BL6 mice treated with recombinant vaccinia viruses VV-PKR, VV-K296R and VVLUC. A. Male mice C57/BL6 seven weeks old, 10 per group, were injected by subcutaneous route with 1×10^7 of TRAMP-C1 mouse prostate cancer cells. At the median tumour volume of 75 to 100 mm³ (30 days post-inoculation), mice were injected by intraperitoneal route with 5×10^7 pfu of vaccinia virus VVPCR, VVLUC, VVK296R, or saline PBS on days 0 and 3. Tumours were measured every 3-4 days using digital caliper. **B.** Virus titers in transplantable tumours. Shown are the mean virus titers in pfu/gr of tumour tissue obtained by surgery 5 days after the second dose of virus was administered by i.p. route.

4. DISCUSSION

Oncolytic vaccinia viruses have demonstrated tumour specificity, high levels of transgene expression, and anti-tumour effect (13-15). PKR is an interferon-induced kinase that is able to induce apoptosis through eIF2 α and NFkB modulation, and have a discussed tumour suppressor activity. PKR is also involved in the pathways of several tumour suppressors such as p53, IRF1, ARF and MDA7 (6). To define the contribution of PKR as an oncolytic agent, we have evaluated the antitumoral activity of a recombinant vaccinia virus expressing PKR inserted in the TK locus, in immunocompetent C57/BL6 mice bearing subcutaneous tumours produced by the prostate cancer cell line

TRAMP-C1. We found that VV-PKR replicates efficiently in prostate tumour TRAMP-C1 cultured cells while it expresses low levels of PKR. However, inoculation of VV-PKR in mice by either i.n. or i.p. routes results in reduced virus replication in tissues and animals recovered from viral infection. Significantly, the establishment of an aggressive tumour in mice by subcutaneous inoculation of TRAMP-C1 cells was markedly reduced following systemic inoculation with VV-PKR. This reduction in tumour burden was similar to that induced by viral vectors lacking TK, similar to VV-LUC or the catalytically inactive mutant VV-PKR(K296R). Since VV-PKR also lacks TK but has a reduced capacity to propagate in tissues than either VV-LUC or VV-PKR(K296R), the fact that the vector inhibits the tumour growth similarly as the two other vectors, suggest that the contribution of PKR is important to restrict tumour growth. This could be mediated by activation of PKR in infected tumour cells leading to apoptosis and cell death, while neither VV-LUC or VV-PKR(K296R) are able to induce apoptosis (16, 17). However, we could not detect virus propagation in most of the animals inoculated with VV-PKR at the tumour site, while virus was easily found in tumours from animals inoculated by i.p. with VV-LUC or VV-K296R. This indicates that factors other than virus replication in tumour cells are responsible for PKR-induced tumour reduction. The reduced virus propagation of VV-PKR will have the added advantage that antibody responses against the vector will be minimized. In fact, we observed that in mice inoculated i.p. with VV-PKR the levels of antibodies produced against the virus vector are about 5-fold lower than those triggered by either VV-LUC or VV-PKR (296R). This characteristic made it possible the administration in vivo of repetitive doses of VV-PKR at the tumour site or systemically as shown here, while a fully replicating VACV vector triggering strong antibody response against itself will be more restricted after additional doses of the vector are inoculated.

Why PKR may be an advantage as an inhibitor of tumour growth? Considering its mode of action, PKR has been shown to act in concert with major inflammatory kinases and directly interact with a critical insulin signalling component, suggesting PKR as a core component of a putative metabolic inflammasome that consist of major elements in inflammatory signalling and insulin action, which can represent a central mechanism for the integration of pathogen response and innate

immunity (6, 18). Based on previous observations on the mode of action of PKR and our findings here in mice, we suggest that VV-PKR might exert its antitumour action not by direct virus replication at the tumour site but through the triggering of innate immune pathways. In fact, PKR has been shown to activate multiple signalling pathways (6). By microarray analyses in human tumour cells infected with VV-PKR we have shown that expression of PKR triggered the induction of 111 genes, of which 97 were upregulated, among those the ATF-3 transcription factor involved in stress-induced B-cell apoptosis, which might also contribute to the antitumor activity of PKR (19). Recently, it has been shown that induction of the tumour suppressor p53 by DNA-damaging stress results in significant increase in the expression of PKR and in turn in PKR-associated biological functions like a translational block and apoptosis, thus contributing to tumour suppression (20). Undoubtedly, induction of PKR in the context of a tumour cell together with its activation by the dsRNA provided from the vector VV-PKR has the advantage that it provides the signals that lead rapidly to innate immune cell activation, like the inflammatory complex, and in turn to tumour growth control.

The oncolytic VACV vectors that have been developed to date are either lacking one or several viral genes or expressing exogenous products that improve the killing ability of the virus vector. Among deleted viral genes: TK (thymidine kinase) which produces a nucleotide pool for replication of the viral genomes, vaccinia growth factor (VGF) that activates the epidermal growth factor receptor, and a variety of immunosuppressive proteins, like B18R which binds and sequester type I interferons (4). Improvements in the killing activity of the vector are a variety of molecules, like vectors expressing cytokines, anti-angiogenic agents, agents that disrupt the extracellular matrix to improve viral spread, and prodrug-converting enzymes (21-23). Phase I and II clinical trials are ongoing with some of the oncolytic VACV vectors. The most advanced vector in the clinic is the one that had inactivated both TK and VGF and also expresses GM-CSF (21). While all of the oncolytic VACV vectors developed had full replication capacity, which makes them more vulnerable to attack by CTLs and antibodies, the vector VV-PKR described here has more restricted replication, but importantly triggers low antibody response against itself and reduces tumour burden.

Overall, our studies provided evidence for a new class of an oncolytic VACV vector inducing low levels of PKR in tumour cells and lacking TK, as a product to selectively destroy tumour cells, not by direct killing but probably by the triggering of innate immune mechanisms, like the inflammasome.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported, in part, by Foundation Marcelino Botín and SAF2008-02036. We thank Victoria Jiménez for expert technical assistance and Alan Goodman for editing the manuscript.

6. REFERENCES

1. Willmon, C. L., Saloura, V., Fridlender, Z. G., Wongthida, P., Diaz, R. M., Thompson, J. *et al.* (2009) Expression of IFN-beta enhances both efficacy and safety of oncolytic vesicular stomatitis virus for therapy of mesothelioma. *Cancer Res.* 69(19): 7713-7720.
2. Peplinski, G. R., Tsung, K., Meko, J. B. & Norton, J. A. (1996) Prevention of murine breast cancer by vaccination with tumor cells modified by cytokine-producing recombinant vaccinia viruses. *Ann. Surg. Oncol.* 3(1): 15-23.
3. Buller, R. M., Smith, G. L., Cremer, K., Notkins, A. L. & Moss, B. (1985) Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature.* 317(6040): 813-815.
4. McCart, J. A., Ward, J. M., Lee, J., Hu, Y., Alexander, H. R., Libutti, S. K., *et al.* (2001) Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res.* 61(24): 8751-8757.
5. Obuchi, M., Fernandez, M. & Barber, G. N. (2003) Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. *J. Virol.* 77(16): 8843-8856.
6. Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., *et al.* (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(4): 1032-1060.
7. Gil, J. & Esteban, M. (2004) Vaccinia virus recombinants as a model system to analyze interferon-induced pathways. *J. Interferon Cytokine Res.* 24(11): 637-646.
8. Gil, J. & Esteban, M. (2000) The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene.* 19(32): 3665-3674.

9. Lee, S. B., Green, S. R., Mathews, M. B. & Esteban, M. (1994) Activation of the double-stranded RNA (dsRNA)-activated human protein kinase in vivo in the absence of its dsRNA binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(22): 10551-10555.
10. Rodriguez, J. F., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., McGowan, E. B. & Esteban, M. (1988) Expression of the firefly luciferase gene in vaccinia virus: a highly sensitive gene marker to follow virus dissemination in tissues of infected animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(5): 1667-1671.
11. Lee, S. B., Melkova, Z., Yan, W., Williams, B. R., Hovanessian, A. G. & Esteban, M. (1993) The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potentially inhibits protein synthesis in cultured cells. *Virology.* 192(1): 380-385.
12. Williams, B. R. (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 18(45): 6112-6120.
13. Kirn, D. H. & Thorne, S. H. (2009) Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 9(1): 64-71.
14. Guo, Z. S., Thorne, S. H. & Bartlett, D. L. (2008) Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochim. Biophys. Acta.* 1785(2): 217-231.
15. Gilbert, P. A. & McFadden, G. (2006) Poxvirus cancer therapy. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 1(3): 309-321.
16. Gil, J., Alcami, J. & Esteban, M. (1999) Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol. Cell Biol.* 19(7): 4653-4663.
17. Gil, J., Alcami, J. & Esteban, M. (2000) Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene.* 19(11): 1369-1378.
18. Balachandran, S. & Barber, G. N. (2007) PKR in innate immunity, cancer, and viral oncolysis. *Methods Mol. Biol.* 383: 277-301.
19. Guerra, S., Lopez-Fernandez, L. A., Garcia, M. A., Zaballo, A. & Esteban, M. (2006) Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281(27): 18734-18745.
20. Yoon, C. H., Lee, E. S., Lim, D. S. & Bae, Y. S. (2009) PKR, a p53 target gene, plays a crucial role in the tumor-suppressor function of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(19): 7852-7857.
21. Lee, J. H., Roh, M. S., Lee, Y. K., Kim, M. K., Han, J. Y., Park, B. H., *et al.* (2010) Oncolytic and immunostimulatory efficacy of a targeted oncolytic poxvirus expressing human GM-CSF following intravenous administration in a rabbit tumor model. *Cancer Gene Ther.* 17(2): 73-79.
22. Frentzen, A., Yu, Y. A., Chen, N., Zhang, Q., Weibel, S., Raab, V., *et al.* (2009) Anti-VEGF single-chain antibody GLAF-1 encoded by oncolytic vaccinia virus significantly enhances antitumor therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(31): 12915-12920.

23. Chang, C. L., Ma, B., Pang, X., Wu, T. C. & Hung, C. F. (2009) Treatment with cyclooxygenase-2 inhibitors enables repeated administration of vaccinia virus for control of ovarian cancer. *Mol. Ther.* 17(8): 1365-1372.

***Información de Contacto:**

Dr. Mariano Esteban.

Departamento de Biología Molecular y Celular, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.

e-mail: mesteban@cnb.csic.es

Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells

Adil el Hadri^{1,4*}, María Ángeles Gómez del Río¹, Jesús Sanz², Azucena González Coloma³, Mohamed Idaomar⁴, Bartolomé Ribas Ozonas⁵, Juana Benedí González¹, María Isabel Sánchez Reus¹

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University Complutense Madrid, 28040-Madrid, Spain.

² Instituto de Química Orgánica General (CSIC), Juan de la Cierva, 3, 28006-Madrid, Spain.

³ Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), Serrano, 115, 28006 Madrid, Spain.

⁴ Laboratory of Biology and Health, Faculty of Sciences, University Abdelmalek Essâadi BP 2121, 93002-Tétouan, Morocco.

⁵ Royal National Academy of Pharmacy, Institute of Spain, Farmacia 11, 28004-Madrid, Spain.

Recibido el 29 de abril de 2010.

ABSTRACT

Background: The purpose of the present work is two-fold: the fractionation of *Salvia officinalis* essential oil and the cytotoxic study of this oil with its fractions “*in vitro*” tumor cell lines. **Materials and Methods:** *S. officinalis* essential oil was obtained by hydrodistillation and fractionated with column chromatography; the essential oil and its fractions were analyzed by gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS). The cytotoxic activity was evaluated in cellular lines of breast cancer MCF-7, colon cancer HCT-116, and murine macrophage RAW264.7 cell lines by the MTT assay. **Results:** the sub-subfraction F1.1.1 of *S. officinalis* essential oil containing α -humulene present highest activity on RAW264.7 and HCT-116 with

IC₅₀ values of 41.9 and 77.3 µg/ml, respectively. The sub-subfraction F1.2.1 of *S. officinalis* essential oil with trans-caryophyllene showed less activity on RAW246.7 and HCT-116 with IC₅₀ values of 90.5 and 145.8 µg/ml. Conclusion: This paper suggests that the α-humulene and trans-caryophyllene extracted from *S.officinalis* essential oil inhibit tumor cell growth.

Keywords: *Salvia officinalis*; cytotoxicity; sesquiterpenes; α-humulene; trans-caryophyllene.

RESUMEN

Actividad citotóxica del α-humuleno y del tras-cariofileno de *Salvia officinalis* en dos líneas celulares tumorales animal y humana

Antecedentes: Este trabajo tiene dos objetivos: el fraccionamiento del aceite esencial de la especie *Salvia officinalis* y la determinación de la citotoxicidad del mencionado aceite esencial con sus fracciones en líneas celulares tumorales “*in vitro*”. Material y Métodos: El aceite esencial de *Salvia officinalis* fue obtenido por hidrodestilación y fraccionado mediante cromatografía en columna; el aceite esencial y sus fracciones fueron analizadas mediante cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS). La actividad citotóxica fue evaluada en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7; cáncer de colon HCT-116 y en macrófago murino RAW264.7 con el ensayo MTT. Resultados: La sub-subfracción F1.1.1 del aceite esencial de *Salvia officinalis* que contiene alfa-humuleno presenta la actividad mas acusada frente a las líneas celulares RAW264.7 y HCT-116, con valores de IC₅₀ de 41,9 y de 77,3 µg/ml respectivamente. La sub-subfracción F1.2.1 del aceite esencial de *Salvia officinalis* con trans-cariofileno, muestra menor actividad sobre células RAW246.7 y HCT-116 con valores de IC₅₀ de 90,5 y 145,8 µg/ml respectivamente. Conclusión: Estos resultados sugieren que el alfa-humuleno y el trans-cariofileno de los extractos del aceite esencial de *Salvia officinalis* inhiben el crecimiento de células tumorales.

Palabras Clave: *Salvia officinalis*; citotoxicidad; sesquiterpenos; alfa-humuleno; trans-cariofileno.

1. INTRODUCTION

The genus *Salvia* L. (sage) of the family *Lamiaceae* is an aromatic and medicinal plant and includes about 900 species spread throughout the world. *Salvia officinalis* L. (*S. officinalis*), with the common arabic name *sâlma*, *sâlniya* or *swak en-nâbi*, is a native to the Mediterranean region that is now extensively cultivated all over the world (1). This plant has been known and utilized for hundreds of years in natural medicine, due to its curative properties and good performance in combating various diseases. Recent publications have shown some interesting features of its chemical composition, which is determined by its volatile (2) and nonvolatile compounds, and its applications in antibacterial (3), anti-inflammatory (4), antifungal (5), antiviral (6), antioxidant activities (7) and clinical treatment of Alzheimer's disease (8). Terpenoids and phenolics have been identified as the two major typical products of *S. officinalis* secondary metabolites (9). Among the terpenoids, volatile oils have been largely investigated (9, 10) because of their broad range of applications to culinary, cosmetic, pharmaceutical, and industrial fields. The essential oil composition of *Salvia* species is highly influenced by genetic and environmental factors, climate conditions (11), season, and culture site (10, 12). The strongest active constituents of sage are within its essential oil (1-2.8%), comprising the monoterpenes α - and β -thujone, camphor, 1,8-cineole, and borneol as well as the sesquiterpenes α -humulene and β -caryophyllene in larger amounts; whereas the leaf contains di- and triterpenes, as well (13). The compounds of the essential oils were divided into five groups according to the amount of the major constituents (13):

1. camphor > α -thujone > 1,8-cineole > β -thujone ((14) and our essential oil).
2. camphor > α -thujone > β -thujone > 1,8-cineole (15).
3. β -thujone > camphor > 1,8-cineole > α -thujone.
4. 1,8-cineole > camphor > α -thujone > β -thujone.
5. α -thujone > camphor > β -thujone > 1,8-cineole.

Moreover, many studies have reported antitumor activities of *Salvia* species, especially for *S. miltiorrhiza*, and *S. officinalis* under *in vitro* conditions (16, 17). In addition, *S. officinalis* has also a poten-

tial in treating cancer “*in vivo*” as it shows strong antitumorigenic activities in mice (18).

In this study, we report the chemical composition of *S. officinalis* collected in the north-west of Morocco. The leaf essential oil and its active fractions, subfractions and sub-subfractions obtained were investigated by gas chromatography (GC) and GC/mass spectrometry (GC-MS) analysis. They were tested against two human cancer cell lines (HCT-116, MCF-7) and murine macrophage cell line (RAW264.7) under *in vitro* conditions.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Essential oil

The leaves of *S. officinalis* plant were collected in Tétouan area, north-west of Morocco in June 2008. The botanical identification of *Salvia* plant and the extraction of essential oil were realized in the Biology and Health laboratory of the Département de Biologie, Université Abdelmalek Essaâdi Tétouan. Two thousand grams of fresh material were submitted to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. The white-yellow essential oil was dried over anhydrous sodium sulphate and stored at 4 °C.

2.2. Fractionation of *S. officinalis* essential oil

Column chromatography was used for the fractionation of the essential oil. Fifteen grams of the *S. officinalis* essential oil was fractionated using a column chromatography (1.5 cm× 500 cm) packed with 100 g of silica gel 60, equilibrated with hexan. The column was eluted successively with 250 ml each of n-hexan (100), n-hexan-ethyl acetate (95/5, 90/10, 85/15, 75/25, 50/50, 20/80, 10/90), ethyl acetate (100), and methanol. The organic solvents were removed from the eluates by evaporation under reduced pressure to get nine fractions (F1-F9). The first fraction F1 showed a significant cytotoxic activity and was further fractionated (Table 2). First by preparative thin-layer chromatography (TLC) and achieved using silica gel 60-F₂₅₄-precoated plates

(Merck) with heptane (100) as the mobile phase. The plates were revealed by sparging with vanillin/ sulfuric acid reagent and subsequent heating at 105 °C. Three subfractions were obtained (F1.1, F1.2 and F1.3); the subfractions F1.1 and F1.2 showed a cytotoxic activity in the three cell lines (Table 2). In the same way, the two active subfractions were fractionated again with TLC analysis in silica plates with toluene/ethyl acetate (97/3) as mobile phase, and two sub-subfractions F1.1.1 and F1.2.1 were selected from the subfractions F1.1 and F1.2 respectively.

2.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis

GC-MS analysis of the essential oil *S. officinalis* and of its active fractions was carried out using a Hewlett-Packard 7890 gas chromatograph equipped with a methylpolysiloxane capillary column (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 film thickness) coupled to a Hewlett Packard 5975C mass spectrometer. Ionization of the sample components was performed in electron impact mode (EI, 70 eV). The carrier gas was helium (5psi, 0.7ml/min) and the temperature program was 70 °C for 2min, then 6 °C/min to 270 °C and held constant for 20 min. 1 μ l of a hexane solution at 0.2-1% was injected in the split mode. Volatile components were identified from their retention data and their mass spectra, which were compared with reference data (Wiley mass spectral library). Relative amount was estimated from total ion current peak area.

2.4. Cancer cell lines

The colorectal adenocarcinoma human cell line (HCT-116), human breast cancer cell (MCF-7) and murine macrophage cell line (RAW264.7) were cultured in RPMI-1640 medium (+)L-glutamin, supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 2 mg of gentamicin, 1% sodium pyruvate 100 mM (Invitrogen-Gibco, Madrid, Spain) and 1% D-(+) glucose solution (45%) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Cells were cultured in a humidified atmosphere at 37 °C in 5% CO₂. The cultures were passed twice a week by trypsinization using a trypsin-EDTA (0.05%) solution (Invitrogen-Gibco, Madrid, Spain).

2.5. Chemicals

1,8-cineole, α -thujone, β -thujone, α -humulene, trans-caryophyllene, tamoxifen and different solvents were purchased from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain.

2.6. Measurement of viability using the MTT Assay

Cytotoxicity was assessed using the microtitration colorimetric method of MTT reduction test as described by Mosmann in 1983 (19). The cells were trypsinized, counted and placed in 96-well plates at optimal plating density of each cell line which was determined over a range from 5×10^4 to 10×10^4 . After 24 h, the cells were treated with serial dilutions of the samples. Each sample was initially dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) and further diluted in medium to produce different concentrations. One hundred microliters/ well of each dilution were added to the plates in six replicates to obtain the final concentrations ranging from 12.5 to 800 $\mu\text{g/ml}$ for whole essential oil, their active fractions, subfractions and sub-subfractions, from 1.56 to 100 $\mu\text{g/ml}$ for the commercially available identified constituents (1,8-cineole, β -thujone, α -humulene, trans-caryophyllene). All compounds were dissolved in DMSO and the final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v). Cytotoxic activity of these compounds was expressed as the concentration of drugs inhibiting cell growth by 50% (IC_{50}). Fluorescence was measured on the automated 96-well plate reader at 550 nm. Tamoxifen (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was used as positive control.

2.7. Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate. Data were expressed as means \pm S.D. Differences were evaluated by the one-way analysis of variance (ANOVA) test completed by a multicomparison Dunnett's test. Differences were considered significant at ($*P < 0.05$). The IC_{50} was calculated by a nonlinear regression curve with the use of Prism GraphPad Prism version 5.0 software for Windows. The dose-response curve was obtained by plotting the percentage of inhibition versus the concentrations.

3. RESULTS

3.1. Essential oil, active fractions, subfractions and sub-subfractions compositions

In order to identify active compounds present within the essential oil and its active subfractions, gas chromatography systems were applied. The chemical composition of the essential oil and its fractions, subfractions and sub-subfractions is shown in Table 1. *S. officinalis* essential oil was characterized by 23 compounds (98% of the total oil) of which 18 were monoterpenes, 4 sesquiterpenes and diterpene. The GC-MS analysis revealed the presence of camphor (21.23%), α -thujone (21.22%), 1,8-cineole (17.52%), β -thujone (13.45%), trans-caryophyllene (1.67%) and α -humulene (1.45%). The fractions F1, F2 and F3 represent respectively 92.67%, 96.67% and 91% of the total compounds identified. In the fraction F1, the main compounds were α -pinene (18.56%), trans-caryophyllene (18.32%), camphene (14.81%) and α -humulene (12.38%). In the F2 and F3 fractions the main compounds were α -thujone and 1,8-cineole with 67.05%, 10.88% and 49.06%, 20.72% respectively.

3.2. Cytotoxicity

The cytotoxicity of the essential oil of *S. officinalis* and its fractions in the three cancer cell lines is shown in Figures 1, 2 and 3, and the IC_{50} values are given in Table 2. The first fraction F1 was the most active on the murine macrophage cells RAW264.7 (IC_{50} 118.4 μ g/ml). Less activity was found when the fraction F1 was applied to both cell cultures (279.3 and 265.5 μ g/ml for HCT-116 and MCF-7, respectively). The sub-subfraction (ssf) F1.1.1 obtained from subfraction (sf) F1.1 was more active on the RAW264.7 cells (IC_{50} 41.9 μ g/ml) than on the HCT-116 cells (IC_{50} 77.3 μ g/ml). Less activity was found when the ssf F1.1.1 was applied to MCF-7 cells (IC_{50} 125.7 μ g/ml). The ssf F1.2.1 selected from sf F1.2 was less cytotoxic in RAW264.7 (IC_{50} 90.5 μ g/ml), HCT-116 (IC_{50} 145.8 μ g/ml) and MCF-7 (IC_{50} 144.7 μ g/ml). Commercially available samples of some of the identified main compounds (1,8-cineole, β -thujone, trans-caryophyllene and α -humulene) were tested for their cytotoxic activity *in vitro* on the three

Table 1. Composition of *S. officinalis* essential oil and its fractions, subfractions and sub-subfractions

t _r	Compound	S. officinalis	F1	Sf F1.1	Ssf F1.1.1	F2	Sf F1.2	Ssf F1.2.1	F3
4.16	α-Thujene	0.31	1.76	-	-	1.01	-	-	-
4.3	α-Pinene	3.18	18.57	-	-	-	0.5	-	-
4.54	Camphene	3.67	14.81	-	-	-	1.12	-	-
4.88	Sabinene	0.41	-	-	-	-	-	-	-
4.97	β-Pinene	2.57	9.01	-	-	-	1.11	-	-
5.09	β-Myrcene	1.94	7.47	-	-	1.51	7.612	-	-
5.61	α-Terpinene	0.2	-	-	-	-	0.58	-	-
5.83	Limonene	1.7	7.21	-	-	0.72	1.17	-	-
5.91	1,8-Cineole	17.52	-	-	-	10.88	-	-	20.72
6.38	γ-Terpinene	0.42	2.06	-	-	0.25	2.152	-	-
6.97	γ-Terpinolene	0.28	-	-	-	-	1.28	-	-
7.39	α-Thujone	21.22	-	-	-	5.91	-	-	12.61
7.60	β-Thujone	13.45	-	-	-	67.06	-	-	49.06
8.24	Camphor	21.23	-	-	-	-	-	-	7.72
8.63	Borneol	1.67	-	-	-	-	-	-	-
8.85	Terpinen-4-ol	1.01	-	-	-	-	-	-	-
9.12	α-Terpineol	0.27	-	-	-	-	-	-	-
9.26	Myrtenol	0.28	-	-	-	-	-	-	-
11.18	Bornyl acetate	-	-	-	-	0.77	-	-	0.87
13.4	β-Bourbonene	-	0.1	-	-	-	-	-	-
14.14	trans-Caryophyllene	1.68	18.32	-	-	2.52	66.71	54.23	-
14.32	β-Cubebene	-	0.13	-	-	-	-	-	-
14.54	Aromadendrene	-	0.53	-	-	-	0.75	-	-
14.84	α-Humulene	1.45	12.38	-	81.48	6.05	0.87	-	-
15.26	γ-Cadinene	-	0.32	-	-	-	1.05	-	-
16.04	Calarene	-	-	-	-	-	1.46	-	-
16.5	Δ-Cadinene	-	-	-	-	-	1.31	-	-
17.45	Caryophyllene oxide	0.46	-	-	-	-	-	7.5	-
17.62	γ-Selinene	2.68	-	-	-	-	-	-	-
25.61	Manool	0.37	-	-	-	-	-	-	-
%	Identification	98	92.67	82.28	81.48	96.67	87.65	61.72	91

(*S. officinalis*) *Salvia officinalis* essential oil, (F1) Fraction F1, (F2) Fraction F2, (F3) Fraction F3, (Sf.F1.1) Subfraction F1.1, (Sf.F1.2) Subfraction F1.2, (Ssf.F1.1.1) Sub-subfraction F1.1.1, (Ssf.F1.2.1) Sub-subfraction F1.2.1. t_r: Retention time (as min). % identification: peak area identified relative to total peak area %.

cancer cells, in order to identify and compare the active oil constituents. Interestingly, trans-caryophyllene exerted cytotoxic activity on HCT-116 (IC_{50} 65.2 μ g/ml) and was more active against RAW264.7 (IC_{50} 35.2 μ g/ml), but in the MCF-7 cells it showed less cytotoxicity (IC_{50} > 100 μ g/ml). The results also indicated that α -humulene was active in a similar manner against HCT-116 and MCF-7 cell lines with IC_{50} values of 64.2 μ g/ml and 81.9 μ g/ml, and the highest cytotoxic activity of this constituent (IC_{50} 38.4 μ g/ml) was found in the RAW264.7 cells.

Table 2. Cytotoxic activity of *S. officinalis*, its fraction and subfraction samples. IC_{50} in μ g/ml.

Essential oil, fractions and subfractions	Cell line		
	HCT-116	MCF-7	RAW264.7
<i>Salvia officinalis</i> L.	394.6 \pm 1.4 *	554.4 \pm 1.5	207.5 \pm 0.8 **
Fraction F1	279.3 \pm 3.6 **	265.5 \pm 4.4 **	139.5 \pm 0.6 ***
Subfraction F1.1	217.4 \pm 7.4 **	213.1 \pm 7.1 **	118.4 \pm 2.5 ***
Subfraction F1.2	145.2 \pm 0.6 **	139.7 \pm 6 **	101.8 \pm 4.7 ***
Subfraction F1.3	371 \pm 4.4 *	> 400	264.9 \pm 3.1 *
Fraction F2	316.6 \pm 6.6 **	444.3 \pm 12.6 *	163.7 \pm 2.5 ***
Fraction F3	423 \pm 6.3 *	514.4 \pm 11	143.8 \pm 3.8 ***
Fraction F4	> 800	556.9 \pm 13	> 400
Fraction F5	> 800	> 800	> 400
Fraction F6	> 800	> 800	> 400
Fraction F7	> 800	> 800	> 400
Fraction F8	> 800	> 800	> 400
Fraction F9	> 800	> 800	> 400

Data are given as the mean \pm S.D (three independent experiments). Significantly different from control at * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001, respectively.

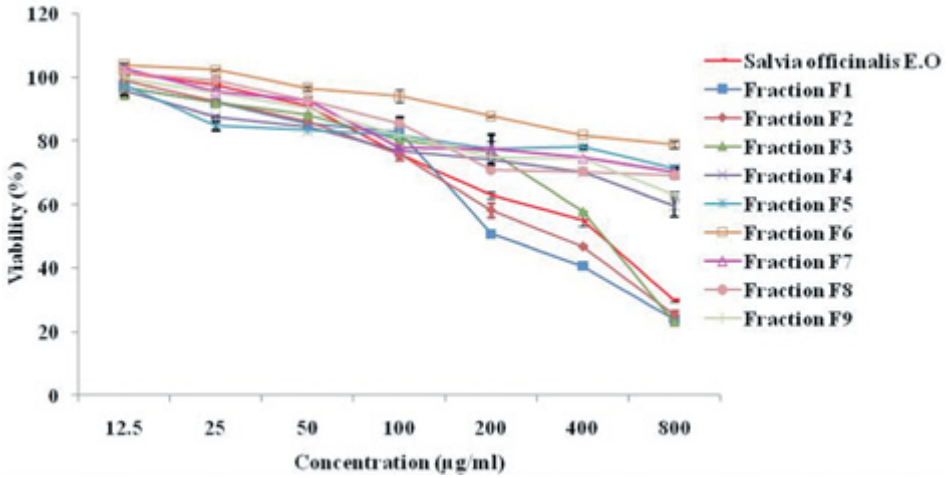


Figure 1. Cytotoxic activity (%) of *S. officinalis* essential oil and its fractions in a dose-dependent pattern (12.5- 800 µg/ml) for the HCT-116 colon cancer cell line. Values are expressed as mean ± S.D of three independent experiments in triplicate.

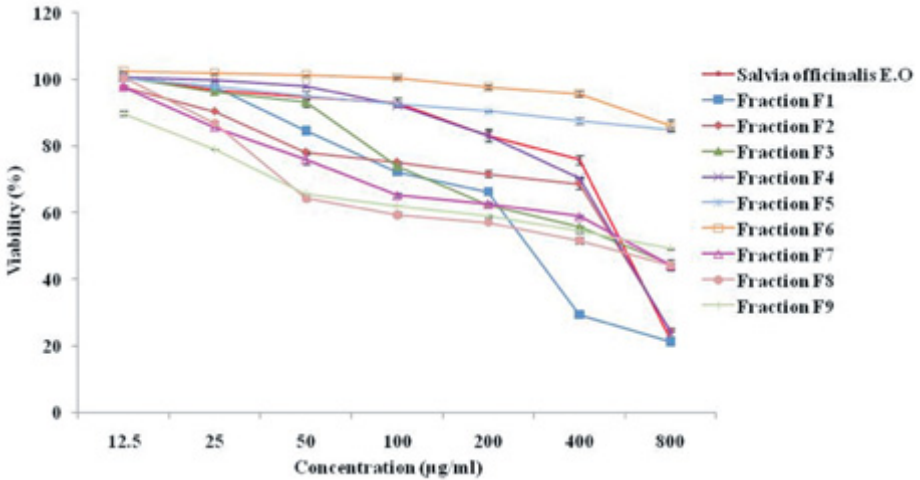


Figure 2. Cytotoxic activity (%) of *S. officinalis* essential oil and its fractions in a dose-dependent pattern (12.5- 800 µg/ml) for the MCF-7 breast cancer cell line. Values are expressed as mean ± S.D of three independent experiments in triplicate.

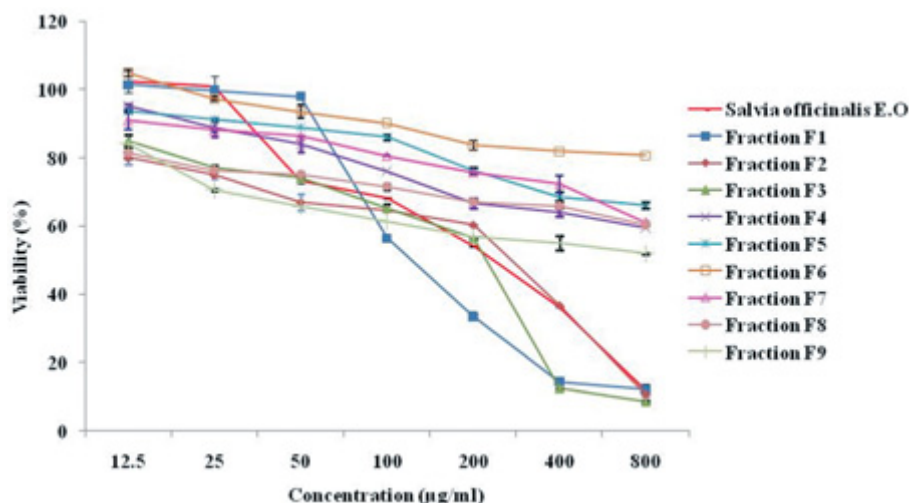


Figure 3. Cytotoxic activity (%) of *S. officinalis* essential oil and its fractions in a dose-dependent pattern (12.5- 800 µg/ml) for the RAW264.7 breast cancer cell line. Values are expressed as mean \pm S.D of three independent experiments in triplicate.

4. DISCUSSION

In our study *S. officinalis* leaf essential oil was analysed with CG-MS and fractionated to identify the mainly cytotoxic compounds in cancer cell lines. This species has been extensively investigated for its chemical composition and pharmacological profile. Some diterpenoid quinones (royleanone-SAR 3, horminone-SAR 26, and horminone-SAR 43) isolated from the roots of *S. officinalis* are able to induce cytotoxic and DNA-damaging activity in human colon carcinoma Caco-2 cells and human hepatoma HepG2 cells *in vitro* conditions (20).

In the ssf F1.1.1, the main compound identified was α -humulene (81.47%) which exhibited high cytotoxic activity in the murine macrophage cells, colorectal adenocarcinoma cells and breast melanoma cells. These results were in accordance with other data which showed that the sesquiterpene fraction of *S. officinalis* with the presence of α -humulene, demonstrate a strong cytotoxic activity in human prostate carcinoma LNCaP cells (21). In the same way,

a previous study reported the cytotoxic activity of α -humulene on PC-3, A-549, DLD-1 and M4BEU tumor cells through glutathione depletion and reactive oxygen species production (22). Similarly, our results showed the production of reactive oxygen species in sesquiterpene sub-subfractions (F1.1.1, F1.2.1) and commercial compounds: α -humulene and trans-caryophyllene (data not shown). The ssf F1.2.1 contained trans-caryophyllene (54.23%) as the main compound and presented less cytotoxicity than ssf F1.1.1 in the three cell lines tested. In some works, the sesquiterpenes α -humulene and trans-caryophyllene are the main active compounds responsible for the anti-inflammatory actions displayed by the essential oil of *Cordia verbenacea* (23). However, the *in vivo* study of α -humulene administered orally to mice was rapidly transported to several important tissues and it was found markedly reduced in some possible inactive mono and di-epoxides (24).

In the present study, the observed variation in cytotoxic activities of the fractions, subfractions and sub-subfractions, can be explained by the sensitivity of the cell line studied. The comparison of results from all *S. officinalis* samples indicates that MCF-7 cells are more resistant than HCT-116 cells, whereas RAW264.7 cells are still more sensitive. Furthermore, the comparison of cytotoxic activity data with the chemical composition of the fractions F1, F2 and F3 of essential oil *S. officinalis* showed that 1,8-cineole and β -thujone were absent in the first fraction F1 which was highly cytotoxic, and both compounds were present in the fractions F2 and F3 (10.87%, 67.05% and 20.72%, 49.06% respectively) with less cytotoxic activity. This observation confirmed that 1,8-cineole and β -thujone were not responsible for the cytotoxicity of our essential oil in all cell lines studied.

5. CONCLUSION

The sesquiterpenes α -humulene and trans-caryophyllene were the main compounds of our sub-subfractions from the essential oil *S. officinalis* and had the ability to inhibit cancer cell growth. In addition, these data suggest that more analysis of the pharmacokinetic parameters of active compounds are necessary before starting the clinical trials.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from the Spanish Agency for International Cooperation and Development (AECID) (2007-2009), Madrid, Spain.

7. REFERENCES

1. Bellakhdar, J. (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle: médecine arabe ancienne et savoirs populaires. 352.
2. Mirjalili, M. H., Salehi, P., Sonboli, A. & Vala, M. M. (2006) Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. *Chem. Nat. Comp.* 42: 19-23.
3. Longaray-Delamare, A. P., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L. & Echeverrigaray, S. (2007) Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 100: 603-608.
4. Baricevic, D., Sosa, S., Loggia, R. D., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A. & Zupancic, A. (2001) Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J. Ethnopharmacol.* 75: 125-132.
5. Daferera, D. J., Ziogas, B. N. & Polissiou, M. G. (2000) GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2576-2581.
6. Watanabe, M., Kobayashi, Y., Ogihara, J., Kato, J. & Oishi, K. (2000) HIV-1 reverse transcriptase inhibitory compound in *Salvia officinalis*. *Food Sci. Tech. Res.* 6, 216-220.
7. Ben Farhat, M., Jordan, M. J., Chaouech-hamada, R., Landoulsi, A. & Sotomayor, J. A. (2009) Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of Tunisian cultivated *Salvia officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10349-10356.
8. Perry, N. S. L., Bollen, C., Perry, E. K. & Ballard, C. (2003) *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharm. Bioch. Beh.* 75: 651-659.
9. Avato, P., Fortunato, I. M., Ruta, C. & D'Elia, R. (2005) Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. *Plant Sci.* 169: 29-36.
10. Santos-Gomes, P. C. & Fernandes-Ferreira, M. (2001) Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2908-2916.
11. Maksimovic, M., Vidic, D., Milos, M., Solic, M. E., Abadzic, S. & Siljak-Yakovlev, S. (2007) Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Bioch. Syst. Ecol.* 35: 473-478.

12. Perry, N. B., Anderson, R. E., Brennan, N. J., Douglas, M. H., Heaney, A. J., McGimpsey, J. A., & Smallfield, B. M. (1999) Essential oils from dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2048-2054.
13. Hethelyi, A. N., Farkas, A., Horvath, G., Lemberkovics, N. & Szoke, E. (2009) Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and sudean sage (*Salvia judaica* Boiss.). *J. Agric. Food Chem.* 57: 4663-4667.
14. Dob, T., Berramdane, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T. & Chelghoum, C. (2007) Chemical composition of the essential oil of *Salvia officinalis* from Algeria. *Chem. Nat. Comp.* 43: 491-494.
15. Bayrak, A. & Akgul, A. (1987) Composition of essential oils from Turkish *Salvia* species. *Phytochem.* 26: 846-847.
16. Sung, H. J., Choi, S. M., Yoon, Y. & An, K. S. (1999) Tanshinone IIA, an ingredient of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, induces apoptosis in human leukemia cell lines through the activation of caspase-3. *Exper. Mol. Med.* 31: 174-178.
17. Liu, J., Shen, H.M. & Ong, C.N. (2000) *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Lett.* 153, 85-93.
18. Ho, C. T., Wang, M., Wei, G. J., Huang, T. C. & Huang, M. T. (2000) Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. *Biofactors.* 13: 161-166.
19. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Meth.* 65: 55-63.
20. Slamenova, D., Masterova, I., Labaj, J., Horvathova, E., Kubala, P., Jakubikova, J. & Wsolova, L. (2004) Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of *Salvia officinalis* L. on colonic and hepatic human cells cultured in vitro. *Basic Clin. Pharm. Toxicol.* 94: 282-290.
21. Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A. & Menichini, F. (2007) Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Res.* 27: 3293-3300.
22. Legault, J., Wivecke, D., Debiton, E., Pichette, A. & Madelmont, J. C. (2003) Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* 69: 402-407.
23. Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., Cunha, F. M. D., Ferreira, J., Campos, M. M., Pianowski, L. F. & Calixto, J. B. (2007) Anti-inflammatory effects of compounds α -humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur. J. Pharm.* 569: 228-236.
24. Chavec, J. S., Leal, P. C., Planowsky, L. & Calixto, J. B. (2008) Pharmacokinetics and tissue distribution of the sesquiterpene α -humulene in mice. *Planta Med.* 74: 1678-1683.

***Información de Contacto:**

Adil el Hadri.

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University Complutense Madrid, 28040 Madrid, Spain.

Tel.: +34617068468.

Fax: +34913941726.

e-mail: ahadri@ucm.farm.es

TSC1-TSC2 complex on the crossroad of pancreatic β cell signaling. Role on cell proliferation, death and survival

Alberto Bartolomé^{1,2,3}, Carlos Guillén^{1,2,3}, Manuel Benito^{1,2,*}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Spain.

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM).

³ These authors contributed equally to this work.

Trabajo galardonado con el Premio FAES Farma 2009 del Concurso Científico de la RANF.

Recibido el 4 de junio de 2010.

ABSTRACT

TSC1-TSC2 complex has emerged as a signal interaction core within the cell. This complex integrates both nutrient and growth factor signaling and is a critical negative regulator of mTORC1. mTORC1 signaling leads to increased protein biosynthesis, which is essential for cell proliferation. Other cellular events such as endoplasmic reticulum stress and autophagy are intimately linked with TSC/mTORC1 pathway and play an important role in pancreatic β cell death or survival. We found that either insulin, glucose independent signaling or the energetic status of the cell are able to modulate TSC2 phosphorylation in pancreatic β cell lines. To show the central role of TSC2 for these cells, we conducted siRNA-mediated TSC2 silencing. Downregulation of TSC2 leads to an increase in mTORC1/p70S6K signaling, this produces resistance to insulin action. However, specific expression of insulin receptor isoform A restored insulin signalling under these conditions. Moreover, we have

explored other processes related to the TSC/mTORC1 pathway and their effect on cell death or survival.

Keywords: TSC2; mTORC1; beta cell; diabetes; insulin.

RESUMEN

Papel del complejo TSC1-TSC2 en la señalización de la célula β pancreática: proliferación, muerte y supervivencia celular

El complejo TSC1-TSC2 ha emergido como un núcleo de integración de la señalización de factores de crecimiento y del estado energético celular. Este complejo funciona como un regulador negativo de la actividad de mTORC1. La señalización a través de mTORC1 dirige la síntesis proteica, esencial para la proliferación celular. Otros procesos como el estrés de retículo y la autofagia están íntimamente ligados a la ruta TSC/mTORC1 y juegan un importante papel en la muerte o supervivencia de las células β pancreáticas. Encontramos que tanto la insulina, como la acción independiente de la glucosa o el estatus energético celular modulan la fosforilación de TSC2 en líneas celulares β pancreáticas. Para demostrar el papel central de TSC2 en la regulación de estas células, hemos silenciado su expresión mediante transfección con ARNi. Una menor expresión de TSC2 lleva a un aumento de la señalización de mTORC1/p70S6K, lo cual produjo un estado de resistencia a la acción de la insulina. Sin embargo, la expresión selectiva de la isoforma A del receptor de insulina consigue salvar esta resistencia. Por otro lado, hemos explorado otros procesos modulados por la ruta como la autofagia o el estrés de retículo, y su efecto en la supervivencia o muerte celular.

Palabras Clave: TSC2; mTORC1; célula beta; diabetes; insulina.

1. INTRODUCTION

β cells are a highly specialized cell type for the production and secretion of insulin, which is required for maintaining metabolic homeostasis. Through a tight regulation of insulin levels, β cells are the en-

ergetic sensor for the metabolic control of the whole organism. Insulin demand is increased under different physiological and pathological conditions, such as pregnancy, obesity or aging (1, 2). These various conditions enforce the β cell mass to adapt to higher insulin synthesis and secretion requirements. Thus, β cell plasticity can be accomplished by an increase in β cell mass, which is the net result of both cell hyperplasia and cell hypertrophy (3). The failure of these compensatory mechanisms results in an insulin deficiency that leads to hyperglycemia and clinical manifestations of type 2 diabetes (3).

Autocrine insulin signaling on β cells has shown to be essential in these compensatory mechanisms (4). On this regard, downstream effectors of insulin signaling such as Akt and the 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) have proven to be positive key regulators of β cell mass (5, 6).

Glucose is the main effector of insulin secretion in β cells, but it also plays a role in β cell proliferation. Mice haploinsufficient for glucokinase are unable to increase β cell mass in response to high-fat diet (7). Furthermore, glucose has been found to stimulate ERK 1/2 activation (8, 9). This activation is independent of insulin signaling as seen in IR $-/-$ β cells (10). Glucose directly increases ATP/AMP ratio inhibiting AMP-activated protein kinase (AMPK) activity.

The TSC1-TSC2 complex is located in the crossroad of this signaling network, integrating different signals to determine the cellular fate through regulation of protein synthesis, cell size and proliferation (11). The GTPase-activating protein (GAP) activity of TSC2 towards Ras homolog enriched in brain (Rheb) negatively regulates mTORC1 signaling. Akt and ERK directly phosphorylates TSC2 leading to an increase in mTORC1 signaling (12, 13). In contrast, AMPK activation has been found to phosphorylate TSC2 and stabilize the TSC1-TSC2 complex, leading to a diminished mTORC1 activity under low energetic states (14). TSC/mTORC1/p70S6K signaling pathway is tightly regulated. Although a diminished mTORC1/p70S6K activity can lead to a decrease in β cell mass and diabetes, its hyperactivity induces an insulin resistance state by a negative feedback loop on IRS-1/2 (15). As the key regulator of protein synthesis, mTORC1 hyperactivity can also lead to endoplasmic reticulum associated stress (ER stress) (16). β cell ER has a high capacity of pro-

tein synthesis and folding, which in turn makes them extremely prone to misfolded protein accumulation (17). Moreover, mTORC1 regulates the autophagic activity of the cell, which has proved to be essential for β cell homeostasis (18).

Just recently, animal models have shown the key role of TSC1-TSC2 complex in pancreatic β cells. Specific disruption of the complex in β cells by either TSC1 (19), TSC2 deletion (20, 21) or Rheb overexpression (22), results in hyperinsulinemia and improved glucose tolerance mainly due to an increase in β cell size.

Alternative splicing of the IR (insulin receptor) results in two isoforms, one encoding the 36 nucleotide exon 11 (IRB) and the other one without it (IRA) (23). The relative expression of the two isoforms varies among different tissues (24), and may play a role in different pathological conditions such as cancer or insulin resistance (25). We have recently observed an increase of IRA in pancreatic islets from inducible-liver IR knock-out (iLIRKO) mice showing compensatory β cell hyperplasia in response to hepatic insulin resistance (26).

Here, we report a differential regulation of TSC2 phosphorylation and mTORC1 signaling by insulin, glucose, or energetic status in pancreatic β cell lines. Also are described its consequences on proliferation, and the involvement of autophagy or ER stress in β cell death or survival.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Antibodies and reagents

All antibodies were from Cell Signaling Biotechnology unless stated otherwise. Exceptions were IR- β (Santa Cruz), TSC1 (Bethyl Laboratories), P-mTOR Ser²⁴⁴⁸ (Biosource), β -actin (Sigma), anti-mono and poly-ubiquitinated protein conjugates FK2 mAb (Enzo Life Sciences). Antibody against P-TSC2 Ser⁶⁶⁴ used for Western-blot was a generous gift from P.P. Pandolfi (Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA). Chemicals were from Calbiochem (U0126, wortmannin and rapamycin) or Sigma-Aldrich.

2.2. Origin of pancreatic β cell lines and cell culture

IR $+/+$ and IR $-/-$ pancreatic β cells from *IR loxP* mice were generated as described before (10). From IR $-/-$ cells, expression of a single IR isoform was reconstituted by retroviral infection, and the differential mRNA splicing was assessed by RT-PCR as previously described (27). TSC2 $-/-$ and TSC2 $+/+$ MEFs were provided by D. J. Kwiatkowsky (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA).

2.3. Cell signalling, Western-blotting and immunofluorescence assays

For cell signaling experiments, cells were serum and glucose starved for 3 h in DMEM containing 0.2 mM glucose and 0.5% bovine serum albumin (BSA), and subsequently stimulated with insulin 10 nM or glucose 5 mM for 5 or 15 min respectively. Inhibitors were added 30 min prior to stimulus. Cells were washed and lysed for protein extraction, protein concentration was determined and samples were subjected to SDS-PAGE for Western-blot according to standard procedures (10). Immunofluorescence, cell cycle and violet crystal assays were carried as described previously (10).

2.4. siRNA transfection

siRNA against the expression of mouse TSC2 was designed and chemically synthesized by Bionova Científica SL. For siRNA transfection, cells were electroporated using Nucleofector II and Cell Line Kit T (Amaxa) following the instructions from the manufacturer. A pool of three different siRNA (2 μ g) was added to the transfection reagent per 2×10^6 cells. After transfection, cells were seeded and protein expression was checked after 24-48 h.

2.5. λ -Phosphatase treatment

100 μ g of total lysates were mixed in λ -Phosphatase Buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM Na_2EDTA , 5 mM dithiothreitol, 0.01% BRIJ

35, 2 mM MnCl₂) with 400 U of λ-Phosphatase (Sigma), and then the mixture was incubated for 1 h at 30 °C.

2.6. Statistics

Statistically significant differences between mean values were determined using paired Student *t*-test for paired comparisons. One-way ANOVA and Tukey tests were used for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at *P* < 0.05.

3. RESULTS

3.1. Characterization of pancreatic β cell lines

Different β cell lines were generated and used in our study (IR +/+, IR -/-, Rec A and Rec B). From an IR -/- β cell line generated in a previous work (10), Rec A and Rec B cell lines were reconstituted by retrovirus-mediated transfection with a human IRA or IRB encoding plasmids. IR levels were measured by Western-blotting (Figure 1A), and RT-PCR of IR exon 11 mRNA determined the specific expression of both isoforms (Figure 1B).

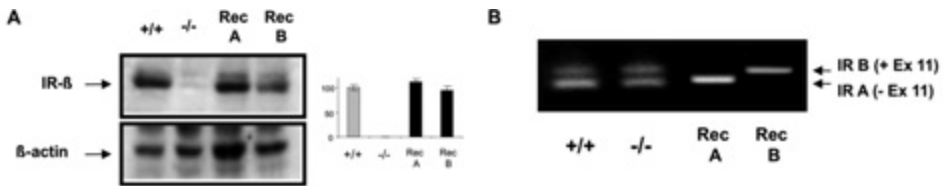


Figure 1. Specific reconstitution of IR isoforms. A) IR expression by Western-blot in the different pancreatic β cell lines: IR +/+, IR -/-, and reconstituted cell lines stably expressing IRA (Rec A), or IRB (Rec B). A densitometric analysis of the IR levels is shown, data are presented as means ± S.E.M. (n = 5). **B)** Total RNA was isolated, and IR exon 11 expression was checked by RT-PCR.

3.2. Insulin stimulates TSC/mTORC1 signaling pathway through PI3K/Akt in pancreatic β cells

To assess the signaling pathway specificity of insulin or glucose-mediated TSC2 phosphorylation, we used selective inhibitors of the class I PI3K (wortmannin 40 nM), and MEK 1/2 (U0126 5 μ M). Use of wortmannin blocked insulin-stimulated Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation and subsequently TSC2 Ser⁹³⁹ and Thr¹⁴⁶² phosphorylation and mTORC1 activity. Inhibition of MEK/ERK pathway did not affect either Akt or TSC2 phosphorylation levels. Surprisingly, although both reconstituted cell lines express similar levels of IR (Figure 1A), wortmannin 40 nM only partially impaired Akt/TSC2 phosphorylation in IRA expressing β cell line. However, this phosphorylation was totally blunted in IR +/+ or IRB expressing β cells (Figure 2). Time-course stimulation also revealed a more sustained phosphorylation of Akt/TSC2 in Rec A cells versus Rec B cells (data not shown). In IR -/- cells, glucose did not stimulate either Akt or TSC2 phosphorylation in these residues. However, glucose stimulated p70S6K Thr³⁸⁹ phosphorylation (Figure 2).

3.3. Glucose activates TSC/mTORC1 signaling via ERK 1/2 independently from insulin signaling in pancreatic β cells

To test whether glucose by itself was capable to stimulate TSC2 Ser⁶⁶⁴ phosphorylation in pancreatic β cells, we submitted IR -/- β cells to 5 mM glucose stimulation. We found a glucose-mediated activation of TSC2 Ser⁶⁶⁴ phosphorylation by Western-blot analysis (Figure 3A). This phosphorylation was completely blunted by the addition of U0126. TSC2 Ser⁶⁶⁴ phosphorylation has been described as a marker of hyperactivation of MEK/ERK signaling in tuberous sclerosis, breast and colon human cancer (28).

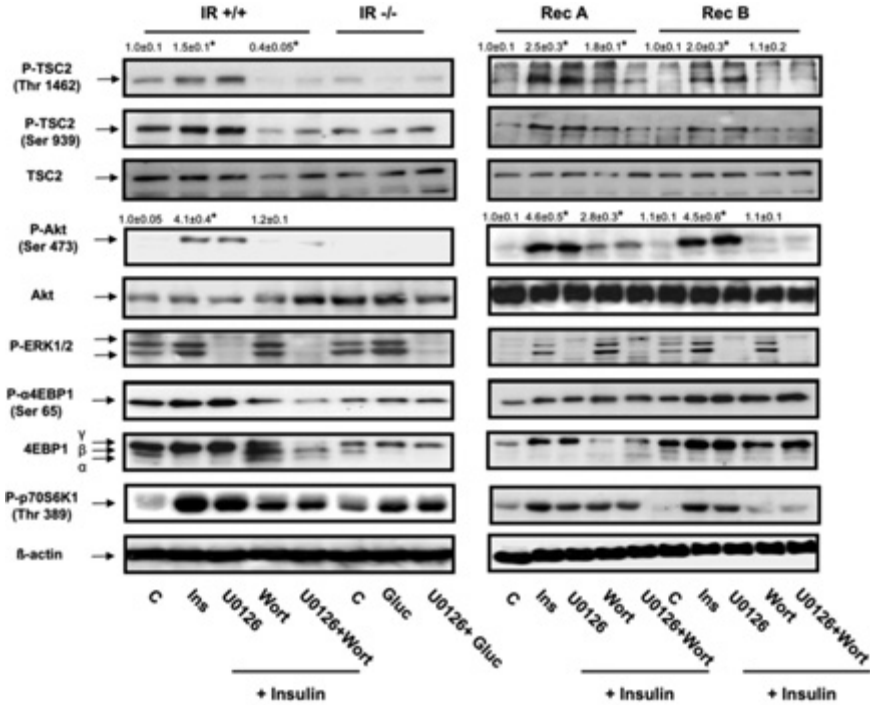


Figure 2. Insulin and glucose action on the PI3K/TSC/mTORC1 pathway. Cells were stimulated with insulin 10 nM for 5 min (IR +/+, Rec A and Rec B), or glucose 5 mM (IR -/-) for 15 min. Specific inhibitors were added 30 min prior to stimulation (wortmannin 40 nM, U0126 5 μM). Protein extracts were collected and submitted to Western-blot with the use of specific antibodies. Blots are representative of three independent experiments. Quantification of the most significant points is shown. Data are presented as means ± S.E.M. **P* < 0.05 compared to control points.

3.4. Energetic status-dependent modulation of mTORC1

AMPK is the energetic sensor of the cell and it is activated by a rise in AMP/ATP ratio (29). Thus, AMPK-Thr¹⁷² phosphorylation is decreased by glucose and increased by 2 deoxyglucose (2-DG) in a dose-dependent manner as well as by 4 mM AICAR in IR +/+ β cells. Activation of AMPK by 2-DG or AICAR addition to the culture medium inhibited mTOR and p70S6K phosphorylation. Conversely, inac-

tivation of AMPK by glucose resulted in an enhancement of mTOR and p70S6K phosphorylation (Figure 3B). Thus, activation of AMPK can directly regulate mTORC1 inhibition. In a similar manner, AMPK activation caused Raptor-Ser⁷⁹² phosphorylation, which has been described as an additional mechanism to downregulate mTORC1 signaling, independently from TSC1-TSC2 complex (30). The role of the TSC complex in energy sensing response was observed, as the phosphorylation of TSC2 by AMPK activation causes a mobility shift of the TSC2 protein in polyacrylamide gel electrophoresis, which is reverted by λ -phosphatase treatment of the samples (Figure 3C).

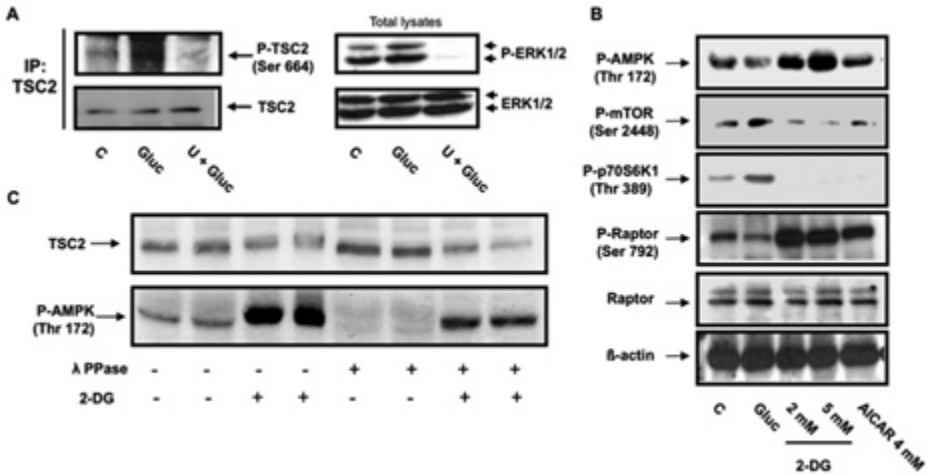


Figure 3. Glucose and energy dependent modulation of TSC2 and mTORC1. **A)** IR ^{-/-} were stimulated with glucose 5 mM for 15 min. U0126 5 μ M was added 30 min prior to the stimulus. Protein extracts were submitted to immunoprecipitation with anti-TSC2 antibody, and blotted with a phosphospecific anti TSC2-Ser⁶⁶⁴ antibody. Total lysates were used for Western-blot against P-ERK 1/2. **B)** IR ^{+/+} cells were stimulated with glucose 5 mM, 2-DG (2-5 mM) or AICAR 4 mM. **C)** IR ^{+/+} cells were stimulated or not with 2-DG 5 mM for 15 minutes, protein extracts were collected and part of the samples were treated with λ -phosphatase. Samples were subjected to SDS-PAGE and incubated with specific antibodies. Blots are representative of at least three independent experiments.

3.5. Effect of TSC2 interference on pancreatic β cell signaling

To assess the importance of TSC complex in the integration of β cell signaling, we targeted the expression of TSC2 with siRNA. A similar rate of TSC2 knockdown was achieved in all the cell lines, close to 70% of protein expression interference (Figure 4B). TSC2 knockdown induced p70S6K basal phosphorylation in all cell lines studied (Figure 4A). TSC2 interference generated insulin resistance, decreasing Akt and p70S6K phosphorylation in response to insulin in IR +/+ (Figure 4, A and C). However, this insulin resistance effect was dependent on the IR isoform expression. Thus, Rec A, but not Rec B cells overcome insulin resistance on Akt Ser⁴⁷³ and p70S6K phosphorylation (Figure 4, A, C and D). In addition, TSC2 interference generated insulin resistance, decreasing ERK 1/2 phosphorylation in IR +/+, Rec A, or Rec B cell lines (Figure 4A). The insulin resistance induced by TSC inactivation in IR +/+ or Rec B cells was blunted by rapamycin treatment, indicating a requirement for mTORC1 signaling. In contrast, the effect observed on ERK 1/2 was rapamycin-independent in all cell lines studied (Figure 4A). In IR -/- cells, TSC2 interference impaired glucose mediated ERK 1/2 phosphorylation. However, glucose induced p70S6K signaling regardless of the presence of the MEK 1/2 inhibitor U0126 through ERK 1/2 independent pathway (Figure 4A, upper right panel). To further investigate the differences between IRA or IRB expression on insulin resistance, we stimulated cells with insulin 10 nM for 15 minutes, and observed a different modulation of IRS-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation. This phosphorylation is mediated by p70S6K, as described before (15), reverted by rapamycin, and upregulated in Rec B cells compared with Rec A or IR +/+ cells (Figure 5).

3.6. Role of the TSC2/mTORC1 pathway in the proliferation of pancreatic β cells bearing IRA or IRB isoforms

To assess the role played by mTORC1 in the proliferation rate of β cell lines studied, we submitted those cells to 10% FBS in the presence or absence of rapamycin 40 nM (Figure 6). The rate of proliferation, as estimated by cell counting, increased by 8-fold in IR +/+ or in Rec B and by 4-fold in IR -/- cells (Figure 6, A and B). In addition, Rec A cells showed a much higher rate of proliferation under the same experimen-

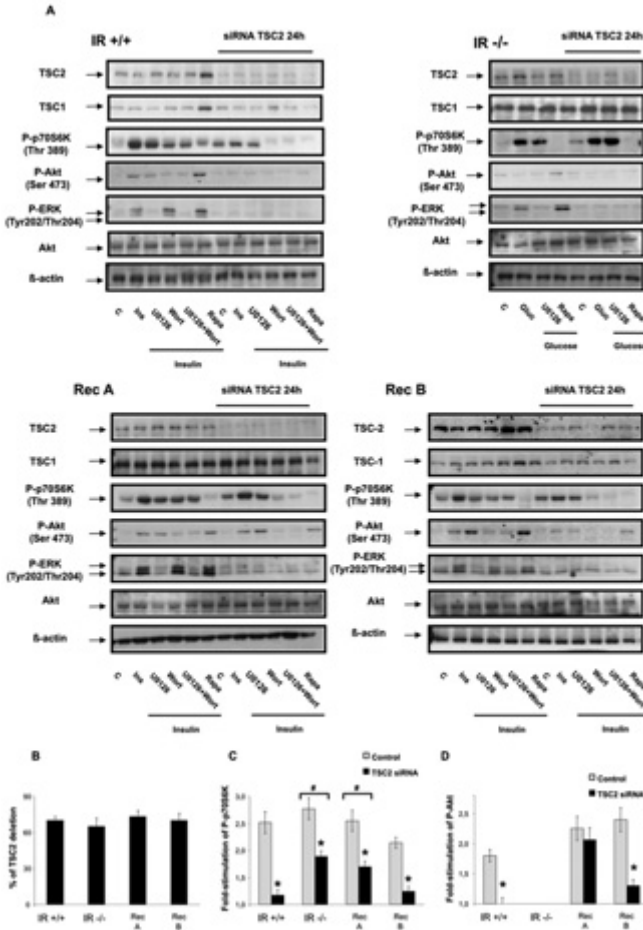


Figure 4. Effect of TSC2 interference on insulin and glucose signaling. **A)** 24 h after siRNA transfection cells were stimulated with insulin 10 nM for 5 min (IR +/+, Rec A and Rec B), or glucose 5 mM for 15 min (in IR -/- cells, right upper panel). Specific inhibitors were added 30 min before stimulation. Blots are representative of four independent experiments. **B)** Densitometric analysis showing the percentage of TSC2 deletion in TSC2-interfered cells compared to control cells. Results are means \pm S.E.M. of the level of interference reached. **C)** Fold-increase of p70S6K Thr³⁸⁹ phosphorylation after insulin or glucose stimulation in control and TSC2-interfered cells. Results are means \pm S.E.M. **P* < 0.05 compared to control cells. The differences between the ratios of fold-stimulation between control and TSC2-interfered cells were calculated and significant differences are indicated #*P* < 0.05. **D)** Fold-increase of Akt Ser473 phosphorylation after insulin or glucose stimulation in control and TSC2-interfered cells. Results are means \pm S.E.M. **P* < 0.05 compared to control cells.

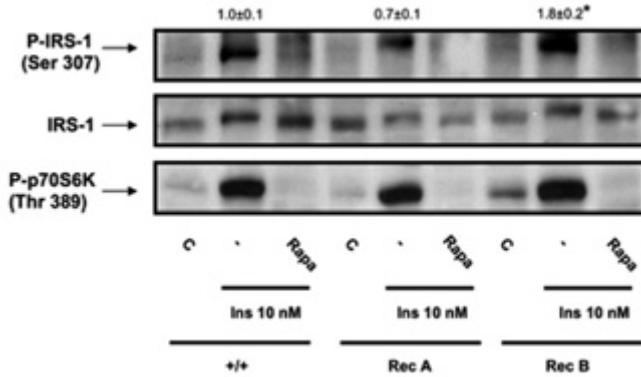


Figure 5. Feedback loop on IRS-1 Ser³⁰⁷ is differentially activated depending on IR isoform expression. Cells were glucose and serum deprived for 3 h, and then were stimulated with insulin 10 nM for 15 min. Rapamycin 40 nM was added 30 minutes before stimulation. Blots are representative of three independent experiments. Results are means ± S.E.M. **P* < 0.05 compared to IR +/+ cells.

tal conditions (10-fold increase). Addition of rapamycin lowered the proliferation rate in all the cell lines studied, but this effect was of different magnitude. In Rec A cells the effect of rapamycin on proliferation was a 4-fold decrease while in Rec B cells only a 2-fold decrease was observed (Figure 6, A and B). Flow cytometry assays showed a tendency in cell size increase after TSC2 interference, although it was not statistically significant (data not shown). In addition, TSC2 interference increased the number of cells in S/G2-M phase in all cell lines studied (Figure 6C). These data were confirmed by crystal violet assays (Figure 6D). Rapamycin treatment reverted the increased proliferation mediated by TSC2 knockdown in all cell lines studied (Figure 6, A, B and C).

3.7. Critical roles of autophagy and ER-stress in β cell death or survival

ER-stress and autophagy are closely related to TSC2/mTORC1 signaling. TSC deficiency is known to lead to ER-stress (16), and mTORC1 blocking with rapamycin is a common way for inducing autophagy in vitro (31). Both processes are also interplaying, as autophagy has a role

in misfolded protein clearance (31). β cells turned out to be more sensible to apoptotic death mediated by chemical ER-stressors when compared to fibroblasts (Figure 7A). Immunofluorescence assays showed that both basal and rapamycin-induced autophagy is sensibly higher in β cells than the observed in fibroblasts, observed as the number of LC3B puncta on cells (Figure 7C). Even more shocking are the differences between both cell types when stained with FK2 mAb against ubiquitin-protein conjugates, which showed higher levels of protein ag-

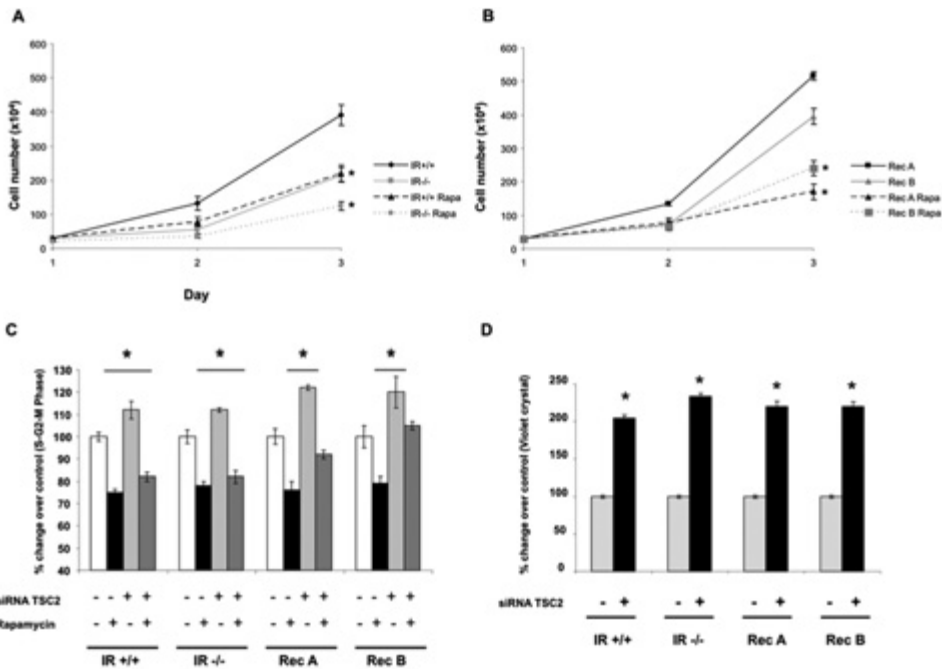


Figure 6. Effect of mTORC1 inhibition or overactivation on β cell proliferation. **A)** IR +/+ and IR -/- cells were counted and seeded at the same density, and grown in glucose 1 g/L 10% FBS-DMEM. At 24 and 48 h, cells were counted. **B)** Same experiment for Rec A and Rec B cells. Results are means \pm S.E.M. * P < 0.05 compared to control points. **C)** Transfected and control cells were grown in glucose 1 g/L 10% FBS-DMEM. DNA content was analyzed by flow cytometry. The bars represent the percentual change of cells in S/G₂-M phase compared to controls for each cell line. **D)** Cells were seeded at the same density. After 24 and 48 h violet crystal stain was measured as described. The differences between absorbances in 24 and 48 h, in control or TSC2 downregulated cells, are represented. Results are means \pm S.E.M. * P < 0.05 compared to controls for each cell line.

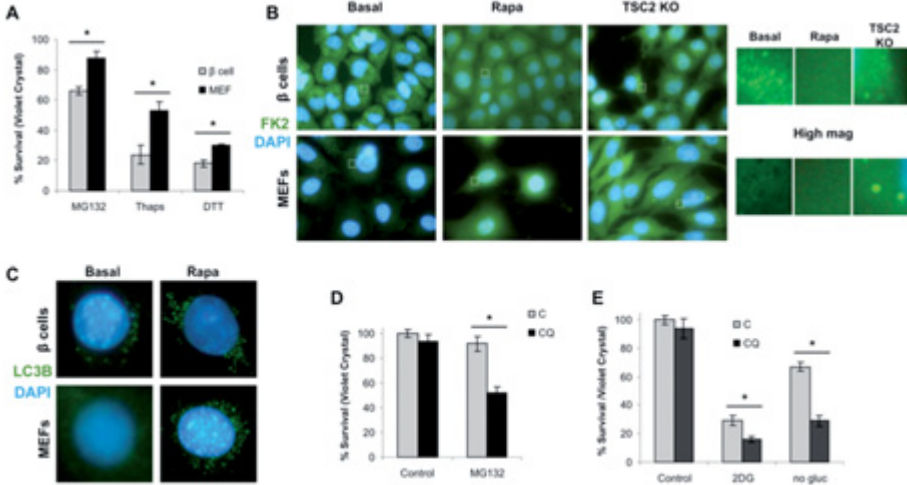


Figure 7. ER-stress and autophagy interplay, effect on β cell death or survival. **A)** Cell survival after 24h treatment with MG132 0,5 μ M; Thaps: Thapsigargin 0,1 μ M; or DTT: dithiothreitol 5 mM, measured by violet crystal assay. **B)** Immunofluorescence against ubiquitin-protein conjugates with FK2 mAb antibody (green), nuclei are counterstained with DAPI (blue). Rapamycin 40 nM treatment for 24 h. TSC2 was interfered with siRNA for 24 h in β cells, TSC2 $-/-$ MEFs were used. **C)** Immunofluorescence against LC3B (green), puncta is indicative of lipidated LC3B accumulation in autophagosomes, while cytoplasmic staining is indicative of no autophagic activity. Rapamycin 40 nM was used for 24 h. **D)** Pancreatic β -cell survival after 24 h treatment with a lower concentration of MG132 (0,1 μ M), and or CQ; chloroquine 25 μ M by violet crystal assay. **E)** β -cell survival after 48 h of glucose deprivation, or 2-DG 5 mM; and or CQ 25 μ M by violet crystal assay. Results are means \pm S.E.M. significant differences are indicated * $P < 0.05$.

gregates in β cells. Interestingly, mTORC1 modulation rendered different outcomes in the accumulation of these conjugates. Rapamycin-mediated blocking of mTORC1 diminished the accumulation observed in β cells. On the other hand, TSC2 interference and the consequent mTORC1 hyperactivation did not further increased staining in β cells. In contrast, TSC2 $-/-$ MEFs showed higher staining when compared with TSC2 $+/+$ MEFs (Figure 7B). Chemical inhibition of autophagy enhances ER-stress, or nutrient starvation mediated cell death in β cells (Figures 7, D and E).

4. DISCUSSION

Recent animal models have pointed out the relevance of TSC1-TSC2 complex acting as a repressor of mTORC1 for the control of β cell mass. Thus, β cell specific knockout models of TSC1 or TSC2, or Rheb overexpression results in an augmented β cell mass, mainly because of a huge cell hypertrophy (19-22). The importance of mTORC1 functioning in human β cells is also patent; progressive impairment in β cell function was observed in patients who received β cell transplantation and were treated with rapamycin as an immunosuppressant (32). We previously demonstrated that insulin or glucose independently induced proliferation signaling in pancreatic β cells of fetal origin (10). Now, we address the important issue of the integration of both independent signaling in the regulation of β cells proliferation.

Insulin stimulation mediates TSC2 phosphorylation in a PI3K/Akt-dependent manner leading to diminished TSC2 activity towards Rheb, and subsequently producing downstream mTORC1 activation (12). More importantly, insulin stimulates Akt/TSC2/p70S6K and MEK/ERKs pathways in either IRA or IRB expressing cell lines. These results contrast with previous data showing specific signaling for each of the IR isoforms (33, 34). However, insulin induced a more sustained signaling in Rec A as compared with Rec B cell lines. In fact, wortmannin did not completely block either Akt or TSC2 phosphorylation in Rec A as compared with Rec B β cells. These results suggest that IRA confers a stronger proliferation capability as compared with IRB in response to insulin, as we recently published in iLIRKO primary islets (26).

Glucose is an essential proliferation and survival factor for pancreatic β cells (7, 10). Glucose stimulation *in vitro* is able to induce ERK 1/2 phosphorylation, independently from insulin secretion in β cells (10). ERK 2 directly phosphorylates TSC Ser⁶⁶⁴ in HEK293T cells (13), and was increased in several human tumours leading to an up-regulation of mTORC1 signaling (28). Neither TSC2 Ser⁹³⁹ nor Thr¹⁴⁶² phosphorylation was observed upon glucose stimulation in β cells. However, TSC2 Ser⁶⁶⁴ was stimulated by glucose in a MEK/ERK-dependent manner. Glucose can also exert its effects on mTORC1 signaling by modulation of ATP levels and therefore by AMPK inhibition. AMPK, on one hand, directly stabilizes TSC1-TSC2 complex (14)

and on the other, modulates an essential component of mTORC1, Raptor (30). AMPK activation implicates a strong inhibition of mTORC1, which can be reverted by glucose addition. We have proven that AMPK activation can induce Raptor Ser⁷⁹² phosphorylation in pancreatic β cells, contributing to energy deprivation-mediated impairment in mTORC1/p70S6K signaling.

TSC2 interference causes an increase in p70S6K activity and insulin resistance in IR +/+ or Rec B β cells on Akt stimulation. Lately, some animal and cellular models have shown the importance of the regulation of mTORC1 in the physiology of β cells. Although mTORC1/p70S6K hyperactivity can lead to IRS-mediated insulin resistance, trials failed to globally diminish it by blocking mTORC1 with the use of rapamycin, because a functional mTORC1 is required for β cell adaptation (35). The inhibition of mTORC1 with rapamycin reverted the insulin resistance on Akt stimulation in our cell lines. More importantly, IRA reconstituted cells overcome the insulin resistance seen above showing insulin-mediated Akt stimulation even though TSC2 knockdown. Our data suggest that the inhibition of the upstream insulin signaling mediated by p70S6K overactivation feedback mechanism, may be differentially modulated in IRA or IRB expressing cells. Phosphorylation of IRS-1 Ser³⁰⁷ is considered a marker of insulin resistance (36). The negative loop concerning IRS-1 Ser³⁰⁷ phosphorylation was upregulated in Rec B cells as compared to Rec A cells in response to insulin. This might explain the differences observed on Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation between Rec A and Rec B cells when we interfered TSC2 expression.

In our β cell lines, we found an increase of proliferation in all cell lines when TSC2 was interfered. This increase was dependent on mTORC1 activity as rapamycin addition blocked the stimulatory effect of TSC2 interference on cell proliferation. Our results point out the higher mitogenic effect of IRA versus IRB isoform in the regulation of β cell proliferation.

Other processes related with TSC2/mTORC1 are also critical for β cell death or survival. We found β cells to be more susceptible to cell death in response to ER-stressors compared with fibroblasts. Both autophagy and ER-stress is basally increased in β cells, observed as the increased number of puncta of LC3B and ubiquitin-protein conjugates, respectively. This may be explained as β cells have a highly deve-

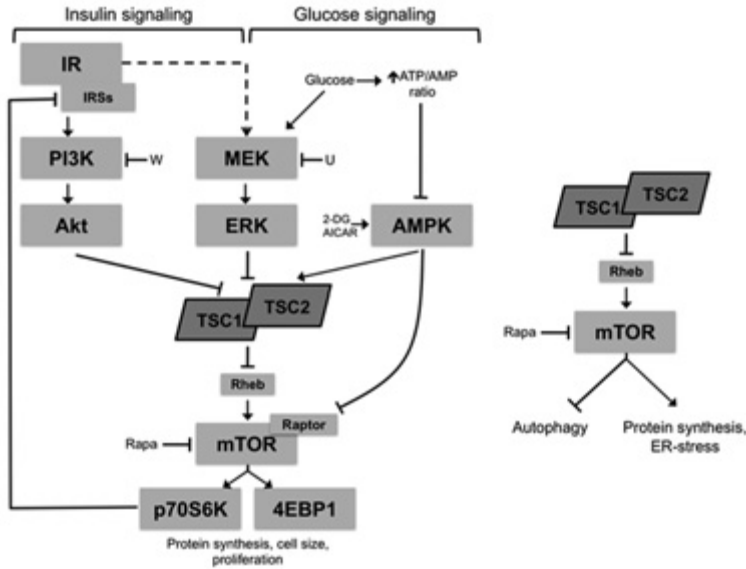


Figure 8. Insulin and glucose signaling toward TSC complex and mTORC1. Integration of insulin or glucose-independent signaling by TSC1-TSC2 complex converging on mTORC1/p70S6K proliferation pathway in pancreatic β -cells. Also is depicted the effect on autophagy and ER-stress.

veloped ER specialized for the production of insulin, and any stress such as in vitro culture makes them prone to misfolded protein accumulation, and extremely sensible to ER-stress mediated cell death. We believe that the basal autophagic level observed in β cells may be a direct consequence of the higher misfolded protein accumulation. Finally, we found autophagy to be protective under certain conditions such as glucose starvation or ER-stress.

In conclusion, here we described the relevance of TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose independent signaling in pancreatic β cell proliferation (Figure 8). This complex participates coordinating multiple signals from either energetic or hormonal status, determining the functioning of protein synthesis through mTORC1. This route has been described as critical for β cell mass maintenance, and may play a very important role in the β cell mass hyperplasia associated with insulin resistance states. Also, the role of autophagy and

ER-stress may be involved in β cell death or survival. At this stage, the relative expression of IRA versus IRB within the β cells may play an essential role in the regulation of pancreatic β cell proliferation. A better knowledge of the molecular mechanisms involved in β cell plasticity is needed to understand its role in type 2 diabetes progression.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Silvia Fernández and Gema García for their technical assistance. This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation Grants SAF2005/00014, SAF2007/60058, and SAF2008/00031. A. B. acknowledges an FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

6. REFERENCES

1. Sorenson, R. L. & Brelje, T. C. (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm. Metab. Res.* 29(6): 301-307.
2. Pick, A., Clark, J., Kubstrup, C., Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S. & Polonsky, K. S. (1998) Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes.* 47(3): 358-364.
3. Muoio, D. M. & Newgard, C. B. (2008) Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9(3): 193-205.
4. Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S. & White, M. F. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 391(6670): 900-904.
5. Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C. M. & Permutt, M. A. (2001) Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J. Clin. Invest.* 108(11): 1631-1638.
6. Pende, M., Kozma, S. C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Le Marchand-Brustel, Y., Klumperman, J., Thorens, B. & Thomas, G. (2000) Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature.* 408(6815): 994-997.
7. Terauchi, Y., Takamoto, I., Kubota, N., Matsui, J., Suzuki, R., Komeda, K., Hara, A., Toyoda, Y., Miwa, I., Aizawa, S., Tsutsumi, S., Tsubamoto, Y., Hashimoto, S., Eto, K., Nakamura, A., Noda, M., Tobe, K., Aburatani, H., Nagai, R. &

- Kadowaki, T. (2007) Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 117(1): 246-257.
8. Frödin, M., Sekine, N., Roche, E., Filloux, C., Prentki, M., Wollheim, C. B. & Van Obberghen, E. (1995) Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J. Biol. Chem.* 270(14): 7882-7889.
 9. Briaud, I., Lingohr, M. K., Dickson, L. M., Wrede, C. E. & Rhodes, C. J. (2003) Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 52(4): 974-983.
 10. Guillen, C., Navarro, P., Robledo, M., Valverde, A. M. & Benito, M. (2006) Differential mitogenic signaling in insulin receptor-deficient fetal pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 147(4): 1959-1968.
 11. Huang, J. & Manning, B. D. (2008) The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* 412(2): 179-190.
 12. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.-L. (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4(9): 648-657.
 13. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Pandolfi, P. P. (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* 121(2): 179-193.
 14. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.-L. (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 115(5): 577-590.
 15. Harrington, L. S., Findlay, G. M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N. R., Cheng, S., Shepherd, P. R., Gout, I., Downes, C. P. & Lamb, R. F. (2004) The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166(2): 213-223.
 16. Ozcan, U., Ozcan, L., Yilmaz, E., Düvel, K., Sahin, M., Manning, B. D. & Hotamisligil, G. S. (2008) Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Molecular Cell.* 29(5): 541-551.
 17. Osłowski, C. M. & Urano, F. (2010) The binary switch between life and death of endoplasmic reticulum-stressed beta cells. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17(2): 107-112.
 18. Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., Kawamori, R., Fujitani, Y. & Watada, H. (2008) Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 8(4): 325-332.
 19. Mori, H., Inoki, K., Opland, D., Muenzberg, H., Villanueva, E. C., Faouzi, M., Ikenoue, T., Kwiatkowski, D., Macdougald, O. A., Myers Jr, M. G. & Guan, K. L. (2009) Critical roles for the TSC-mTOR pathway in [beta]-cell function. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297: E1013-E1022.
 20. Rachdi, L., Balcazar, N., Osorio-Duque, F., Elghazi, L., Weiss, A., Gould, A., Chang-Chen, K. J., Gambello, M. J. & Bernal-Mizrachi, E. (2008) Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(27): 9250-9255.

21. Shigeyama, Y., Kobayashi, T., Kido, Y., Hashimoto, N., Asahara, S., Matsuda, T., Takeda, A., Inoue, T., Shibutani, Y., Koyanagi, M., Uchida, T., Inoue, M., Hino, O., Kasuga, M. & Noda, T. (2008) Biphasic response of pancreatic beta-cell mass to ablation of tuberous sclerosis complex 2 in mice. *Mol. Cell. Biol.* 28(9): 2971-2979.
22. Hamada, S., Hara, K., Hamada, T., Yasuda, H., Moriyama, H., Nakayama, R., Nagata, M. & Yokono, K. (2009) Upregulation of the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway by Ras homolog enriched in brain in pancreatic beta-cells leads to increased beta-cell mass and prevention of hyperglycemia. *Diabetes.* 58(6): 1321-1332.
23. Seino, S. & Bell, G. I. (1989) Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159(1): 312-316.
24. McClain, D. A. (1991) Different ligand affinities of the two human insulin receptor splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol. Endocrinol.* 5(5): 734-739.
25. Denley, A., Wallace, J. C., Cosgrove, L. J. & Forbes, B. E. (2003) The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm. Metab. Res.* 35(11-12): 778-785.
26. Escribano, O., Guillén, C., Nevado, C., Gómez-Hernández, A., Kahn, C. R. & Benito, M. (2009) β Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes.* 58(4): 820-828.
27. Nevado, C., Benito, M. & Valverde, A. M. (2008) Role of insulin receptor and balance in insulin receptor isoforms A and B in regulation of apoptosis in simian virus 40-immortalized neonatal hepatocytes. *Mol. Biol. Cell.* 19(3): 1185-1198.
28. Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Bonner, P., Bernardi, R., Franz, D. N., Witte, D., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P. P. (2007) Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer Res.* 67(15): 7106-7112.
29. Towler, M. C. & Hardie, D. G. (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* 100(3): 328-341.
30. Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. & Shaw, R. J. (2008) AMPK phosphorylation of rapTOR mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell.* 30(2): 214-226.
31. Ogata, M., Hino, S.-i., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J. A., Urano, F. & Imaizumi, K. (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 26(24): 9220-9231.
32. Desai, N. M., Goss, J. A., Deng, S., Wolf, B. A., Markmann, E., Palanjian, M., Shock, A. P., Feliciano, S., Brunnicardi, F. C., Barker, C. F., Naji, A. & Markmann, J. F. (2003) Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: local immunosuppression or islet toxicity? *Transplantation.* 76(11): 1623-1625.
33. Leibiger, B., Leibiger, I. B., Moede, T., Kemper, S., Kulkarni, R. N., Kahn, C. R., de Vargas, L. M. & Berggren, P. O. (2001) Selective insulin signaling through A

- and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Molecular Cell*. 7(3): 559-570.
34. Uhles, S., Moede, T., Leibiger, B., Berggren, P. O. & Leibiger, I. B. (2007) Selective gene activation by spatial segregation of insulin receptor B signaling. *FASEB J*. 21(7): 1609-1621.
 35. Fraenkel, M., Ketzinel-Gilad, M., Ariav, Y., Pappo, O., Karaca, M., Castel, J., Berthault, M.-F., Magnan, C., Cerasi, E., Kaiser, N. & Leibowitz, G. (2008) mTOR inhibition by rapamycin prevents beta-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes. *Diabetes*. 57(4): 945-957.
 36. Shah, O. J. & Hunter, T. (2005) Tuberous sclerosis and insulin resistance. Unlikely bedfellows reveal a TORrid affair. *Cell Cycle*. 4(1): 46-51.

***Información de Contacto:**

Dr. Manuel Benito de las Heras.

Department of Biochemistry and Molecular Biology II. Faculty of Pharmacy.
Universidad Complutense de Madrid. Spain.

Tel.: +34 91 394 17 77; FAX: +34 91 394 17 79

e-mail: benito@farm.ucm.es

SESIONES CIENTÍFICAS

20 de mayo

Mesa Redonda organizada por la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales sobre el Balneario de Baños de la Concepción, en Albacete.

27 de mayo

Conferencia del Ilmo. Sr. D. José Manuel Bautista Santacruz, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV en la Facultad de Veterinaria de la UCM, titulada: “Progreso clínico y fenotipo molecular de la malaria cerebral en ratón”.

28 de mayo

Toma de posesión como Académico Correspondiente extranjero del Prof. Prof. Kazuhide Inoue, Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Profesor del Departamento de Farmacología Molecular y Sistemas de la Kyushu University en Japón, quien pronunció una conferencia sobre: “The role of spinal microglia in neuropathic pain” y fue presentado por la Excm. Sra. Dña. M.^a Teresa Miras Portugal, Presidenta de la RANF.

10 de junio

Mesa Redonda coordinada por el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez, titulada: “Un nuevo concepto, la polypill”. Actuarán como ponentes los Prof. Dres. D. José Luis López-Sendón Hentschel, Jefe de Servicio de Cardiología en el Hospital Universitario La Paz de Madrid: “Factores de riesgo, prevención primaria y secundaria” y D. Antonio Guglietta, Director de I+D del Grupo Ferrer Internacional: “Desarrollo farmacéutico de una polypill cardiovascular”.

17 de junio

Toma de Posesión como Académica de Número de la Excma. Sra. Dña. M.^a José Alonso Fernández, quien leyó su discurso titulado: “Ciencia y salud global: la brecha del desarrollo”. Le contestó en nombre de la Corporación el Excmo. Sr. D. José Luis Vila Jato.

7 de octubre

Mesa Redonda sobre: “La Biotecnología en el descubrimiento de nuevos medicamentos”. Ponentes: Dr. Pablo Ortiz Betés, Director General de DIGNA BIOTECH: “La transferencia de conocimientos de biotecnología en el descubrimiento de medicamentos” y Dr. José María Fernández Sousa-Faro, Presidente de ZELTIA: “El desarrollo de medicamentos de origen marino”.

14 de octubre

Conferencia del Dr. José Javier Lucas, Profesor de Investigación del CSIC en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, titulada: “Patogénesis y reversibilidad de la enfermedad de Huntington: estudios en ratones transgénicos”.

21 de octubre

Toma de posesión como Académico Correspondiente Extranjero del Prof. Henri R. Manasse, Executive Vice President and Chief Executive Officer de la American Society of Health-System Pharmacists (USA), quien pronunció su discurso titulado: “Accountability in Pharmacy Practice”. Fue presentado por el Académico de Número Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

21 de octubre

Conferencia del Dr. Francisco González de Posada, Académico Correspondiente de la RANF, titulada: “El principio de matematicidad de la Naturaleza: Aplicación a las ciencias de la Farmacia”.

26 de octubre

Sesión científica en colaboración con el COFM y el Instituto Tomás Pascual Sanz titulada: “La grasa dietética en la prevención y tratamiento de las enfermedades crónicas”, a cargo de los Drs. Concepción Aguilera y Ángel Gil, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

28 de octubre

Conferencia de la Dra. Icíar Astiasarán Anchía, Académica Correspondiente de la RANF, titulada: “Legislación sobre etiquetado de alimentos”.

4 de noviembre

Conferencia del Dr. Enrique Fernández-Caldas Rodríguez, Académico Correspondiente de la RANF, titulada: “Desarrollo de nuevas vacunas antialérgicas”.

10 de noviembre

Jornada organizada por el Instituto Tomás Pascual para la Nutrición y la Salud, el Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid y la Real Academia Nacional de Farmacia sobre: “Innovación terapéutica y factores de protección frente a la enfermedad de Alzheimer”. Ponentes: Jesús Benavides Yanguas y Pablo Martínez Martín. El Dr. Benavides es neurofarmacólogo y el Dr. Martínez Marín es Director científico del Proyecto Alzheimer de la Fundación Reina Sofía.

11 de noviembre

Mesa Redonda conmemorativa del 2010 Año Internacional de la Biodiversidad. Coordinador: Excmo. Sr. D. Mariano Esteban

Rodríguez, Académico de Número de la RANF. Presentación a cargo del Prof. D. Daniel Sánchez Mata, Académico Correspondiente de la RANF. Actuaron como ponentes el Dr. D. Gonzalo Nieto Feliner, Director del Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC: “Diversidad vegetal: ¿Qué hay detrás de este concepto?, ¿Cuánto conocemos?, ¿Cuánto perderíamos?” y el Prof. D. Ricardo Amils Pibernat, Catedrático de Microbiología, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid, CSIC: “Biodiversidad en ambientes ácidos extremos”.

11 de noviembre

Mesa Redonda organizada por la Comisión de Aguas Minerales y Mineromedicinales sobre el Balneario de Baños de la Concepción, en Albacete. Ponentes: Dra. Dña. Esperanza Torija Isasa: “Análisis físico-químico de las aguas del balneario”, Dras. Dña. Ángeles Moso Romeo y Dña. Carmen de la Rosa Jorge: “Estudio Microbiológico de las aguas del balneario”, Dr. D. Francisco Monturiol Rodríguez: “Estudio de los suelos del término municipal del balneario” y Dra. Dña. Josefina San Martín Bacaicoa: “Acción terapéutica de las aguas del balneario”.

18 de noviembre

Mesa Redonda sobre “Seguridad del paciente Oncológico. Innovación Tecnológica en la Cadena Terapéutica”. Organizada por la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria y patrocinada por la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF. Presentación a cargo de los Dres. Dña. M.^a Teresa Miras Portugal, Presidenta de la RANF y D. José Luis Poveda Andrés, Presidente de la SEFH. Intervino como moderador, D. Víctor Jiménez Torres, Académico de Número de la RANF. Ponentes: Dr. Luis Manso Sánchez, Adjunto del Servicio de Oncología Médica en el Hospital Doce de Octubre, Madrid: “Seguridad del Paciente en la Prescripción de Antineoplásicos”, Dra. Irene Mangues Bafalluy, Adjunto del Servicio de Farmacia en el Hospital Arnau de Vilanova, Lérida: “Seguridad del Paciente en la Preparación y Dispensación de Antineoplásicos” y Dra. Alicia Herrero Ambrosio, Jefe de

Servicio de Farmacia en el Hospital Universitario La Paz, Madrid:
“Seguridad del Paciente en la Administración de Antineoplásicos”.

25 de noviembre

Toma de Posesión como Académica Extranjera de la Dra. Cristina M. Rondinone, Directora de Investigación y Jefe de Departamento de Enfermedades Metabólicas en Hoffmann-La Roche, quien pronunció su discurso titulado: “Descubriendo nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la diabetes de tipo 2”. Le presentó la Excma. Sra. Dña. M.^a Teresa Miras Portugal, Presidenta de la RANF.

La Presidenta de nuestra Corporación, Excma. Sra. D.^a M.^a Teresa Miras Portugal, ha sido nombrada «Farmacéutica ejemplar». El acto tuvo lugar el pasado 22 de mayo en el Palacio de Fonseca, antigua Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela. Recibió el galardón de manos de la Presidenta de la Asociación de Antiguos alumnos de dicha Facultad, Dña. Asunción Lamas. Realizó la laudatio de la homenajeadada el Excmo. Sr. D. José Miñones Trillo, Decano de la Facultad y Académico de Número de nuestra Institución.

* * *

El Embajador de Japón en España, Excmo. Sr. D. Fumiaki Takahashi, visitó nuestra Sede el viernes 28 de mayo con motivo de la toma de posesión como Académico Correspondiente extranjero del Prof. Kazuhide Inoue, Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Profesor del Departamento de Farmacología Molecular y Sistemas de la Kyushu University en Japón. El Dr. Inoue pronunció una conferencia sobre: «The role of spinal microglia in neuropathic pain» y fue presentado por la Excma. Sra. Dña. M.^a Teresa Miras Portugal, Presidenta de la RANF. El Embajador inauguró minutos antes, la Sala de nuestro Museo dedicada al arte japonés Ukiyo-e, con 500 grabados donados por el Académico Correspondiente extranjero en Japón, Dr. Goino, descubriendo una placa conmemorativa. El Embajador ofreció una cena en su residencia, a la que acudieron la Presidenta y Secretario de la Academia y una representación de la Industria farmacéutica japonesa en España, que transcurrió en un ambiente muy agradable y distendido, comprometiéndose ésta a una colaboración con nuestra Academia.

* * *

La Excma. Sra. D.^a Rosa Basante Pol, ha sido elegida por la Real Academia Nacional de Farmacia, reunida en Asamblea Plenaria el 10 de junio, nueva Académica de Número de la Institución. La Dra. Basante ocupará la medalla n.º 23, cuyo antecesor fue el Excmo. Sr. D. Juan Manuel Reol Tejada. La Dra. Basante es profesora de Historia de la Farmacia y Legislación del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Complutense. Ha sido vicerrectora de

dicha universidad y viceconsejera de la Comunidad de Madrid, durante el mandato de D. Alberto Ruiz Gallardón. Es muy conocida en los medios culturales y sobre todo taurinos, perteneciendo a la comisión taurina de la Comunidad de Madrid. Es autora de numerosos libros y artículos sobre su especialidad y ha dirigido también tesis doctorales y tesinas de licenciatura. Actualmente, era Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y es miembro de número de la de Doctores. Nuestra Academia se felicita por tan valiosa adquisición.

* * *

El pasado día 9 de junio de 2010 se celebró en la sede de la RANF, la sesión anual de la Academia Española de Nutrición de Madrid. Entre las diferentes actividades realizadas se procedió a la entrega de las Medallas de Académico de Honor y a la Entrega de los Premios Mataix 2010 de la Academia. Tras el acto se celebró una comida en el casino de Madrid.

* * *

El Excmo. Sr. D. César Nombela Cano fue elegido por unanimidad el 22 de junio, Presidente de la sección 6.^a de Historia, Legislación y Bioética, sucediendo en el cargo al Excmo. Sr. D. Guillermo Giménez Gallego.

* * *

El Ministro de Trabajo, Celestino Corbacho, entregó el 29 de junio en Madrid, la Medalla de Oro al Mérito en el Trabajo a la científica cartagenera María Cascales Angosto. Académica de la Real Academia Nacional de Farmacia, fue la primera mujer española que ingresó en una Real Academia científica (en 1987). También recibieron la medalla, entre otros, la periodista Rosa María Mateo y los componentes del «Dúo Dinámico»: Ramón Arcusa y Manuel De la Calva. La Dra. Cascales dijo: «No sé si el concepto bíblico de trabajo tal como Dios lo introdujo en el Paraíso Terrenal cuando castigó a Adán con la sentencia «trabajarás con el sudor de tu frente» puede aplicarse a mi. La Investigación Bioquímica a la que he dedicado mi vida activa, me ha producido gratificaciones inmensas, de tal manera que me han llevado a sentir por ella verdadera adicción. Hoy, ya jubilada, es mucho lo

que añoro la mesa de laboratorio y los experimentos de cada día... y trato de seguir ocupada en temas de mi especialidad para sentirme viva. La Medalla al Mérito del Trabajo que acabo de recibir de manos del Señor Ministro, me produce gran satisfacción y legítimo orgullo y tengo que agradecer de todo corazón a quienes han evaluado mi actividad de manera tan generosa como para encontrarla digna de esta máxima distinción. Quiero compartir esta distinción con mis familiares y amigos que hoy me acompañan en esta sala».

* * *

El 6 de agosto falleció el pintor farmacéutico Nicolás Forteza Forteza, que fuera galardonado con nuestra Medalla Carracido en 2005. La Real Academia Nacional de Farmacia, que estaba preparando una exposición de sus obras para el curso próximo, lamenta tan sensible pérdida. El artista compaginó su pasión por el arte con la farmacia que regentaba durante más de 25 años y expuso su obra en más de cien muestras. De formación autodidacta, en 1951 realizó su primera exposición individual en Palma, labor que llevó de la mano con su profesión de farmacéutico, hasta que se desprendió de su farmacia y se dedicó exclusivamente a la pintura. Dentro de su corriente postimpresionista de carácter local, el artista sustentó su carrera al cultivo del paisaje mallorquín siendo parajes como Serra Nord, Deià, Pollença, Valldemossa o Alcúdia, algunas de las protagonistas de sus telas.

* * *

Nuestro Académico de Número, Prof. Dr. Benito del Castillo ha sido nombrado Presidente de la Comisión Nacional de la Real Farmacopea Española, que depende de la Agencia del Medicamento del Ministerio de Sanidad y Política Social. En esta prestigiosa Comisión figuran también como vocales nuestros Académicos Fidel Ortega y Gloria Frutos. Además, ha sido nombrado Académico Honorario y padrino de la Academia de Farmacia de Paraguay. El Dr. Amarilla, Presidente de esta Institución declaró: «El Plenario Académico de la Academia de Ciencias Farmacéuticas del Paraguay en su sesión extraordinaria de fecha 28 de agosto de 2010 ha tenido el honor de designar a D. Benito del Castillo como Académico Honorario de esta institución. Debido a los relevantes méritos profesionales y personales que revisten su persona y en total coincidencia con el Art. 10º del Estatuto de la Academia se ha to-

mado esta resolución de la que nos sentimos extraordinariamente complacidos. Estamos convencidos que su incorporación como Académico Honorario dará lustre y prestigio a nuestra novel institución».

* * *

El Profesor Ángel Villar del Fresno, Académico de Número de esta Institución, fue galardonado el 16 de septiembre en la Asamblea General del XXIX Congreso Internacional celebrado en Granada, con la medalla Canals, el más alto honor que concede la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino. El objeto de la Sociedad es el de establecer una colaboración científica, profesional y cultural entre farmacéuticos, universitarios y profesionales relacionados con las ciencias farmacéuticas de los Países miembros de la Sociedad. También se le concedió el título de «Presidente de Honor del Grupo Español».

* * *

Nuestro Académico Correspondiente Juan Hernando Costa, falleció en Madrid el 25 de septiembre. Era profesor de Edafología en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense y fue vicedecano de la misma.

* * *

El pasado mes de septiembre, el Excmo. Sr. D. Eugenio Sellés ha sido nombrado Presidente General de la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino. La Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino es una sociedad internacional constituida por tres grupos nacionales: español, francés e italiano y reúne por tanto a farmacéuticos de estos tres países. Desde su fundación en 1953, ha tenido como objetivo primordial establecer una colaboración científica, profesional y cultural entre farmacéuticos y profesionales relacionados con las ciencias farmacéuticas.

* * *

Presidido por Sus Majestades los Reyes de España, Don Juan Carlos I y Doña Sofía, acompañados por el Ministro de Educación D. Ángel Gabilondo y la Presidenta de la RANF, Doña María Teresa Miras Portugal, se ha celebrado en nuestra sede el solemne acto de apertu-

ra del curso de las Reales Academias del Instituto de España. Tomó en primer lugar la palabra la Presidenta de nuestra Corporación. En su intervención, puso de manifiesto el agradecimiento de la Academia por la presencia de Sus Majestades. Por otra parte, puso énfasis en el papel de las Academias como transmisoras del conocimiento a las futuras generaciones y en el esfuerzo realizado por éstas para abrirse a la Sociedad. El Académico Secretario de la RANF D. Antonio Doadrio, en representación del Instituto de España, leyó el informe de las actividades del pasado curso de las Academias integradas en aquel. Entre los diferentes cometidos realizados resaltó el homenaje a Miguel Delibes, así como el homenaje a Sabino Fernández Campo. Respecto a las actividades realizadas en la RANF, destacó la inauguración de un canal privado por internet, así como la atención que ha puesto esta institución en las enfermedades olvidadas. En la lectura de la lección inaugural a cargo de nuestro académico de número D. José Luis Vila Jato, éste habló de los fármacos indicando que el principio activo, componente fundamental de éstos, debe estar en armonía con las propiedades terapéuticas. También, se refirió a la importancia de la liberación de los medicamentos como instrumento de regulación de la dosis. Este aspecto es de vital importancia, ya que en función de las formas de dosificación se pueden aplicar dosis mayores o menores, con la consiguiente disminución de efectos secundarios. Además, hizo un repaso histórico para esta ciencia que tiene menos de 50 años de antigüedad así como en los estudios de biodisponibilidad. A continuación, el Ministro de Educación D. Ángel Gabilondo, agradeció el apoyo de la Corona a las Reales Academias expresando su gratitud por el trabajo realizado. También, mencionó la entrada en vigor del Real Decreto del 17 de Septiembre por el que se refunda el Instituto de España y que, según el Ministro, mejorará la capacidad de autogobierno de las Reales Academias. Finalmente y para cerrar el acto tomó la palabra Su Majestad el Rey D. Juan Carlos I. En su intervención, hizo mención al respeto de la corona hacia las Reales Academias y felicitó a los nuevos académicos que tomaron posesión el curso pasado y tuvo un recuerdo para los que nos dejaron. En este sentido hizo alusión a D. Juan Manuel Reol como anterior presidente de la RANF. Refiriéndose concretamente a nuestra Institución, puso de manifiesto su brillante trayectoria en la transmisión del conocimiento, mencionando expresamente la digitalización del archivo histórico y el portal multimedia. También se refirió a la renovación de los estatutos y

a la labor realizada por D. Salustiano del Campo al frente del Instituto de España, así como al nuevo presidente D. Víctor de la Concha y al secretario general D. Pedro García Barreno. El acto terminó declarando el Rey inaugurado el nuevo curso 2010-2011.

* * *

El Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza, Académico de número de la RANF ha sido nombrado recientemente presidente de la recién creada Comisión Internacional contra la Pena de Muerte. En el acto celebrado en la Moncloa agradeció al Gobierno español esta iniciativa y recordó que aún hay 58 países que mantienen vigente la pena capital. Trabajaremos, dijo, para lograr “la erradicación total de esta pena inhumana”. José Luis Rodríguez Zapatero, en su comparecencia tras la creación de la Comisión Internacional contra la Pena de Muerte, ha resaltado la “ejemplar trayectoria” de su presidente, Federico Mayor Zaragoza, en la defensa de los derechos humanos.

* * *

Joan Guinovart ha sido nombrado nuevo miembro de la Real Academia de Farmacia de Cataluña. En la toma de posesión ha pronunciado el discurso “La biomedicina, una área de futuro para la farmacia catalana”. El Dr. Guinovart ha defendido que el sector farmacéutico puede experimentar en las próximas décadas un crecimiento sin precedentes gracias a los avances en ciencias de la vida, muy especialmente en biología molecular. Para el director del IRB Barcelona, “hoy nos encontramos frente a un nuevo paradigma en el descubrimiento de fármacos. La actividad es hoy tan compleja, que de ella no se puede ocupar sólo la industria farmacéutica sino que también tendrán un papel clave la Genómica, la Bioinformática y la Biología Estructural”. El discurso de contestación lo ha elaborado el Académico de Honor, Joan Massagué, que fue discípulo de Guinovart y con quien continúa teniendo lazos profesionales por su cargo de director adjunto del IRB Barcelona. Massagué ha alabado la trayectoria del profesor Guinovart como farmacéutico, académico, líder científico y personalidad vital para el progreso de la ciencia en Cataluña.

* * *

