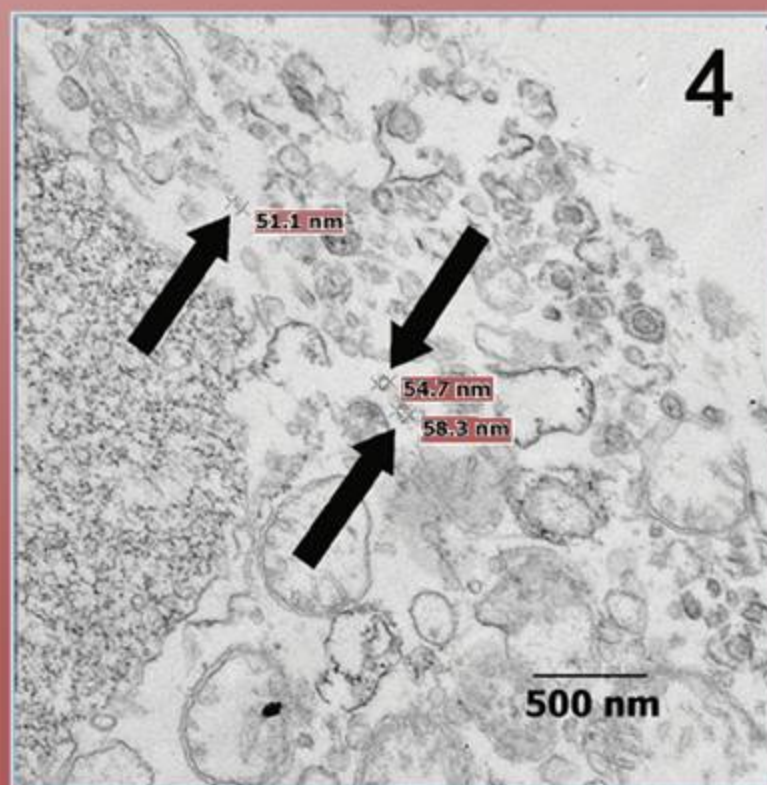
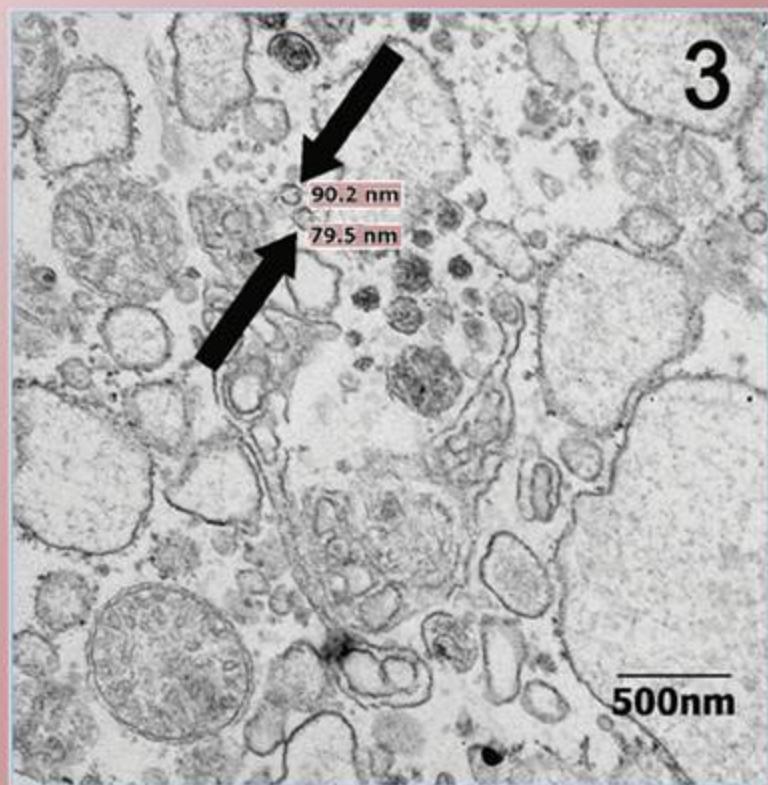


ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 80 | Número 1 | Enero-Marzo 2014



www.analesranf.com

ISSN 1697-4271



REAL ACADEMIA
NACIONAL DE
FARMACIA



Instituto
De España



Ministerio de
Educación Cultura
y Deporte

Publicación científica electrónica trimestral

Madrid, Spain

Academia Nacional Joven: ¿vamos a dejar pasar el tren para España?

Ana María Pascual-Leone Pascual

Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

El 28 de enero de 2014, convocada por el Excmo. Sr. D. Alberto Galindo Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y, a su vez, actualmente, Presidente del Instituto de España, tuvo lugar, en su sede, una reunión con el título “La Primavera de Academias Jóvenes” (The Young Academy Spring).

Los ponentes, por orden de actuación y después de la inauguración y bienvenida de D. Alberto Galindo Tixaire, fueron:

- Prof. Volker ter Meulen, co-Presidente de la Inter- Academy Panel (IAP)
- Prof. Weiss, ex Presidente de la Global Young Academy (GYA)
- Prof. Hans Hilgenkamp, antiguo miembro de la Dutch Young Academy (Academia Joven Alemana)

El Acto se cerró celebrando una Mesa Redonda sobre la creación de una Academia Joven Española y lo clausuraron el Prof. Jorge Sainz González, Director General de Política Universitaria del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte y el Excmo. Sr. D. Alberto Galindo, Presidente del Instituto de España.

PONENCIA DEL DR. MEULEN

“THE ROLE OF THE GLOBAL NETWORK OF THE SCIENCE ACADEMIES “ (EL PAPEL DE LA RED GLOBAL DE ACADEMIAS DE CIENCIAS)

El Dr. Meulen presenta la IAP, Consorcio de Academias de Ciencias, cuyas redes se extienden por América, Asia, África y Europa, como un foro independiente internacional que tiende puentes a las academias de ciencias del mundo para desarrollar mutuas colaboraciones, para adoptar posiciones comunes y acciones sobre asuntos globales y regionales de importancia para el futuro de la clase humana. También ayuda para establecer y apoyar a gentes meritorias en lugares donde no existe ninguna base cultural, y de esa forma facilitar el fichaje de jóvenes científicos. Desarrollando cuestiones de significación global y facilitando la colaboración entre Academias científicas y otras instituciones.

La IAP ha estado estructurada en dos vertientes, la de Ciencias y la Médica. En su nueva estructura sus intereses se dirigirán a cuestiones de Política Científica, Ciencias y Salud. La IAP está constituida por 106 miembros.

El Dr. Meulen fue Presidente de la Academia Leopoldina, de gran prestigio mundial, creada en Alemania en el siglo XVII. Las colaboraciones con jóvenes científicos comenzaron en la IAP en 2008 y, desde entonces, viene también siendo soporte de las Academias Nacionales Jóvenes (National Young Academies, NYAs) y de la Global Academia Joven (Global Young Academy, GYA).

PONENCIA DEL DR. WEISS

“THE GLOBAL YOUNG ACADEMY : THE VOICE OF YOUNG SCIENTISTS AROUND THE WORLD” (LA ACADEMIA JOVEN GLOBAL : LA VOZ DE JÓVENES CIENTÍFICOS ALREDEDOR DEL MUNDO)

El Prof. Weiss es el primer Co-Presidente de la Global Academia Joven mundial (GYA) y pertenece al Departamento de Química y Biología Molecular de la Universidad de California, viene a hablar en primer lugar de la GYA y a patrocinar la creación de Academias Nacionales Jóvenes en los diferentes países del mundo. El Prof. Weiss hace su investigación en nanotecnología aplicada a la biofísica, membranas proteicas y evolución molecular. Con él los otros Co-Presidentes de la GYA son una profesora tailandesa y un profesor de Sud-África.

La GYA promueve a) La investigación de las tres “I”: interdisciplinariedad, intergeneracionalidad e internacionalidad, b) Propicia el diálogo Ciencia – Sociedad. c) Representa el interés de jóvenes escolares, d) Ayuda al desarrollo de sus miembros y, por último, e) tiende puentes en varias vertientes; promueve la igualdad y eleva la calidad de la investigación nacional y a lo ancho del mundo. Finalmente, promueve y sostiene, también, la formación de Academias Jóvenes Nacionales

Se fundó en Berlín en 2010 y pronto tuvo una ayuda crucial de la IAP y estatus de observador en sus reuniones y, además, de la Academia Leopoldina. Desde 2014 recibe fondos del Ministerio Federal de Educación e Investigación Alemán y también de fundaciones privadas. Sus miembros se seleccionan a través de Academias Nacionales y otras Instituciones Científicas de reputación. También aceptan nominaciones personales. En la selección se tiene en cuenta excelencia en sus estudios y motivación en los fines de la Academia ya expuestos. Sus miembros tienen de 30-40 años, después de 3-10 años de acabado el Doctorado, y solo pertenecen a la GYA 4 años.

La idea de la GYA surgió de discusiones entre jóvenes científicos que acudían a Foros económicos del tipo de la “Summer Davos”. Actualmente tiene 155 miembros de 55 países.

El Dr. Weiss afirma que la primera Academia Nacional Joven fue la alemana en el año 2000 Die Junge Akademie (DJA). Entre 2000-2007 se fundaron: en Alemania, Holanda, Austria, Sudan. Entre 2009-2014 en Tailandia, Nigeria, Egipto, Pakistán, Suecia, Sud-África, Japón, Escocia, Dinamarca, Israel, Malasia y Kenia. Finalmente, se ha creado en Canadá donde se llama Academia de Ciencias Artes y Humanidades dentro de la Royal Academy of Canadá.

Sus sugerencias para la Academia Nacional Joven Española son tener altas aspiraciones para proveer auténticas y efectivas voces, tratando de convocar a los jóvenes científicos con fines de ayudar a la política científica y estimular nuevas vocaciones para la ciencia. Ayudar a la interfase Ciencia -Sociedad y avanzar en la calidad de la investigación española y la innovación. El criterio para la selección de miembros: excelencia en investigación, además de voluntad y compromiso de servicio. La GYA brinda el consejo y el soporte en la formación de la Academia Nacional Española como hace siempre en las Academias Nacionales.

Quizá sea esta ponencia donde se da más información básica sobre lo que se propone, y también ideas claras de lo que quieren hacer y cuáles son sus fines.

Se pretende una globalización de la cultura. Una globalización intergeneracional, aprovechando por una parte la experiencia de los mayores y, por otra, la creatividad de la juventud y, además, se intenta extender la cultura a todas las naciones del Mundo. Teniendo en cuenta, además, todas las vertientes culturales. De alguna manera, supone una globalización cultural total en el mundo unida a una gran solidaridad. Es una ampliación educativa absolutamente nueva, correspondiendo, incluso cronológicamente, al cambio de milenio. Los patrocinadores de esta idea, en principio son alemanes, país culturalmente, sin duda, de alto nivel. Se diría que es una innovación salida de un país culto que reflexiona.

Las personalidades que hasta ahora están patrocinando la idea son de muy alta calificación en todos los países. Desde el año 2000 en que se formaron y concibieron las Academias Jóvenes Europeas dentro, entonces del marco de la ALLEA (All European Academies), se ha consolidado, reformado y enriquecido la idea primaria. También se ha clarificado la elección de sus miembros a jóvenes entre 30-40 años y con al menos 4 años de haber finalizado su Doctorado.

La idea de contribuir globalmente, en todo el Mundo, a la política educativa es absolutamente revolucionaria y puede tener en el futuro consecuencias enormes mejorando las sociedades humanas. Creo que en nuestro país este aire fresco nos ventilaría la casa y nos puede ayudar en muchas vertientes; por ejemplo en el diálogo Ciencia-Sociedad que tanto se echa de menos actualmente.

El entusiasmo en su intervención arrastraba al oyente abierto a una mente solidaria donde lo haya ... por eso creo que la idea es imparabile .

Uno de sus fines primordiales es lograr el diálogo.... Y ello, creo yo, cambia los comportamientos sociales siempre.

PONENCIA DEL DR.HILGENKAMP

“(STARTING)A NATIONAL YOUNG ACADEMY; EXPERIENCES FROM THE NETHERLANDS AND OTHER EUROPEAN COUNTRIES”“(COMENZANDO) UNA ACADEMIA NACIONAL JOVEN; EXPERIENCIAS DESDE HOLANDA Y OTROS PAÍSES EUROPEOS)

La ponencia del Dr.Hans Hilgenkamp, que fue miembro de la Academia Joven Alemana entre 2005-2010 y pertenece al Instituto de Nanotecnología y Facultad de Ciencias y Tecnologías en la Universidad de Twente, Enschede , en Holanda, fué la más centrada en el tema de las NYAs y la que más puede aportar cosas concretas para la Academia Nacional Joven de España.

Explica que su actual Academia Nacional Joven Holandesa, se estableció en 2005 después de cinco años de establecida la alemana y recogiendo su experiencia. Tiene 50 miembros, los cuales permanecen 5 años. Cada año 10 miembros salen y 10 entran. También dice que entran un hombre y una mujer paralelamente, asegurando así la igualdad numérica de sexos en la población de la Academia. Se seleccionan por la Juntas Universitarias, por los Centros de investigación, o por Instituciones de alta calidad cultural. También Decanos de Centros de Arte y Humanidades, y cita que se implica en su selección la Academia Nacional Alemana. y las Redes Nacionales de Mujeres Profesoras en Holanda. Dice que se tiene absoluta transparencia en las Comisiones y en los criterios de selección. Los miembros tienen de 30-40 años y entran después de 10 años de terminada su Tesis Doctoral. Los fines de su Academia: 1).Interacciones científicas e interdisciplinaria 2) Política científica y 3) Ciencia-Sociedad.

CONCLUSIONES

Es evidente que a partir del año 2000 ha comenzado un replanteamiento, en Europa, y llevado a cabo en Alemania, de la importancia política y económica de la cultura para los países del Mundo. Estas ponencias rezuman, en primer lugar, “globalización” a gran escala. Los científicos que las elaboran, es claro, para el que los oye o para el que los lee, que se sienten Ciudadanos del Mundo. Y lo que es más importante Solidarios de sus habitantes. Parece que en vertiente cultural es una llamada a un esfuerzo compartido para que la clase humana no deje perder ninguna vocación cultural, ni ninguna creatividad innovadora. Ese y no otro parece ser el esfuerzo que se pide para la creación de las llamadas Academias Jóvenes Nacionales.

También es cierto que en la creación de ellas se piensa y se demanda, desde el principio, a estructuras suprauniversitarias, concebidas y constituidas por

gentes ya formadas y que se supone han sido ya reconocidas en sus países como personas de excelencia cultural.

En las tres ponencias se remarca la importancia tanto en las Academias Jóvenes Nacionales (NYAs), como en la Global Academia Joven (GYA), que es mundial, la importancia de conseguir y cultivar tres vertientes: la interdiscipliniedad, la intergeneracionalidad y por último la internacionalidad. Lo que ellos llaman las tres "I".

Todo ello hace caer por su peso, en vertiente cultural, la "superespecialización" que, sin duda, se creó con un afán desmedido económico y que parece haber fracasado.

Hoy la **CULTURA** con mayúscula cambia de rumbo. Y se quiere cambiar comenzando por los jóvenes excelentes escolares de todo el Mundo.

Con la intergeneracionalidad se quiere recoger y rendir culto a las gentes, ya no jóvenes, que han sostenido la cultura en sus países y no desaprovechar su posible sabiduría.

Con la internacionalidad se cuenta con la globalización de la cultura, y la posible ayuda a países no muy desarrollados culturalmente. No cabe duda de que ello supone un avance enorme de planteamientos que honra a la humanidad actual.

Pero creo que, de cualquier modo, el impulso para crear la Nacional Joven Academia de España no tiene que partir, en primer lugar, del Ministerio, creo que ello corresponde pensarlo, crear comisiones y estructurarlo a las Academias Senior agrupadas y reunidas por el Instituto de España, y por ello, en principio, se han dirigido a él.

En la primera reunión que hubo de estos temas en el Instituto de España, en febrero de 2010, siendo yo Vicepresidente de nuestra institución, se incitaba a crear una Academia Joven en España dentro del marco europeo, pero la idea no resultaba clara. Se habló de tenerlo ultimado para 2012, pero actualmente la idea se ha perfilado en cualquier vertiente que se considere. Se ha globalizado, se habla de Nacionales Academias Jóvenes NYAs, englobadas en la Global Academia Joven que es mundial y que ya ha sido creada en Berlín en 2010 y a la cual pertenece medio mundo; sus miembros son de 55 países. Ahora la idea parece imparable y es sostenida por personalidades de gran prestigio en cada país ¿vamos a dejar pasar el tren para España?



M^a del Carmen Avendaño López

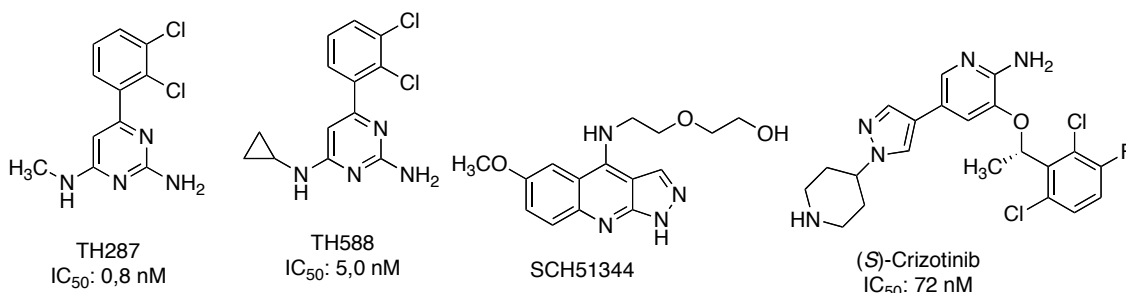
Académica de número de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrática de Química Orgánica.
e-mail: avendano@ucm.es

Recibido el 2 de abril de 2014

An. Real Acad. Farm. Vol 80, N° 1 (2014), pág. 9-13

“New Anticancer Target Identified: Cancer cells need MTH1 enzyme to thrive; inhibiting it kills them”. Chem. Eng. News 2014, 92, p. 9

Tres recientes publicaciones confirman que la enzima MTH1, conocida también como NUDT1, resulta crítica para que las células cancerosas proliferen. Una de estas publicaciones es la de Thomas Helleday (del Instituto Karolinska de Estocolmo) y sus colaboradores, que han validado esta enzima como una diana anticáncer y han desarrollado dos inhibidores: TH287 y TH588 (1). Otra es la de Giulio Superti-Furga (del Centro de Investigación de Medicina Molecular de la Academia Austriaca de Ciencias de Viena) y sus colaboradores, que han encontrado que el agente anticancerígeno descubierto anteriormente SCH51344 también inhibe MTH1. SCH51344 se identificó en modelos celulares de cánceres dependientes de la señal KRAS, pero su mecanismo de acción era desconocido. También han comprobado que (*S*)-crizotinib (Xalkori®), un inhibidor de la cinasa ALK aprobado por la FDA en 2011 para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer de pulmón no microcítico, es también un inhibidor de MTH1 (2). Los inhibidores MTH1 permiten que las bases de las células cancerígenas dañadas por reacciones de oxidación se incorporen al ADN y se originen mutaciones que suprimen el crecimiento de diversos tumores (piel, colorectal y mama) en animales modelo.



permite que se generen *in situ* radicales libre de oxígeno evitando la acción de los antioxidantes que los eliminan (4).

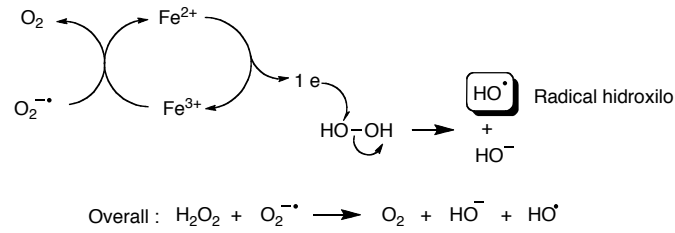


Figura 1.- Actuación del catión el Fe^{2+} en la generación de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno.

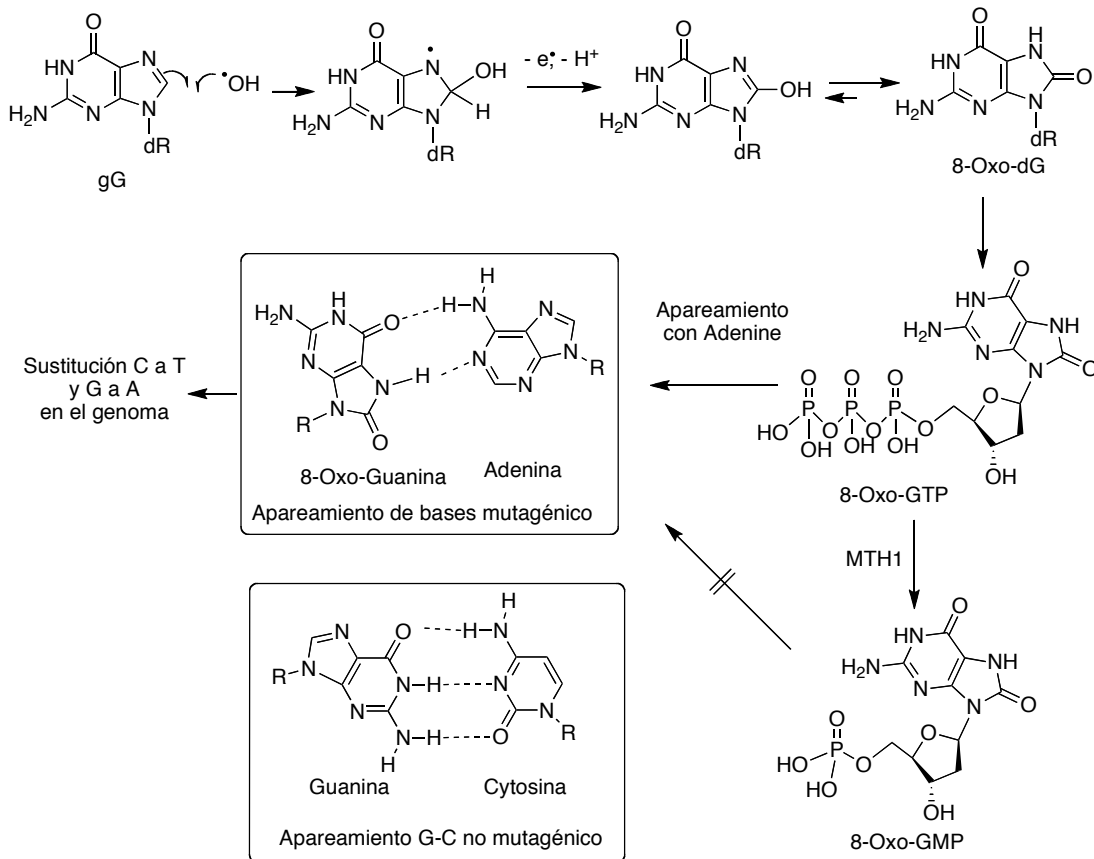


Figura 2.- Formación de 8-oxo-GTP. Su incorporación al ADN produce un efecto mutagénico que puede eliminarse por la acción de la enzima MTH1.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), además de dañar al ADN directamente, pueden oxidar las bases del conjunto de nucleótidos que lo componen. Así, pueden producir 8-oxo-dGTP que, al incorporarse como un falso nucleótido al ADN, si no se repara el daño puede causar mutaciones en el genoma al aparearse con un residuo de adenina (5). La enzima 8-oxo-dGTP difosfohidrolasa, que requiere Mg^{2+} como cofactor, hidroliza eficazmente el trinucleótido oxidado [8-oxo-dGTP (2'-desoxi-8-oxoguanosina trifosfato)], evitando su incorporación al ADN (Figura 2). Esta enzima, que está presente en el núcleo y

en las mitocondrias, es un miembro de la superfamilia de hidrolasas y se denomina MTH1 (MutT Homolog 1).

Como la producción del monofosfato, en contraposición al difosfato, es importante para evitar la regeneración de 8-oxo-dGTP por la acción de la nucleótido difosfato cinasa, la acción de la hidrolasa MTH1 es esencial para que se produzca la replicación del ADN (6). Por otra parte, como esta enzima no es tan esencial en las células normales, que poseen un metabolismo regulado capaz de evitar el daño a los componentes de los nucleótidos, si se inhibe esta enzima se originan roturas de la doble hebra que son letales especialmente para las células cancerosas.

La estructura cristalina del complejo que forma la enzima MTH1 humana con 8-oxo-dGMP muestra que el nucleótido se enlaza en una conformación *anti*, sin interacciones entre el grupo 8-oxo y la proteína, lo que sugiere que el reconocimiento específico depende de la estabilización de la forma tautómera enólica de 8-oxo-dGTP (7).

En el año 2004, se observó que en los ratones deficientes en la expresión de MTH1 aumentaba la susceptibilidad a la carcinogénesis espontánea y que en los pacientes con distintas enfermedades neurodegenerativas se producía una acumulación de 8-oxo-dG. En los ratones deficientes en la expresión de las proteínas OGG1 y MUTYH también aumentaba la susceptibilidad a la carcinogénesis. OGG1 es una glicosilasa de ADN que elimina la 8-oxoG en el ADN, minimizando su acumulación en los genomas celulares. MUTYH es una adenina/2-hidroxiadenina ADN glicosilasa que elimina la adenina que se aparea con 8-oxoG, suprimiendo de este modo la mutagénesis inducida por 8-oxoG. También se observó una mayor carcinogénesis espontánea en las células hepáticas, de pulmón o del intestino en ratones que carecían de MTH1, OGG1 y MUTYH (8) y que el aumento de la incidencia de tumores pulmonares en ratones carentes de OGG1 se eliminaba con la interrupción del gen *Mth1* (9), lo que indicaba que la acumulación de 8-oxoG y/o 2-OH-A podía provocar la muerte celular. Como ya hemos apuntado, estos mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo también juegan un importante papel en la neuroprotección. De hecho, la 8-oxoguanina se acumula en los genomas nucleares y mitocondriales con la edad, y aumenta de forma dramática en las neuronas dopaminérgicas del nigroestriado en los pacientes con enfermedad de Parkinson, lo que demuestra que el daño oxidativo producido en el ADN es un factor de riesgo muy importante para esta enfermedad (10).

REFERENCIAS

1. Gad, H.; Koolmeister, T.; Jemth, A.-S.; Eshtad, S.; Jacques, S. A.; Ström, C. E.; Svensson, L. M.; Schultz, N.; Lundbäck, T.; Einarsdottir, B. O.; Saleh, A.; Göktürk, C.; Baranczewski, P.; Svensson, R.; Berntsson, R. P.-A.; Gustafsson, R.; Strömberg, K.; Sanjiv, K.; Jacques-Cordonnier, M.-C.; Desroses, M.; Gustavsson, A.-L.; Olofsson, R.; Johansson, F.; Homan, E. J.; Loseva, O.; Bräutigam, L.; Johansson, L.; Höglund, A.; Hagenkort, A.; Pham, T.; Altun, M.; Gaugaz, F. Z.; Vikingsson, S.; Evers, B.; Henriksson, M.; Vallin, K. S. A.; Wallner, O. A.; Hammarström, L. G. J.; Wiita, E.; Almlöf, I.; Kalderén, C.; Axelsson, H.; Djureinovic, T.; Carreras Puigvert, J.; Häggblad, M.; Jeppsson, F.; Martens, U.; Lundin, C.; Lundgren, B.; Granelli, I.; Jenmalm Jensen, A.; Artursson, P.; Nilsson, J. A.; Stenmark, P.; Scobie, M.; Berglund, U. W.; Helleday, T.; (2014) "MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool"; *Nature*, doi: 10.1038/nature13181.
2. Kilian V. M. Huber, Eidarus Salah, Branka Radic, Manuela Gridling, Jonathan M. Elkins, Alexey Stukalov, Ann-Sofie Jemth, Camilla Göktürk, Kumar Sanjiv, Kia Strömberg, Therese Pham, Ulrika Warpman Berglund, Jacques Colinge, Keiryn L. Bennett, Joanna I. Loizou, Thomas Helleday, Stefan Knapp & Giulio Superti-Furga; (2014) "Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy"; *Nature*, doi:10.1038/nature13194.
3. Streib, M.; Kräling, K.; Richter, K.; Xie, X.; Steuber, H.; Meggers, E.; (2014) "An Organometallic Inhibitor for the Human Repair Enzyme 7,8-Dihydro-8-oxoguanosine Triphosphatase", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 305-309.
4. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; (1999) "Free Radicals in Biology and Medicine", 3rd Edition, Oxford University Press.
5. Cheng, K. C.; Cahill, D. S.; Kasai, H.; Nishimura, S.; Loeb, L. A.; (1992) "8-Hydroxyguanine, an Abundant Form of Oxidative DNA Damage Causes G→T and C→A substitutions", *J. Biol. Chem.*, 267, 166-172.
6. Nakabeppu, Y.; Kajitani, K.; Sakamoto, K.; Yamaguchi, H.; Tsuchimoto, D.; (2006) "MTH1, an oxidized purine nucleoside triphosphatase, prevents the cytotoxicity and neurotoxicity of oxidized purine nucleotides", *DNA Repair (Amst)*, 5, 761-772.
7. Svensson, L. M.; Jemth, A.-S.; Desroses, M.; Loseva, O.; Helleday, T.; Högbom, M.; Stenmark, P.; (2011) "Crystal structure of human MTH1 and the 8-oxo-dGMP product complex", *FEBS Lett.*, 585, 2617-2621.
8. Nakabeppu, Y.; Tsuchimoto, D.; Furuichi, M.; Sakumi, K.; (2004) "The defense mechanisms in mammalian cells against oxidative damage in nucleic acids and their involvement in the suppression of mutagenesis and cell death", *Free Radic. Res.* 2004, 38, 423-429 (Review).
9. Nakabeppu, Y.; Tsuchimoto, D.; Ichinoe, A.; Ohno, M.; Ide, Y.; Hirano, S.; Yoshimura, D.; Tominaga, Y.; Furuichi, M.; Sakumi, K.; (2004) "Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1011,101-111.
10. Nakabeppu, Y.; Tsuchimoto, D.; Yamaguchi, H.; Sakumi, K.; (2007) "Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease.", *J. Neurosci. Res.*, 85, 919-934. (Review).

SREBP-1c, ChREBP y LXR: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico

Elvira López-Oliva Muñoz¹, Emilia Muñoz Martínez^{2*}

¹Sección departamental de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid. ²Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

*e-mail: emilia@ucm.es

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 1 (2014), pág. 14-48

RESUMEN

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una enfermedad que se define como un espectro continuo que oscila entre una esteatosis macrovesicular, de curso clínico favorable, hasta un cuadro de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que da lugar a daños irreversibles y que se ha convertido en los últimos años en un problema sanitario de primera magnitud. El HGNA se caracteriza por una infiltración grasa de los hepatocitos que se asocia con un estado de resistencia a la insulina y por ello ligado, como factor de riesgo, al síndrome metabólico. Los factores de transcripción SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador del estero), ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) y LXR (receptor X hepático) son reguladores fundamentales de la homeostasis lipídica y glucídica y de la inflamación, cuya activación regula al alza genes implicados en la síntesis *de novo* de los ácidos grasos en respuesta a insulina, glucosa y oxiesteroles, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En esta revisión se describen datos recientes sobre la biología, la regulación y la coordinación funcional entre SREBP-1c, ChREBP y LXR y su relación con el HGNA. El desarrollo de agonistas selectivos de estos factores les hacen ser prometedoras dianas en el tratamiento del HGNA y de la EHNA.

Palabras clave: Hígado graso no alcohólico; Factores de transcripción; Lipogénesis.

ABSTRACT

SREBP-1c, ChREBP and LXR: Their role in the pathogenesis of the non-alcoholic fatty liver.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become a major public health issue that comprises a disease spectrum which ranges from benign hepatic steatosis to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), leading to irreversible liver damages. Deposition of excess triglycerides within liver cells is the hallmark of NAFLD, which is associated with a loss of insulin sensitivity. A growing body of evidence implicates the lipogenic transcription factors SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein), ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein) and LXR (liver X receptor) in the pathogenesis of NAFLD. These factors have emerged as central regulators of the *de novo* fatty acid synthesis, the glucose homeostasis and the inflammation in response to insulin, glucose and oxysterols, under both physiological and physiopathological conditions. In this review we describe recent findings in the biology, the function and the cross-regulation between SREBP-1c, ChREBP and LXR on the control of lipid and glucose metabolism and their link to NAFLD. Specific pharmacologic ligands are available, making them attractive therapeutic targets for NAFLD and NASH.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver; Transcription factors; Lipogenesis.

INTRODUCCIÓN

Los triglicéridos (TG) almacenados en los adipocitos constituyen una forma de depósito de nutrientes fácilmente disponible, ante fluctuaciones de su disponibilidad y de la demanda energética. Solo cuando la capacidad de almacenar grasa del tejido adiposo blanco (TAB) se ve sobrepasada (dietas altas en grasa (HFD) o en carbohidratos (HCD), estados de resistencia a la insulina (RI), etc.), se produce un depósito anómalo en tejidos no adiposos, como el hígado, alterando el balance entre el aporte de lípidos (ácidos grasos libres (AGL) circulantes captados y los sintetizados *de novo*) y su catabolismo (oxidación de ácidos grasos (AG) y/o secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (1). Ello da lugar a una alteración del metabolismo lipídico hepático, que puede tener consecuencias clínicas graves.

El hígado graso no alcohólico se caracteriza histológicamente por una infiltración grasa en el parénquima hepático (>55mg/g), en individuos que no consumen alcohol (<20 ó 40g/semana para hombres o mujeres, respectivamente) o que no padecen enfermedades virales, congénitas o autoinmunes del hígado (2). Desde que fue descrito por Ludwig y col en 1980 (3), el hígado graso no alcohólico (HGNA) se define como un espectro continuo que va incrementando su gravedad, desde una esteatosis simple macrovesicular (HGNA), de curso clínico favorable,

hasta una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) caracterizada por la existencia de necroinflamación, apoptosis de los hepatocitos, fibrosis, cirrosis y eventualmente carcinoma hepatocelular, lesiones indistinguibles de las del hígado graso alcohólico (4,5). Debido a que el acúmulo de TG hepáticos está asociado a un estado de resistencia a la insulina, el HGNA es considerado como la manifestación hepática del síndrome metabólico y ligado muy estrechamente, como factor de riesgo, a todas sus manifestaciones: obesidad, diabetes tipo 2, dislipemia, hipertensión y aterosclerosis (6,7). Por ello, aunque la incidencia del HGNA es alta entre la población (20-30 % en los adultos y 3-10% en los niños), según cifras de EEUU extrapolables a Europa y a España (8), la obesidad (80-90%) y la diabetes tipo 2 (30-50%) acentúan el problema, pudiendo desarrollar EHNA hasta en el 35% de los casos (9). Así pues, el predominio de los hábitos sedentarios, la ingesta hipercalórica y la prevalencia de obesidad en la población occidental han aumentado el riesgo de padecer EHNA, por lo que se ha convertido en la causa más común de enfermedad crónica hepática, configurándose como un importante problema económico y de salud pública (10), con un índice de mortalidad muy elevado (11). En la clínica, además de las pruebas de laboratorio, existen técnicas no invasivas de evaluación diagnóstica (ultrasonidos, resonancia magnética, tomografía computarizada etc.), pero sin embargo, el cuadro histopatológico real y su gravedad, solo puede establecerse mediante la biopsia hepática (5). En cuanto al tratamiento, aunque se han postulado el uso de agentes sensibilizadores a la insulina (metformina, tiazolidinedionas), antilipémicos (fibratos), antioxidantes, inhibidores del factor de necrosis tumoral α (TNF α), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) etc., no existe una terapia específica de EHNA. Por ello, el tratamiento recomendado hoy día, se basa en el cambio de estilo de vida y de hábitos dietéticos y en el control de peso (4).

En este trabajo se revisan, en primer término, los mecanismos patogénicos de HGNA y su progresión hacia EHNA. En segundo lugar, se examinan los datos actuales sobre la biología y la función de los factores de transcripción; SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador del estero), ChREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) y el receptor X hepático (LXR), como reguladores esenciales de la homeostasis lipídica, glucídica y de la inflamación, haciendo énfasis en su implicación en la patogenia del HGNA.

PATOGENIA DEL HIGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

La patogenia del hígado graso no alcohólico es multifactorial y todavía no bien conocida. Se han utilizado varios modelos animales que desarrollan síntomas similares, a fin de establecer los mecanismos patogénicos del HGNA y su progresión a la EHNA. Entre ellos, los más usados son los modelos genéticos (*ob/ob*, con una mutación del gen de leptina y *db/db*, con una mutación del gen del

receptor de leptina) y modelos con EHNA inducida por dieta (HFD, HCD, alta en fructosa, deficiente en colina-metionina, etc. (12).

Resistencia a la insulina en la esteatosis

El origen de la infiltración grasa del hígado es relativamente comprendido. Se acepta hoy que la RI es un factor primordial en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Se ha sugerido a este respecto que la RI periférica sería el primer acontecimiento que originaría un aumento del flujo de AGL al hígado, mediante la reducción del efecto supresor de la lipólisis por insulina en el tejido adiposo (Figura 1). En el HGNA, como en otros modelos de RI, el hígado se hace resistente a la acción de la hormona, incrementando la gluconeogénesis y la glucogenólisis (13) mientras que, por el contrario, responde a la hiperinsulinemia aumentando la transcripción de los genes lipogénicos. El aumento en la producción de glucosa hepática acoplada a su menor captación periférica acentúa la hiperglucemia e incrementa la secreción de insulina, aumentando todavía más la lipogénesis hepática (14). Sin embargo, no está claro si la RI hepática es la causa o la consecuencia de la esteatosis (15). Algunos estudios señalan una asociación entre el HGNA y la RI, ya que el decrecimiento de los TG hepáticos se correlaciona con la mejora de la sensibilidad a la insulina (16). Sin embargo, se ha sugerido recientemente que especies lipídicas como los ácidos grasos saturados (AGS), los diacilgliceroles (DAG) o las ceramidas, son los verdaderos determinantes de su desarrollo (17,18) y no los TG, que podrían ejercer una acción protectora, al tamponar el exceso de AG. En este sentido, aunque la relación entre los DAG y la resistencia insulínica no se ha podido confirmar en modelos que sobreexpresan enzimas de la esterificación, como la diacilglicerol-acil-transferasa-2 (DGAT2) (19) o se bloquea la secreción de VLDL (20), en los que se muestra una clara disociación entre esteatosis y RI, en varios modelos de HGNA, no obstante, se ha demostrado que los DAG como intermediarios del metabolismo de los AG inducen RI interfiriendo con la señalización de insulina, mediante la activación de la proteína-quinasa Cε (PKCε) que fosforila los residuos de serina en los sustratos del receptor de insulina (IRS-1/2), alterando más adelante en la vía, la actividad de las quinasas fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3-K) y Akt (21)(22).

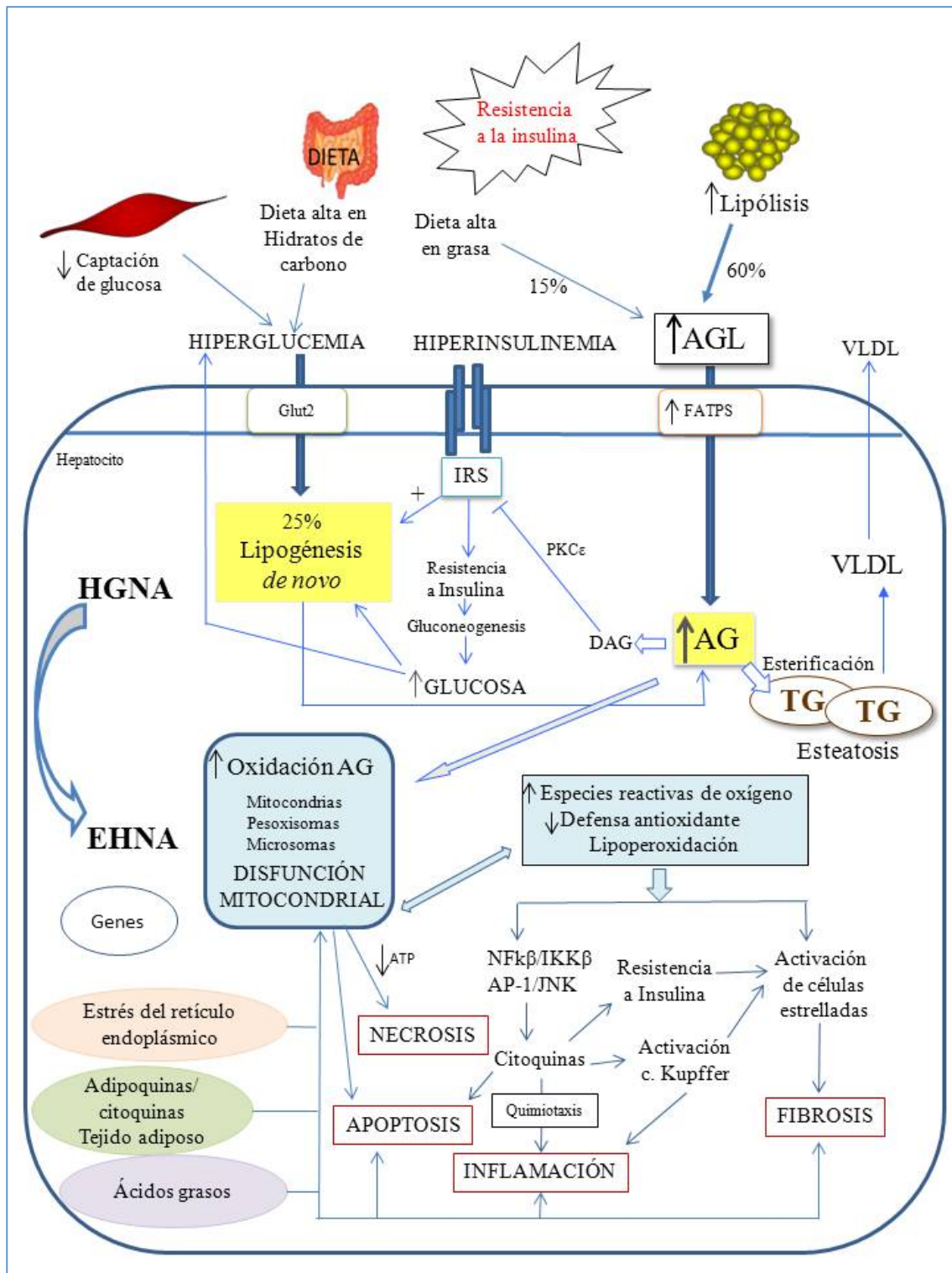


Figura 1.- Mecanismos patogénicos de la esteatosis hepática (HGNA) y de su progresión a la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). El hígado graso no alcohólico es una enfermedad que se define como un espectro continuo que incrementa su gravedad desde una esteatosis hepática benigna (HGNA), caracterizada por la infiltración grasa del parénquima hepático, hasta una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), que está determinada por la existencia de necroinflamación, apoptosis de los hepatocitos, fibrosis, cirrosis y en su caso carcinoma hepatocelular. La resistencia a la insulina es un factor primordial en el desarrollo del HGNA, mientras que su progresión a la EHNA se debe a la interacción de múltiples factores, genéticos y ambientales, que ejercen efectos deletéreos en el hepatocito dando lugar al daño tisular. (Véase el texto)

Vías metabólicas implicadas en la esteatosis hepática

La esteatosis hepática se desarrolla como resultado del desequilibrio entre el aporte y la degradación de los lípidos. Los lípidos almacenados en el TAB que fluyen al hígado como AGL, los sintetizados en el hígado mediante la lipogénesis *de novo* y los AG procedentes de la dieta, son las fuentes lipídicas que, en condiciones fisiológicas, contribuyen a formar la grasa hepática. Después de la esterificación, los TG pueden ser almacenados como gotas lipídicas en los hepatocitos, secretados a la sangre como partículas VLDL, o hidrolizados de nuevo a AG para su oxidación. Por consiguiente, la infiltración grasa del hígado puede producirse por alguna de las siguientes causas: el aumento de la cantidad de AGL que alcanzan el hígado por la porta; el incremento de la lipogénesis *de novo* y la disminución de la β -oxidación de los AG y/o de la secreción de TG en forma de VLDL. En pacientes con EHNA Donnelly y col (23) demuestran que el 60% de los TG hepáticos proceden de los AGL circulantes, el 25% deriva de la lipogénesis *de novo* y el 15% restante se forma a partir de los AG procedentes de la dieta (Figura 1). Por lo tanto, el elevado aporte de AGL al hígado y el incremento de la síntesis *de novo* de los AG, son las principales causas del acúmulo graso en la esteatosis, mientras que la alteración de las vías de oxidación de los AG y/o de la secreción de VLDL, presentan una menor incidencia.

Aporte de AGL al hígado

Como ya se ha indicado, la RI periférica contribuye a aumentar el flujo de AGL liberados desde el TAB hacia el hígado, al reducir la acción supresora de la insulina sobre la lipasa sensible a hormona (24). Un aumento de la capacidad hepática para captar estos AGL circulantes es crucial para inducir el hígado graso. Teniendo en cuenta que la tasa de captación de los AGL, depende de su concentración y de la capacidad de transporte del hepatocito a través de la membrana, la alteración de sus sistemas de transporte influye significativamente en el desarrollo del HGNA. En este sentido, estudios recientes han demostrado que el aumento en la expresión de las proteínas de transporte de AG ((FATPs), la traslocasa de AG (FAT/CD36) y las proteínas ligadoras de AG (FABPs), parecen favorecer la lipotoxicidad y el desarrollo de esteatosis hepática, como se ha observado en el hígado de pacientes con HGNA (25). Por el contrario, la delección del gen *FATP5*, disminuye la obesidad, la esteatosis y la RI, en ratones sometidos a una dieta HFD (26).

Lipogénesis *de novo*

A consecuencia de la ingesta alimenticia, los animales superiores utilizan los carbohidratos preferentemente para la formación de ATP. Cuando la ingesta de carbohidratos es excesiva, la vía de la lipogénesis *de novo* permite su conversión en AG, que a su vez, pueden ser esterificados a TG en el hígado. En el HGNA el aumento de la glucemia y la hiperinsulinemia derivadas de la RI favorecen, de

forma sinérgica, la conversión de glucosa en AG aumentando la expresión de las enzimas glucolíticas y lipogénicas mediante la activación de los factores de transcripción (FT), SREBP-1c, ChREBP y LXR (Figura 2) (27,28). La conversión de glucosa en AG, incluye la entrada del piruvato procedente de la glucólisis al ciclo de Krebs, en la mitocondria. El citrato formado es transportado al citosol donde se convierte a acetil-CoA por la enzima ATP citrato-liasa (ACL). A su vez, la acetil-CoA-carboxilasa (ACC1), la primera enzima limitante de la lipogénesis *de novo*, convierte el acetil-CoA en malonil-CoA (29), que se transforma en palmitoil-CoA, por acción de la ácido graso-sintasa (FAS) (30). El ácido palmítico puede ser elongado o desaturado mediante la acción de las enzimas, elongasa de larga cadena 6 (ELOLV6) y estearil-CoA-desaturasa-1 (SCD1) (31) y finalmente, las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (GPAT), 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas (AGPATs), la lipina 1 y la DGAT2, que catalizan la esterificación de los acil-CoA sobre los carbonos 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato respectivamente, sintetizan glicerolípidos (32). El receptor nuclear LXR es el regulador fundamental (33), capaz de aumentar la expresión de los FT citoplásmicos SREBP-1c, inducido por insulina (34) y ChREBP, activado por glucosa (35) ambos, blancos directos de LXR. A su vez LXR, SREBP-1c y ChREBP inducen la expresión de los genes lipogénicos y glucolíticos que intervienen en la lipogénesis *de novo* (33, 34, 35), cuya sobreexpresión incrementa la infiltración grasa en el hígado.

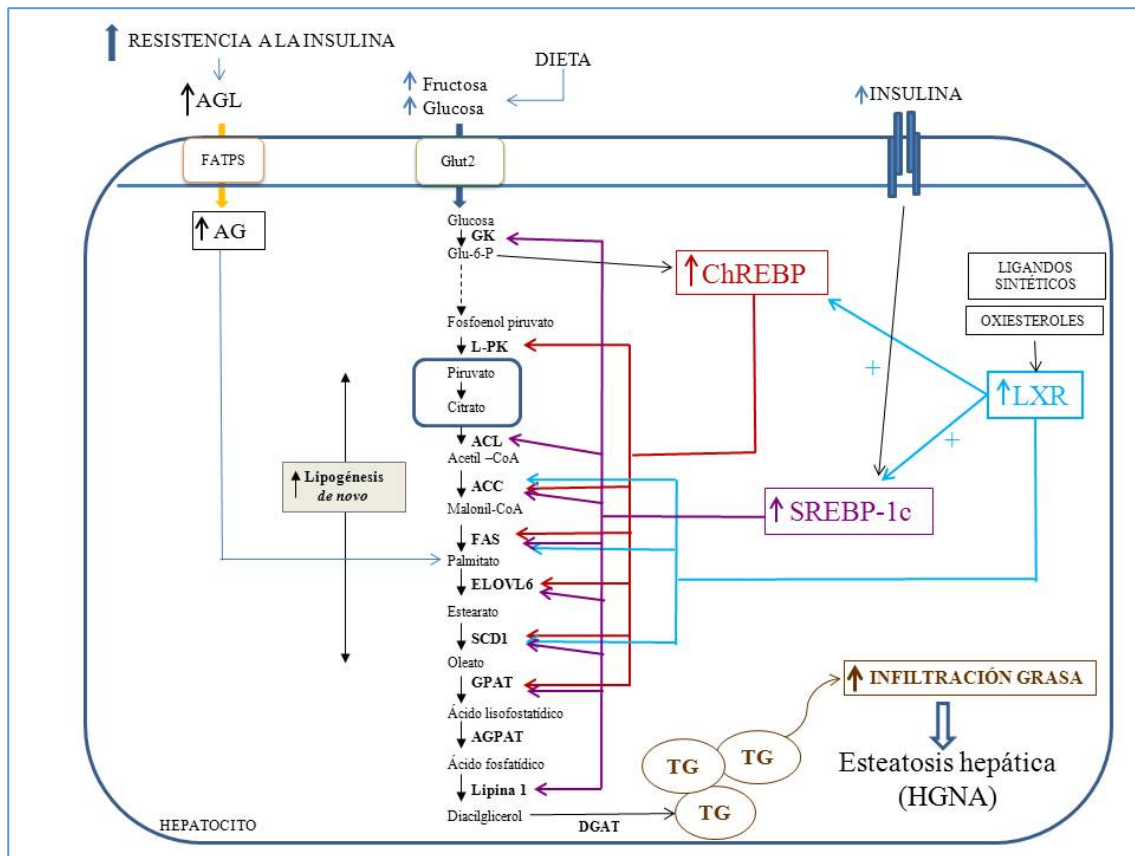


Figura 2.- Interacción funcional entre los factores de transcripción SREBP-1c, ChREBP y LXR en la inducción de la esteatosis hepática. En respuesta a oxisteroles y otros ligandos, el receptor nuclear LXR, como principal regulador de la lipogénesis *de novo*, controla los genes que codifican los factores de transcripción SREBP-1c y ChREBP. A su vez, SREBP-1c responde a los altos niveles de insulina, mientras que metabolitos de la glucosa (Glu-6-P, Xu 5P, etc.) que penetra en exceso en el hepatocito mediante el transportador Glut-2, inducen la expresión de ChREBP. Una vez activados, SREBP-1c, ChREBP y LXR incrementan la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la glucólisis (GK, L-PK), en la síntesis de los ácidos grasos (ACL, ACC, FAS, ELOVL6, SCD1) y/o de los triglicéridos (GPAT, Lipina 1), lo que da lugar al aumento del depósito de grasa, que junto a la procedente de los AGL circulantes captados por el hígado, da lugar a la esteatosis. (Véase el texto).

Oxidación de los ácidos grasos

La disminución de las vías de utilización de los AG también puede generar esteatosis hepática. Los AG son catabolizados a través de la β -oxidación en las mitocondrias y en los peroxisomas y de la ω -oxidación en los microsomas, siendo la β -oxidación mitocondrial, la vía dominante de metabolización de los AG de cadena corta, media y larga (36). En el HGNA aparecen varios cambios adaptativos dirigidos a incrementar la β -oxidación mitocondrial para compensar la excesiva captación y síntesis *de novo* de los AG (37). Sin embargo, si se sobrepasa esta capacidad oxidativa, los lípidos pueden acumularse en los hepatocitos. Por ejemplo, un incremento de malonil-CoA puede comprometer la β -oxidación y favorecer el acúmulo de los AG por su función inhibitoria de la carnitina-palmitoil transferasa (CPT-1), enzima que regula la entrada de los AG en la mitocondria (38). También una menor actividad oxidativa en los peroxisomas induce una esteatosis severa microvesicular, como se ha observado por delección del gen del enzima acil-

CoA oxidasa (*AOX1*) en el ratón (39). Por el contrario, la sobreexpresión de los genes de la familia *CYP4A* de ω -hidroxilasas microsomales, en pacientes con EHNA y en animales alimentados con una dieta HFD, ha sugerido una posible función protectora de estas enzimas sobre la toxicidad lipídica (40), al detoxificar los ácidos dicarboxílicos derivados del exceso de AG, altamente tóxicos.

El receptor nuclear PPAR α (receptor activado por proliferadores de peroxisomas α) es el regulador principal de la oxidación de los AG. La activación de PPAR α induce la expresión de genes involucrados en la β y la ω -oxidación (41, 42) y, por ello, su inactivación puede inducir HGNA, como se ha observado en ratones *knockout* de PPAR α en condiciones de ayuno o alimentados con una dieta HFD (43,44). Por el contrario, la estimulación de PPAR α con su agonista fenofibrato mejora la esteatosis hepática en el ratón (45).

Secreción de VLDL

El hígado secreta TG en forma de partículas VLDL, que son transportadas hacia los tejidos periféricos y son convertidos en lipoproteínas de baja (LDL) e intermedia (IDL) densidad, por la enzima lipoproteínlipasa. Pacientes con HGNA y EHNA presentan una sobreproducción de VLDL en comparación con sujetos sanos (46), lo que se debe a modificaciones en el ensamblaje y en la secreción de TG. En el HGNA, la disponibilidad de lípidos para el ensamblaje aumenta, a lo que se añade la incapacidad de la insulina para disminuir la producción de VLDL (47). Debido al aumento de TG, la apolipoproteína-B100 (apo-B100) no se degrada y la expresión de la proteína de transferencia microsómica (MPT) se eleva a consecuencia de la sostenida localización de FoxO1 (*forkhead box-01*) en el núcleo (48), lo que favorece el aumento de la trigliceridemia observada en estos pacientes. Sin embargo, aunque la exposición crónica a insulina induce mayor producción de VLDL, el incremento de su secreción no compensa la excesiva formación de TG, manteniéndose la esteatosis. Además, la secreción de apo-B100 no se incrementa, lo que sugiere que su producción parece limitar la capacidad del hígado para exportar los TG hepáticos (Figura 1)(48).

PATOGENIA DE EHNA

De esteatosis a esteatohepatitis

El mecanismo de la progresión del HGNA a la EHNA es todavía poco conocido. Se atribuye a la interacción de diferentes factores, tanto genéticos como ambientales, cuya secuencia es desconocida. El modelo tradicional para explicarlo es la hipótesis del doble impacto (“two-hit hypothesis”) (49), que postula una evolución desde la esteatosis, “primer impacto”, en la que el exceso de grasa hace al hígado más susceptible a otras noxas, denominadas en conjunto “segundo impacto”, que a su vez conducen a la EHNA. En la actualidad, esta teoría está siendo

reemplazada por el modelo de lipotoxicidad, que parte de la premisa de que todos los posibles determinantes, metabólicos e inflamatorios de la EHNA no actúan por separado, sino que son interactivos y colaboran en la progresión al daño tisular (50).

Entre los factores que contribuyen a la progresión a la EHNA, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la disminución de la capacidad de defensa antioxidante tienen un papel importante (Figura 1). La aparición de cambios ultraestructurales y funcionales en las mitocondrias de pacientes con EHNA se ha propuesto como un índice de la progresión de la enfermedad (51). También la elevada generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), potencialmente tóxicas, por un aumento excesivo de la oxidación de los AG por la vía mitocondrial y /o no mitocondrial (52), puede considerarse como una causa directa de la disfunción de las mitocondrias, puesto que interfieren con la cadena respiratoria y la integridad del DNA mitocondrial (53). Recíprocamente, la disfunción de la cadena de la fosforilación oxidativa y del transporte de electrones puede contribuir al desarrollo de la esteatosis, al inducir la inhibición de la β -oxidación (54). El aumento de productos de la lipoperoxidación (LPO), como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4HNE)(55), amplifican el efecto de las ERO al dañar las membranas e inactivar las macromoléculas celulares, lo que intensifica la disfunción mitocondrial y perpetúa la producción de ERO. El aumento consecutivo de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial permite la liberación al citosol de proteínas proapoptóticas, que inducen la muerte de los hepatocitos y favorecen el desarrollo de la inflamación y la fibrosis (56). Las ERO y los productos de LPO, inducen también la síntesis de citoquinas proinflamatorias como TNF α , TGF- β (factor de crecimiento transformante β) y las interleucinas IL-6 y IL-8 (57), a través de la activación de las vías del factor nuclear Kappa β /I kappa β quinasa (NF- κ B/IKK β) y de la proteína activadora 1/c-Jun N-terminal quinasa 1 (AP-1/JNK1) propiciando, además del mantenimiento de la RI, la muerte celular (TNF α ;TGF- β), la quimiotaxis de los neutrófilos (IL-8), la formación del infiltrado inflamatorio y la activación de las células de Kupffer (58). El reclutamiento y la activación de las células de Kupffer, que pasan de un fenotipo de macrófagos antiinflamatorios (M2) a un fenotipo proinflamatorio (M1), es crítico para la propagación de la inflamación y del daño tisular (59). Las células de Kupffer también inducen fibrosis mediante la estimulación paracrina de las células estrelladas (HSC), las cuales proliferan y se activan, induciendo su transformación en miofibroblastos profibrogénicos, que incrementan la matriz extracelular al sintetizar colágeno, proteoglicanos e hialuronato (60).

El estrés del retículo endoplásmico (RE) es un mecanismo recientemente implicado en la patogenia y en la progresión de EHNA (Figura 1) (61,62). Cualquier alteración en la homeostasis del RE que afecte la capacidad de plegado de las

proteínas, induciendo su acúmulo en el lumen, conduce al estrés del RE. Esta situación pone en marcha una respuesta fisiológica, la respuesta de proteínas no plegadas (UPR), que permite disminuir la carga proteica y aumentar su plegado y su degradación, a través de la activación de una cascada de señales que aumentan la transcripción de chaperonas residentes en el RE (63). Factores como la hipoxia, la exposición a AGS de cadena larga, la hiperinsulinemia, el desequilibrio cálcico o alteraciones en la glicosilación, entre otros, pueden desencadenar la UPR (64). Sin embargo, una UPR insuficiente o inadecuada activa vías de señalización que derivan en el establecimiento de varios determinantes de la progresión a EHNA: la RI (vía *inositol requiring enzyme 1α* (IRE1α)-JNK1), el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (vía *nuclear factor erythroid-2 related factor 2* (Nrf2), la apoptosis (vía intrínseca) y la inflamación (vía NF-κβ) (63). En este sentido, se ha observado que el exceso de AGS induce estrés del RE por activación de mediadores de la UPR, lo que deriva en daño hepático y apoptosis de los hepatocitos (65).

El desequilibrio en la razón adipoquinas/citoquinas secretadas por el TAB en estados de RI, como la obesidad, tiene un papel esencial en la modulación de la señalización insulínica y en la inflamación (Figura 1). En pacientes con HGNA, además de las citoquinas proinflamatorias, TNFα e IL-6, (66), la alteración de las adipoquinas, también deriva en la progresión a la EHNA. La adiponectina es reconocida por los receptores, AdipoR1 y AdipoR2, expresados en el hígado (67), donde aumenta la β-oxidación de los AG y la sensibilidad a la insulina, mediante la activación de PPARα y la fosforilación de la quinasa activada por AMP (AMPK) (68). Además, la adiponectina modula la inflamación al suprimir la activación de IKKβ inducida por TNFα (69). Por ello, el tratamiento con adiponectina disminuye la esteatosis hepática en el ratón obeso (70), mientras que en pacientes obesos con la EHNA, la reducción de la adiponectinemia se asocia con el grado de esteatosis, de necroinflamación y de fibrosis (71). Por el contrario, los altos niveles de resistina encontrados en plasma de enfermos de EHNA se correlacionan con la RI, la esteatosis y la inflamación (72). La leptina, por su parte, presenta datos contradictorios pues si bien sensibiliza los tejidos a la insulina y activa la β-oxidación de los AG, parece inducir la inflamación y la fibrogénesis, actuando directamente sobre las células de Kupffer y las células estrelladas del hígado (73).

La RI *per se* debe ser también considerada como un inductor del daño hepático, debido a su capacidad de aumentar los mediadores inflamatorios y tener efectos directos sobre las células HSC (Figura 1) (74). Además, la lipotoxicidad de las especies lipídicas, que pueden inducir todos los mecanismos desencadenantes del daño tisular ya mencionados, constituyen un factor de primera importancia en la progresión del HGNA a la EHNA (75). Los factores genéticos, por su parte, tienen una gran influencia en su desarrollo. Por ejemplo, el polimorfismo rs738409, que corresponde a una mutación del gen que codifica la proteína fosfolipasa 3 similar a

patatina (*PNPLA3*), también denominada adiponutrina (una proteína multifuncional unida a membrana con actividades lipolíticas y lipogénicas), está significativamente asociada a la presencia de necroinflamación hepática (76). Por último, los endocannabinoides, la proteína de unión al retinol (RBP) y la dehidroepiandrosterona (DHEA), así como mediadores moleculares, tales como el receptor Toll-like 4 (TLR-4), la serotonina y el sistema renina-angiotensina, se han descrito como potenciales mediadores del HGNA y de su progresión a EHNA (77).

SREBP-1C, CHREBP Y LXR.: SU INFLUENCIA EN LA PATOGENIA DEL HGNA.

La homeostasis del metabolismo lipídico requiere de sensores intracelulares que puedan sensibilizarse a cambios hormonales y metabólicos y coordinen las vías metabólicas implicadas. SREBP-1c, CHREBP y LXR, juegan un papel esencial como reguladores de la lipogénesis en respuesta a insulina, glucosa y oxisteroles y, por ello, su disfunción condiciona la aparición y el desarrollo del HGNA.

SREBPs

Los factores de transcripción SREBPs son miembros de la familia de proteínas cuyo dominio N-terminal (con función de transcripción) presenta una estructura básica/hélice-bucle-hélice/cremallera de leucina (bHLH-LZ) (78). Se han descrito tres miembros de esta familia, SREBP-1a, -1c y -2. SREBP-1a y -1c están codificados por el mismo gen (*SREBP-1*) a través de transcripción alternativa, diferenciándose en el exon 1 (79), mientras SREBP-2 procede del gen *SREBP-2* y tiene un 50% de homología con SREBP-1 (78). Ambas isoformas, SREBP-1a y SREBP-1c, regulan preferentemente la síntesis de los AG y de los TG (80), aunque SREBP-1c es el subtipo predominante en el hígado y en el TAB. En respuesta a insulina, SREBP-1c induce la expresión de los genes que codifican las enzimas lipogénicas ACL, ACC, FAS, ELOVL6, SCD1, GPAT y lipina1) y glucolíticas (glucoquinasa, (GK)) (81), por su capacidad de interacción con los elementos de respuesta al esteroles (SRE), ubicados en su promotor (Figura 2). SREBP-2, por su parte, se expresa de forma ubicua y abundante y, preferentemente, controla genes del metabolismo del colesterol (COL) (78,82).

Activación de SREBP-1c

SREBP-1c, como todos los miembros de la familia, se sintetizan como proteínas de membrana del RE, de cuyo emplazamiento deben ser liberados hacia el Golgi donde son activados por proteólisis. Ya en forma madura emigran al núcleo ejerciendo su función de transcripción. El proceso tiene varios pasos: inmediatamente después de su síntesis, la forma precursora de las proteínas SREBPs (pre-SREBPs) ligadas al RE se une a la proteína SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*), situada también en el RE, que actúa como un sensor del COL. En

condiciones de COL intracelular bajo, SCAP es requerida para su unión a las proteínas COPII que rodean a las vesículas de transporte, permitiendo al complejo SREBPs-SCAP desplazarse al aparato de Golgi. Una vez en el Golgi, las proteasas Site-1(S1P) y Site-2 (S2P) liberan el extremo N-terminal de las proteínas precursoras, que migran al núcleo como SREBPs maduras (nSREBPs), activando sus genes blanco por unión al SRE en su promotor. Por el contrario, cuando el COL se acumula en la célula, se une a su sensor SCAP por su dominio sensible al esteroles, cambiando su conformación molecular y permitiendo su unión a Insig (*Insulin-induced gene*), otra proteína del RE. Esta unión impide a SCAP unirse a las proteínas COPII, bloqueando la migración del complejo SREBP-SCAP al Golgi y en consecuencia, la activación y maduración de las proteínas SREBPs es inhibida (83,84). Una vez en el núcleo, varios cofactores cooperan con las proteínas SREBPs en la transcripción de sus genes blanco, entre ellos se encuentran los factores de transcripción NFY (*nuclear transcription factor*), Sp1 (*specificity protein 1*) y CBP (*CREB-binding protein*) (85). El factor PGC-1 β (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivador-1 β*) actúa como un coactivador transcripcional de los genes lipogénicos (86).

Regulación de SREBP-1c

Además de poder autorregularse induciendo su propia transcripción (83), SREBP-1c está controlado por factores hormonales y nutritivos, así como por el receptor LXR. La transcripción, el procesamiento proteolítico, la cantidad y la estabilidad de SREBP-1c están controlados por insulina. En hepatocitos aislados de ratón se ha observado que la insulina aumenta hasta 40 veces el ARNm de SREBP-1c (87), mientras que disminuye con el tratamiento con estreptozotocina, un inhibidor de la secreción de insulina (88). La vía de señalización PI3K/AKT-mTORC1 es fundamental en esta regulación, ya que la expresión y la maduración de SREBP-1c se bloquean con rapamicina, un inhibidor de mTORC1 (87). Además, se requiere la activación de la p70S6quinasa (vía PI3K/Akt-mTORC1- p70S6K) (89) para regular el procesamiento proteolítico de SREBP-1c, lo que favorece su maduración. Se ha demostrado además, que la insulina a través de la vía Akt/PKB incrementa la afinidad del complejo SCAP-SREBPs por las proteínas COPII, mientras decrece su afinidad por la proteína Insig, la cual retiene el complejo en la membrana del RE, favoreciendo el procesamiento proteolítico de las proteínas SREBPs (90). La insulina también incrementa los niveles de nSREBPs al inhibir la acción represora de la lipina-1 sobre la función de transcripción de las proteínas SREBPs. Este efecto se verifica mediante la fosforilación de la lipina-1 por mTORC1, impidiendo su depósito en el núcleo, lo que elimina su efecto represor y aumenta la cantidad de nSREBPs (91).

Interacción de insulina y LXR en el control de SREBP-1c

El control transcripcional de *SREBP-1c* por insulina requiere la presencia del receptor LXR (Figura 2). LXR altamente expresado en el hígado forma heterodímeros (LXR/RXR) con el receptor del ácido 9-*cis* retinoico (RXR), que en estado basal se une a los elementos de respuesta LXREs en el promotor de sus genes blanco (92). *SREBP-1c* es un blanco directo de LXR, ya que contiene dos elementos de respuesta a LXR en su promotor (LXRE1, LXRE2), que son fundamentales para la regulación de su transcripción (93), puesto que la insulina, requiere la cooperación de las secuencias LXRE y SRE, para inducir la expresión de *SREBP-1*(94). De acuerdo con esto, el tratamiento con un agonista de LXR incrementa significativamente la transcripción del gen *SREBP-1c*, aun en condiciones de una sobrecarga de esterol (95), mientras que el tratamiento con un antagonista de LXR bloquea la activación de la transcripción de *SREBP-1* por insulina (94). Sin embargo, el incremento del ARNm de *SREBP-1c* mediado por LXR parece ser insuficiente para la maduración completa de n-*SREBP-1c*, lo que se ha atribuido a un procesamiento proteolítico limitado, ya que LXR aumenta la expresión de la proteína Insig-2, con la subsiguiente retención de *SREBP-1c* en el RE. Por el contrario, en presencia de insulina, que regula a la baja Insig-2, se incrementa el transporte del complejo *SREBPs-SCAP* al Golgi, aumentando la lipogénesis, lo que ha sugerido que la interacción de insulina y LXR en el control de Insig podría ser un mecanismo protector del exceso de lípidos (96).

Estado nutritivo y SREBP-1c

El estado nutritivo es también un importante regulador de *SREBP-1c* en hígado, TAB y músculo esquelético. Su expresión disminuye con el ayuno y se incrementa por realimentación con una dieta HCD, a consecuencia del aumento de la glucemia y de la insulinemia (97). Se ha sugerido a este respecto que la glucosa tiene un efecto regulador sobre *SREBP-1c* mediante una acción directa a nivel transcripcional (98), aunque este concepto está en plena investigación. Sin embargo, se ha demostrado que en respuesta a carbohidratos se requiere la acción sinérgica de ambos factores de transcripción, *SREBP-1c* y ChREBP, sensible a glucosa, para regular los genes glucolíticos y lipogénicos (99), ya que se ha observado que la delección de *SREBP-1c* en el ratón sometido a una dieta HCD, solo induce una disminución del 50% en la síntesis de AG, lo que ha sugerido que la actividad de *SREBP-1c* no parece ser suficiente, en sí misma, para estimular la total expresión de estos genes (100). Por otra parte, dietas altas en grasa saturada (86) y en fructosa (101) aumentan la respuesta lipogénica en el hígado a través de la activación de *SREBP-1c* mediada por el coactivador PGC-1 β , mientras que por el contrario, los AG PUFA disminuyen la cantidad del n-*SREBP-1c* maduro al inhibir la proteólisis del factor *SREBP-1c*, a través de la regulación del catabolismo proteasómico de Insig, (102).

Otros reguladores de SREBP-1c

Se han descubierto recientemente otros reguladores, positivos y negativos, de SREBP-1c. En el ratón *ob/ob* insulín resistente se ha observado que el estrés del RE puede activar SREBP-1c, al eliminar la acción inhibidora de la proteína Insig1 sobre la migración al Golgi de SREBP-1c, aumentando así, su forma madura (nSREBP-1c) (103). También el aminoácido glutamina y la proteína RBP4 activan SREBP-1c al aumentar su expresión y procesamiento a través del Golgi, el primero, (104) e induciendo su maduración y migración al núcleo, la segunda (105). Por el contrario, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), la desacetilasa NAD⁺-dependiente (SIRT1) y la quinasa AMPK regulan a la baja la transcripción, el procesamiento, el transporte al núcleo y la estimulación de SREBP-1c sobre sus genes blanco (106, 107).

El factor SREBP-1c y el HGNA

El factor SREBP-1c hepático juega un papel esencial en el desarrollo del HGNA. El aumento de la concentración del nSREBP-1c es un mecanismo potencial para aumentar la síntesis *de novo* de los AG en el hígado, al regular al alza los genes glucolíticos (*GCK*) y lipogénicos (*ACLY*, *ACACA*, *FASN*, *GPAT*, *ELOVL6*, *SCD1* y *LPIN1*) en cooperación con LXR y ChREBP, en situaciones de hiperinsulinemia e hiperglucemia (108), como se ha observado en varios modelos animales de RI y en clínica humana (Figura 2). Así, la esteatosis hepática desarrollada en ratones que sobreexpresan SREBP-1c (108) y en ratones *ob/ob* leptina-deficientes (88), presenta dicho origen. De igual modo, en pacientes con VIH que sufren lipodistrofia, la sobreexpresión hepática de SREBP-1c, se ha asociado con el desarrollo de esteatosis (109), mientras que en pacientes obesos se ha encontrado el único polimorfismo del gen *SREBP-1c*, que predispone al hígado graso (110). Además, varios estudios experimentales han mostrado el papel fundamental que tiene SREBP-1c como inductor del HGNA, a consecuencia de la ingesta de un exceso de calorías procedentes de grasa (111) o de carbohidratos (101), mientras que por el contrario, la deficiencia hepática de SREBP-1c o la administración de PUFA reducen muy significativamente la infiltración grasa del hígado (100, 112). Por otra parte, la influencia que la alteración de las vías de activación y regulación de SREBP-1c tienen en el desarrollo del HGNA se ha puesto de manifiesto en varios modelos experimentales. Así, un efecto protector sobre la esteatosis desarrollada en el ratón *ob/ob* o la inducida por sobrealimentación se ha observado, respectivamente, por la deficiencia hepatoespecífica de la Akt2 (113), o por la de raptor (componente del complejo mTORC1), que elimina aparentemente toda la actividad de mTORC1 (91). En contraste, la delección de TSC1 (tuberous sclerosis protein complex), que funciona como un regulador negativo de TORC1 en la vía Akt, da lugar al aumento de la actividad de TORC1, lo que parece proteger de la esteatosis inducida por la dieta HFD (114). Los autores atribuyen este efecto a la

activación de una vía dependiente de Akt, pero resistente a rapamicina, que podría limitar la señal de insulina sobre SREBP-1c y por lo tanto disminuir la síntesis de AG. Asimismo, la delección de la proteína SCAP parece reducir la lipogénesis y proteger de la esteatosis hepática aún en condiciones de obesidad, hiperinsulinemia e hiperglucemia (115), debido a la disminución del proceso de migración y maduración de SREBP-1c.

Como hemos visto, la inhibición de la vía SREBP-1c y su efecto reductor de la síntesis lipídica puede disminuir el riesgo de la aparición de enfermedades metabólicas como el hígado graso. Por ello, la posibilidad de inhibir diferentes pasos de la vía SREBP-1c, se contempla hoy como una nueva estrategia en el tratamiento de las enfermedades metabólicas en general y del HGNA en particular. El estudio de nuevas moléculas se ha intensificado en los últimos años y, en este sentido, Tang y col (116) encuentran una molécula, la betulina, abundante en la corteza del abedul, que inhibe de forma específica la maduración de SREBP-1c al inducir la interacción entre las proteínas SCAP e Insig y favorecer, por lo tanto, la retención del complejo SCAP-SREBP-1c en el RE. La betulina, además, disminuye la dislipemia y la RI en un modelo de síndrome metabólico, lo que podría ser un prometedor camino en la terapéutica de las alteraciones del metabolismo lipídico (117).

CHREBP

El factor de transcripción ChREBP, también conocido como MONDO A o MLXIPL, fue identificado en 2001 por el grupo de Uyeda (118) en extractos nucleares de tejido hepático de ratas alimentadas con una dieta HCD, como un factor de transcripción que induce la expresión del gen que codifica a la enzima piruvato-quinasa (L-PK), en respuesta a altas concentraciones de glucosa. La glucosa actúa como una molécula señal y, en sinergia con insulina, es necesaria para la inducción de la lipogénesis *de novo*, como se ha demostrado en el TAB (119) y en el hígado (120), para lo que se requiere su metabolización vía GK (99). En estos tejidos la glucosa estimula la transcripción de genes glucolíticos y lipogénicos, mediante la activación del factor ChREBP y su unión específica al elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE), compuesto por dos cajas E separadas por 5 nucleótidos (5'-CACGTGnnnnnCACGTG-3') (121). Otras funciones de ChREBP recientemente descubiertas son el control del ritmo circadiano, de la señal redox y del sistema endocrino (122).

ChREBP es un FT de la familia bHLH-LZ que presenta dos isoformas, α y β . Se ha sugerido que el gen *ChREBP α* es el primero que se transcribe y este a su vez, activaría posteriormente la transcripción de *ChREBP β* , mucho más potente (123). *ChREBP α* es una proteína de 94,6 kDa cuya estructura está muy conservada entre las especies, con una homología de secuencia del 82% entre el hombre, la rata y el

ratón (124). La proteína presenta varios dominios: una señal de localización nuclear (NLS), una señal de exportación nuclear (NES), los dominios bHLH-LZ y LZ y dominios de poliprolina. Además, contiene un módulo sensible a glucosa (GSM), que a su vez, consta de un dominio inhibidor a baja glucosa (LID) y un elemento conservado de activación en respuesta a glucosa (GRACE). LID, a su vez, presenta la región conservada MONDO (MCR) I-IV, y GRACE contiene MCR V (122). Por su parte, la isoforma ChREBP β solo contiene GRACE en el módulo GSM (123). La expresión de ambas isoformas de ChREBP es ubicua, aunque muy abundante en hígado, TAB y tejido adiposo marrón (TAM), pero difiere en su localización intracelular. ChREBP α se sitúa en el núcleo y en el citosol celular, mientras ChREBP β presenta localización nuclear. En respuesta a altas concentraciones de glucosa, ChREBP α es rápidamente relocalizado desde el citosol hacia el núcleo (125). Una vez en el núcleo ChREBP debe unirse al elemento de respuesta a carbohidratos (ChoRE), en la región promotora de los genes glucolíticos y lipogénicos, lo que requiere la heterodimerización de ChREBP con la proteína Mlx (Max-like protein), un miembro de la familia de FT (bHLH-LZ), Myc/Max/Mad, que es un cofactor obligado de ChREBP en la regulación de estos genes hepáticos. Se configura así el complejo ChREBP/Mlx como el principal mediador de la expresión génica en respuesta a glucosa (126).

Regulación de la actividad de ChREBP

Se han postulado varias modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de ChREBP en respuesta a glucosa. El mecanismo de fosforilación/defosforilación, el mejor caracterizado, puede actuar como un regulador positivo o negativo de ChREBP y tiene gran importancia para su localización intracelular. Así, la proteína-quinasa activada por AMPc (PKA) y la AMPK, regulan negativamente ChREBP, mediante la fosforilación de los residuos Ser196, Ser626 y Treo666 (PKA) y de Ser568 (AMPK) de su molécula, reteniéndolo en el citosol en respuesta a bajas concentraciones de glucosa, a dietas HFD o en situaciones de ayuno (127), mientras que por el contrario, la defosforilación de ChREBP en el residuo Ser196, induce su entrada en el núcleo en respuesta a la sobrecarga de glucosa (128). Otras posibles modificaciones postraduccionales de ChREBP son la acetilación en el residuo Lys 67, por acción del coactivador p300 con actividad histona acetiltransferasa (HAT) (129) y la O-glicosilación por activación de la O-N-acetilglucosamina-transferasa (OGT), enzima que transfiere el monosacárido N-acetilglucosamina a los residuos Ser/Treo de ChREBP (130). Ambas son reguladores positivos del factor, aumentando sus niveles y su capacidad de transcripción. En este sentido se ha observado que el aumento de la acetilación y la o-glicosilación de ChREBP, bajo condiciones de hiperglucemia (ratón *ob/ob* y *db/db*), incrementan su activación, favoreciendo el desarrollo de esteatosis hepática (129, 131).

Metabolitos implicados en la activación del complejo ChREBP/Mondo-Mlx.

Varios metabolitos de la glucosa han sido implicados en la activación de ChREBP/Mondo-Mlx. Se ha señalado a la enzima xilulosa 5-fosfato (Xu-5P), un intermediario de la vía de las pentosas fosfato, como un posible mediador que induce la entrada de ChREBP en el núcleo. El mecanismo implica la activación de la fosfatasa 2A (PP2A), que defosforila ChREBP en el residuo Ser196. En el núcleo una segunda defosforilación en el residuo Treo666, PP2A-inducida, le permite al factor ChREBP unirse a las secuencias ChoRE de los genes blanco, induciendo su transcripción (132). Otros metabolitos (glucosa-6-fosfato (Glu-6-P) y fructosa 2,6-bisfosfato (F-2,6P2)) también se han propuesto como activadores de ChREBP. Los trabajos de Dentin y col (133), señalan al metabolito Glu-6-P, como la molécula fundamental de activación de ChREBP, ya que demuestran que la sobreexpresión de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6-PDH) suprime la actividad de ChREBP a través de la disminución de los niveles de Glu-6-P y, viceversa, la delección de G6-PDH incrementa la actividad transcripcional de ChREBP por aumento de los niveles de Glu-6-P. Por otra parte, el metabolito F-2,6P2 que se sintetiza a partir de fructosa-6-fosfato (F-6-P) y es degradado de nuevo a F-6-P por la acción de la enzima bifuncional fructosa 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/FBPasa2), ha sido implicado en la respuesta de ChREBP a glucosa en hepatocitos. Se ha comprobado a este respecto que la depleción selectiva de F-2,6P2, por una variante deficiente de la actividad bisfosfatasa de PFK-2/FBPasa2, inhibe la unión de ChREBP a sus genes blanco (134).

Regulación transcripcional de ChREBP

Los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación transcripcional del gen *ChREBP* no son bien conocidos. Se ha sugerido que ChREBP puede regular su propia expresión en respuesta a glucosa (126), pero estudios recientes han mostrado que LXR y el receptor de la hormona tiroidea β (TR- β) son los reguladores transcripcionales básicos de este factor en el hígado, por su unión en la región promotora del gen a los elementos de respuesta, LXRE1 y LXRE2 (Figura 2) (135,136). El heterodímero LXR/RXR presenta una gran afinidad por LXRE1, regulando al alza la transcripción de *ChREBP* como gen diana directo de LXR α (135). Cha y Repa (135) encuentran que el tratamiento con agonistas de LXR y RXRs aumenta hasta 6 veces el ARNm de ChREBP en el hígado del ratón salvaje, pero no en el doble *knockout* de LXR (LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}). Además, el hecho de que la deficiencia en LXR disminuya hasta un 80% la lipogénesis hepática, un porcentaje superior al producido por la delección independiente de SREBP-1c (50%) (100) y ChREBP (60%) (137,138)), señala la dependencia directa de ambos respecto a la estimulación de LXR para ejercer sus funciones. El receptor nuclear TR- β , por su parte, previa dimerización con RXR (TR- β /RXR), también regula positivamente la expresión génica de *ChREBP* por su unión específica a la secuencia LXRE2, pero no

a LXRE1 (que resulta ser preferente para LXR), aunque se ha demostrado, que la inducción de la expresión de *ChREBP* por TR- β , es independiente de LXR (136). Por último, la insulina es otro regulador positivo de *ChREBP* que actúa mediante la disminución de octamer-1 (Oct1), un represor de la transcripción que se une a su promotor (139).

ChREBP, lipogénesis, RI e HGNA

ChREBP, como intermediario de LXR y actuando en sinergia con SREBP-1c, regula al alza la expresión de genes implicados en el metabolismo de glúcidos y lípidos, incrementando la lipogénesis *de novo* (Figura 2). Usando un dominante negativo de Mlx (dnMlx) se han analizado los genes blanco cuya expresión está regulada por ChREBP/Mlx. Entre ellos destacan genes lipogénicos (*ACACA*, *FASN*, *ELOVL6*, *SCD1* Y *GPAT*), glucolíticos (*PKLR*), gluconeogénicos (*GLPC* (glu-6-Pasa, subunidad catalítica)) y *PEPCK* (fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa), de la vía de las pentosas fosfato (*G6PD* (G6-PDH) y *TKT* (transcetolasa) y el gen *S14* del enzima Spot 14, inducible por glucosa, que presenta una acción específica de tejido promotora de la lipogénesis (126, 140). De acuerdo con este perfil funcional, el factor ChREBP puede considerarse como un mediador de la conversión de un exceso de carbohidratos en lípidos, cuya activación, puede inducir el desarrollo del HGNA. Este efecto proesteatótico de la activación de ChREBP se ha confirmado en el hígado de pacientes con EHNA y en sujetos obesos (141, 142), en los que se observa un aumento de la expresión del ARNm de ChREBP, mientras que por el contrario, en el ratón *knockout* (ChREBP^{-/-}) se reducen las vías glucolítica y lipogénica hepáticas y los AGL circulantes (137). Sin embargo, los datos actuales del papel jugado por ChREBP en el metabolismo de la glucosa y en especial sobre la RI y su relación con la lipogénesis durante el desarrollo del HGNA, son confusos y contradictorios. Así, mientras la deficiencia global de ChREBP, reduce la lipogénesis y mantiene la RI (137), su inhibición hepatoespecífica o la sobreexpresión de un antagonista (dnMlx) mejora ambas, la esteatosis y la RI, en el hígado del ratón *ob/ob* (143) y en el ratón C57BL/6J diabético (144), lo que se ha asociado con un aumento de la actividad de la vía AKT/PKB y de las cinasas ERK1 y ERK2 hepáticas (145). Teniendo en cuenta los dos fenotipos, Benhamed y col (142) han propuesto que este efecto beneficioso de la deficiencia de ChREBP sobre el metabolismo de la glucosa, aumentando la sensibilidad a la insulina, solo puede producirse en el caso de una sobrecarga de lípidos. El trabajo realizado por este grupo, que puede cambiar el concepto actual del papel que ChREBP tiene en la esteatosis hepática y en la RI, muestra que la sobreexpresión de ChREBP en ratones sometidos a una dieta estándar desarrolla esteatosis hepática, pero permanecen insulín-sensibles. Más interesante aún, ratones alimentados con una dieta HFD y que sobreexpresan ChREBP presentan una insulinemia normal y una mejora de la señalización insulínica y de la tolerancia a la glucosa, a pesar de

desarrollar una esteatosis hepática masiva en relación al control. Los autores atribuyen la mejora de la sensibilidad insulínica a la modificación de las especies lipídicas que componen el depósito graso del hígado y que resulta del incremento de los AG monoinsaturados (MUFAs), respecto a los AGS lipotóxicos como el palmitato, que disminuyen, modificando el balance MUFA/AGS a favor de MUFA. El aumento de la expresión de la enzima SCD1, cuyo gen es blanco de ChREBP y que convierte los AGS en MUFA, parece ser fundamental para implementar el efecto beneficioso que la activación de ChREBP tiene en la esteatosis hepática. Benhamed y col (142) postulan que la estimulación de ChREBP parece disociar la esteatosis hepática de la RI, generando efectos paliativos sobre ambos, el metabolismo glucídico y el lipídico, al tamponar los AG lipotóxicos y favorecer la partición de los lípidos en el tejido. Este resultado refuerza el concepto de que no todos los lípidos son perjudiciales para la sensibilidad a la insulina y que, almacenados en el espacio y en el tiempo en zonas adecuadas, pueden generar señales que modulen la adaptación al estrés (146). Entre las consecuencias que se pueden derivar de estos resultados, se encuentran en primer lugar, la reconsideración del concepto del factor ChREBP como promotor de la esteatosis hepática y de la RI y en segundo, la posibilidad de explorar la expresión de ChREBP como un posible blanco terapéutico del HGNA y de otras manifestaciones del síndrome metabólico (147).

RECEPTOR X HEPÁTICO (LXR)

Los receptores LXR son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (RN) (148) y cuya función es esencial en la regulación del metabolismo del COL y de los ácidos biliares y en el control de la homeostasis lipídica y glucídica y de la inflamación, en respuesta a oxisteroles (138, 149, 150). Existen dos isoformas de LXR (LXR α y LXR β), que presentan entre sí un 78% de identidad y que son codificadas respectivamente, por los genes *NR1H3* y *NR1H2* (151). LXR α se expresa mayoritariamente en el hígado y en menor medida en intestino, TAB, riñón y macrófagos y su función primordial es regular de forma específica de tejido, el metabolismo del COL y la lipogénesis *de novo*, como se ha observado en el ratón deficiente en LXR α (LXR α ^{-/-}) y en el doble deficiente (LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}) (138, 149, 152). La isoforma LXR β , por su parte, tiene una expresión ubicua y actúa de forma primordial como un regulador del metabolismo glucídico y de la homeostasis energética en el TAB y en músculo estriado (153). A este respecto, en el ratón LXR β ^{-/-}, se ha observado un aumento del gasto energético y un efecto protector frente a la obesidad inducida por dieta, que se acompaña de un aumento de la expresión de la proteína desacoplante 1 (UPC1) en varios tejidos, en especial en el TAM (153,154).

Su estructura, común para todos los RN, presenta un dominio activador funcional de la transcripción (AF-1) N-terminal, independiente de ligando; un

dominio de interacción al ADN (DBD), que contiene dos dedos de zinc que interaccionan con los sitios DR4 en el promotor de los genes blanco; un dominio D, donde se produce la interacción con cofactores y un dominio de unión a ligandos C-terminal (LBD), que contiene una función activadora dependiente de ligando (AF-2), que media la activación de la maquinaria de transcripción (155).

Activación de LXR

Según el mecanismo de activación convencional, el heterodímero (LXR/RXR) en ausencia de ligando se une al ADN sobre sus elementos de respuesta (LXREs), compuestos por dos secuencias (5'-AGGTCA-3'), separadas por cuatro nucleótidos (DR4)(93) e interacciona con corepresores, como NCoR (*nuclear receptor co-represor*) o SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptors*), que bloquean la transcripción al unirse con proteínas con actividad histona desacetilasa (HDAC), a través de la proteína Sin3A (*stress-activated MAPkinase interacting protein 3*)(156). Una vez unido al ligando, LXR cambia su conformación, liberando los corepresores y reclutando coactivadores como ASC2 (*activating signal cointegrator-2*) o RIP140 (*receptor interacting protein 140*) sobre el LBD, que permite a la cromatina tener un estado permisivo para iniciar la transcripción (157,158).

Además de activarse también por un mecanismo de activación alternativa, mediante la modulación por marcadores epigenéticos (159), LXR puede regular negativamente la expresión de genes inflamatorios que contienen sitios NF-kB, AP-1 o STATs (*signal transducer and activator of transcription*), por el mecanismo de transrepresión dependiente de ligando (160).

Regulación de LXR

La activación de LXR y su unión al ADN está regulada por una interacción compleja entre sus ligandos, los cofactores, las hormonas y las modificaciones postraduccionales que le afectan. Varios tipos de oxiesteroles, entre ellos, 20(S)-hidroxicolesterol, 22(R) hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol y 24(S) y 25-epoxicolesterol, derivados de la oxidación del COL, son ligandos naturales activadores de LXR en hepatocitos y en otros tipos celulares (161). También se han utilizado, tanto *in vivo* como *in vitro* (162), agonistas sintéticos de LXR como T091317, GW3965 o WYE-672, mientras que los AG PUFA actúan como antagonistas (163). Por otra parte, los corepresores NCoR y SMRT (156) son reguladores negativos de LXR, mientras el cofactor PPAR γ coactivador-1 α (PGC-1 α), parece potenciar su actividad (164).

Entre las modificaciones postraduccionales que pueden afectar a LXR, podemos destacar la desacetilación por SIRT-1, en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. El cambio de conformación de LXR, una vez unido a su ligando, favorece su interacción con SIRT1 en residuos de lisina, desencadenando la ubiquitinación y

degradación del receptor, mecanismo importante para su reciclaje y activación (165). Además, la fosforilación de LXR por PKA, que regula negativamente la actividad de LXR, impide la transcripción de *SREBP-1c* en los hepatocitos (166). Otra importante modificación de LXR es la sumoilación, que resulta fundamental para la transactivación de los genes antiinflamatorios (160).

Por otra parte, en estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha observado que la insulina estimula al alza la expresión del ARNm de LXR α en hepatocitos, mientras que este disminuye, junto a la de otros genes lipogénicos (ACC, FAS), en los ratones *knockout* LXR α ^{-/-} y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} tratados con la hormona (167), lo que confirma el papel fundamental de LXR como sensor de la insulina en la estimulación fisiológica de la expresión de *SREBP-1* (94). El mecanismo propuesto sugiere que la insulina inhibiría por fosforilación mediante la proteína quinasa B (PKB), la forma activa de FoxO1, eliminando su efecto inhibitor sobre la unión de LXR a los LXREs del promotor de *SREBP-1c*, favoreciendo su transcripción (168). Por último, los RN PPAR α y PPAR γ son reguladores positivos de la expresión de LXR (169), mientras el receptor X farnesoide (FXR), un FT que es activado por los ácidos biliares, reprime la actividad de LXR mediante la inducción de la proteína SHP (*small heterodimer partner*), un RN huérfano, atípico, que no contiene el dominio DBD (170).

LXR y el metabolismo del colesterol

LXR fue inicialmente identificado por su función de sensor nuclear del COL (138, 149). Su función, esencial en el metabolismo y en el aclaramiento del COL en respuesta a oxisteroles y a agonistas sintéticos, contribuye a la eliminación del exceso de COL en el organismo. Estudios en modelos transgénicos de ratón han puesto de manifiesto que LXR induce la síntesis de ácidos biliares a partir del COL hepático, regulando al alza el gen *CYP7A1* que codifica a la colesterol-7 α -hidroxilasa, enzima limitante de dicha síntesis (149), mientras que por el contrario, el hígado del ratón LXR α ^{-/-} alimentado con una dieta alta en COL, presenta una sobrecarga de COL esterificado (171). La administración *in vivo* de agonistas de LXR también incrementa el aclaramiento del COL mediante la regulación al alza de la expresión de genes relacionados con la absorción, la excreción y el transporte reverso del COL (RCT), como los transportadores ABCA1, ABCG1/ABCG4 y ABCG5/ABCG8 en hígado, intestino y macrófagos (172). En este sentido, el hecho de que la inducción de la proteína ABCA1 intestinal por activación de LXR α eleve las lipoproteínas HDL en plasma, parece indicar que el efecto sobre el RTC se produce fuera del hígado y sugiere que el LXR intestinal tiene importancia en la biogénesis del HDL-colesterol, vía ABCA1 (173). Además, el aumento de la expresión de la apolipoproteína E asociada a HDL, que facilita el flujo del COL celular, ha sugerido un papel protector de LXR en la aterosclerosis (174).

LXR y el metabolismo de la glucosa

En modelos murinos de RI se ha demostrado que agonistas sintéticos de LXR incrementan la sensibilidad a la insulina y reducen la glucemia (175, 176). El efecto neto sería el aumento de la utilización de la glucosa y la reducción de su producción hepática, aunque los datos existentes son contradictorios. Una menor producción de glucosa hepática se ha observado en el ratón *db/db* (175) y en ratas alimentadas con una dieta HFD (177) por activación de LXR, debido a la regulación a la baja de la expresión génica de las enzimas gluconeogénicas PEPCK y Glu-6-Pasa. Por otra parte, el efecto sensibilizador a la insulina de LXR se asocia con el aumento de la captación de la glucosa basal y la estimulada por insulina, a través de la regulación al alza de los transportadores GLUT4 y GLUT1, observado en adipocitos 3T3-L1 que sobreexpresan LXR (176) y en el TAB de ratones tratados con el agonista GW3965 (178). Este efecto beneficioso sobre el metabolismo de la glucosa parece mediado por ambas isoformas de LXR, aunque solo el ratón *LXR α ^{-/-}*, muestra un nivel disminuido de la expresión de GLUT4 (179). Por el contrario, otros estudios o no han podido reproducir estos efectos (180) u observan un efecto negativo de LXR, sobre la captación de glucosa. En este sentido, Pettersson y col. (2013) (181) señalan que la activación de LXR en adipocitos humanos inhibe la traslocación a la membrana de GLUT4 y suprime varios genes que codifican mediadores de la señalización insulínica (*Akt2*, la proteína asociada a c-Cbl (*CAP*) y la caveolina1), generando un efecto diabético. Además, aunque ambas isoformas *LXR α* y *LXR β* inducen la secreción de insulina estimulada por glucosa (182), este efecto se contrarresta por el aumento de la lipogénesis pancreática derivada de la activación de LXR, que conduce a lipotoxicidad, daño celular y disfunción de la célula beta (183).

LXR α . lipogénesis e HGNA

El receptor LXR es el regulador fundamental de la biosíntesis de los AG en el hígado, función que lleva a cabo mediante un doble mecanismo: un efecto directo sobre los genes que codifican las enzimas lipogénicas ACC, FAS y SCD-1, por interacción con los LXREs funcionales contenidos en su promotor (184, 185,186) y otro indirecto, ya señalado, que se efectúa mediante el control de la expresión génica de *SREBP-1c* y *CHREBP*, que son dianas de LXR (Figura 2) (94, 135,186). Por ello, la sobreexpresión de LXR en un modelo diabético de ratón (*db/db*) (187) o la administración del agonista T0901317 (188), inducen una esteatosis hepática masiva, trigliceridemia y un incremento de la secreción de VLDL. En sentido opuesto, ratones *knockout* (*LXR α ^{-/-}*) muestran una disminución en la expresión de los genes lipogénicos indicados (149), lo que confirma su implicación en el desarrollo del HGNA. El mediador primordial del efecto prolipogénico de LXR es la isoforma *LXR α* (138,149), aunque recientemente se ha demostrado la participación de *LXR β* en el proceso, ya que el efecto estimulador del agonista

T0901317 sobre la lipogénesis *de novo*, se reduce en el ratón LXR β ^{-/-} (189) y además este subtipo parece mediar la esteatosis hepática inducida por glucocorticoides (190).

Por lo tanto, LXR como regulador principal junto con SREBP-1c y CHREBP forman una red de FT que, de forma coordinada, controlan la lipogénesis *de novo* hepática y cuya sobreexpresión media la infiltración grasa del hígado en respuesta a la hiperinsulinemia y la hiperglucemia desarrolladas en estados de RI, como en el HGNA (Figura 2)(191, 192).

LXR e inflamación

Estudios recientes hacen énfasis en el papel fundamental que LXR parece tener en la integración de las señales metabólica e inflamatoria (193) y su proyección en numerosas enfermedades, entre ellas las relacionadas con el síndrome metabólico, en las que estos aspectos están intrínsecamente unidos (194). A este respecto, se han identificado a las isoformas LXR α y LXR β como factores de transcripción antiinflamatorios y reguladores fisiológicos de la fagocitosis, de la respuesta inmune y de la apoptosis (195). Mediante el mecanismo de transrepresión, LXR regula a la baja la expresión de genes inflamatorios y de la inmunidad innata en diversos tipos celulares, incluyendo los hepatocitos (160), las células de Kupffer (196) y las células estrelladas (HSC) del hígado (197). Los primeros datos al respecto indican que la activación de los LXRs en macrófagos, antagoniza la expresión de iNOS y COX-2, en respuesta a la estimulación con endotoxina (LPS), TNF α o IL-1 β , mediante la inactivación de los factores de transcripción NF- κ B, STATs y AP-1 (193). Del mismo modo, el tratamiento de las células de Kupffer con el agonista GW3965 interfiere con la regulación postranscripcional de la producción de TNF α y la activación de la quinasa MAPK p38, inducidos por LPS, reduciendo los niveles de TNF α y protegiendo al hígado de la endotoxemia (196). Asimismo, ambas isoformas, LXR α y LXR β , inhiben la expresión de las proteínas de fase aguda, aunque LXR β parece ser el mediador principal (160). En otro sentido, un efecto inhibitorio de LXR sobre la activación de las células HSC hepáticas se ha descrito recientemente (198). En este estudio la estimulación de LXR mantiene el fenotipo quiescente de las células HSC, disminuyendo la producción de marcadores de la fibrogénesis, mientras por el contrario, la doble deficiencia de LXR (LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}), aumenta su capacidad fibrogénica, haciendo al hígado más susceptible al trauma. Todos estos datos han sugerido que la estimulación de LXR podría ser beneficiosa en la progresión del HGNA a la EHNA, no solo por su efecto preventivo de la alteración de las células de Kupffer y de las HSC (196,197), sino también por su capacidad de aumentar la excreción del COL libre, un lípido que actúa como una molécula lipotóxica, capaz de inducir la inflamación (199, 200).

Debido a sus funciones antiaterogénica, antidiabética y antiinflamatoria, en los últimos años se ha intentado el uso en terapéutica de LXR y de sus agonistas, pero su utilización se ha visto limitada por el efecto deletéreo que genera sobre el metabolismo lipídico desarrollando hígado graso. La búsqueda de nuevos agonistas de LXR que manteniendo sus efectos beneficiosos puedan reducir al mismo tiempo los prolipopépticos, ha sido intensa, aunque en principio la aparición de otros efectos colaterales en algunos compuestos, ha conducido a abandonar su uso. Actualmente sin embargo, la investigación se orienta en la síntesis de moléculas que puedan disecar las funciones individuales y muy específicas de los subtipos de LXR, obviando así, los efectos indeseados (201). En relación a un posible tratamiento de la esteatosis y de otras enfermedades metabólicas, muy recientemente se ha descrito un agonista inverso de LXR (SR9238), hepato-selectivo, que suprime además de la colesterolemia, la lipogénesis y el daño hepáticos en un modelo experimental de obesidad inducida por dieta HFD, lo que abre un camino muy relevante en la prevención del HGNA y quizá de su progresión a la EHNA (202). Sin embargo, para cumplir con el objetivo de obtener moléculas beneficiosas en el tratamiento del HGNA y EHNA, la investigación actual se orienta hacia el estudio de la interacción funcional entre LXR, SREBP-1c y ChREBP con otros reguladores del metabolismo de glúcidos y de lípidos tales como el receptor FXR, el receptor X pregnano (PXR), el receptor constitutivo de androstano (CAR), el receptor de la vitamina D (VDR) y los receptores de la familia PPARs (α β y γ), a fin de poder conocer en toda su dimensión, la regulación molecular de la vía lipogénica y su proyección en la patogenia de la esteatosis y su progresión a la EHNA, abriendo la posibilidad de encontrar nuevas dianas, útiles en la terapia de esta enfermedad (194) (203)(204).

CONCLUSIÓN

En los últimos años se ha progresado de forma sustancial en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen en la patogenia del HGNA y su progresión hacia la EHNA. El HGNA puede ser considerado como la manifestación hepática del síndrome metabólico cuya primera causa es la RI. El acúmulo de TG en los hepatocitos es básicamente el resultado del aumento del aporte de AGL circulantes y de la lipogénesis *de novo*. Los factores de transcripción SREBP-1c, ChREBP y LXR, forman una red funcional interactiva que regula al alza la transcripción de genes que codifican enzimas de la biosíntesis de los AG y de los TG en respuesta a insulina, glucosa y oxiesteroles y que están implicados en el desarrollo del HGNA. Los datos actuales permiten dirigir la atención en varias direcciones: el estudio del papel diferencial y específico que el factor ChREBP parece tener en el hígado respecto al TAB, en donde se postula un efecto reductor de la lipogénesis *de novo* y de la RI en la obesidad humana (205); un mayor

conocimiento de la interrelación funcional de todos los FT implicados en la regulación de los factores que afectan al HGNA; y el desarrollo de agonistas selectivos, sin efectos secundarios, que puedan tener efectos terapéuticos específicos sobre el HGNA y su progresión a la EHNA.

REFERENCIAS

1. Farrell, G.C., Larter, C.Z., 2006. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99-S112.
2. Angulo, P., 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346, 1221-1231.
3. Ludwig, J., Viggiano, T.R., McGill, D.B., Oh, B.J., 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55, 434-438.
4. Kopec, K.L., Burns, D., 2011. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of the spectrum of disease, diagnosis, and therapy. *Nutr Clin Pract* 26, 565-576.
5. Adams, L.A., Lindor, K.D., 2007. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol* 17, 863-869.
6. Marchesini, G., Babini, M., 2006. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Minerva Cardioangiol* 54, 229-239.
7. Edens, M.A., Kuipers, F., Stolk, R.P., 2009. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with cardiovascular disease risk markers. *Obes Rev* 10, 412-419.
8. Caballería, L., Pera, G., Auladell, M.A. y col. 2010. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22, 24-32.
9. Bellentani, S., Scaglioni, F., Marino, M., Bedogni, G., 2010. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* 28, 155-161.
10. Baumeister, S.E., Völzke, H., Marschall, P. y col. 2008. Impact of fatty liver disease on health care utilization and costs in a general population: a 5-year observation. *Gastroenterology* 134, 85-94.
11. Calori, G., Lattuada, G., Ragogna, F. y col. 2011. Fatty liver index and mortality: the Cremona study in the 15th year of follow-up. *Hepatology* 54, 145-152.
12. Kanuri, G., Bergheim, I., 2013. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* 14, 11963-11980.
13. Bugianesi, E., McCullough, A.J., Marchesini, G., 2005. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology* 42, 987-1000.
14. Morino, K., Petersen, K.F., Shulman, G.I., 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2, S9-S15.
15. Kotronen, A., Yki-Järvinen, H., 2008. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 27-38.
16. Savage, D.B., 2009. Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J Clin Invest* 119, 315-322.
17. Gonzalez-Baró, M.R., Lewin, T.M., Coleman, R.A., 2007. Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1195-1199.
18. Yamaguchi, K., Yang, L., McCall, S. y col. 2007. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45, 1366-1374.
19. Monetti, M., Levin, M.C., Watt, M.J. y col. 2007. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* 6, 69-78.
20. Minehira, K., Young, S.G., Villanueva, C.J. y col. 2008. Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice. *J Lipid Res* 49, 2038-2044.
21. Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X. y col. 2004. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 279, 32345-32353.
22. Samuel, V.T. y Shulman G.I. 2012. Integrating mechanisms for insulin resistance. Common threads and missing links. *Cell* 148, 852-871.

23. Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J. y col. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115, 1343-1351.
24. Ginsberg, H.N., Zhang, Y.L., Hernandez-Ono, A., 2005. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res* 36, 232-240.
25. Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J. y col. 2008. Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G1281-1287.
26. Hubbard, B., Doege, H., Punreddy, S. y col. 2006. Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity. *Gastroenterology* 130, 1259-1269.
27. Fabbrini, E., Sullivan, S., Klein, S., 2010. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 51, 679-689.
28. Foufelle, F., Ferré, P., 2002. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c.
29. Munday, M.R., 2002. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans* 30, 1059-1064.
30. Smith, S., Witkowski, A., Joshi, A.K., 2003. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Res* 42, 289-317.
31. Ntambi, J.M., Miyazaki, M., 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 43, 91-104.
32. Yen, C.L., Stone, S.J., Koliwad, S. y col. 2008. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res* 49, 2283-2301.
33. Chen, G., Liang, G., Ou, J. y col. 2004. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11245-11250.
34. Shimano, H., 2001. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* 40, 439-452.
35. Dentin, R., Girard, J., Postic, C., 2005. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87, 81-86.
36. Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A., Tiengo, A., 2009. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19, 291-302.
37. Kotronen, A., Seppälä-Lindroos, A., Vehkavaara, S. y col. 2009. Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver Int* 29, 1439-1446.
38. Lavoie, J.M., Gauthier, M.S., 2006. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci* 63, 1393-1409.
39. Reddy, J.K., Rao, M.S., 2006. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G852-858.
40. Leclercq, I.A., Farrell, G.C., Field, J. y col. 2000. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 105, 1067-1075.
41. Louet, J.F., Chatelain, F., Decaux, J.F. y col. 2001. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-independent pathway. *Biochem J* 354, 189-197.
42. Reddy, J.K., Hashimoto, T., 2001. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 21, 193-230.
43. Akiyama, T.E., Nicol, C.J., Fievet, C. y col. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates lipid homeostasis, but is not associated with obesity: studies with congenic mouse lines. *J Biol Chem* 276, 39088-39093.
44. Stienstra, R., Mandard, S., Patsouris, D. y col. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology* 148, 2753-2763.
45. Harano, Y., Yasui, K., Toyama, T. y col. 2006. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver. *Liver Int* 26, 613-620.
46. Adiels, M., Taskinen, M.R., Packard, C. y col. 2006. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 49, 755-765.

47. Adiels, M., Westerbacka, J., Soro-Paavonen, A. y col. 2007. Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance. *Diabetologia* 50, 2356-2365.
48. Choi, S.H., Ginsberg, H.N., 2011. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 22, 353-363.
49. Day, C.P., James, O.F., 1998. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114, 842-845.
50. Trauner, M., Arrese, M., Wagner, M., 2010. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801, 299-310.
51. Pérez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martín, M.A. y col. 2003. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 38, 999-1007.
52. Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C., 2006. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol* 21 Suppl 3, S3-6.
53. Maher, J.M., 2006. Mechanisms of liver injury due to fat", AASLD Postgrad. Course Syllabus, p.89-96.
54. Pessayre, D., Fromenty, B., 2005. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* 42, 928-940.
55. Grieco, A., Forgione, A., Miele, L. y col. 2005. Fatty liver and drugs. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 9, 261-263.
56. Wieckowska, A., Zein, N.N., Yerian, L.M. y col. 2006. In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 44, 27-33.
57. Carter-Kent, C., Zein, N.N., Feldstein, A.E., 2008. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment. *Am J Gastroenterol* 103, 1036-1042.
58. Feldstein, A.E., 2010. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 30, 391-401.
59. Stienstra, R., Saudale, F., Duval, C. y col. 2010. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology* 51, 511-522.
60. Leonarduzzi, G., Scavazza, A., Biasi, F. y col. 1997. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J* 11, 851-857.
61. Kaplowitz, N., Than, T.A., Shinohara, M., Ji, C., 2007. Endoplasmic reticulum stress and liver injury. *Semin Liver Dis* 27, 367-377.
62. Kammoun, H.L., Hainault, I., Ferré, P., Foufelle, F., 2009. Nutritional related liver disease: targeting the endoplasmic reticulum stress. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 575-582.
63. Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
64. Gentile, C.L., Frye, M., Pagliassotti, M.J., 2011. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Antioxid Redox Signal* 15, 505-521.
65. Wang, D., Wei, Y., Pagliassotti, M.J., 2006. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* 147, 943-951.
66. Schenk, S., Saberi, M., Olefsky, J.M., 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118, 2992-3002.
67. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y. y col. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769.
68. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y. y col. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8, 1288-1295.
69. Wu, X., Mahadev, K., Fuchsel, L. y col. 2007. Adiponectin suppresses I κ B kinase activation induced by tumor necrosis factor- α or high glucose in endothelial cells: role of cAMP and AMP kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1836-1844.
70. Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H. y col. 2003. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 112, 91-100.

71. Targher, G., Bertolini, L., Scala, L. y col. 2004. Decreased plasma adiponectin concentrations are closely associated with nonalcoholic hepatic steatosis in obese individuals. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61, 700-703.
72. Bertolani, C., Sancho-Bru, P., Failli, P. y col. 2006. Resistin as an intrahepatic cytokine: overexpression during chronic injury and induction of proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 169, 2042-2053.
73. Marra, F., 2007. Leptin and liver tissue repair: do rodent models provide the answers? *J Hepatol* 46, 12-18.
74. Ota, T., Takamura, T., Kurita, S. y col. 2007. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 132, 282-293.
75. Fuchs, M., Sanyal, A.J., 2012. Lipotoxicity in NASH. *J Hepatol* 56, 291-293.
76. Hotta, K., Yoneda, M., Hyogo, H. y col. 2010. Association of the rs738409 polymorphism in PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genet* 11, 172.
77. Petta, S., Muratore, C., Craxì, A., 2009. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: the present and the future. *Dig Liver Dis* 41, 615-625.
78. Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131.
79. Hua, X., Wu, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Hobbs, H.H., 1995. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics* 25, 667-673.
80. Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D. y col. 1997. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* 99, 838-845.
81. Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., Foufelle, F., 1999. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12737-12742.
82. Sato, R., 2010. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys* 501, 177-181.
83. Daemen, S., Kutmon, M., Evelo, C.T., 2013. A pathway approach to investigate the function and regulation of SREBPs. *Genes Nutr* 8, 289-300.
84. Jeon, T.I., Osborne, T.F., 2012. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 23, 65-72.
85. Bennett, M.K., Osborne, T.F., 2000. Nutrient regulation of gene expression by the sterol regulatory element binding proteins: increased recruitment of gene-specific coregulatory factors and selective hyperacetylation of histone H3 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6340-6344.
86. Lin, J., Yang, R., Tarr, P.T. y col. 2005. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell* 120, 261-273.
87. Li, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2010. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3441-3446.
88. Shimomura, I., Bashmakov, Y., Horton, J.D., 1999. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 274, 30028-30032.
89. Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S. y col. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39, 171-183.
90. Yellaturu, C.R., Deng, X., Park, E.A. y col. 2009. Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP).SREBP-1c complex. *J Biol Chem* 284, 31726-31734.
91. Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E. y col. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146, 408-420.
92. Willy, P.J., Mangelsdorf, D.J., 1997. Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev* 11, 289-298.
93. Yoshikawa, T., Shimano, H., Amemiya-Kudo, M. y col. 2001. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol* 21, 2991-3000.

94. Chen, G., Liang, G., Ou, J. y col. 2004. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11245-11250.
95. Ye, J., DeBose-Boyd, R.A., 2011. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. pii: a0047
96. Bobard, A., Hainault, I., Ferré, P. y col. 2005. Differential regulation of sterol regulatory element-binding protein 1c transcriptional activity by insulin and liver X receptor during liver development. *J Biol Chem* 280, 199-206.
97. Horton, J.D., Bashmakov, Y., Shimomura, I., Shimano, H., 1998. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5987-599217.
98. Hasty, A.H., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M. y col. 2000. Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *J Biol Chem* 275, 31069-31077.
99. Dentin, R., Pégurier, J.P., Benhamed, F. y col. 2004. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* 279, 20314-20326.
100. Liang, G., Yang, J., Horton, J.D. y col. 2002. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 277, 9520-9528.
101. Nagai, Y., Yonemitsu, S., Erion, D.M. y col. 2009. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell Metab* 9, 252-264.
102. Lee, J.N., Zhang, X., Feramisco, J.D. y col. 2008. Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig-1 at a postubiquitination step. *J Biol Chem* 283, 33772-33783.
103. Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I. y col. 2009. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 119, 1201-1215.
104. Inoue, J., Ito, Y., Shimada, S. y col. 2011. Glutamine stimulates the gene expression and processing of sterol regulatory element binding proteins, thereby increasing the expression of their target genes. *FEBS J* 278, 2739-2750.
105. Xia, M., Liu, Y., Guo, H. y col. 2013. Retinol binding protein 4 stimulates hepatic sterol regulatory element-binding protein 1 and increases lipogenesis through the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 β -dependent pathway. *Hepatology* 58, 564-575.
106. Zhang, Y., Lei, T., Huang, J.F. y col. 2011. The link between fibroblast growth factor 21 and sterol regulatory element binding protein 1c during lipogenesis in hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* 342, 41-47.
107. Ruderman, N.B., Xu, X.J., Nelson, L. y col. 2010. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E751-760.
108. Bécard, D., Hainault, I., Azzout-Marniche, D. y col. 2001. Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice. *Diabetes* 50, 2425-2430.
109. Lemoine, M., Barbu, V., Girard, P.M. y col. 2006. Altered hepatic expression of SREBP-1 and PPARgamma is associated with liver injury in insulin-resistant lipodystrophic HIV-infected patients. *AIDS* 20, 387-395.
110. Eberlé, D., Clément, K., Meyre, D. y col. 2004. SREBF-1 gene polymorphisms are associated with obesity and type 2 diabetes in French obese and diabetic cohorts. *Diabetes* 53, 2153-2157.
111. Biddinger, S.B., Almind, K., Miyazaki, M. y col. 2005. Effects of diet and genetic background on sterol regulatory element-binding protein-1c, stearoyl-CoA desaturase 1, and the development of the metabolic syndrome. *Diabetes* 54, 1314-1323.
112. Teran-Garcia, M., Adamson, A.W., Yu, G. y col. 2007. Polyunsaturated fatty acid suppression of fatty acid synthase (FASN): evidence for dietary modulation of NF- κ B binding to the Fasn promoter by SREBP-1c. *Biochem J* 402, 591-600.
113. Leavens, K.F., Easton, R.M., Shulman, G.I. y col. 2009. Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. *Cell Metab* 10, 405-418.

114. Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S. y col. 2011. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab* 14, 21-32.
115. Moon, Y.A., Liang, G., Xie, X. y col. 2012. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab* 15, 240-246.
116. Tang, J.J., Li, J.G., Qi, W. y col. 2011. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab* 13, 44-56.
117. Xiao, X., Song, B.L., 2013. SREBP: a novel therapeutic target. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 45, 2-10.
118. Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., Uyeda, K., 2001. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9116-9121.
119. Foufelle, F., Gouhot, B., Pégurier, J.P. y col. 1992. Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate. *J Biol Chem* 267, 20543-20546.
120. Girard, J., Ferré, P., Foufelle, F., 1997. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr* 17, 325-352.
121. Ishii, S., Iizuka, K., Miller, B.C., Uyeda, K., 2004. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15597-15602.
122. Iizuka, K., 2013. Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism. *Endocr J* 60, 543-555.43.
123. Herman, M.A., Peroni, O.D., Villoria, J. y col. 2012. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333-338.
124. Cairo, F., Rotundo, R., Frazzngaro, G. y col. 2001. [Diabetes mellitus as a risk factor for periodontitis]. *Minerva Stomatol* 50, 321-330.
125. Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H. y col. 2002. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277, 3829-3835.
126. Ma, L., Robinson, L.N., Towle, H.C., 2006. ChREBP**Mlx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J Biol Chem* 281, 28721-28730.55.
127. Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T., Uyeda, K., 2001. Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13710-13715.
128. Tsatsos, N.G., Towle, H.C., 2006. Glucose activation of ChREBP in hepatocytes occurs via a two-step mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 449-456.
129. Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F. y col. 2010. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 120, 4316-4331.
130. Zeidan, Q., Hart, G.W., 2010. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci* 123, 13-22.
131. Guinez, C., Filhoulaud, G., Rayah-Benhamed, F. y col. 2011. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* 60, 1399-1413.
132. Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B.E., Uyeda, K., 2003. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5107-5112.57.
133. Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Foufelle, F. y col. 2012. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *J Hepatol* 56, 199-209.
134. Arden, C., Tudhope, S.J., Petrie, J.L. y col. 2012. Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem J* 443, 111-123.

135. Cha, J.Y., Repa, J.J., 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282, 743-751.
136. Gauthier, K., Billon, C., Bissler, M. y col. 2010. Thyroid hormone receptor beta (TRbeta) and liver X receptor (LXR) regulate carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) expression in a tissue-selective manner. *J Biol Chem* 285, 28156-28163.
137. Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G. y col. 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7281-7286.
138. Repa, J.J., Liang, G., Ou, J. y col. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14, 2819-2830.
139. Sirek, A.S., Liu, L., Naples, M. y col. 2009. Insulin stimulates the expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) by attenuating the repressive effect of Pit-1, Oct-1/Oct-2, and Unc-86 homeodomain protein octamer transcription factor-1. *Endocrinology* 150, 3483-3492.
140. Havula, E., Hietakangas, V., 2012. Glucose sensing by ChREBP/MondoA-Mlx transcription factors. *Semin Cell Dev Biol* 23, 640-647.
141. Hurtado del Pozo, C., Vesperinas-García, G., Rubio, M. y col. 2011. ChREBP expression in the liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity. *Biochim Biophys Acta* 1811, 1194-1200.
142. Benhamed, F., Denechaud, P.D., Lemoine, M. y col. 2012. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 122, 2176-2194.
143. Dentin, R., Benhamed, F., Hainault, I. y col. 2006. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* 55, 2159-2170.
144. Iizuka, K., Takeda, J., Horikawa, Y., 2009. Hepatic overexpression of dominant negative Mlx improves metabolic profile in diabetes-prone C57BL/6J mice. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 499-504.
145. Robichon, C., Girard, J., Postic, C., 2008. [Can the hyperactivity of lipogenesis cause hepatic steatosis? A role for ChREBP]. *Med Sci (Paris)* 24, 841-846.
146. Lodhi, I.J., Wei, X., Semenkovich, C.F., 2011. Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab* 22, 1-8.
147. Charlton, M.R., 2013. ChREBP in NASH - a liver transcription factor comes in from the cold. *J Hepatol* 59, 178-179.
148. Färnegårdh, M., Bonn, T., Sun, S. y col. 2003. The three-dimensional structure of the liver X receptor beta reveals a flexible ligand-binding pocket that can accommodate fundamentally different ligands. *J Biol Chem* 278, 38821-38828.
149. Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W. y col. 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693-704.
150. Blaschke, F., Takata, Y., Caglayan, E. y col. 2006. A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. *Circ Res* 99, e88-99.
151. Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S. y col. 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9, 1033-1045.
152. Zhang, Y., Repa, J.J., Gauthier, K., Mangelsdorf, D.J., 2001. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J Biol Chem* 276, 43018-43024.
153. Korach-André, M., Parini, P., Larsson, L. y col. 2010. Separate and overlapping metabolic functions of LXRalpha and LXRbeta in C57Bl/6 female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E167-178.
154. Korach-André, M., Archer, A., Barros, R.P. y col. 2011. Both liver-X receptor (LXR) isoforms control energy expenditure by regulating brown adipose tissue activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 403-408.
155. Viennois, E., Pommier, A.J., Mouzat, K. y col. 2011. Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 15, 219-232.
156. Chen, J.D., Evans, R.M., 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.

157. Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
158. Lee, S., Lee, J., Lee, S.K., Lee, J.W., 2008. Activating signal cointegrator-2 is an essential adaptor to recruit histone H3 lysine 4 methyltransferases MLL3 and MLL4 to the liver X receptors. *Mol Endocrinol* 22, 1312-1319.
159. Jakobsson, T., Venteclef, N., Toresson, G. y col. 2009. GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus. *Mol Cell* 34, 510-518.
160. Venteclef, N., Jakobsson, T., Ehrlund, A. y col. 2010. GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRBeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev* 24, 381-395.
161. Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B. y col. 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272, 3137-3140.
162. Li, X., Yeh, V., Molteni, V., 2010. Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007- 2009). *Expert Opin Ther Pat* 20, 535-562.
163. Ou, J., Tu, H., Shan, B. y col. 2001. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6027-6032.
164. Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F., Patsch, W., 2003. Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J* 371, 89-96.
165. Li, X., Zhang, S., Blander, G. y col. 2007. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 28, 91-106.
166. Yamamoto, T., Shimano, H., Inoue, N. y col. 2007. Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J Biol Chem* 282, 11687-11695.
167. Tobin, K.A., Ulven, S.M., Schuster, G.U. y col. 2002. Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 277, 10691-10697.
168. Liu, X., Qiao, A., Ke, Y. y col. 2010. FoxO1 represses LXR α -mediated transcriptional activity of SREBP-1c promoter in HepG2 cells. *FEBS Lett* 584, 4330-4334.
169. Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V. y col. 2001. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 7, 53-58.
170. Brendel, C., Schoonjans, K., Botrugno, O.A. y col. 2002. The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 16, 2065-2076.
171. Kalaany, N.Y., Gauthier, K.C., Zavacki, A.M. y col. 2005. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab* 1, 231-244.
172. Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A. y col. 2000. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289, 1524-1529.
173. Brunham, L.R., Kruit, J.K., Pape, T.D. y col. 2006. Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ Res* 99, 672-674.
174. Feig, J.E., Pineda-Torra, I., Sanson, M. y col. 2010. LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. *J Clin Invest* 120, 4415-4424.
175. Cao, G., Liang, Y., Broderick, C.L. y col. 2003. Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 278, 1131-1136.
176. Grefhorst, A., van Dijk, T.H., Hammer, A. y col. 2005. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E829-838.
177. Laffitte, B.A., Chao, L.C., Li, J. y col. 2003. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5419-5424.

178. Ross, S.E., Erickson, R.L., Gerin, I. y col. 2002. Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol* 22, 5989-5999.
179. Dalen, K.T., Ulven, S.M., Bamberg, K. y col. 2003. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 278, 48283-48291.
180. Gerin, I., Dolinsky, V.W., Shackman, J.G. y col. 2005. LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem* 280, 23024-23031.
181. Pettersson, A.M., Stenson, B.M., Lorente-Cebrián, S. y col. 2013. LXR is a negative regulator of glucose uptake in human adipocytes. *Diabetologia* 56, 2044-2054.
182. Zitzer, H., Wenthe, W., Brenner, M.B. y col. 2006. Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 147, 3898-3905.
183. Choe, S.S., Choi, A.H., Lee, J.W. y col. 2007. Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 56, 1534-1543.
184. López, J.M., Bennett, M.K., Sanchez, H.B. y col. 1996. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1049-1053.
185. Tabor, D.E., Kim, J.B., Spiegelman, B.M., Edwards, P.A., 1998. Transcriptional activation of the stearoyl-CoA desaturase 2 gene by sterol regulatory element-binding protein/adipocyte determination and differentiation factor 1. *J Biol Chem* 273, 22052-22058.
186. Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H. y col. 2002. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 277, 11019-11025.
187. Chisholm, J.W., Hong, J., Mills, S.A., Lawn, R.M., 2003. The LXR ligand T0901317 induces severe lipogenesis in the db/db diabetic mouse. *J Lipid Res* 44, 2039-2048.
188. Grefhorst, A., Elzinga, B.M., Voshol, P.J. y col. 2002. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 277, 34182-34190.
189. Ducheix, S., Montagner, A., Polizzi, A. y col. 2013. Essential fatty acids deficiency promotes lipogenic gene expression and hepatic steatosis through the liver X receptor. *J Hepatol* 58, 984-992.
190. Patel, R., Patel, M., Tsai, R. y col. 2011. LXRβ is required for glucocorticoid-induced hyperglycemia and hepatosteatosis in mice. *J Clin Invest* 121, 431-441.
191. Ducheix, S., Montagner, A., Theodorou, V. y col. 2013. The liver X receptor: a master regulator of the gut-liver axis and a target for non alcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol* 86, 96-105.
192. Higuchi, N., Kato, M., Shundo, Y. y col. 2008. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 38, 1122-1129.
193. Zelcer, N., Tontonoz, P., 2006. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* 116, 607-614.
194. Hong, C., Tontonoz, P., 2008. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr Opin Genet Dev* 18, 461-467.
195. Jakobsson, T., Treuter, E., Gustafsson, J., Steffensen, K.R., 2012. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci* 33, 394-404.
196. Wang, Y.Y., Dahle, M.K., Agren, J. y col. 2006. Activation of the liver X receptor protects against hepatic injury in endotoxemia by suppressing Kupffer cell activation. *Shock* 25, 141-146.
197. Mallat, A., Lotersztajn, S., 2011. The liver X receptor in hepatic stellate cells: a novel antifibrogenic target? *J Hepatol* 55, 1452-1454.
198. Beaven, S.W., Wroblewski, K., Wang, J. y col. 2011. Liver X receptor signaling is a determinant of stellate cell activation and susceptibility to fibrotic liver disease. *Gastroenterology* 140, 1052-1062.

199. Musso, G., Gambino, R., Cassader, M., 2013. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res* 52, 175-191.
200. Caballero, F., Fernández, A., De Lacy, A.M. y col. 2009. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol* 50, 789-796.
201. Steffensen, K.R., Jakobsson, T., Gustafsson, J., 2013. Targeting liver X receptors in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 17, 977-990.
202. Griffett, K., Solt, L.A., El-Gendy, B.I.-D. y col. 2013. A liver-selective LXR inverse agonist that suppresses hepatic steatosis. *ACS Chem Biol* 8, 559-567.
203. Zhai, Y., Wada, T., Zhang, B., Khadem, S., Ren, S., Kuruba, R., Li, S., Xie, W., 2010. A functional cross-talk between liver X receptor- α and constitutive androstane receptor links lipogenesis and xenobiotic responses. *Mol Pharmacol* 78, 666-674.
204. Roth, A., Looser, R., Kaufmann, M. y col. 2008. Regulatory cross-talk between drug metabolism and lipid homeostasis: constitutive androstane receptor and pregnane X receptor increase Insig-1 expression. *Mol Pharmacol* 73, 1282-1289.
205. Eissing, L., Scherer, T., Tödter, K y col. 2013. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health. *Nat Commun* 4, 1528-1549.

Los medicamentos de origen biotecnológico, el futuro comienza ahora

Jorge Enrique Machado-Alba

Grupo de Investigación en Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia. Universidad Tecnológica de Pereira-Audifarma S.A. Colombia. Paraje la Julita, Pereira, Risaralda, Colombia; Código postal: 660003.

*e-mail: machado@utp.edu.co

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 1 (2014), pág. 49-90

RESUMEN

Los medicamentos de origen biotecnológico pueden ser anticuerpos monoclonales o moléculas pequeñas diseñadas para actuar sobre blancos terapéuticos definidos. Se hizo una búsqueda de publicaciones en PubMed y ScienceDirect, FDA. Se obtuvo la información sobre mecanismos de acción, blancos terapéuticos, principales aspectos farmacocinéticos, reacciones adversas más frecuentes e importantes y los usos aprobados y en investigación. Se describen los anticuerpos monoclonales según los grupos farmacológicos a los que pertenecen, inhibidores de la tirosina cinasa; inhibidores del proteasoma y bloqueadores de la coestimulación de células T. Son significativos los avances en el tratamiento del cáncer y enfermedades reumáticas, pero van acompañados de elevados costos y toxicidad no despreciable.

Palabras clave: Biotecnología; Utilización de Medicamentos; Antineoplásicos; Antiinflamatorios; Antirreumáticos.

ABSTRACT

Drugs derived from biotechnology, the future starts now

Biotechnology drugs may be monoclonal antibodies or small molecules designed to act on defined therapeutic targets. Was made a search in PubMed, ScienceDirect and FDA. Information on mechanisms of action, therapeutic targets, main pharmacokinetic aspects, more frequent and significant adverse reactions and approved uses and research was obtained. It describes monoclonal antibodies as the drug groups to which they belong, tyrosine kinase inhibitors; proteasome inhibitors and blockers of T cell costimulation. Are significant advances in the treatment of many diseases, especially cancer and rheumatic diseases, but are accompanied by high costs and frequent toxicity.

Keywords: Biotechnology; Drug Utilization; Antineoplastic Agents; Anti-Inflammatory Agents; Antirheumatic Agents.

INTRODUCCIÓN

La insulina humana fue el primer medicamento de origen biotecnológico desarrollado, obtenida a partir de las técnicas diseñadas con DNA recombinante empleando *E. coli*. Este gran avance abrió la puerta para el desarrollo de un gran número de nuevos fármacos que parece pueden ser capaces de controlar enfermedades que hasta ahora eran incurables. En especial, la evolución de conocimientos adquiridos sobre las bases moleculares del cáncer ha llevado a generar medicamentos con la capacidad de actuar sobre receptores específicos de factores de crecimiento involucrados, o en vías de regulación de la actividad intracelular o sobre defectos en la reparación del DNA, en la apoptosis e incluso en la angiogénesis tumoral. Las herramientas primarias para la inhibición de estos objetivos son los anticuerpos monoclonales (con el sufijo MAB de Monoclonal Anti Bodies) que pueden atacar receptores de superficie o logran ingresar a la célula por tratarse de moléculas pequeñas que modifican la actividad de enzimas críticas (sufijo NIB) (1).

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas diseñadas para actuar sobre blancos terapéuticos definidos, con el fin de detener un proceso patogénico específico, o estimular una acción celular o incluso desviar un mecanismo celular hacia otra vía. La producción se fundamenta en el desarrollo de linfocitos B inmortales que son modificados por biotecnología para generar una inmunoglobulina (Ig), que según su nivel de pureza, podrá ser: **murina** (derivada de roedores, en la denominación una “o” precede al sufijo “mab” como en ibritumomab); **quimérica** en que toda la Ig es humana, excepto la región variable que es murina (“xi” precede el mab, como en el rituximab); **humanizada**, cuando toda la Ig es humana, con excepción de la región complementaria variable que es murina (“zu” precede el mab, como en natalizumab); finalmente, puede ser completamente **humana** (“u” antecede el mab, como en adalimumab) (2).

Los anticuerpos monoclonales antagonizan la función de receptores de la superficie celular y reclutan células inmunitarias sin complemento al complejo antígeno – anticuerpo con lo que logran la destrucción de células tumorales. Pueden ser elaborados para que transporten toxinas o radionúclidos a las células de interés con lo que aumentan los efectos citotóxicos. Generalmente son específicos para un solo receptor, tienen una vida media de eliminación ($t_{1/2}$) prolongada y se pueden administrar intermitentemente (1). Las moléculas pequeñas pueden atacar los mismos objetivos y vías que los anticuerpos monoclonales, pero pueden además penetrar las células y actuar sobre una o múltiples funciones enzimáticas, tienden a ser sustratos del sistema microsomal hepático y poseen vidas medias de eliminación de 12 a 24 horas, por lo que se deben administrar a diario (1). Actualmente se encuentra un gran número de medicamentos de origen biotecnológico disponibles en un mercado que sigue

creciendo. Se han clasificado según algunas de sus características farmacodinámicas (ver Tabla 1).

Tabla 1.- Grupos de medicamentos biotecnológicos.

1. Modificadores de la respuesta biológica
1.1. Anticuerpos monoclonales
1.1.1. Anticuerpos monoclonales sin aditivos
1.2. Nuevos factores de crecimiento hematopoyético
1.3. Anticuerpos monoclonales conjugados
1.3.1. Anticuerpos monoclonales conjugados con compuestos citotóxicos
1.3.2. Radioinmunoconjugados
1.4. Anticuerpos monoclonales con actividad sobre las interleuquinas
1.5. Anticuerpos monoclonales inhibidores de la angiogénesis
1.6. Antirreumáticos modificadores de enfermedad (ARMÉs) biológicos
1.6.1. Inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa
1.7. Anticuerpos monoclonales inhibidores del complemento
1.8. Anticuerpos monoclonales antiasmáticos
1.9. Anticuerpos monoclonales para el tratamiento de la psoriasis
1.10. Anticuerpos monoclonales para enfermedades infecciosas
1.11. Anticuerpos monoclonales trifuncionales
1.12. Agentes antiplaquetarios
1.13. Inmunosupresores para evitar rechazo de trasplantes
1.14. Agentes modificadores óseos
2. Inhibidores de la tirosina cinasa
2.1. Inhibidores de la cinasa BCR-ABL
2.2. Inhibidores de la cinasa BRAF
2.3. Inhibidores de receptores de factor de crecimiento epidérmico
2.4. Inhibidores de HER2/neu
3. Inhibidores del proteasoma
4. Bloqueadores selectivos de la coestimulación de células -T

1. MODIFICADORES DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA

En este grupo pueden estar citosinas o anticuerpos monoclonales que actúan de manera indirecta mediando los efectos antitumorales al aumentar la respuesta autoinmune contra las células cancerosas, o directamente al unirse a los receptores de células tumorales y suministrar toxinas o radionúclidos. La tecnología del DNA recombinante ha permitido la identificación y producción de

varias proteínas humanas con importantes efectos en la función y el crecimiento de células normales y también de las neoplásicas (1). Hasta la fecha se encuentran en uso clínico diferentes proteínas como interferones, interleuquinas, factores de crecimiento hematopoyético como la eritropoyetina, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) como filgrastim y los anticuerpos monoclonales.

1.1. Anticuerpos monoclonales

Tras el desarrollo de la metodología para la fusión de células de mieloma del ratón con linfocitos B, se hizo posible producir especies únicas de anticuerpos murinos con capacidad de reconocer un antígeno específico. Las células neoplásicas expresan antígenos que se convierten en blancos terapéuticos para fármacos que son anticuerpos monoclonales. Básicamente lo que se hace es inmunizar ratones con extractos de células cancerosas humanas y después se aíslan los anticuerpos monoclonales que reaccionan contra antígenos singulares (1). Están disponibles rituximab, ofatumumab, alemtuzumab, ipilimumab, natalizumab y belimumab. Para revisar todos los anticuerpos monoclonales ver la Tabla 2.

Tabla 2.- Anticuerpos monoclonales, blanco terapéutico y principales indicaciones.

Anticuerpos monoclonales	Nivel de pureza	de Blanco terapéutico	Principales indicaciones
Abciximab	Quimérico	Inhibe el receptor IIb/IIIa	Trombosis coronaria, angina inestable
Rituximab	Quimérico	Antígeno CD20 de los linfocitos B	Linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, artritis reumatoide
Ofatumumab	Humana	Antígeno CD20 de los linfocitos B	Leucemia linfocítica crónica refractaria
Alemtuzumab	Humanizada	Células CD52+	Leucemia linfocítica crónica de células B
Ipilimumab	Humana	Antígeno 4 (CTL-4) de linfocitos T citotóxicos	Melanoma no resecable o metastásico
Natalizumab	Humanizada	Inhibidor selectivo de adhesión de moléculas	Enfermedad de Crohn
Belimumab	Humana	proteína estimulante de linfocitos B humanos (BLyS)	Lupus eritematoso generalizado
Nivolumab, Lambrolizumab	Humana/Humanizada	Receptor de muerte celular programada 1 (PD-1)	Melanoma, cáncer de células renales y cáncer pulmonar de células no pequeñas
Mogamulizumab	Humanizada	La región terminal-N del CCR4 humano	Linfomas de células T periféricos
Gemtuzumab ozogamicina	Humanizada	Antígeno CD33 de linfocitos	Leucemia mieloide aguda CD33 positiva, leucemia promielocítica aguda
Brentuximab Vedotin	Quimérico	Células que expresan CD30	Linfoma sistémico anaplástico de células grandes

Anticuerpos monoclonales	Nivel de pureza	Blanco terapéutico	Principales indicaciones
Ibritumomab	Murina	El antígeno CD20 DE linfocitos B	Linfoma no Hodgkin folicular de células B refractario
Tositumomab	Murina	El antígeno CD20 DE linfocitos B	Linfoma no Hodgkin folicular de células B refractario
Canakinumab	Humana	Criopirinas, IL-1 β	Síndrome familiar autoinflamatorio por frío y el síndrome de Muckle-Wells
Daclizumab	Humanizada	Subunidad CD25 del receptor de IL-2, y células T	Reducir la incidencia de rechazo agudo en receptores de trasplante renal
Bevacizumab	Humanizada	Neutraliza el VEGF-A y receptores endoteliales Fit-1 y KDR	Cáncer colorrectal metastásico, degeneración macular
Ranibizumab	Humanizada	Inhibe el factor de crecimiento del endotelio vascular	Neovascularización húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad
Infliximab	Quimérico	Inhibición de la actividad endógena de TNF- α humano	Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante
Adalimumab	Humana	Inhibición de la actividad endógena de TNF- α humano	Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica y artritis juvenil.
Certolizumab pegol	Humanizada	Inhibición y neutralización de la actividad de TNF- α	Artritis reumatoide y enfermedad de Crohn
Golimumab	Humana	Une al TNF- α e interfiere con su actividad endógena	Artritis reumatoide, la artritis psoriásica y espondilitis anquilosante
Tocilizumab	Humanizada	Receptor de interleuquina-6 (IL-6)	Artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil activa
Eculizumab	Humanizada	Proteína del complemento C5	Hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome hemolítico urémico atípico
Omalizumab	Humanizada	Inhibe la IgE en receptor de células cebadas y basófilos	Asma
Dupilumab	Humana	Receptor IL-4 α e IL-13	Asma
Ustekinumab	Humana	Citoquinas proinflamatorias, interleuquinas IL-12 e IL-23	Psoriasis en placas
Palivizumab	Humanizada	Neutraliza la actividad del virus sincitial respiratorio	Prevención de la enfermedad grave en aparato respiratorio inferior causada por virus sincitial respiratorio en neonatos
Raxibacumab	Humana	Antígeno PA de toxina del ántrax	Infección por Bacillus anthracis por vía inhalada (ántrax)

Anticuerpos monoclonales	Nivel de pureza	Blanco terapéutico	Principales indicaciones
Catumaxomab	Murina	Moléculas de adhesión epitelial celular, EpCAM y el antígeno de células T CD3	Ascitis maligna o peritonitis carcinomatosa
Basiliximab	Quimérico	Complejo de receptores de IL-2	Profilaxis del rechazo de órganos
Denosumab		Factor nuclear del ligando kappa	Osteoporosis
Cetuximab	Quimérico	Dominio extracelular del EGFR	Cáncer colorrectal metastásico
Panitumumab	Humana	Dominio extracelular del EGFR	Cáncer colorrectal refractario
Edrecolomab	Murina	Glicoproteína transmembranal	Cáncer colorrectal
Nimotuzumab	Humanizada	Dominio extracelular del EGFR	Carcinoma escamocelular de cabeza y cuello
Trastuzumab	Humanizada	Dominio extracelular del EGFR (HER-2)	Cáncer de mama
Pertuzumab	Humanizada	Dominio extracelular del EGFR (HER-2)	Cáncer de mama

1.1.1. Anticuerpos monoclonales sin aditivos

Rituximab

Es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el antígeno CD20 de los linfocitos B. El CD20 regula la iniciación del ciclo celular y posiblemente la función de los canales de calcio. El rituximab se une a este antígeno sobre la superficie de los linfocitos B activando la citotoxicidad dependiente del complemento en las células B y tras la unión a receptores Fc es un mediador de la muerte de las células a través de toxicidad celular dependiente de anticuerpos (1,3,4). Se administra en infusión e inmediatamente se absorbe lleva a una rápida y sostenida depleción de las células B circulantes, hasta por 3 a 6 meses después de ser aplicado, tiempo en el cuál comienzan a recuperarse los niveles de células B, pero solo se normalizarán a los 12 meses de terminado el tratamiento. La $t_{1/2}$ oscila entre 6 y 78 días y la excreción es incierta, pero debe ser por fagocitosis y catabolismo en el sistema retículo endotelial (1,3,4).

Se ha asociado con edemas, fatiga, escalofríos, insomnio, ansiedad; además, anemia, granulocitopenia, linfopenia, trombocitopenia, neuropatía. Sin embargo los efectos más llamativos corresponden a las reacciones infusionales que pueden presentarse hasta en el 77% de pacientes en la primera dosis, pero disminuyen con las subsecuentes y que pueden incluir angioedema, fiebre, broncoespasmo, cefalea, hiper/hipotensión, mialgias, rigidez, urticaria y vómito. Dado que se han presentado incluso fatalidades después de la primera infusión, debe hacerse un

monitoreo estrecho las primeras 24 horas (1, 3-5). Se ha reportado una leucoencefalopatía multifocal debida al virus JC que puede ser fatal entre pacientes tratados con rituximab. Durante el tratamiento de linfomas no Hodgkin (LNH) se ha observado síndrome de lisis tumoral que ha llevado a insuficiencia renal aguda y hemodiálisis. También se han visto reacciones mucocutáneas severas y ocasionalmente fatales (dermatitis liquenoide, pénfigo paraneoplásico, Síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica y dermatitis vesiculobulósa) (1, 3-5).

Está aprobado para el tratamiento del LNH CD20 positivo, en las recaídas y manejo de los LNH de células B foliculares, solo o asociado con otros agentes, en los LNH de células B foliculares, los LNH de células B grandes difusas; además en la leucemia linfocítica crónica CD20 positivo; se emplea en combinación con metotrexato en administraciones cada 6 meses a pacientes adultos con artritis reumatoide moderada a severa que tuvieron una respuesta inadecuada a uno o varios antiTNF. También se utiliza en la poliangiitis granulomatosa y de la poliangiitis microscópica en asocio con corticoides. Se han reportado efectos favorables en el tratamiento del linfoma de Burkitt, linfomas del SNC, linfoma Hodgkin, linfoma asociado a tejido linfoide, linfoma de zona esplénica marginal, macroglobulinemia de Waldstrom, desorden linfoproliferativo postransplante, anemia hemolítica autoinmune en niños, purpura trombocitopénica inmune y en el pénfigo vulgaris refractario (1,3,4,6-8).

Ofatumumab

Es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a las asas extracelulares (grandes y pequeñas) de las moléculas CD20 (las cuales están expresadas en los linfocitos B normales y en las células B de la leucemia linfocítica crónica) resultando en una lisis celular dependiente de complemento y en toxicidad celular mediada por anticuerpos en las células que sobreexpresan CD20. Se aplica por vía intravenosa y tiene una $t_{1/2}$ que varía entre 2 y 62 días (7,9). Se ha reportado fiebre, fatiga, rash, neutropenia, anemia, neumonía, otras infecciones bacterianas, micóticas o virales en 70% de pacientes. Las reacciones infusionales se han presentado tras la primera infusión (44%) y la segunda (29%) y se pueden prevenir con una premedicación con acetaminofen y antihistamínicos. Además, se ha observado edema periférico, hiper/hipotensión, taquicardia, escalofríos, hiperhidrosis, espasmo muscular, sepsis, anemia y trombocitopenia y reactivación de la hepatitis B. Es una alternativa para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC) refractaria (7,9,10).

Alemtuzumab

Es un anticuerpo monoclonal que se une al CD52, un antígeno no modulador presente en la superficie de linfocitos B y T, la mayoría de monocitos, macrófagos, células NK y una subpoblación de granulocitos. Después de la unión a las células

CD52+, ocurre la muerte por lisis de las células leucémicas. Habitualmente se aplica por vía intravenosa, pero algunos estudios han mostrado que se puede hacer por vía subcutánea también. La $t_{1/2}$ es de unas 11 horas a 14 días (7,9,11). Se ha asociado con hiper/hipotensión, taquicardia, fatiga, escalofríos, insomnio, disestesias, ansiedad, estomatitis, angioedema, anemia, granulocitopenia, linfopenia, trombocitopenia, elevación de enzimas hepáticas, neuropatía, espasmo muscular, reacciones infusionales tras la primera dosis. Además, se han reportado infecciones serias (bacterianas, virales, micóticas o por protozoarios), por lo que se recomienda utilizar medicación profiláctica contra neumonía y herpes virus al momento de iniciar la terapia. Debe hacerse vigilancia estrecha del conteo de células sanguíneas por el riesgo de pancitopenia. Se utiliza en el tratamiento de la LLC de células B (7,9,10-12).

Ipilimumab

Es un anticuerpo monoclonal de origen recombinante tipo IgG₁ el cual se une a los linfocitos T citotóxicos asociados al antígeno 4 (CTL-4). CTL-4 es un regulador a la baja de las vías de activación de células T y su bloqueo conduce a una mejoría en la activación y proliferación de células T. En melanoma el ipilimumab puede indirectamente mediar la respuesta inmune de las células T contra el tumor. Se administra en forma de infusión IV de unos 90 minutos y tiene una $t_{1/2}$ de 14,7 días (7,13). Las reacciones adversas más comunes son fatiga, fiebre, dermatitis (incluso síndrome de Stevens-Johnson), anorexia, anemia. Se han descrito casos de hipopituitarismo, hipotiroidismo e insuficiencia suprarrenal, hepatotoxicidad, nefritis y colitis. Pueden presentarse efectos mediados por la inmunidad de carácter grave y fatal debido a la activación y proliferación de células T. Se deben revisar signos de enterocolitis, hepatitis, dermatitis, neuropatía y desordenes endocrinos antes de aplicar cada dosis. Se usa en el tratamiento del melanoma no resecable o metastásico (7,13,14).

Natalizumab

Se trata de un anticuerpo monoclonal e inhibidor selectivo de la adhesión de moléculas considerado un agente de uso gastrointestinal. Se está utilizando actualmente en monoterapia de formas recidivantes de esclerosis múltiple y en el tratamiento de la enfermedad de Crohn moderada a severa (1).

Belimumab

Es un anticuerpo monoclonal IgG₁-lambda que impide la supervivencia de linfocitos B por bloqueo de la unión de la proteína estimulante de linfocitos B humanos (BLyS) a los receptores de estas mismas células. Así reduce la actividad de la inmunidad mediada por células B y la respuesta autoinmune. Se coloca por vía intravenosa en infusión de una hora y el efecto pleno es evidente después de 8 semanas y la mejoría clínica tras 16 semanas. La $t_{1/2}$ es de 19,4 días. Las reacciones

adversas más comunes son náuseas, fiebre, depresión, ansiedad, gastroenteritis, cistitis, leucopenia, dolor en extremidades, bradicardia, bronquitis y otras infecciones de tracto respiratorio superior e inferior (7,15). Es un agente riesgoso que requiere de mucho cuidado para su empleo. En estudios que lo comparan con placebo se ha observado mayor riesgo de muerte debido a infecciones, enfermedad cardiovascular y suicidio. No se recomienda si coexiste una infección severa. Se pueden presentar reacciones infusionales severas. Puede incrementar el riesgo de malignidades. Se emplea en el tratamiento del lupus eritematoso generalizado con autoanticuerpos positivos agregado a la terapia estándar (7,15,16).

Nivolumab, Pembrolizumab

El receptor de muerte celular programada 1 (PD-1) es un tipo de receptor inhibitorio expresado en células T, preferiblemente aquellas expuestas por largos periodos de tiempo a ciertos antígenos. Este receptor regula negativamente la fase efectora de la respuesta de células T después de que el ligando primario (PD-L1) se expresa dentro del tumor (7,14,17). Son anticuerpos monoclonales humanizados del tipo IgG₄ que bloquean el receptor de muerte celular programada (PD-1), que produce una respuesta duradera en pacientes con melanoma, o incluso con cáncer de células renales y cáncer pulmonar de células no pequeñas. Su uso se ha asociado con rash, fatiga, elevación de lipasas y enzimas hepáticas. También algunos casos de neumonitis y uveítis, hipotiroidismo, mialgias, fiebre, escalofríos, falla renal y disnea (7,14,17).

Mogamulizumab

Es un anticuerpo monoclonal humanizado producido por una novedosa tecnología de glico-ingeniería que reconoce la región terminal-N del receptor de quimioquinas 4 (CCR4) humano que realza la citotoxicidad dependiente de células. El CCR4 está expresado en varios tipos de linfomas de células T periféricos, que han tenido tradicionalmente un grave pronóstico, para lo cual se ha venido empleando este nuevo medicamento (18,19).

1.2. Nuevos factores de crecimiento hematopoyético

Filgrastim y Pegfilgrastim

El G-CSF recombinante (filgrastim) es una glicoproteína de 175 aminoácidos que es producida por la *Escherichia coli*. Existe una forma recombinante pegilada (pegfilgrastim) que se ha conjugado con una molécula de polietilenglicol, lo cual reduce a un mínimo la depuración por filtración glomerular, para que su principal vía de eliminación sea la depuración mediada por neutrófilos (ver Tabla 3) (1,7). Estimulan las unidades formadoras de colonias de granulocitos para inducir e incrementar la producción, maduración y activación de neutrófilos. También activan las funciones de migración, fagocitosis y citotoxicidad de neutrófilos y así acortan el periodo de neutropenia grave, reduciendo la

morbilidad sumada a infecciones por bacterias y hongos. Se ha asociado en pacientes sometidos a regímenes de quimioterapia intensiva con disminución de hospitalizaciones por neutropenia febril, pero no ha demostrado un efecto positivo en la supervivencia del paciente (20-23).

Tabla 3.- Fármacos que interactúan con interleuquinas, factores de crecimiento hematopoyético e inhibidores de proteasomas.

Interleukinas y otros	Blanco terapéutico	Principales indicaciones
Aldesleukin	Linfocitos T activados y B, de células Natural Killers (NK) y de timocitos	Adenocarcinoma renal metastásico, el melanoma metastásico y la leucemia mieloide aguda
Denileukin Diftitox	ADP y el factor EF-2 de elongación de células eucariotes	Linfoma cutáneo de células T, micosis fungoides, y linfoma de células T periféricas
Anakinra	Receptor de IL-1	Artritis reumatoide
Bortezomib	Inhibidor de proteasomas	Mieloma múltiple y linfoma de células del manto refractario
Filgrastim	Unidades formadoras de colonias de granulocitos	Cáncer (no mieloide) que reciben terapia mielosupresora, neutropenia grave
Pegfilgrastim	Unidades formadoras de colonias de granulocitos	Cáncer (no mieloide) que reciben terapia mielosupresora

El filgrastim se administra por vía subcutánea o intravenosa y el pegfilgrastim por vía subcutánea. El efecto aparece en las primeras 24 horas y se mantiene por unos 3 a 5 días. Después de 4 días, los neutrófilos generalmente vuelven a los valores basales. La $t_{1/2}$ del filgrastim oscila entre 1,8 y 3,5 horas, mientras que la de pegfilgrastim puede ir hasta 80 horas (7). Entre las más frecuentes reacciones adversas se tiene fiebre, petequias, incremento de la deshidrogenasa láctica y de ácido úrico; esplenomegalia con neutropenia crónica severa; elevación de fosfatasa alcalina, dolor muscular y esquelético, hiper/hipotensión, infarto de miocardio y arritmias. Además, reacciones en el sitio de aplicación, hemorragias, artralgias, vasculitis, osteoporosis, pericarditis, insuficiencia renal, síndrome Sweet's (dermatosis febril aguda) y trombocitopenia (7,20-23).

El filgrastim está aprobado en pacientes con cáncer (no mieloide) que reciben terapia mielosupresora, para disminuir la incidencia de infecciones (neutropenia febril). En la leucemia mieloide aguda (LMA) después de la quimioterapia para acortar el tiempo de recuperación de los neutrófilos y reducir la duración de la fiebre. En pacientes con neutropenia grave a consecuencia de trasplante autólogo de médula ósea para reducir la duración de la neutropenia y sus consecuencias. En la neutropenia de pacientes con mielodisplasia, anemia aplásica moderada o infiltración tumoral de la médula ósea. Para pacientes en

quienes se practica la obtención de células primordiales de sangre periférica y reciben un trasplante de estas. En pacientes con neutropenia crónica severa para reducir la incidencia y duración de complicaciones por neutropenia. Pegfilgrastim está aprobado para reducir la incidencia de infecciones por estimulación de la producción de granulocitos en pacientes con malignidades no mieloides que reciben quimioterapia mielosupresora asociada con un riesgo elevado de neutropenia febril (7, 20-24).

1.3. Anticuerpos monoclonales conjugados

1.3.1. Anticuerpos monoclonales conjugados con compuestos citotóxicos

Gemtuzumab ozogamicina

Son anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno CD33 el cual se encuentra expresado en el 80% de los pacientes con LMA, de lo cual resulta la internalización del complejo antígeno anticuerpo, a lo que sigue un desdoblamiento del anticuerpo y de un derivado, la caliqueamicina, que entra al núcleo, donde se une a un surco menor de DNA y causa la ruptura del DNA de doble hélice y la muerte celular. Se administra por vía intravenosa, la caliqueamicina tiene una $t_{1/2}$ de 41 a 45 horas (7,25). Con su uso se ha descrito hemorragia cerebral, hiper/hipotensión, edema periférico, taquicardia, ansiedad, escalofríos, depresión, fiebre, insomnio, hematomas, rash, hiperglicemia, hipocalcemia, hipocalemia, dispepsia e infecciones respiratorias. Se ha asociado a hepatotoxicidad severa conocida como síndrome de obstrucción sinusoidal hepática, por lo que debe observarse de cerca la función de este órgano. También se pueden presentar reacciones infusionales graves con anafilaxia por lo que debe observarse el paciente de 2 a 4 horas después de finalizar la infusión y los síntomas generalmente se resuelven con líquidos endovenosos, acetaminofen y antihistamínicos. En todos los pacientes que lo reciben a las dosis recomendadas se presenta mielosupresión severa. Es un medicamento bastante controversial por su enorme toxicidad, así que se reserva para el tratamiento de la LMA CD33 positiva y en la terapia “salvaje” de la leucemia promielocítica aguda (7,25).

Brentuximab Vedotin

Se trata de un conjugado de anticuerpos (ADC) dirigido al CD30 consistente en 3 componentes: 1) un anticuerpo IgG₁ quimérico CD30-específico cAC10; 2) un agente que causa disrupción de microtúbulos (monometilauristatina E- MMAE) y 3) una proteasa fijadora de dipéptidos (la cual covalentemente conjuga MMAE con cAC10). El conjugado se une a células que expresan CD30 y forma un complejo el cual es internalizado en la célula y libera MMAE, que causa una disrupción de la red de microtúbulos, induciendo un freno del ciclo celular y apoptosis. Se administra por vía intravenosa y MMAE sufre mínimo metabolismo a través de CYP3A4; la $t_{1/2}$ es de 4 a 6 días (7,26,27). A nivel hematológico se ha observado que puede ocasionar leucopenia, anemia, trombocitopenia, mientras que en SNC se

puede presentar fatiga, fiebre, dolor, insomnio, discinesia y ansiedad. También se puede presentar rash, alopecia, dolor abdominal, edema periférico, neuropatía periférica, infecciones de tracto respiratorio superior, reacciones infusionales y arritmias supraventriculares. Se han presentado casos de leucoencefalopatía multifocal y muerte a causa de infección por virus JC. Se emplea para el tratamiento del LNH después del fracaso de al menos dos regímenes de quimioterapia (en pacientes que no son candidatos de trasplante) o después del fracaso de un trasplante de células madre. También se emplea en el linfoma sistémico anaplásico de células grandes después de que falle al menos un régimen de quimioterapia (7,26,27)

1.3.2. Anticuerpos monoclonales radioinmunoconjugados

Ibritumomab y Tositumomab

Se trata de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno CD20 encontrado en los linfocitos B (normales y malignos). La unión del ibritumomab induce apoptosis en los linfocitos B in vitro. En el caso de ibritumomab este viene unido a un quelante llamado tiuxetan, el cual actúa como un sitio específico de transporte de Indio 111 o de Yttrium 90, mientras que tositumomab vienen con Yodo 131. El anticuerpo monoclonal actúa como un sistema de transporte para dirigir el isótopo radiactivo a las células blanco, sin embargo la unión se ha observado incluso en células linfoides de diferentes partes del cuerpo y del intestino. El In-111 emite radiación gamma, mientras que Y-90 emite radiación beta. La radiación beta induce daño celular a través de la formación de radicales libres (tanto en la células blanco como en las circundantes). Se debe administrar previamente rituximab para saturar los sitios de unión inespecíficos (7, 28,29).

Se administran por vía intravenosa, se distribuyen al tejido linfoide; los isótopos radiactivos decaen a metabolitos no radiactivos. La $t_{1/2}$ varía de 30 horas para los anticuerpos monoclonales hasta unas 67 horas para los isótopos. Además de los efectos indeseables del rituximab que se debe administrar antes, se han registrado muchas reacciones como fatiga, escalofríos, fiebre, náuseas, pero lo más llamativo es que hasta 95% de pacientes hacen trombocitopenia, 77% desarrollan neutropenia, 61% anemia. Además, se eleva el riesgo de infecciones respiratorias, urinarias y de malignidades y se han reportado severas reacciones cutáneas y mucocutáneas que obligan a suspenderlos en caso de que aparezca cualquier manifestación en piel. Se emplean para el tratamiento de LNH folicular de células B refractario o recidivante en pacientes con una respuesta parcial o incompleta a la quimioterapia de primera línea (7, 28,29).

1.4. Anticuerpos monoclonales con actividad sobre las interleuquinas

Aldesleukin

Es un producto de interleuquina-2 (IL-2) humana de origen recombinante la cual promueve la proliferación, diferenciación y reclutamiento de linfocitos T activados y B, de células Natural Killers (NK) y de timocitos. Debe causar

destrucción de células tumorales a consecuencia del incremento de la destrucción por células inmunitarias efectoras (ver Tabla 3). La $t_{1/2}$ tiene una primera fase α de 13 minutos y una fase β de 90 minutos. El metabolismo es renal y se excreta por orina como metabolito inactivo (7,30).

Hasta un 71% de pacientes se tornan hipertensos, pero puede causar edema periférico, taquicardia supraventricular, escalofríos, confusión, fiebre, dermatitis exfoliativa, acidosis e hipocalcemia. Un 67% de pacientes presenta diarrea, pero también puede asociarse con hiperbilirrubinemia, diabetes, otras arritmias, edema pulmonar, disnea y elevación de fosfatasa alcalina. Está contraindicado en pacientes con cualquier forma de taquicardia ventricular, arritmias cardíacas no controladas, signos de angina o enfermedad cardíaca isquémica, falla renal que requiera diálisis, coma o convulsiones refractarias. Altas dosis de aldesleukin se han asociado con el síndrome de fuga capilar caracterizado por vasodilatación y extravasación de proteínas del plasma al espacio extravascular, lo cual resulta en hipotensión significativa y reducción de la perfusión a tejidos, que podría incluso resultar en la muerte. Está aprobado para el tratamiento del adenocarcinoma renal metastásico, el melanoma metastásico y la LMA (7,30).

Denileukin Diftitox

Es una inmunoglobulina producida por la combinación genética de IL-2 y un fragmento catalítico activo de la toxina diftérica. La introducción de la toxina diftérica al interior de las células causa ribosilación de la ADP y desactivación del factor EF-2 de elongación de células eucariotes, en especial las células malignas donde inhibe la síntesis de proteínas y rápidamente lleva a la muerte celular (ver Tabla 3). Se aplica por vía intravenosa, sufre metabolismo hepático por degradación proteolítica y la $t_{1/2}$ es de 70 a 80 minutos (31,32).

Se presenta con frecuencia edema periférico, hipotensión, dolor precordial, taquicardia y eventos tromboembólicos. Además fiebre, fatiga, rash, hipoalbuminemia, linfopenia, artralgias, infecciones respiratorias, hipertensión y reacciones en el sitio de inyección. Se ha asociado con un síndrome de fuga capilar potencialmente severo que puede comprometer la vida, por lo que se debe monitorear el peso, edemas, presión arterial y albumina sérica, antes y durante el tratamiento. Además, se ha reportado pérdida de la agudeza visual y de la visión de colores. Se utiliza en el tratamiento del linfoma cutáneo de células T que expresen el componente CD25 del receptor de IL-2, en micosis fungoides, síndrome Sézary y linfoma de células T periféricas (31,32).

Canakinumab

Los síndromes periódicos asociados a criopirinas (CAPS) son raros problemas genéticos causados por mutaciones en el dominio de unión de nucleótidos de la familia rica en leucina (NLR). Los dominios de pirinas contienen

genes que producen síndromes autoinflamatorios inducidos por frío. La criopirina, una proteína codificada por este gen, regula la activación de IL-1 β y su deficiencia resulta en excesiva inflamación. El canakinumab reduce la inflamación por unión a IL-1 β lo que previene su interacción con los receptores de superficie celular (7,33). Se administra por vía subcutánea, con una biodisponibilidad del 70% y una $t_{1/2}$ de 26 días. Como reacciones adversas se ha asociado con vértigo, gastroenteritis, ganancia de peso, dolor músculo esquelético, rinitis y reacciones en el sitio de aplicación. No debe emplearse en pacientes inmunosuprimidos, ni mientras tengan infecciones latentes o activas. Se emplea en el tratamiento de síndromes periódicos asociados a criopirina, incluyendo síndrome familiar autoinflamatorio por frío y el síndrome de Muckle-Wells (7,33).

Daclizumab

Es un anticuerpo monoclonal humanizado del tipo IgG₁ que bloquea la subunidad CD25 del receptor de IL-2, con lo cual modifica la proliferación y activación de células T, lo que eleva el número de linfocitos NK. Estos cambios se han asociado en pacientes con esclerosis múltiple con reducción de las lesiones cerebrales y de la inflamación y una reducción en la sobrevida de los linfocitos T activados. Además de la esclerosis múltiple se está utilizando combinado con prednisolona, ciclosporina y micofenolato de mofetilo para reducir la incidencia de rechazo agudo en receptores de trasplante renal (34,35).

1.5. Anticuerpos monoclonales inhibidores de la angiogénesis

Desde 1971 surgió la hipótesis de que la inducción de la formación de nuevos vasos era una propiedad de los cánceres, condición que ya ha sido demostrada y es la base para la comprensión y tratamiento de muchas neoplasias. Las células cancerosas secretan factores angiogénicos que llevan a la formación de nuevos vasos sanguíneos y garantizan el flujo de los nutrientes a las células neoplásicas. Los factores angiogénicos reconocidos son el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor transformador del crecimiento β (TGF β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que son expresados por varios tipos de tumores, ya que su secreción es esencial para el crecimiento del cáncer y las metástasis. El antagonismo de estas moléculas proangiogénicas detiene el crecimiento tumoral (1).

En 2009, Jain y colaboradores propuso un mecanismo que también mejoraba la respuesta al tratamiento. Sus observaciones concluyeron que en los tumores existen fugas capilares que elevan la permeabilidad y la presión intersticial, lo cual inhibe el flujo sanguíneo, reduce la oxigenación y evita el suministro de fármacos al tejido tumoral. Los anticuerpos dirigidos contra el VEGF disminuyen la presión intersticial y mejoran la oxigenación y el flujo de sangre en el tumor, por lo que incrementan la capacidad de los quimioterápicos para llegar a la neoplasia (36).

Bevacizumab

Es un anticuerpo monoclonal humanizado de origen recombinante que se une y neutraliza el VEGF-A evitando su asociación con los receptores endoteliales Fit-1 y KDR, con lo cual se retarda el crecimiento de todos los tejidos (incluyendo los metastásicos). Se administra en infusión intravenosa usualmente después de los otros quimioterápicos y tiene una $t_{1/2}$ de unos 20 días. También se puede aplicar en inyección intravítrea precedido por antibióticos (37,38). A nivel cardiovascular se ha asociado con hipertensión, eventos tromboembólicos, trombosis arterial, hipotensión, neuropatía sensitiva, alopecia, dermatitis exfoliativa, decoloración de la piel, hemorragia gastrointestinal, otras hemorragias, leucopenia, mialgias, proteinuria e infecciones respiratorias altas. En los 50 primeros días de tratamiento se ha observado perforación gastrointestinal hasta en 2,4% de casos. Se han presentado casos de leucoencefalopatía (37,38).

Está aprobado para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico, del cáncer pulmonar de células no pequeñas no resecable, localmente avanzado o metastásico, en glioblastoma, y en el tratamiento del cáncer renal metastásico. Además se viene empleando en el tratamiento del cáncer mamario, cáncer recurrente de cuello, cáncer recurrente de ovario, sarcomas de tejidos blandos (angiosarcoma o hemangiopericitoma) y en la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (7, 37,38).

Sunitinib

El sunitinib obtiene sus propiedades anticancerosas y antiangiogénicas de su capacidad de inhibir múltiples receptores de tirosina cinasas y de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFR α y PDGFR β), factores de crecimiento endotelial (VEGFR 1, 2 y 3), tirosina cinasa 3 (FLT3), factor estimulante de colonias tipo 1 (CSF-1R) y el receptor del factor neurotrófico derivado de células madre (RET). Se administra por vía oral con una adecuada absorción sin que los alimentos la modifiquen. El efecto pico se alcanza en 6 a 12 horas y se metaboliza en el hígado vía CYP3A4 a un metabolito activo (SU12662) con lo cual las $t_{1/2}$ van desde 40 horas para el fármaco, hasta 110 horas para el metabolito. La excreción es fecal (61%) y renal (16%) (39).

Hasta en el 34% de pacientes se produce hipertensión, acompañada de edema palpebral e incluso falla cardíaca; además, depresión, decoloración de la piel, síndrome de mano-pie, cambios en el color del pelo, alopecia, hiperglicemia, hiperuricemia, hipocalcemia, hipoalbuminemia, hiponatremia e hipocalemia. Entre 26% y 79% de pacientes pueden presentar anemia, neutropenia, trombocitopenia y sangrados. Se han reportado casos de pancreatitis, embolismo pulmonar y de eventos trombóticos. Se debe vigilar la función hepática por toxicidad, incluso fatal. Se emplea en el tratamiento del tumor de estroma gastrointestinal (GIST) de pacientes que no toleran o continúa progresando la enfermedad con el manejo con

imatinib, en el tratamiento del cáncer de células renales avanzado, en tumores neuroendocrinos del páncreas que no son resecables. Además, se viene usando en cáncer de tiroides avanzado y en sarcomas de tejidos blandos no GIST (7, 39).

Ranibizumab

Se trata de un fragmento de anticuerpo monoclonal recombinante humanizado el cual se une e inhibe el VEGF con lo cual suprime la neovascularización y retarda la pérdida de la visión. Se administra por vía intravítrea y su $t_{1/2}$ alcanza los 9 días. Se ha observado que provoca cefalea, artralgias, hemorragia conjuntival, dolor ocular, incremento de la presión intraocular, visión borrosa, inflamación intraocular y blefaritis. Pero además, se ha reportado nasofaringitis, bronquitis, fibrilación auricular, eventos tromboembólicos, náuseas, anemia, tos, disnea, exacerbación de la hipertensión y dolor facial. Está contraindicado en caso de que se presenten infecciones oculares o perioculares. Se debe vigilar la presión intraocular a los 30 minutos y entre los 2 y 7 días posteriores al procedimiento. Está indicado en el tratamiento de la neovascularización húmeda de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), en el manejo del edema macular subsecuente a la oclusión venosa de retina (RVO) e incluso se ha ensayado en el tratamiento del deterioro visual asociado al edema macular de la diabetes (DME) (37,40).

Aflibercept

El aflibercept es una proteína de fusión de origen recombinante que actúa como un receptor señuelo para el factor de crecimiento endotelial (VEGF-A) y el factor de crecimiento placentario (PlGF). La unión al receptor señuelo previene que VEGF-A y PlGF se unan y activen los receptores de las células endoteliales con lo que se suprime la neovascularización y se enlentece la pérdida de la visión. Es de aplicación intravítrea y su $t_{1/2}$ es de 5 a 6 días (42,43). Se ha asociado a hemorragia conjuntival, dolor y hemorragia en el sitio de la inyección, cataratas, decoloración vítrea, aumento de la presión intraocular, hiperemia conjuntival, erosión corneal, sensación de cuerpo extraño, visión borrosa, endoftalmitis, eventos tromboembólicos y anticuerpos anti aflibercept. Está aprobado para el tratamiento de la neovascularización (húmeda) de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (42,43).

Pegaptanib

Es un aptámero, un oligonucleótido unido covalentemente a polietilenglicol, el cual puede adoptar tres formas dimensionales y unirse al VEGF, con lo cual suprime la unión de este a sus receptores y suprime la neovascularización y enlentece la pérdida de la visión. Se aplica por vía intravítrea, es metabolizado por endo y exonucleasas y tiene una $t_{1/2}$ de 6 a 14 días. Entre el 10% y 40% de los pacientes presentan hipertensión, inflamación de la cámara

anterior del ojo, visión borrosa, cataratas, hemorragia conjuntival, edema corneal, dolor ocular, incremento de la presión intraocular, queratitis punctata, disminución de la agudeza visual y opacidades vítreas. Del 1% a 10% de pacientes pueden experimentar oclusión de la arteria carótida, accidentes cerebrovasculares, isquemia cerebral transitoria, vértigo, dermatitis de contacto, diabetes mellitus, retención urinaria, blefaritis, conjuntivitis, fotopsias, endoftalmitis, midriasis, pérdida auditiva y bronquitis. Se emplea en el tratamiento de la AMD (37,44).

Axitinib

Es un poderoso inhibidor de VEGFR-1, 2 y 3 que ha mostrado actividad antitumoral como agente único con un perfil de seguridad aceptable para el tratamiento de varios tumores sólidos en estado avanzado, incluyendo el carcinoma de células renales. Se administra por vía oral, alcanza una biodisponibilidad de 58%, es transportado unido a albúmina, sufre metabolismo hepático vía CYP3A4 y es eliminado por vía biliar. Las reacciones adversas más comunes son disfonía, hipertensión y síndrome mano-pie. En ensayos clínicos ha mostrado que puede lograr una sobrevida libre de enfermedad de unos 12 meses. Está aprobado para el tratamiento del cáncer de células renales avanzado (45).

1.6. Antirreumáticos modificadores de enfermedad (ARMEs) biológicos

1.6.1. Inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) induce respuestas biológicas e inflamatorias, tales como expresión de moléculas de adhesión (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1), de citoquinas proinflamatorias (interleuquinas) y de metaloproteinasas (MMP-1 y MMP-3), aumento de la migración leucocitaria con activación de neutrófilos, eosinófilos y la inducción de reactantes de fase aguda y enzimas, todos estos relacionadas con la destrucción del cartílago y daños en otros tejidos. El TNF- α se eleva en los tejidos y fluidos relacionados con la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa (1,7,8).

El infliximab, adalimumab, etanercept, certolizumab, golimumab y tocilizumab son medicamentos diseñados por tecnología recombinante, que comparten la capacidad de inhibir el TNF- α . Algunos son anticuerpos monoclonales de tipo IgG₁, quiméricos o totalmente humanos, mientras que otros son glicoproteínas consistente en dos cadenas idénticas del monómero p75 del receptor de TNF- α humano recombinante, fusionado a un segmento de IgG₁ humano, que inactivan el TNF circulante (1,7,8).

Los ARME biológicos se reservan para los pacientes con actividad moderada o severa de la enfermedad y con indicios de pronóstico desfavorable como son las alteraciones funcionales, erosión ósea evidente por radiología, enfermedad extraarticular y factor reumatoide positivo. El tratamiento debe ser ajustado a cada

paciente y el uso de estos medicamentos debe considerarse según las reacciones adversas que pueden ser graves (1,7,8, 46).

Infliximab

Es un anticuerpo monoclonal quimérico de tipo IgG₁ murino/humano cuyo mecanismo de acción es la unión al TNF- α humano e inhibición de la actividad endógena de este, bloqueando la expresión de citoquinas, reduciendo la migración leucocitaria y la expresión de enzimas que degradan los tejidos articulares y digestivos. El infliximab debe ser administrado en infusión continua durante al menos 2 horas. Su $t_{1/2}$ va de 7 a 12 días (47).

Las reacciones adversas más frecuentes son cefalea, náuseas, dolor abdominal, infecciones del aparato respiratorio superior, bronquitis, desarrollo de anticuerpos antinucleares, reacciones infusionales, hipertensión, infecciones del tracto urinario y candidiasis. Se han reportado arritmias, carcinoma basocelular, cáncer de mama, linfadenopatías, linfomas, anemia, leucopenia, hipotensión, infarto y convulsiones. Está contraindicado en pacientes que tengan infecciones severas (sepsis, abscesos e infecciones por oportunistas). Se ha reportado la activación de tuberculosis y micosis invasivas (7,47,48). Es un medicamento alternativo para el tratamiento de la artritis reumatoide activa moderada y severa (con metotrexato). En la enfermedad de Crohn moderada y severa que no responde a la terapia convencional ha reducido los signos y síntomas y disminuido el número de drenajes enterocutáneos y fístulas. En la artritis psoriásica reduce los síntomas y la progresión del daño estructural, además es útil en la psoriasis en placas, en espondilitis anquilosante y en la colitis ulcerativa (7,47-49). .

Adalimumab

Es un anticuerpo monoclonal del tipo IgG₁ humano, que se une al TNF- α e interfiere con los sitios de unión del receptor de este factor llevando a bloquear el consecuente proceso inflamatorio. Su inhibición conduce a reducir el dolor y destrucción articular y a mejorar los signos y síntomas en articulaciones, piel e intestino. Se administra por vía subcutánea y alcanza una biodisponibilidad del 64%; logra concentraciones en líquido sinovial que van del 31% al 96% de las séricas. La $t_{1/2}$ es de 10 a 20 días (7,49,50). Se ha reportado que provoca rash, eritema, inflamación, dolor e incluso hemorragia en el sitio de aplicación, incremento de CPK, infecciones en tracto respiratorio superior, anticuerpos anti adalimumab, hipertensión, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, infecciones de tracto urinario, síndrome similar a influenza, arritmias (fibrilación auricular), angina, infarto de miocardio, pericarditis, esclerosis múltiple, hematoma subdural, asma, lupus eritematoso sistémico, linfomas, melanomas y reacciones anafilácticas. Debe evaluarse antes de iniciar el tratamiento la posibilidad de una tuberculosis latente, pues se ha reportado la reactivación con formas diseminadas y extrapulmonares (7,51).

Se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide activa (moderada o severa) y la artritis psoriásica, solo o en combinación con ARMEs no biológicos; también en el tratamiento de la espondilitis anquilosante, de la enfermedad de Crohn moderada o severa que no responde al tratamiento convencional. Además ha sido aprobado para el tratamiento de la psoriasis en placas y la artritis reumatoide juvenil (7,49-52).

Etanercept

Es una proteína de fusión del receptor TNF totalmente humano, que consiste en moléculas del segmento de unión al ligando del receptor TNF fusionado con la fracción Fc de IgG₁, que se une a TNF soluble y bloquea su interacción con los receptores de la superficie celular. Se administra por vía subcutánea, alcanza el efecto en 1 a 2 semanas y tiene una $t_{1/2}$ de 72 a 132 horas. Para conocer las diferentes proteínas de fusión, ver Tabla 4 (7,49).

Muchos de los pacientes pueden experimentar cefalea, rash, dolor abdominal, vómito, reacciones en el sitio de aplicación (dolor, eritema, inflamación, hematomas), infecciones del tracto respiratorio, otras infecciones y anticuerpos antinucleares. Pero también se ha presentado eventos menos frecuentes como abscesos, reacciones alérgicas, anemia, isquemia cerebral, desmielinización de SNC, eritema multiforme, hidrocefalia, perforación intestinal, parestesias, pancreatitis, pancitopenia, convulsiones, tromboflebitis, vasculitis y xerostomía. Los pacientes que reciben etanercept tienen un riesgo incrementado de infecciones severas la cuales pueden resultar en hospitalización y muerte. Se han reportado tuberculosis activa (o reactivación de la forma latente), micosis invasiva (incluyendo aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, coccidioidomicosis, histoplasmosis y pneumocistosis) y otras infecciones por oportunistas bacterianos y virales. Su uso se ha asociado a la aparición de linfomas (Hodgkin y no Hodgkin) y otras malignidades. Se emplea en la artritis reumatoide y la artritis idiopática juvenil poliarticular de moderada a severa; en la artritis psoriásica, en espondilitis anquilosante y en la psoriasis en placas (7, 49-52).

Tabla 4.- Proteínas de fusión, blanco terapéutico y principales indicaciones de uso.

Proteínas de fusión	Blanco terapéutico	Principales indicaciones
Aflibercept	Factor de crecimiento endotelial y factor de crecimiento placentario	Neovascularización (húmeda) de degeneración macular por la edad
Etanercept	Bloquea la acción del TNF- α	Artritis reumatoide y artritis idiopática juvenil
Abatacept	Sitios CD80 y CD86 de células presentadoras de antígenos	Artritis reumatoide y artritis idiopática juvenil
Alefacept	Receptor CD2 de la superficie de linfocitos	Psoriasis en placas crónica
Belatacept	Sitios CD80 y CD86 de células presentadoras de antígenos	Profilaxis del rechazo de órganos

Certolizumab pegol

Es un anticuerpo monoclonal pegilado y humanizado que corresponde a un fragmento Fab' del TNF- α . Dado que no es un anticuerpo completo, sino una porción de la región Fc, no induce la activación del complemento, la citotoxicidad mediada por células anticuerpo dependiente, ni apoptosis. El mecanismo de acción corresponde a la inhibición y neutralización de la actividad de TNF- α . La pegilación del fármaco consigue retardar su eliminación y extender la vida media. Se administra por vía subcutánea, con una biodisponibilidad superior al 80% y una $t_{1/2}$ de 14 días (7, 53). Las reacciones adversas son prácticamente las mismas que se han reportado para etanercept con incremento significativo del riesgo de infecciones (respiratorias, urinarias), reacciones en el sitio de aplicación y elevación del riesgo de linfomas y otras malignidades. Se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Crohn moderada a severa que no responde al tratamiento convencional y en el manejo en monoterapia o en la terapia asociada a ARMEs no biológicos en artritis reumatoide moderada a severa (7,53).

Golimumab

Se une al TNF- α e interfiere con su actividad endógena, que incluye evitar la inducción de liberación de citocinas proinflamatorias (interleuquinas, factor estimulante de colonias de granulocitos), la expresión de moléculas de adhesión vascular (VCAM) e intracelular (ICAM) necesarias para la infiltración de leucocitos y la activación de neutrófilos y eosinófilos. Se administra por vía subcutánea, logrando una biodisponibilidad del 53%, con un pico de acción entre 2 y 6 días y una $t_{1/2}$ de 2 semanas (54). Además del mayor riesgo de desarrollar infecciones a todo nivel (respiratorias, urinarias, virales y por hongos), incrementa el riesgo de leucemia, linfomas, cáncer de piel diferente a melanomas, hipertensión arterial y elevación de transaminasas. Ha sido recientemente aprobado para el tratamiento de la artritis reumatoide moderada a severa, la artritis psoriásica y la espondilitis anquilosante (7,54).

Abatacept

Es un antirreumático, que actúa como modulador selectivo de la coestimulación que inhibe la activación de linfocitos T por unión en los sitios CD80 y CD86 de las células presentadoras de antígenos (APC), y así bloquea la interacción CD28 requerida entre las APC y los linfocitos T. Se han hallado células T activadas en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide. Puede ser administrado por vía subcutánea o intravenosa, alcanzando una biodisponibilidad de 78% y una $t_{1/2}$ de 8 a 25 días (7,55).

Se han reportado infecciones de cualquier índole (urinarias, neumonía, bronquitis, sinusitis), formación de anticuerpos, hipertensión, discinesias, fiebre, reacciones en el sitio de aplicación, exacerbación de EPOC, linfomas, cánceres de

pulmón, colédoco, vejiga, mama, cérvix, melanomas y síndrome mielodisplásico. Debe usarse con cuidado en pacientes con EPOC, pues se ha encontrado que se asocia con exacerbaciones. Debe descartarse la infección con virus de hepatitis B antes de comenzar su uso (7,56). Está aprobado para el manejo de la artritis reumatoide moderada a severa en monoterapia o en combinación con otros ARMEs no biológicos. También se ha empleado para el tratamiento de la artritis idiopática juvenil moderada a severa solo o asociado a metotrexato (7,56).

Tocilizumab

Es un antagonista del receptor de interleuquina-6 (IL-6), la cual es inducida normalmente por estímulos inflamatorios y es mediadora de una variedad de respuestas inmunológicas. La inhibición del receptor de IL-6 lleva a una reducción en la producción de reactantes de fase aguda y de citoquinas. Se administra por vía intravenosa y tiene una $t_{1/2}$ de 6,3 a 23 días (7,8). Es común que se presente elevación en transaminasas, hipertensión, edema periférico, incremento de colesterol, hipotiroidismo, úlceras en la boca, úlcera gástrica, ganancia de peso, neutropenia, trombocitopenia, conjuntivitis, nefrolitiasis, infecciones de tracto respiratorio superior, anticuerpos anti-tocilizumab, esclerosis múltiple y algunas malignidades (7). Se emplea en el tratamiento de la artritis reumatoide moderada a severa en pacientes adultos quienes hayan tenido una respuesta inadecuada a uno o más antiTNF (en monoterapia o en combinación con ARMEs); y en el manejo de la artritis idiopática juvenil activa, como terapia única o combinada con metotrexato (7,8).

Anakinra

Las interleuquinas, y en particular IL-1 son inductoras endógenas de los estímulos inflamatorios y mediadoras de una variedad de respuestas inmunológicas incluyendo la degradación del cartílago (pérdida de proteoglicanos) y la estimulación de la resorción ósea. Anakinra, un antagonista del receptor de IL-1, se administra por vía subcutánea y tiene una $t_{1/2}$ de 4 a 6 horas. Se ha asociado con inducir reacciones en el sitio de aplicación (leves y aparecen típicamente 14 a 28 días después con eritema, equimosis y dolor). Como los demás inmunosupresores, hasta un 39% de pacientes pueden presentar infecciones; además, neutropenia, neumonía, sinusitis, celulitis, malignidades (linfoma y melanoma) y trombocitopenia. Se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide moderada a severa en adultos en quienes haya fallado uno o más ARMEs; puede usarse sola o en combinación con otros ARMEs incluyendo otros antiTNF (7).

1.7. Anticuerpos monoclonales inhibidores del complemento

Eculizumab

La hemólisis intravascular terminal mediada por complemento es una característica clínica clave de la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN). El bloqueo de la formación del complejo de ataque de membrana (CAM) resulta en una estabilización de la hemoglobina y en reducción de la necesidad de transfusiones de glóbulos rojos concentrados. La incapacidad de regular la actividad del complemento lleva a su activación incontrolada en el síndrome hemolítico urémico atípico. Eculizumab, un anticuerpo monoclonal del tipo IgG se une a la proteína del complemento C5 y previene la escisión en C5a y C5b, con lo cual se inhibe la formación del complejo terminal C5b-9 o CAM. Se administra por vía intravenosa, y su efecto inhibitorio de la hemólisis se observa en una semana; la $t_{1/2}$ es de unos 11 días (7,57). Se han observado como efectos indeseables hipertensión, taquicardia, edema periférico, fiebre, infecciones del tracto urinario y de tracto respiratorio superior, anemia, leucopenia, mialgias, infecciones por herpes virus y por otros virus. Se han reportado casos de infecciones meningocócicas que pueden ser graves o incluso letales si no son tratadas oportunamente. Se recomienda que los pacientes sean vacunados contra meningococo al menos dos semanas antes de recibirlo. También se han observado infecciones por *S. pneumoniae* y *H. influenzae* por lo que se debe recomendar su inmunización (7). Se emplea en el tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna para reducir la hemólisis; en el manejo del síndrome hemolítico urémico atípico para inhibir la microangiopatía trombótica mediada por complemento. No está indicado en el síndrome hemolítico urémico relacionado con la toxina Shiga de *E. coli* (7,57).

1.8. Anticuerpos monoclonales antiasmáticos

Se ha reconocido que entre 10% y 20% de pacientes con asma tienen un fenotipo de la enfermedad persistente de moderada a gran severidad. Las investigaciones recientes indican que el proceso inflamatorio asociado con la inmunidad mediada por linfocitos Th2 está presente en aproximadamente la mitad de los pacientes con asma. Ensayos clínicos de anticuerpos para citoquinas asociadas con Th2 consistentemente mostraron una eficacia elevada en aquellos pacientes con niveles elevados de eosinófilos o de otros marcadores de la vía de activación Th2. Estas citoquinas, específicamente la IL-4 y la IL-13 están implicadas en asma y otras enfermedades atópicas. La IL-4 activa receptores en los linfocitos Th2 y controla la diferenciación celular. Los anticuerpos que tienen como blanco el receptor IL-4 α pueden potencialmente inhibir las vías que comprometen ambas citoquinas (1).

Omalizumab

Es un anticuerpo monoclonal del tipo IgG (derivado de DNA recombinante) el cual inhibe la IgE, por unión con alta afinidad a su receptor en las células cebadas y los basófilos. La disminución de la unión de IgE limita la activación y liberación de mediadores de la respuesta alérgica (tanto de fase temprana como tardía). Se reducen los niveles en sangre de IgE libre y de sus receptores. El tratamiento a largo plazo de pacientes con asma alérgica ha mostrado una reducción en sus exacerbaciones y en la necesidad de uso de corticoides. Se administra por vía subcutánea logrando una biodisponibilidad del 62%, el efecto máximo se alcanza en 6 a 7 días, sufre metabolismo hepático por la vía de degradación de inmunoglobulinas por el sistema retículo endotelial y por células endoteliales. La $t_{1/2}$ es de 26 días y la excreción es hepática (7, 57). Se han reportado reacciones en el sitio de aplicación, infecciones de aparato respiratorio superior, infecciones virales, dermatitis, artralgias, fracturas, alopecia, angioedema, disnea, hipotensión, trombocitopenia e incremento de malignidades. No se puede aplicar si el paciente tiene un broncoespasmo agudo o está en estatus asmático. Se han observado casos de anafilaxia tras su aplicación, especialmente en las primeras 2 horas, pero puede ocurrir a las 24 horas y se han visto incluso reacciones de este tipo después de un año de iniciado el tratamiento. Se usa en el manejo del asma alérgica persistente de moderada a severa que no se ha controlado adecuadamente con corticoides inhalados (7,57).

Dupilumab

Es un anticuerpo monoclonal completamente humanizado que se une a la subunidad del receptor IL-4 α que inhibe tanto las señales de IL-4 como de IL-13. Se administra por vía subcutánea y tiene una $t_{1/2}$ que le permite aplicarse cada semana, y ha mostrado reducir las exacerbaciones de manera significativa llevando a mejoría y reducción de la necesidad de medicación de rescate con agonistas β_2 . Las evaluaciones de seguridad no lo han asociado con toxicidad grave y se ha presentado exacerbación de desorden afectivo bipolar, angioedema, aumento de los síntomas de asma, rash, urticaria y edema en el sitio de la inyección. Es una nueva opción para el tratamiento del asma de moderada a severa intensidad en pacientes que no mejoran con tratamiento convencional (58).

1.9. Anticuerpos monoclonales para el tratamiento de la psoriasis

Alefacept

Pertenece a la categoría de anticuerpos monoclonales, pero se trata de una proteína de fusión humana. Alefacept se une al receptor CD2 de la superficie de linfocitos e inhibe su interacción con el antígeno funcional 3 de leucocitos (LFA-3). La interacción entre CD2 y LFA-3 es importante para la activación de los linfocitos T en la psoriasis, puesto que cuando están activados secretan un número importante de mediadores de la inflamación, incluyendo interferón gamma, el cual

está envuelto en la patogénesis de esta enfermedad. Se administra por vía intramuscular con una biodisponibilidad de 63% y tiene una $t_{1/2}$ de unas 270 horas (7,59). Se ha observado linfopenia hasta en el 10% de pacientes que ha obligado a discontinuar temporalmente la terapia, además reacciones locales en el sitio de aplicación (inflamación, edema, dolor, hemorragia), escalofríos, prurito, incremento de enzimas hepáticas, mialgias e infarto de miocardio. Es un agente peligroso que debe ser manipulado y dispuesto con mucho cuidado. Se ha asociado con reacciones de hipersensibilidad, incluso anafilaxia, así que debe discontinuarse en caso de que aparezcan. Reduce los conteos de linfocitos T CD4 y CD8, por lo que deben monitorearse quincenalmente mientras dure la terapia, y no debe iniciarse si había una disminución previa de estos. Puede elevar el riesgo de malignidades, de infecciones y además reactivar infecciones latentes. Se utiliza en el tratamiento de la psoriasis en placas crónica de moderada a severa intensidad en adultos que sean candidatos a terapia sistémica o a fototerapia (7,59).

Ustekinumab

Es un anticuerpo monoclonal humano que se une e interfiere con la citoquinas proinflamatorias, IL-12 e IL-23. Los efectos biológicos de estas interleuquinas incluyen la activación de los linfocitos NK, la diferenciación y activación de los linfocitos T CD4. También interfiere con la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), el TNF- α , la proteína -10 inducible por interferón (IP-10) y la IL-8. Se administra por vía subcutánea, con una biodisponibilidad del 57% y una $t_{1/2}$ muy amplia que va desde los 10 hasta los 126 días (7,60). Las reacciones adversas más importantes están relacionadas con el riesgo incrementado de presentar infecciones (hasta 61% de pacientes), pero también se pueden presentar fatiga, discinesias, depresión, reacciones en el sitio de aplicación, formación de anticuerpos, hipertensión, malignidades (cáncer de mama, colon, cabeza y cuello, riñón, próstata y tiroides) y un síndrome de leucoencefalopatía reversible. Se emplea en el tratamiento de la psoriasis en placas moderada a severa y se ha ensayado en enfermedad de Crohn (7,60).

1.10. Anticuerpos monoclonales para enfermedades infecciosas

Palivizumab

Es un anticuerpo monoclonal que neutraliza la actividad y además inhibe la fusión del virus sincitial respiratorio (VSR), con lo cual se impide la replicación viral. Se administra por vía intramuscular y posee una $t_{1/2}$ de unos 20 días en niños menores de 24 meses. Se ha asociado con pocas reacciones adversas, entre ellas arritmias, cianosis, fiebre, rash, gastroenteritis, vómito, incremento de enzimas hepáticas, otitis media, infecciones de aparato respiratorio superior, desarrollo de anticuerpos y debe prestarse especial cuidado a las reacciones de hipersensibilidad y discontinuar el medicamento ante las formas graves de estas. Debe usarse con precaución en pacientes con trombocitopenia o desordenes de la

coagulación (1,7). Se utiliza para la prevención de la enfermedad grave en aparato respiratorio inferior causada por el VSR en neonatos y niños con alto riesgo de esta enfermedad, que son prematuros con menos de 28 semanas, en niños que nacieron con alguna anomalía congénita de las vías respiratorias o con un trastorno neuromuscular que les dificulta manejar las secreciones y en niños que nacieron con una enfermedad pulmonar crónica como la displasia broncopulmonar o una cardiopatía congénita (1,7).

Raxibacumab

El raxibacumab es producto de la investigación que sucedió a los ataques terroristas posteriores al 11 de septiembre de 2001. Es un anticuerpo monoclonal del tipo inmunoglobulina humana IgG1 λ que tiene como blanco terapéutico un componente (antígeno PA) de la toxina del ántrax, con lo cual previene que otros componentes de la toxina causen sus efectos patológicos. Se administra por vía intramuscular en sitios diferentes durante cinco ocasiones hasta el mes 18. En los estudios hechos en voluntarios sanos se asoció con cefalea, infecciones de tracto respiratorio superior, náuseas, dolor en el sitio de aplicación, prurito, tos, artralgia e infecciones urinarias. Tiene como indicaciones la profilaxis y el tratamiento de pacientes con infección por *Bacillus anthracis* por vía inhalada (ántrax) (61,62).

1.11. Anticuerpos monoclonales trifuncionales

Catumaxomab

Es un nuevo anticuerpo monoclonal trifuncional híbrido murino/ratón que tiene especificidad sobre las moléculas de adhesión epitelial celular, EpCAM y el antígeno de células T CD3. Además, tiene una región Fc funcional constante que preferentemente se une a receptores Fc-gamma (Fc γ R) I/II y III. Esta trifuncionalidad conduce a una destrucción efectiva de células tumorales EpCAM positivas. Durante su desarrollo, el anticuerpo demostró ser eficaz en el tratamiento de carcinomas avanzados intraperitoneales asociados a ascitis maligna (AM) causada por productos de secreción de las células tumorales. Se administra en infusión intraperitoneal posterior al drenaje del líquido ascítico, precedido de acetaminofen y antihistamínicos. Las principales reacciones adversas reportadas han sido fiebre, escalofríos, vómito, disnea, hiper/hipotensión, íleo paralítico y elevación de enzimas hepáticas. Se ha utilizado en el tratamiento de la ascitis maligna o peritonitis carcinomatosa asociada a cáncer ovárico avanzado y otras malignidades gastrointestinales (63-66).

1.12. Agentes antiplaquetarios

Abciximab

Es un agente antiplaquetario que corresponde a un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal quimérico humano-murino 7E3, de tal forma que se une e inhibe el receptor IIb/IIIa resultando en una inhibición de la agregación de las

plaquetas. Se aplica por vía intravenosa, e inhibe la agregación plaquetaria en tan solo 10 minutos, pero el efecto se mantiene por unas 72 horas y es metabolizado por proteólisis. La $t_{1/2}$ varía de 30 minutos a 4 horas (7,67,68). A nivel cardiovascular se ha relacionado con hipotensión, dolor precordial, bradicardia, edema periférico, embolismo, hemorragia intracraneal, taquicardia ventricular. También, sangrados menores, dolor lumbar, dolor abdominal, trombocitopenia, dolor en el sitio de inyección, pensamientos anormales, anafilaxia, bloqueos AV, derrame pleural y xerostomía. Su administración se ha asociado con incremento de la frecuencia de complicaciones por sangrados mayores, incluyendo hemorragia retroperitoneal, pulmonar, gastrointestinal o genitourinaria. El riesgo de sangrado se eleva con la terapia conjunta con trombolíticos y anticoagulantes. El anticuerpo es administrado a pacientes que se someterán a angioplastia vía percutánea para el tratamiento de la trombosis coronaria, asociado a ASA y heparina, con lo cual evita una nueva estenosis, el reinfarto y la muerte. También se utiliza en pacientes con angina inestable que no responden a angioplastia convencional en las primeras 24 horas y combinado a tenecteplasa en el tratamiento del infarto agudo de miocardio con elevación ST (7,67).

1.13. Inmunosupresores para evitar rechazo de trasplantes

Basiliximab

Es un agente inmunosupresor del grupo de los anticuerpos monoclonales de tipo quimérico (murino/humano) el cual bloquea la cadena- α del complejo de receptores de IL-2. Este receptor está expresado en linfocitos T activados y es una ruta crítica para la activación mediada por células del rechazo de aloinjertos. Se administra por vía intravenosa, alcanza una $t_{1/2}$ de 7 a 9 días, pero el efecto dura en promedio unos 36 días (7,57). Su administración no ha mostrado incremento de efectos adversos graves. Se ha observado hipertensión, edema periférico, fiebre, insomnio, acné, hipocalcemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, infecciones de tracto urinario, anemia, tremor, disnea, agitación, ansiedad, depresión, hipertrichosis, acidosis, hiperglicemia, artralgias, proteinuria, broncoespasmo y neumonía (7,57). Debe utilizarse como parte de un régimen inmunosupresor con ciclosporina y corticoides. Puede elevarse la frecuencia de infecciones por oportunistas. Se han presentado reacciones de hipersensibilidad, incluso anafilaxia. Se emplea en la profilaxis del rechazo de órganos tras el trasplante de riñón en una terapia combinada con ciclosporina y corticoides. También en el tratamiento de la enfermedad injerto versus huésped refractaria y grave. Se ha explorado además en la prevención del rechazo de trasplantes hepáticos y de corazón (7,57).

1.14. Agentes modificadores óseos

Denosumab

Es un anticuerpo monoclonal con afinidad por el factor nuclear del ligando kappa (RANKL). Los osteoblastos secretan RANKL, el cual activa los precursores de osteoclastos y la subsecuente osteólisis lo cual promueve la liberación de factores derivados de crecimiento óseo, tales como el factor de crecimiento parecido a insulina (IGF1) y lo transforma en el factor de crecimiento-beta (TGF-beta) que incrementa los niveles séricos de calcio. Denosumab se une a RANKL y bloquea su interacción con RANK (el receptor localizado en la superficie de osteoclastos) y previene la formación de estos, lo cual conduce a una disminución de la reabsorción ósea e incrementa la masa de hueso en la osteoporosis. En tumores sólidos con metástasis a hueso, la inhibición de RANKL disminuye la actividad osteoclástica con una reducción de los eventos esqueléticos relacionados con la destrucción ósea por la neoplasia (7). Se administra por vía subcutánea alcanzando una biodisponibilidad del 62% y una $t_{1/2}$ de 25 a 28 días. Ha demostrado que reduce en solo tres días los marcadores de resorción ósea en un 85% y el efecto máximo se consigue en un mes, pero los marcadores vuelven a sus niveles previos tras 12 meses de suspensión de la terapia (7).

Se ha relacionado con aparición de fatiga, dermatitis, eczema, hipofosfatemia, dolor en extremidades y el dorso, disnea, edema periférico, angina, hipercolesterolemia, mialgias, osteonecrósis de la mandíbula, infecciones de aparato respiratorio superior, nuevas malignidades y formación de anticuerpos. Puede causar o exacerbar la hipocalcemia, por lo que se requiere monitorear los niveles de calcio; debe usarse con precaución en pacientes con hipoparatiroidismo, cirugía de tiroides, síndromes malabsortivos, resección de una porción de intestino delgado y alteración grave de la función renal. Los pacientes deben mantener una óptima higiene oral para reducir el riesgo de cualquier proceso dental que favorezca una osteomielitis (7).

Se puede utilizar en el tratamiento de la osteoporosis en mujeres post menopáusicas con alto riesgo de fracturas; en el manejo de la pérdida ósea en hombres que reciben terapia de deprivación de andrógenos por cáncer de próstata no metastásico; en el manejo de la pérdida ósea en mujeres que reciben inhibidores de la aromatasas para el cáncer mamario. Además, en la prevención de eventos relacionados con el esqueleto (ej. fracturas, compresión medular y dolor óseo que requiera radiación o cirugía) en pacientes con metástasis a hueso desde tumores sólidos. También se ha empleado en el tratamiento de la destrucción ósea causada por artritis reumatoide (7).

2. Inhibidores de la tirosina cinasa

Las proteínas cinasas son esenciales para la transducción de señales que regulan el crecimiento y adaptación celulares al medio extracelular. Las vías de señalización involucran la transcripción génica y la síntesis de DNA. El genoma humano puede tener unas 550 cinasas que se han clasificado en tres categorías diferentes: aquellas que fosforilan residuos de tirosina, o de serina y treonina o las que tienen actividad sobre los tres residuos. Bajo condiciones fisiológicas los factores de crecimiento y otros ligandos se fijan a los receptores de tirosina cinasa y los activan. En muchos cánceres, algunas mutaciones activan las proteínas cinasas de tirosina, por lo que estas se han convertido en objetivos terapéuticos. (Ver Tabla 5) (1).

Tabla 5.- Inhibidores de la tirosina cinasa, blancos terapéuticos y principales indicaciones.

Inhibidores de tirosinas cinasas	Blanco terapéutico	Principales indicaciones
Sunitinib	Tirosina cinasas	Tumor de estroma gastrointestinal
Pegaptanib	Factor de crecimiento endotelial (VEGF)	Neovascularización (húmeda) de degeneración macular por la edad
Axitinib	Inhibidor de VEGFR-1, 2 y 3	Cáncer de células renales
Imatinib	Tirosina cinasa BCR-ABL	Leucemia Mieloide Crónica cromosoma Filadelfia positivo, enfermedad mieloproliferativa/mielodisplásica
Dasatinib	Tirosina cinasa BCR-ABL	Leucemia Mieloide Crónica cromosoma Filadelfia positivo, Leucemia Linfoblástica Aguda
Nilotinib	Tirosina cinasa BCR-ABL	Leucemia Mieloide Crónica cromosoma Filadelfia positivo
Crizotinib	Cinasa de linfoma anaplásico, Receptor del Factor de Crecimiento del Hepatocito	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
Pazopanib	Inhibidor de la tirosina cinasa (multicinasas)	Cáncer de células renales avanzado
Ruxolitinib	Cinasas asociadas Janus	Mielofibrosis
Sorafenib	Inhibidor de múltiples cinasas	Cáncer de células renales
Bosutinib	Inhibidor de las cinasas Src y Abl	Leucemia mieloide crónica Ph+
Vemurafenib	Inhibidor de la cinasa BRAF	Melanoma metastásico
Gefitinib	Inhiben la tirosina cinasa del EGFR	Cáncer broncopulmonar no microcítico
Erlotinib	Inhiben la tirosina cinasa del EGFR	Cáncer broncopulmonar no microcítico
Lapatinib	Inhibidor de la tirosina cinasa bloqueando la actividad de EGFR	Cáncer mamario avanzado con sobreexpresión HER-2

Inhibidores de la cinasa BCR-ABL

Imatinib, Dasatinib y Nilotinib

El mesilato de imatinib fue el primer inhibidor de la proteína cinasa aprobado. Inhiben la tirosina cinasa BCR-ABL (Breakpoint Cluster Region-fusionado con el protooncogen Abelson ABL), la cual es un producto génico anormal constitutivo de la Leucemia Mieloide Crónica cromosoma Filadelfia positivo (LMC Ph+) (1). La inhibición de esta enzima bloquea la proliferación e induce la apoptosis en líneas celulares BCR-ABL positivas y en células frescas leucémicas. El imatinib también inhibe la tirosina cinasa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), del factor de células madre (SCF), c-KIT y los eventos celulares mediados por estos (7). El dasatinib ha mostrado ser efectivo sobre blancos que resultaron resistentes a imatinib, y también inhibe las familias SCR, c-KIT, EPHA2 y PDGF. La resistencia a los inhibidores de la tirosina cinasa se genera a partir de mutaciones específicas en los segmentos separados del dominio de la cinasa (69,70). La mayor parte de mutaciones mantienen la enzima en su configuración abierta y activa. Se absorben bien después de la administración oral, con adecuadas biodisponibilidades. Sufren metabolismo hepático principalmente vía CYP3A4 y la excreción es fecal y renal.

Los tres se han asociado principalmente a retención de líquidos y edemas que incluso han sido relacionados con ascitis y anasarca; además, fiebre, insomnio, ansiedad, alopecia, hipocalcemia, ganancia de peso, hemorragias, sangrado digestivo, neutropenia, trombocitopenia, anemia, hepatotoxicidad, mialgias, edema periorbitario, derrame pleural, e infecciones de tracto respiratorio superior (7).

El imatinib está aprobado para el tratamiento de adultos con LMC Ph+ en fase crónica, en pacientes pediátricos con LMC Ph+ en fase crónica que se les hará trasplante de células madre o son resistentes a terapia con interferón alfa, en LMC Ph+ en fase blástica, acelerada o crónica después del fracaso de la terapia con interferón, en tumores GIST, en mastocitosis sistémica agresiva, además en dermatofibroma protuberans, síndrome hipereosinofílico y enfermedad mieloproliferativa/mielodisplásica. Se viene recientemente empleando en tumor desmoide (sarcoma de tejidos blandos) y en pacientes con LMC post trasplante de células madre (7,69,70). El dasatinib está aprobado para el tratamiento de LMC en fases blástica, acelerada y crónica resistentes o intolerantes a terapia previa (con imatinib), para el tratamiento de pacientes con LMC Ph+ nuevos en fase crónica, en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) Ph+ resistente o intolerante al tratamiento previo. También en el tratamiento de pacientes con LMC sometidos a trasplante de células madre y tumores GIST (71-73). El nilotinib fue autorizado para el tratamiento de LMC Ph+ en fase crónica o acelerada, resistentes o que no toleran el tratamiento previo con imatinib (7,72,74).

Crizotinib

Es un inhibidor de la tirosina cinasa, la cual bloquea: la cinasa de linfoma anaplástico (ALK), el Receptor del Factor de Crecimiento del Hepatocito (HGFR, c-MET) y el Receptor de Origen Nantais (RON). Las anormalidades génicas de ALK debidas a mutaciones o translocaciones pueden llevar a la expresión de proteínas de fusión oncogénica las cuales alteran la señalización y expresión y resultan en incrementos de la proliferación y sobrevida celular en tumores que expresan ese tipo de proteínas de fusión. Se administra por vía oral y alcanza una biodisponibilidad del 43%. Tiene metabolismo hepático vía CYP3A4 y una $t_{1/2}$ de 42 horas. La excreción es fecal (63%) y por orina (22%) (75-77). Se ha asociado con edemas, disfagia, reflujo gastroesofágico, linfopenia, elevación enzimas hepáticas y neuropatía. Se han reportado desordenes visuales hasta en el 62% de los pacientes, además, dolor precordial, artralgias e infecciones respiratorias, prolongación del intervalo QT y otras arritmias. Solo está aprobado para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado o metastásico en quienes tengan un test positivo para el gen anormal de ALK (75-77).

Pazopanib

Es un inhibidor de la tirosina cinasa (multicinasas), que limita el crecimiento tumoral por inhibición de la angiogénesis por bloqueo de los receptores de la superficie celular del factor de crecimiento endotelial (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-alfa y beta), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-1 y 3), receptor de citoquinas (cKIT), el receptor de IL-2 de células T inducible por cinasas, entre otros. Se administra por vía oral, con una biodisponibilidad que incrementa con los alimentos, es metabolizado principalmente vía CYP3A4 y alcanza una $t_{1/2}$ de 31 horas. Su excreción es fecal (78,79). Hasta un 40% de pacientes han presentado hipertensión, pero también se ha observado fatiga, cambios en el color del cabello, hiperglicemia, hipofosfatemia, hiponatremia, incremento de TSH, hipomagnesemia e hipoglicemia. Debe monitorearse estrechamente la función hepática, pues se han reportado casos fatales de hepatotoxicidad con elevación de transaminasas y bilirrubinas. Debe emplearse con cuidado en pacientes con riesgo cardiovascular pues puede elevar el riesgo de eventos trombóticos, angina, ictus e infarto del miocardio. Se han reportado casos de perforación intestinal a veces fatal, por lo que deben evaluarse muy bien los síntomas digestivos. Está aprobado para el tratamiento del cáncer de células renales avanzado (RCC), pero también se han reportado resultados favorables en el manejo del cáncer de tiroides y algunos sarcomas de tejidos blandos metastásicos o refractarios (78,79).

Ruxolitinib

Es un inhibidor selectivo de las llamadas cinasas asociadas Janus (JAKs) JAK-1 y JAK-2 que median la señalización de citoquinas y de factores de crecimiento responsables de la hemopoyesis y la función inmune. La señalización mediada por JAK involucra el reclutamiento de receptores de citoquinas que llevan a la modulación de la expresión de genes. Muestra una rápida absorción oral, el metabolismo es hepático por la vía del CYP3A4 a un metabolito activo, lo que les da una $t_{1/2}$ de 3 horas y 6 horas respectivamente. La excreción es urinaria (80,81). Los efectos más frecuentes incluyen discinesias, hematomas, elevación de colesterol, anemia, trombocitopenia, neutropenia, elevación de enzimas hepáticas, ganancia de peso, infecciones de tracto urinario e infecciones por herpes virus. No debe iniciarse la terapia si el paciente tiene menos de 200.000 plaquetas/mm³ y debe vigilarse muy bien el recuento de todas las series sanguíneas. Se está empleando en el tratamiento de la mielofibrosis, incluyendo la forma primaria, la secundaria a policitemia vera y la mielofibrosis post trombocitopenia esencial (80,81).

Sorafenib

Es un inhibidor de múltiples cinasas, que inhibe el crecimiento tumoral y la angiogénesis por inhibición intracelular de las cinasas (CRAF, BRAF y BRAF mutante) y los receptores de superficie (VFGFR-1, 2 y 3, PDGFR-beta, cKIT, FLT-3 y RET). Se administra por vía oral, con una biodisponibilidad del 49%, pero que puede verse disminuida en presencia de alimentos grasos; sufre metabolismo hepático vía CYP3A4, alcanza una $t_{1/2}$ de 25 a 48 horas y su excreción es principalmente fecal (7,82,83). Hasta el 17% de los pacientes presentan hipertensión, pero además, fatiga, neuropatía sensitiva, alopecia, hipoalbuminemia, hipofosfatemia, incremento de lipasas y amilasas, dolor abdominal, linfopenia, trombocitopenia, incremento de INR, disfunción hepática, infarto de miocardio, depresión, anemia y artralgias (7, 82,83). Se está empleando en el tratamiento del cáncer de células renales, en cáncer hepatocelular no resecable, en el manejo de cáncer de tiroides avanzado, en angiosarcoma recurrente o metastásico y en los tumores GIST (7,82,83).

Bosutinib

Pertenece a la tercera generación de inhibidores de las cinasas. Se trata de un inhibidor de las cinasas Src y Abl, aprobado para el tratamiento de pacientes adultos con LMC Ph+ en fase blástica o acelerada, en pacientes intolerantes o resistentes a las dos primeras generaciones de estos fármacos. Ha demostrado su mayor efectividad en la resistencia a imatinib conferida por mutaciones BCR-ABL. Se administra también por vía oral y tiene un perfil de seguridad aceptable con casos de toxicidad hematológica con neutropenia, anemia, trombocitopenia; diarrea, náuseas, vómito, dolor abdominal, hemorragias por alteración en la

función plaquetaria. Se pueden presentar hiperglicemia, elevación de enzimas hepáticas, hipocalcemia, rash, fatiga e infecciones respiratorias altas (84).

1.3. Inhibidores de la cinasa BRAF

Vemurafenib

Es un potente inhibidor de la cinasa BRAF, lo cual inhibe los factores de crecimiento tumoral en melanomas por inhibición de la actividad de ciertas formas de cinasas BRAF mutadas, incluyendo la mutación V600E, que lleva al bloqueo de la proliferación de células de melanoma (cerca del 50% de melanomas). La administración es oral, con metabolismo hepático vía CYP3A4, 1A2 y 2D6, alcanza una $t_{1/2}$ de 57 horas y una eliminación fecal (94%) (85,86). Entre el 17% y 23% de pacientes presentan edemas periféricos, pero además, fatiga, fiebre, fotosensibilidad, alopecia, hiperqueratosis, papilomas de piel, carcinoma de piel de células escamosas, queratosis actínica, eritema, fibrilación auricular, hipotensión, prolongación de intervalo QT, vasculitis, parálisis facial, carcinoma basocelular, eritema nodoso y síndrome de Stevens-Johnson. Solo es útil en el tratamiento del melanoma metastásico o no resecable que tengan la mutación BRAF V600E (85,86).

1.4. Inhibidores de receptores de factor de crecimiento epidérmico

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pertenece a la familia ErbB de receptores transmembrana de la tirosina cinasa. El EGFR también se le conoce como HER1 y se requiere para el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales (1). En el tratamiento de tumores sólidos se están utilizando dos clases de fármacos importantes dirigidos a la vía EGFR. Gefitinib y erlotinib inhiben la tirosina cinasa del EGFR y bloquean su actividad, mientras que cetuximab y panitumumab, se unen específicamente al dominio extracelular de EGFR.

Gefitinib, Erlotinib

Estos dos fármacos inhiben la tirosina cinasa del EGFR por bloqueo competitivo de la unión de ATP; se administran por vía oral logrando concentraciones máximas entre 1 y 7 horas con una biodisponibilidad del 60%, sufren metabolismo hepático vía CYP3A4 y cuentan con una $t_{1/2}$ de 36 a 41 horas. Más del 50% de pacientes que los toman presenta diarrea y un exantema, además pueden asociarse con piel seca, acné, vómito, prurito, anorexia, edemas periféricos, fatiga y además se ha descrito una neumopatía intersticial (7,87,88). Algunos ensayos clínicos no encontraron diferencias en la supervivencia de pacientes que tomaban gefitinib comparado con placebo, lo que llevó a que su uso se restringiera solo a pacientes que en el pasado hubiesen obtenido beneficios clínicos con este fármaco en el tratamiento de cáncer pulmonar de células no pequeñas avanzado o metastásico después de la falla de terapias con compuestos con platino o docetaxel. Con erlotinib también se presentaron problemas para demostrar su superioridad

en supervivencia, por lo que está actualmente aprobado para pacientes con cáncer broncopulmonar no microcítico, que sea metastásico y en cáncer pancreático localmente avanzado de pacientes no susceptibles a resección quirúrgica o con metástasis (7,87,88).

Cetuximab

Es un anticuerpo monoclonal dirigido a un dominio extracelular del EGFR que evita la señalización dependiente del ligando y la dimerización del receptor, con lo que antagoniza el crecimiento celular y las señales de supervivencia. Además, puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos contra las células tumorales. Específicamente se trata de una inmunoglobulina G₁ quimérica recombinante humana y murina. Debe ser administrado por vía intravenosa y logra el equilibrio terapéutico en tres semanas, con $t_{1/2}$ de unas 112 horas y la eliminación se presenta a través de la degradación por el sistema retículo endotelial (7,89,90). Las reacciones adversas son bastante comunes y se ha detallado fatiga hasta en 89% de pacientes, cefalea, insomnio, fiebre, ansiedad, depresión, una forma de rash acneiforme en 88%, hipomagnesemia, dolor abdominal, dispepsia, tos, infecciones, reacciones en el sitio de la infusión, paro cardiopulmonar y sepsis. Se han reportado reacciones infusionales serias hasta en 3% de pacientes con algunos raros desenlaces fatales, lo que debe obligar a la pronta suspensión de la infusión. Está aprobado para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico positivo para EGFR solo o asociado con irinotecan, también en el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, solo o en combinación con fármacos basados en platino o con radioterapia. Además, en la terapia del cáncer pulmonar de células no pequeñas (7,89,90).

Panitumumab

Se trata de un anticuerpo IgG_{2k} completamente humanizado, recombinante que se une y bloquea el dominio extracelular del EGFR y que no media la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. También se administra por vía intravenosa y tiene una $t_{1/2}$ de 7,5 días (90). Los efectos secundarios son similares a los de cetuximab, encabezados con fatiga, toxicidad dermatológica (90%), eritema, rash acneiforme. Algunas de las manifestaciones en piel pueden complicarse con infecciones, sepsis y abscesos. Se ha reportado la posibilidad de que se presenten reacciones severas infusionales hasta en el 1% de los casos. Se usa en la monoterapia del tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal refractario y metastásico (90).

Edrecolomab

Es un anticuerpo monoclonal de origen murino del tipo IgG_{2a} dirigido contra una glicoproteína transmembranal expresada en muchos adenocarcinomas, con lo que media la supresión tumoral a través de citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpos, mediada por células y por complemento con lo que lleva a lisis de las células neoplásicas. Se administra en infusión intravenosa. Se emplea en el tratamiento de cáncer colorrectal (91).

Nimotuzumab

Es un anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe el dominio extracelular del EGFR, con lo cual ha demostrado propiedades antiproliferativas, proapoptóticas y además efectos antiangiogénicos en tumores que sobre expresan este receptor. Ha demostrado ser eficaz en mejorar la sobrevida hasta por 16 meses en pacientes con carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, en tumores nasofaríngeos, gliomas en adultos y niños y en cáncer esofágico avanzado (92,93).

1.5. Inhibidores de HER2/neu

Trastuzumab

Fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado para el tratamiento de tumores sólidos. El mecanismo de acción tiene que ver con su capacidad de unirse a un dominio extracelular del EGFR (HER-2) y así mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos por inhibición de la proliferación de células, las cuales tienen sobreexpresada la proteína HER-2. La farmacocinética del trastuzumab depende de la dosis y tiene una $t_{1/2}$ de 5,8 días, logrando concentraciones de equilibrio entre la semana 16 y 32 de tratamiento (7). Las reacciones adversas son múltiples y muy variadas; se ha observado disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF: 4% a 22%), dolor, fiebre, diarrea, anorexia, cansancio, dolor lumbar, disnea y faringitis; reacciones infusionales, edemas, taquicardia, arritmias, hipertensión, depresión, infecciones de tracto urinario, artralgias, parestesias, reacciones alérgicas y síndrome similar a cuadro gripal (7,94).

La exposición a trastuzumab durante el embarazo puede llevar a oligohidramnios, hipoplasia pulmonar, malformaciones esqueléticas y muerte neonatal. Por sus efectos cardiovasculares se ha asociado a disminución en la LVEF y falla cardíaca. Se han podido observar eventos pulmonares agudos (síndrome de distrés respiratorio) las cuales en su mayoría ocurren con la primera aplicación. Se emplea en el tratamiento adyuvante de pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión HER-2; también en pacientes con adenocarcinoma gástrico o gastroduodenal con sobreexpresión HER-2 que no han recibido tratamiento previo (94-96).

Lapatinib

Se comporta como inhibidor de la tirosina cinasa bloqueando la actividad de EGFR (ErbB1) y HER-2 (ErbB2) por unión reversible a la enzima con lo que bloquea la fosforilación y activación de los segundos mensajeros (Erk1/2 y Akt), lo que regula la proliferación y sobrevida celular en tumores que expresan ErbB- y

ErbB2. Tras su administración oral, presenta absorción incompleta y variable, metabolismo hepático vía CYP3A4 en mayor medida generando metabolitos inactivos. Tiene una $t_{1/2}$ de 24 horas y la excreción es principalmente fecal (7). Entre 10% y 20% de pacientes se quejan de fatiga y ha sido descrita eritrodisestesia palmo-plantar, rash, piel seca, alopecia, dolor abdominal, estomatitis, anemia, neutropenia y trombocitopenia, incremento de enzimas hepáticas, disnea, epistaxis, disminución de LVEF y prolongación del intervalo QT. También se ha reportado hepatotoxicidad grave con elevación tres veces mayor de las transaminasas que puede incluso ser letal. Se utiliza en combinación con capecitabina en el tratamiento del cáncer de seno avanzado o metastásico con sobreexpresión HER-2 en pacientes que hayan recibido terapia previa (con antraciclina, taxanos o trastuzumab). También en combinación con trastuzumab en pacientes con cáncer de seno con sobreexpresión HER-2 que han progresado a pesar de recibir previamente trastuzumab (7,97).

Pertuzumab

Es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al receptor HER-2, en un dominio de la porción extracelular del mencionado receptor pero diferente al que se une trastuzumab y bloquea la dimerización del HER-2. Se ha investigado para ser asociado al trastuzumab buscando una ventaja teórica al bloquear dos blancos terapéuticos diferentes del mismo receptor, con lo que se han logrado mayores sobrevivencias, lo que sugiere que esta combinación es más eficaz en el tratamiento de cánceres mamarios HER-2 positivos que el uso de uno solo. En los estudios ha mostrado algún nivel de cardiotoxicidad, diarrea, rash, inflamación de mucosas y piel seca (98,99).

3. Inhibidores del proteasoma

Bortezomib

Es un inhibidor de proteasomas, un complejo de enzimas que regula la homeostasis de proteínas dentro de la célula. Específicamente, se une a la subunidad beta 5 del núcleo 20S del proteasoma 26S y produce inhibición de su actividad similar a la quimiotripsina, llevando a la activación de una cascada de señales, frenado del ciclo celular y apoptosis. Se administra por vía intravenosa, es transportado unido a proteínas, sufre metabolismo hepático vía CYP2C19, CYP3A4 y CYP1A2 a metabolitos inactivos; la $t_{1/2}$ tras múltiples dosis puede ser hasta de 193 horas (7). Se han presentado algunos efectos de tipo cardiovascular como edemas, hipotensión, falla cardíaca, con edema pulmonar y choque cardiogénico. También se han observado alteraciones psiquiátricas, ansiedad, fiebre, insomnio, trombocitopenia, neutropenia, neuropatía periférica, dolor óseo, mialgias, infecciones de tracto respiratorio superior e infecciones por herpes virus. Es un agente de riesgo que puede causar neuropatía periférica especialmente de tipo sensitivo. Se ha asociado con prolongación del intervalo QT. Puede provocar hiper

o hipoglicemia y es necesario ajustar las dosis de los antidiabéticos en pacientes con esta morbilidad. Es un medicamento aprobado para el tratamiento del mieloma múltiple y el linfoma de células del manto refractario. Además se ha ensayado en la macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de células T periféricas, linfomas de células T cutáneas (micosis fungoides) y amiloidosis de cadenas ligeras (7,100).

4. Bloqueadores selectivos de la coestimulación de células -T

Belatacept

Se trata de una proteína de fusión la cual actúa como un bloqueante selectivo de la coestimulación de las células T por unión a los receptores CD80 y CD86 de las células presentadoras de antígenos (APC), inhibiendo la interacción requerida que es mediada por CD28 entre las APCs y los linfocitos T, la cual es necesaria para su activación. La estimulación de células T resulta en producción y proliferación de citoquinas, los cuales son mediadores del rechazo inmune asociado al trasplante de riñón. Se administra por vía intravenosa y alcanza una $t_{1/2}$ de unos 10 días (1,7).

Las reacciones reportadas son obtenidas de ensayos clínicos en que se ha comparado belatacept con ciclosporina. Se ha asociado con edema periférico, hipertensión, hipotensión, hipocalcemia, hipercalcemia, dislipidemia, hiperglicemia, infecciones de tracto urinario, anemia, leucopenia, artralgias, incremento de creatinina, fibrilación auricular, hiperuricemia, hematomas, nefropatía crónica por aloinjertos, reacciones infusionales y estenosis de la arteria renal (7). Está contraindicado en pacientes que desconozcan su estado de infección por virus de Epstein Barr. Se han reportado desordenes linfoproliferativos post-trasplante (PTLD), en especial en SNC. También incrementa el riesgo de infecciones por oportunistas, sepsis, tuberculosis, y algunos virus asociados a leucoencefalopatía multifocal. Se ha reportado un incremento de malignidades, en particular de piel. Se utiliza en la profilaxis del rechazo de órganos junto a basiliximab, micofenolato y corticoides en pacientes receptores de un trasplante renal que sean seropositivos para virus de Epstein Barr (7).

Consideraciones finales

En los últimos meses se han autorizado por la FDA, el INVIMA y las demás agencias responsables en el mundo una gran cantidad de medicamentos de origen biotecnológico para el manejo de múltiples patologías, en especial para el cáncer y sus formas de mal pronóstico que no tenían tratamientos efectivos, con lo cual se ha modificado incluso la expectativa y la calidad de vida de estos pacientes (1-3). Condiciones impensables hace años, como lograr sobrevividas al parecer bastante prolongadas en pacientes con LMC Ph+ son posibles ahora, al igual que para el cáncer mamario (69,95). Además, se han presentado avances significativos en el

tratamiento de la artritis reumatoide resistente a metotrexato y otros antirreumáticos modificadores de enfermedad, logrando disminuir el daño articular y las secuelas incapacitantes (47,50).

Incluso se han desarrollado medicamentos útiles para hacerle frente a la guerra biológica, donde el ántrax fue un protagonista en la década pasada, o se ha avanzado contra algunas dolencias que si bien no son mortales, generan incapacidad y afectan la calidad de vida como el asma, la osteoporosis y la psoriasis en placas (57,58,60-62). Algunos de estos medicamentos ofrecieron alternativas de uso para las cuales no fueron creados, como el caso de la degeneración macular relacionada con la edad y el bevacizumab (37,38).

No existen dudas, que el mayor desarrollo de los nuevos medicamentos se ha enfocado en el tratamiento del cáncer, lo cual está ligado con la importante morbilidad y mortalidad que genera en el mundo entero (101). Pero también se han convertido en generadores de terapias costosísimas que están poniendo en aprietos a los sistemas de salud de todos los países, incluyendo aquellos de elevados ingresos, quienes han comenzado a preguntarse cuanto están dispuestos a pagar por aumentar una año de vida a un paciente, o un año de vida con calidad para ese mismo paciente (102,103).

La discusión se hace crítica, cuando hablamos del manejo de condiciones no mortales como el asma, la osteoporosis, la psoriasis o la misma artritis reumatoide, donde los costos que se están generando parecen sobrepasar la capacidad financiera que tiene el Sistema General de Seguridad Social en Salud de Colombia y están consumiendo los recursos que pueden ser prioritarios para la atención de problemas más prevalentes (103).

A todo esto, se debe sumar que no han resultado ser tratamientos inocuos y exentos de toxicidad. Con ellos se han descubierto nuevas reacciones adversas y se han reportado algunas lo suficientemente graves como para condicionar su utilización no solo a la disponibilidad de recursos, sino a la toxicidad aguda y los efectos a largo plazo de elevar la tensión arterial o favorecer la aparición de malignidades (1,2,7,9,23,24,46,67,102). El futuro de estos medicamentos es promisorio y todos los médicos deben estar al día en su conocimiento.

REFERENCIAS

1. Brunton L, Chabner B, Knollmann B. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e. McGraw-Hill Education. 2012; pp 1731-53
2. Casanova Estruch B. Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment. *Neurologia* **28**(3), 169-178 (2013).
3. Rosman Z, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. *BMC Med* **11**, 88 (2013).

4. Greenhalgh J, Bagust A, Boland A, Blundell M, Oyee J, Beale S, et al. Rituximab for the First-Line Maintenance Treatment of Follicular Non-Hodgkin's Lymphoma : A NICE Single Technology Appraisal. *Pharmacoeconomics* **31**(5), 403-13 (2013).
5. Niyazi M, Maihoefer C, Krause M, Rödel C, Budach W, Belka C. Radiotherapy and "new" drugs--new side effects? *Radiat Oncol* **6**, 177 (2011).
6. Yan L. Molecular targeted agents--where we are and where we are going. *Chin J Cancer* **32**(5), 225-32 (2013).
7. American Pharmacists Association. *Drug Information Handbook*. 21st Edition. Lexicomp 2012
8. Tak P, Kalden J. Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther* **13**(Suppl 1), S5 (2011).
9. Dyer MJ. Safety and efficacy of ofatumumab in patients with fludarabine and alemtuzumab refractory chronic lymphocytic leukaemia. *Ther Adv Hematol* **3**(4), 199-207 (2012).
10. Wu M, Akinleye A, Zhu X. Novel agents for chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol* **6**, 36 (2013).
11. Warner JL, Arnason JE. Alemtuzumab use in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia: a history and discussion of future rational use. *Ther Adv Hematol* **3**(6), 375-89 (2012).
12. Kousin-Ezewu O, Coles A. Alemtuzumab in multiple sclerosis: latest evidence and clinical prospects. *Ther Adv Chronic Dis* **4**(3), 97-103 (2013).
13. Feldmann G, Brossart P, Zipfel M, von Lilienfeld-Toal M. Mixed response to ipilimumab in a melanoma patient with brain metastases: case report and review of the literature. *Case Rep Oncol* **6**(1), 229-35 (2013).
14. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **369**(2), 122-33 (2013).
15. Chiche L, Jourde N, Thomas G, Bardin N, Bornet C, Darque A, et al. New treatment options for lupus - a focus on belimumab. *Ther Clin Risk Manag* **8**, 33-43 (2012).
16. Kim SS, Kirou KA, Erkan D. Belimumab in systemic lupus erythematosus: an update for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis* **3**(1), 11-23 (2012).
17. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, et al. Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N Engl J Med* **369**(2), 134-44 (2013).
18. Beck A, Reichert JM. Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering. *MAbs* **4**(4), 419-25 (2012).
19. Tobinai K, Takahashi T, Akinaga S. Targeting chemokine receptor CCR4 in adult T-cell leukemia-lymphoma and other T-cell lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep* **7**(3), 235-40 (2012).
20. Cooper KL, Madan J, Whyte S, Stevenson MD, Akehurst RL. Granulocyte colony-stimulating factors for febrile neutropenia prophylaxis following chemotherapy: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **11**, 404 (2011).
21. Barosi G, Bosi A, Abbraccio MP, Danesi R, Genazzani A, Corradini P, et al. Key concepts and critical issues on epoetin and filgrastim biosimilars. A position paper from the Italian Society of Hematology, Italian Society of Experimental Hematology, and Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* **96**(7), 937-42 (2011).
22. Agarwal R, Abidi MH. Successful autologous stem cell collection with filgrastim and plerixafor after long-term lenalidomide therapy for multiple myeloma. *Hematol Rep* **4**(4), e26 (2012).
23. Arora S, Bhargava A, Jasnosz K, Clark B. Relapsing acute kidney injury associated with pegfilgrastim. *Case Rep Nephrol Urol* **2**(2), 165-71 (2012).
24. Cesaro S, Nesi F, Tridello G, Abate M, Panizzolo IS, Balter R, et al. A randomized, non-inferiority study comparing efficacy and safety of a single dose of pegfilgrastim versus daily filgrastim in pediatric patients after autologous peripheral blood stem cell transplant. *PLoS One* **8**(1), e53252 (2013).
25. Jawad M, Yu N, Seedhouse C, Tandon K, Russell NH, Pallis M. Targeting of CD34+CD38- cells using Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in combination with tipifarnib (Zarnestra) in Acute Myeloid Leukaemia. *BMC Cancer* **12**, 431 (2012).
26. Zinzani PL, Viviani S, Anastasia A, Vitolo U, Luminari S, Zaja F, et al. Brentuximab vedotin in relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma: Italian experience and results of the use in the daily clinic outside clinical trials. *Haematologica* **98**(8), 1232-6 (2013).

27. Vaklavas C, Forero-Torres A. Safety and efficacy of brentuximab vedotin in patients with Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *Ther Adv Hematol* **3**(4), 209-25 (2012).
28. Stevens PL, Oluwole O, Reddy N. Advances and application of radioimmunotherapy in non-Hodgkin lymphoma. *Am J Blood Res* **2**(2), 86-97 (2012).
29. Chamrathy MR, Williams SC, Moadel RM. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: from the 'magic bullets' to 'radioactive magic bullets'. *Yale J Biol Med* **84**(4), 391-407 (2011).
30. Weiss GR, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Zhao Y, Liu H, Slingluff CL Jr, et al. Molecular insights on the peripheral and intratumoral effects of systemic high-dose rIL-2 (aldesleukin) administration for the treatment of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* **17**(23), 7440-50 (2011).
31. Ansell SM, Tang H, Kurtin PJ, Koenig PA, Nowakowski GS, Nikcevich DA, et al. Denileukin diftitox in combination with rituximab for previously untreated follicular B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **26**(5), 1046-52 (2012).
32. Prince HM, Martin AG, Olsen EA, Fivenson DP, Duvic M. Denileukin diftitox for the treatment of CD25 low-expression mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Leuk Lymphoma* **54**(1), 69-75 (2013).
33. Chakraborty A, Tannenbaum S, Rordorf C, Lowe PJ, Floch D, Gram H, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of canakinumab, a human anti-interleukin-1 β monoclonal antibody. *Clin Pharmacokinet* **51**(6), e1-18 (2012).
34. Saghafi h, Rahbar K, Nobakht haghghi A, Qoreishi M , Safdari F. Efficacy of Anti-Interleukin-2 Receptor Antibody (Daclizumab) in Reducing the Incidence of Acute Rejection After Renal Transplantation. *Nephro-Urol Mon* **4**(2), 475-7 (2012).
35. Chanvillard C, Jacolik RF, Infante-Duarte C, Nayak RC. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol* **4**, 63 (2013).
36. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* **8**(9), 2496-508 (2009).
37. Akar EE, Oner V, Küçükerdönmez C, Aydın Akova Y. Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of corneal neovascularization in a rat model. *Int J Ophthalmol* **6**(2), 136-40 (2013).
38. Li J, Zhang H, Sun P, Gu F, Liu ZL. Bevacizumab vs ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration in Chinese patients. *Int J Ophthalmol* **6**(2), 169-73 (2013).
39. Sun M, Shariat SF, Trinh QD, Meskawi M, Bianchi M, Hansen J, et al. An evidence-based guide to the selection of sequential therapies in metastatic renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol* **5**(2), 121-8 (2013).
40. Matsumiya W, Honda S, Kusuhara S, Tsukahara Y, Negi A. Effectiveness of intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration (AMD): comparison between typical neovascular AMD and polypoidal choroidal vasculopathy over a 1 year follow-up. *BMC Ophthalmol* **13**, 10 (2013).
41. Sabour-Pickett S, Loughman J, Nolan JM, Stack J, Pesudovs K, Meagher KA, et al. Visual performance in patients with neovascular age-related macular degeneration undergoing treatment with intravitreal ranibizumab. *J Ophthalmol* **2013**, 268438 (2013).
42. Thomas M, Mousa SS, Mousa SA. Comparative effectiveness of aflibercept for the treatment of patients with neovascular age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* **7**, 495-501 (2013).
43. Ohr M, Kaiser PK. Aflibercept in wet age-related macular degeneration: a perspective review. *Ther Adv Chronic Dis* **3**(4), 153-61 (2012).
44. Saeed MU, Gkaragkani E, Ali K. Emerging roles for antiangiogenesis factors in management of ocular disease. *Clin Ophthalmol* **6**, 533-43 (2013).
45. Ueda T, Uemura H, Tomita Y, Tsukamoto T, Kanayama H, Shinohara N, et al. Efficacy and Safety of Axitinib Versus Sorafenib in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Subgroup Analysis of Japanese Patients from the Global Randomized Phase 3 AXIS Trial. *Jpn J Clin Oncol* **43**(6), 616-28 (2013).
46. Busquets N, Carmona L, Surís X. [Systematic review: safety and efficacy of anti-TNF in elderly patients]. *Reumatol Clin* **7**(2), 104-12 (2011).
47. Smolen JS, Emery P. Infliximab: 12 years of experience. *Arthritis Res Ther* **13** Suppl 1, S2 (2011).

48. Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* **108**(1), 40-7 (2013).
49. Rodgers M, Epstein D, Bojke L, Yang H, Craig D, Fonseca T, et al. Etanercept, infliximab and adalimumab for the treatment of psoriatic arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* **15**(10), 1-329 (2011).
50. Burmester GR, Panaccione R, Gordon KB, McIlraith MJ, Lacerda AP. Adalimumab: long-term safety in 23 458 patients from global clinical trials in rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Ann Rheum Dis* **72**(4), 517-24 (2013).
51. Aaltonen KJ, Virkki LM, Malmivaara A, Konttinen YT, Nordström DC, Blom M. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of existing TNF blocking agents in treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One* **7**(1), e30275 (2012).
52. Agarwal SK. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *J Manag Care Pharm* **17**(9 Suppl B), S14-8 (2011).
53. Simsek I. TNF inhibitors - new and old agents for rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* **68**(3), 204-10 (2010).
54. Singh JA, Cameron DR. Summary of AHRQ's comparative effectiveness review of drug therapy for rheumatoid arthritis (RA) in adults--an update. *J Manag Care Pharm* **18**(4 Supp C), S1-18 (2012).
55. Herrero-Beaumont G, Martínez Calatrava MJ, Castañeda S. Abatacept mechanism of action: concordance with its clinical profile. *Reumatol Clin* **8**(2), 78-83 (2012).
56. Guyot P, Taylor P, Christensen R, Pericleous L, Poncet C, Lebmeier M, et al. Abatacept with methotrexate versus other biologic agents in treatment of patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate: a network meta-analysis. *Arthritis Res Ther* **13**(6), R204 (2011).
57. Reichert JM. Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* **4**(3), 413-5 (2012).
58. Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, et al. Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels. *N Engl J Med* **368**(26), 2455-66 (2013).
59. Lebre MC, Jonckheere CL, Kraan MC, van Kuijk AW, Bos JD, de Rie M, et al. Expression of IL-20 in synovium and lesional skin of patients with psoriatic arthritis: differential response to alefacept treatment. *Arthritis Res Ther* **14**(5), R200 (2012).
60. Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johans J, Guzzo C, et al; CERTIFI Study Group. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med* **367**(16), 1519-28 (2012).
61. Migone TS, Subramanian GM, Zhong J, Healey LM, Corey A, Devalaraja M, et al. Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *N Engl J Med* **361**(2), 135-44 (2009).
62. Mazumdar S. Raxibacumab. *MAbs* **1**(6), 531-8 (2009).
63. Ruf P, Kluge M, Jäger M, Burges A, Volovat C, Heiss MM, et al. Pharmacokinetics, immunogenicity and bioactivity of the therapeutic antibody catumaxomab intraperitoneally administered to cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* **69**(6), 617-25 (2010).
64. Xu L, Kohli N, Rennard R, Jiao Y, Razlog M, Zhang K, et al. Rapid optimization and prototyping for therapeutic antibody-like molecules. *MAbs* **5**(2), 237-54 (2013)
65. Sebastian M. Review of catumaxomab in the treatment of malignant ascites. *Cancer Manag Res* **2**, 283-6 (2010).
66. Seimetz D. Novel monoclonal antibodies for cancer treatment: the trifunctional antibody catumaxomab (removab). *J Cancer* **2**, 309-16 (2011).
67. Diaz JF, Cardenal R, Gomez-Manchero A, Sanchez-Gonzalez C. Safety and efficacy of tirofiban as adjunctive therapy for patients with ST-elevation myocardial infarction: a comparison versus placebo and abciximab. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **9**(3), 147-53 (2011).
68. Michelson AD. Advances in antiplatelet therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**, 62-9 (2011).
69. Klamová H, Poláková KM, Mužík J, Ráčil Z, Záčková D, Steinerová K, et al. Evaluation of 5-year imatinib treatment of 458 patients with CP-CML in routine clinical practice and prognostic impact of different BCR-ABL cutoff levels. *Cancer Med* **2**(2), 216-25 (2013).

70. Bhamidipati PK, Kantarjian H, Cortes J, Cornelison AM, Jabbour E. Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* **4**(2), 103-17 (2013).
71. Breccia M, Alimena G. Second-generation tyrosine kinase inhibitors as first-line treatment strategy in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia patients. *Curr Cancer Drug Targets* **12**(4), 391-401 (2012).
72. Mealing S, Barcena L, Hawkins N, Clark J, Eaton V, Hirji I, et al. The relative efficacy of imatinib, dasatinib and nilotinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a systematic review and network meta-analysis. *Exp Hematol Oncol* **2**(1), 5 (2013).
73. Breccia M, Salaroli A, Molica M, Alimena G. Systematic review of dasatinib in chronic myeloid leukemia. *Onco Targets Ther* **6**, 257-65 (2013).
74. Piccaluga PP, Paolini S, Bertuzzi C, De Leo A, Rosti G. First-line treatment of chronic myeloid leukemia with nilotinib: critical evaluation. *J Blood Med* **3**, 151-6 (2012).
75. Awad MM, Katayama R, McTigue M, Liu W, Deng YL, Brooun A, et al. Acquired Resistance to Crizotinib from a Mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med* **368**(25), 2395-401 (2013).
76. Roberts PJ. Clinical use of crizotinib for the treatment of non-small cell lung cancer. *Biologics* **7**, 91-101 (2013).
77. Pennell NA. Treating Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Lung Cancer in the Weeks After the US Food and Drug Administration Approval of Crizotinib. *J Oncol Pract* **8**(3 Suppl), 34s-7s (2012).
78. Rajendra R, Jones RL, Pollack SM. Targeted treatment for advanced soft tissue sarcoma: profile of pazopanib. *Onco Targets Ther* **6**, 217-22 (2013).
79. Heudel P, Cassier P, Derbel O, Dufresne A, Meeus P, Thiesse P, et al. Pazopanib for the treatment of soft-tissue sarcoma. *Clin Pharmacol* **4**, 65-70 (2012).
80. Harrison C, Vannucchi AM. Ruxolitinib: a potent and selective Janus kinase 1 and 2 inhibitor in patients with myelofibrosis. An update for clinicians. *Ther Adv Hematol* **3**(6), 341-54 (2012).
81. Gu L, Su L, Chen Q, Xie J, Wu G, Yan Y, et al. Ruxolitinib for myelofibrosis. *Exp Ther Med* **5**(3), 927-931 (2013).
82. Cohen GS, Black M. Multidisciplinary management of hepatocellular carcinoma: a model for therapy. *J Multidiscip Healthc* **6**, 189-95 (2013).
83. Wang Z, Wu XL, Zeng WZ, Xu GS, Xu H, Weng M, et al. Meta-analysis of the Efficacy of Sorafenib for Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**(2), 691-4 (2013).
84. Amsberg GK, Schafhausen P. Bosutinib in the management of chronic myelogenous leukemia. *Biologics* **7**, 115-22 (2013).
85. Mena F. Latest approved therapies for metastatic melanoma: what comes next? *J Skin Cancer* **2013**, 735282 (2013).
86. Sapkota B, Hill CE, Pollack BP. Vemurafenib enhances MHC induction in BRAF(V600E) homozygous melanoma cells. *Oncoimmunology* **2**(1), e22890 (2013).
87. Vergnenègre A, Borget I, Chouaid C. Update on the treatment of non-small-cell lung cancer: focus on the cost-effectiveness of new agents. *Clinicoecon Outcomes Res* **5**, 137-41 (2013).
88. Chen X, Liu Y, Røe OD, Qian Y, Guo R, Zhu L, et al. Gefitinib or Erlotinib as Maintenance Therapy in Patients with Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review. *PLoS ONE* **8**(3), e59314 (2013).
89. Sonoda H, Mekata E, Shimizu T, Endo Y, Tani T. Safety and efficacy of panitumumab therapy after metastatic colorectal cancer progression with cetuximab: Experience at a single Japanese institution. *Oncol Lett* **5**(4), 1331-34 (2013).
90. Muhammad S, Jiang Z, Liu Z, Kaur K, Wang X. The role of EGFR monoclonal antibodies (MoABs) cetuximab/panitumab, and BRAF inhibitors in BRAF mutated colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* **4**(1), 72-81 (2013).
91. Niedzwiecki D, Bertagnolli MM, Warren RS, Compton CC, Kemeny NE, Benson AB 3rd, et al. Documenting the natural history of patients with resected stage II adenocarcinoma of the colon after random assignment to adjuvant treatment with edrecolomab or observation: results from CALGB 9581. *J Clin Oncol* **29**(23), 3146-52 (2011).
92. Zhao L, He LR, Xi M, Cai MY, Shen JX, Li QQ, et al. Nimotuzumab promotes radiosensitivity of EGFR-overexpression esophageal squamous cell carcinoma cells by upregulating IGFBP-3. *J Transl Med* **10**, 249 (2012).
93. Perez R, Crombet T, de Leon J, Moreno E. A view on EGFR-targeted therapies from the oncogene-addiction perspective. *Front Pharmacol* **4**, 53 (2013).

94. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol* **2012**, 428062 (2012).
95. Gunturu KS, Woo Y, Beaubier N, Remotti HE, Saif MW. Gastric cancer and trastuzumab: first biologic therapy in gastric cancer. *Ther Adv Med Oncol* **5**(2), 143-51 (2013).
96. Qin T, Yuan Z, Peng R, Bai B, Shi Y, Teng X, et al. HER2-positive breast cancer patients receiving trastuzumab treatment obtain prognosis comparable with that of HER2-negative breast cancer patients. *Onco Targets Ther* **6**, 341-7 (2013).
97. Stebbing J, Payne R, Reise J, Frampton AE, Avery M, et al. The Efficacy of Lapatinib in Metastatic Breast Cancer with HER2 Non-Amplified Primary Tumors and EGFR Positive Circulating Tumor Cells: A Proof-Of-Concept Study. *PLoS ONE* **8**(5), e62543 (2013).
98. Diessner J, Bruttel V, Becker K, Pawlik M, Stein R, Häusler S, et al. Targeting breast cancer stem cells with HER2-specific antibodies and natural killer cells. *Am J Cancer Res* **3**(2), 211-20 (2013).
99. Tinoco G, Warsch S, Glück S, Avancha K, Montero AJ. Treating breast cancer in the 21st century: emerging biological therapies. *J Cancer* **4**(2), 117-32 (2013).
100. Chen F-T, Yang C-M, Yang C-H. The Protective Effects of the Proteasome Inhibitor Bortezomib (Velcade) on Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Retina. *PLoS ONE* **8**(5), e64262 (2013).
101. Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Zitvogel L, Kroemer G, et al. Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* **2**(1), e22789 (2013).
102. Machado J, Moncada JC, Pineda R. [Profile of use of anti tumor necrosis factor in Colombian patients]. *Biomedica* **31**(2), 250-7 (2011).
103. Machado Alba JE, Moncada Escobar JC. [Evolution of consumption of high-cost drugs in Colombia]. *Rev Panam Salud Publica* **31**(4), 283-9 (2012).

Class I phosphoinositide 3-kinases in immunity: Effect of inhibitors in immune and autoimmune reactions

José María Rojo^{1,2}, Pilar Portolés^{3*}

¹Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid, Spain. ²Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. ³Unidad de Inmunología Celular, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III; Ctra. Majadahonda-Pozuelo km. 2, Majadahonda, 28220-Madrid, Spain.

*e-mail: pportols@isciii.es

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 1 (2014), pág. 91-125

ABSTRACT

Class I phosphoinositide-3 kinases (PI3Ks) generate PtdIns(3,4,5)P₃ to activate cell signaling cascades essential to cell growth, differentiation and survival, and are essential to the function of innate and adaptive immunity. The generation of a vast array of newly developed PI3K inhibitors to treat cancer poses the question of their use in the modulation of pathological immune reactions like autoimmune diseases, or the effect of these drugs in the anti-tumor immune reactions. Here, the role of PI3K in adaptive immune reactions and data concerning the use of inhibitors to control immune responses are reviewed.

Keywords: PI3K; PI3K inhibitors; Immune responses.

RESUMEN

Las fosfatidilinositol 3-cinasas de clase I en la inmunidad: Efecto de inhibidores en respuestas inmunes y autoinmunes

Las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K) de clase I dan lugar a fosfolípidos trifosforilados (PtdIns(3,4,5)P₃) que son clave en las señales de crecimiento, diferenciación y la supervivencia de las células y son esenciales para el funcionamiento de la inmunidad innata y adaptativa. Los nuevos inhibidores de PI3K generados para el tratamiento de tumores pueden ser útiles en inmunoterapia, especialmente en enfermedades autoinmunes, y ha de investigarse su impacto en la inmunidad anti tumoral. Se revisa el papel de las PI3K de clase I en las respuestas inmunes adaptativas, y los datos conocidos relativos al efecto de inhibidores en respuestas inmunes adaptativas.

Palabras clave: PI3K; Inhibidores de PI3K; Respuesta inmunitaria.

1. INTRODUCTION

This review focuses on the use and possible applications of phosphoinositide-3 kinase (PI3K)-specific inhibitors to modulate immune responses, with an emphasis on T lymphocyte-dependent adaptive responses.

Phosphoinositide-3 kinases (PI3Ks) are enzymes that phosphorylate the OH- group at the D3-position of the inositol ring of inositol-containing lipids (PtdIns) located in inner leaflet of membrane bilayers. In this way, they generate intracellular phosphorylated inositol lipids (PtdInsP) that serve to anchor cytosolic enzymes facilitating interaction with their substrates and/or their activation, initiating different cell signaling cascades (Figure 1) (reviewed in (1-5)). This is mediated by membrane translocation of different effector proteins that possess domains, like the Pleckstrin homology domain (PH), the Phox homology domain (PX) or the FYVE domain, specific for distinct phosphorylated inositides (Figure 1). These effector proteins are involved in the regulation of many essential cell functions including cell survival, growth, and proliferation. Not surprisingly, different signals essential to the function of cells of the immune system activate PI3K activity. For instance, in lymphocytes PI3K activity is enhanced upon antigen activation, engagement of costimulatory molecules, binding of cytokines or quimiokines to their receptors, or integrin-mediated adhesion. Thus, PI3Ks are prime targets for immunomodulatory strategies.

Differences in protein structure, regulation of activity, and lipid substrate preference define three different classes of PI3K, namely class I, class II and class III PI3K (Figure 1, 2). In mammals there are eight different PI3K isoforms. Of them, four are class I PI3Ks (p110 α , p110 β , p110 γ and p110 δ), three belong to class II PI3K (PI3K-C2 α , PI3K-C2 β , PI3K-C2 γ) and the vacuolar sorting protein 34 (VPS34) is the only class III PI3K. Class I are PI3Kinases specific for PtdIns(4,5)P₂ and play a major role in signal transduction induced by receptors that activate protein tyrosine kinases (class IA PI3K) or by receptors coupled to small GTPases (class IB PI3K). Class II and III PI3Kinases phosphorylate PtdIns. Class II have a role in signal transduction, but many aspects of their biology are not well known; Class III have a role in vesicle trafficking.

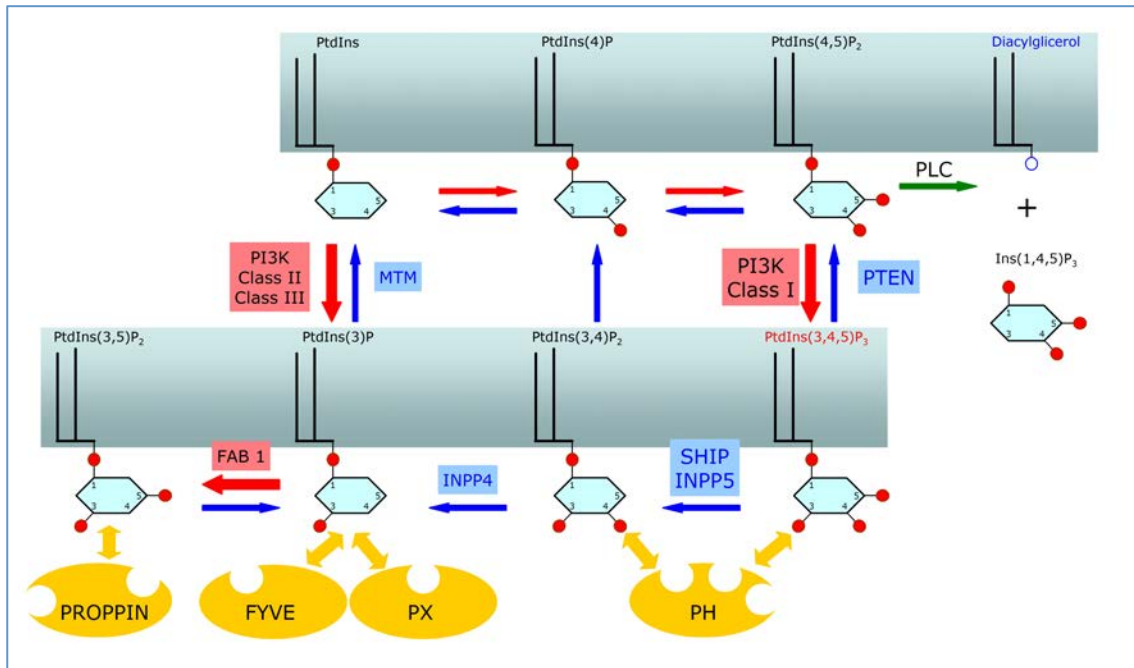


Figure 1.- A summary of phosphoinositide phosphorylation/dephosphorylation steps in the cell membrane is shown. These phosphoinositides recruit proteins endowed with phosphorylated inositol lipid-binding protein domains that serve to cell signaling. Phosphorylation and dephosphorylation steps are indicated by red and blue arrows, respectively; steps where PI3K kinases intervene are shadowed in red; Inositol phosphate phosphatases are shadowed in blue; effector protein domains binding to different phosphorylated inositol lipids are in yellow. Abbreviations: FAB1: PtdIns(3)P 5-kinase; FYVE: Fab 1 YOTB Vac 1 and EEA1 domain; INPP4: Inositol polyphosphate 4-phosphatase; INPP5: Inositol polyphosphate 5-phosphatase; MTM: Myotubularin; PH: Pleckstrin homology domain; PI3K: Phosphoinositide-3 kinase; PLC: Phospholipase C; PROPPIN: β -propeller that bind phosphoinositide species domain; PtdInsP: Phosphorylated inositol lipids; PTEN: Phosphatase and Tensin Homologue; PX: Phox homology domain; SHIP: SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase.

2. CLASS I, II, III PI3K, AND PI3K-LIKE KINASES

Of interest to the development and effect of PI3K-specific inhibitors, PI3Ks have sequence similarity with a number of other related serine and threonine protein kinases collectively known as “PI3K-like protein kinases”, or PIKK. These PIKK play a role in the cellular response to stresses like DNA damage or replication block, mRNA splicing errors and nutrient deprivation. Importantly, PIKK include one of the main downstream effectors of class I PI3K activation in lymphocytes, namely the mechanistic target of the immunosuppressant Rapamycin (mTOR), but also the ataxia-telangiectasia mutated protein (ATM), the ataxia- and Rad3-related protein (ATR), and the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) (6,7). DNA-PK is required for the activation of the non-homologous end-joining pathway to repair double-strand DNA breaks induced by ionizing radiation. Furthermore, DNA-PK activates protein kinase B (Akt), another primer target of class I PI3K, and is particularly important to lymphocyte biology as its mutation is a cause for severe combined immunodeficiency (8). Structural homology among PI3K isoforms, or between PI3K and PIKK (6) has the consequence that frequently,

PI3Kinase inhibitors are specific for more than one isoform, or that PI3K inhibitors primarily aimed at inhibiting class I PI3Kinases significantly inhibit PIKK like mTOR or DNA-PK (9).

3. CLASS IA AND CLASS IB PI3KINASES: STRUCTURE AND ACTIVATION, CONTROL BY PHOSPHATASES

Class I PI3Kinases are heterodimers formed by one catalytic of 110 kDa and one regulatory subunit of variable size (Figure 2). According to the nature of the regulatory subunit they bind to, and the mode they are classically activated, class I PI3Kinases are further divided into class IA (Figure 2A and B) and class IB (Figure 2C). The former (catalytic subunits p110 α , p110 β , and p110 δ) bind to any of five regulatory subunit isoforms (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , and p55 γ) all possessing two SH2 domains separated by an alpha-helix inter-SH2 domain (iSH2) that interacts with catalytic subunits; Class IA catalytic subunits are characteristically activated through tyrosine kinase-dependent mechanisms. Phosphorylation of the Tyr residues of Tyr-x-x-Met is the initial step inducing binding of SH2 domains that are conserved in all class IA regulatory isoforms. The p85, but not the p50 or p55 regulatory isoforms have additional SH3, proline rich and BCR-homology GTPase activation domain (BH-domain) that might mediate binding to small G proteins of the Rho/Rac/cdc42 family.

On the other hand, class IB catalytic subunit p110 γ binds to regulatory subunits p101 and p87 (Figure 2C). Subunit p101 is the main subunit in most tissues; p101 and p85 differentially help in G protein-coupled receptor (GPCR)-induced PI3K activation, such that interaction of p101 with the G $\beta\gamma$ chains is strong and efficient in recruitment of p110 γ to membranes whereas p87 interacts weakly with G $\beta\gamma$ chains and recruitment of p110 γ needs additional interactions with Ras-GTP (10).

Class I catalytic subunits are structured in domains with distinct function (Figure 2A-C); these include a N-terminal adaptor binding domain (ABD) that constitutively bind regulatory subunits, a Ras-binding domain, the C2 and helical domains that regulate the association with regulatory subunits, and one C-terminal kinase domain. Interactions of class IA p110 α and the iSH2 and amino-terminal domain of regulatory p85 α subunits have been determined in detail (11,12). In the steady state, the p110-p85 heterodimers have low enzymatic activity; however, binding of SH2 domains to phosphorylated peptides disrupt the inhibitory interactions including the one between the p85 nSH2 domain and the helical domain of p110 α (12,13). Given the inhibitory nature of the regulatory subunits, it should be noted that there are clear differences among catalytic isoforms concerning their interaction strength with regulatory subunits (14). In addition, at

least in certain cases Ras-family proteins might play an active role in recruiting to membranes catalytic class IA (15) and class IB subunits (10).

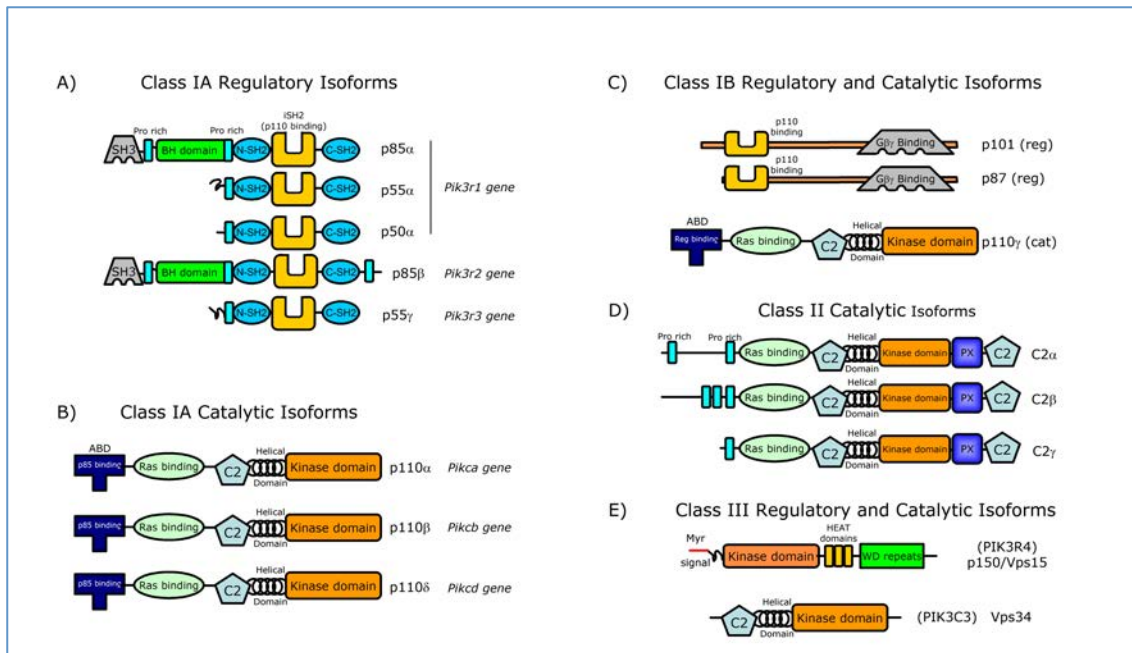


Figure 2. Structure of the catalytic and regulatory subunits of mammalian PI3K classes and subclasses. Size in kDa is indicated in the name of class I PI3K, all proteins are represented at the same approximate scale. PI3K catalytic subunits contain a common core of one C2 domain, one helical domain, and one catalytic kinase domain. Class IA and IB catalytic subunits (α , β , δ , and γ) are the product of single genes; they have two domains N-terminal to the core, namely an adaptor binding domain (ABD) that binds to regulatory subunit, and one Ras-binding domain where binding of Ras family proteins activate the kinase activity. **A; B)** Class IA catalytic subunits (α , β , and δ) associate with any class IA regulatory subunits encoded by three different genes. *Pik3r1* can produce three different proteins (p85 α , p55 α and p50 α) sharing one Pro-rich region, plus one N-terminal and one C-terminal SH2 domains separated by an inter-SH2 domain (iSH2) that binds the ABD domain in the catalytic α , β , and δ subunits. The p85 α subunit has one N-terminal SH3, one Proline-rich, and one BH (BCR homology) domain; the p85 β subunit coded by the *Pik3r2* gene is similar to p85 α subunit but has an additional c-terminal Pro-rich region. The p55 γ subunit encoded by *Pik3r3* and p55 α have similar structures. **C)** Class IB catalytic subunits (p110 γ) bind to p87 or p101 class IB regulatory subunits endowed with domains able of associating to the $G\alpha$ and $G\beta$ subunits of heterotrimeric Guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) that initiate signals delivered by G-protein coupled receptors (GPCR). **D)** Class II PI3Ks do not have regulatory subunits, and seem to be constitutively bound to intracellular membranes. They have a role in different cell functions including cell migration, exocytosis, and apoptosis, but the precise mechanisms involved are not clear. The Class III catalytic subunit Vps34 (Vacuolar protein sorting 34, also termed PIK3C3) is part of a heterodimer with the myristoylated protein Vps15, that is located in the cell membranes and form larger multi-protein complexes depending on the particular vesicle traffic process considered (autophagy, phagocytosis, endosome traffic). Vps15 has a kinase domain probably inactive, HEAT domains containing anti-parallel α -helices involved in protein-protein interactions; and WD repeats that serve as scaffolds for interaction with other proteins.

Regulatory subunits inhibit the catalytic activity of the p110 subunits but also prevent their degradation. Activation of PI3K begins upon recruitment of the enzyme complex through regulatory subunits to the inner side of membrane bilayers where their substrate is located, and where interaction with the negatively charged surface through positively charged amino acid residues further stabilizes its location. This is followed by interaction with and activation of the

catalytic subunits by small GTPases of the Ras family, with a clear selectivity of the different catalytic subunits for activation by distinct Ras family members (16).

The signaling outcome of PI3K is also controlled by the activity of PtdIns(3,4,5)P₃ phosphatases that are essential to correct lymphocyte function (17-19) (Figure 1, 3). The PtdIns(3,4,5)P₃ 3-phosphatase Phosphatase and Tensin Homologue (PTEN) controls PtdIns(3,4,5)P₃ levels by generating PtdIns(4,5)P₂; PTEN is particularly important to control basal levels of PtdIns(3,4,5)P₃. The PtdIns(3,4,5)P₃ 5-phosphatases SHP-1 and SHP-2 (SH2 domain-containing Inositol Phosphatase-1 and -2) dephosphorylate PtdIns(3,4,5)P₃ levels yielding PtdIns(3,4)P₂. Interestingly, SHP-1, 2 bind to surface molecules of lymphocytes that are essential to negatively control immune responses including CTLA-4, PD-1, and BTLA (17).

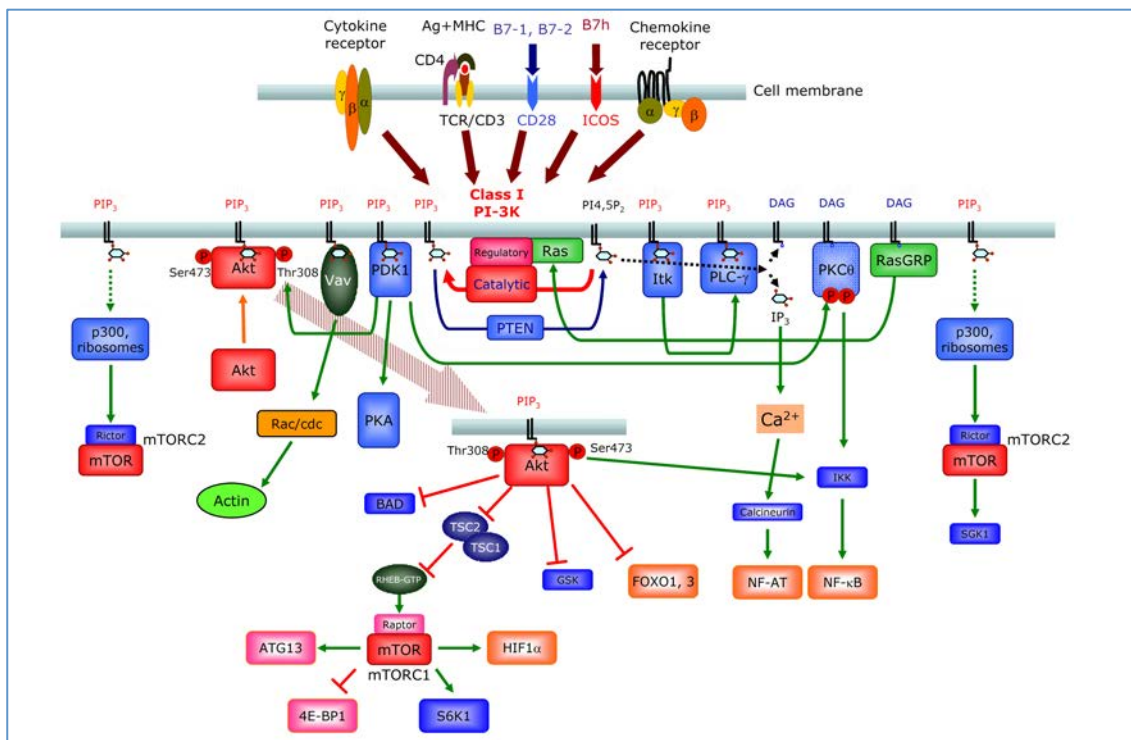


Figure 3. A diagram of class I PI3K-mediated signaling in T (CD4⁺) lymphocytes. Class IA PI3K are recruited to the cell membrane and activated upon binding of ligands for cytokine and antigen receptors or CD28 family costimulator molecules like CD28 or ICOS. Class IB subunits are characteristically recruited and activated upon binding of chemokines to their G protein-coupled receptors. Enhanced levels of PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) favor the recruitment and activation of proteins containing PH domains including Ser and Thr kinases like PDK1 and Akt, Tec family protein Tyr kinases (Itk), phospholipases like PLC-γ, or GEF like Vav. Akt is activated by phosphorylation of Thr308 and Ser473 by PIP₃-dependent activated PDK1 and mTORC2, respectively. Akt has an array of different targets involved in many cell functions. One major effector of Akt is the mTORC1 complex containing the Ser/Thr kinase mTOR and Raptor. This is achieved by inactivation/phosphorylation of the tuberous sclerosis 1 and 2 complex (TSC1-TSC2) that blocks RHEB (Ras homologue enriched in brain), a small GTPase and mTOR activator. Through phosphorylation of other substrates like ATG13 (autophagy-related protein 13), S6K, 4E-BP1, or HIF-1α, mTORC1 controls important cell processes including autophagy or cell metabolism. Akt also regulate apoptosis through Bcl-2-associated death promoter (BAD) protein phosphorylation, the transcription of genes controlled by FOXO transcription factors, or Glycogen synthase kinase (GSK) 3-mediated effects on cell cycle and metabolism. mTORC2 and PDK1 also phosphorylate the

PKC θ activated by diacylglycerol (DAG), or Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) 1. PLC- γ is recruited to PI3P₃ containing membranes to generate IP₃ and DAG; IP₃ induces enhanced cytoplasmic Ca²⁺ levels and activation of NF-AT transcription factors. DAG activates not only NF- κ B through PKC θ , but RasGRP that activates the Ras proteins, thus enhancing PI3K and other Ras-dependent signals including the MAPK pathway.

One, then, faces a situation where class I PI3K, an enzyme essential to many cell functions is regulated at many levels, particularly: i) by the expression levels of each regulatory and catalytic isoform of PI3K, of the different PtdIns(3,4,5)P₃ phosphatases, and the different activator and effector proteins of PI3K; and ii) by the nature of the signals that activate PI3K activity in different cells and conditions. The final outcome of the cell response will depend on the integration of all these factors. Furthermore, differences among different cells and tissues concerning these factors allow for distinct pharmacological effects of PI3Kinase inhibitors and a selective intervention in different pathological situations.

As a general rule, the expression of class IA p110 α and p110 β is broad, whereas class IA p110 δ and class IB p110 γ are mainly expressed by cells of hematopoietic origin. Among class I PI3K, lymphocytes express readily detectable amounts of class IA p110 δ and class IB p110 γ catalytic subunits that are characteristic of leukocytes. Interestingly, in T lymphocytes class IA p110 α is expressed at levels similar to p110 δ , but expression of p110 β is low (14). The particular function for the different class IA regulatory subunit isoforms is not clearly established. Among class IA regulatory subunits, T lymphocytes express low amounts of p85 β and p55 γ chains ((14), and unpublished data), so p85 α and its splicing variants p55 α and p50 α are the main regulatory subunits (14). There are clear variations in the abundance of these isoforms in resting and activated T cells. Thus, resting CD4⁺ T lymphocytes have similar levels of p85 α and p50 α , but the levels of p50 α is strongly reduced upon activation; low levels of p50 α are also common in T cell lines (14). In turn, p50 α subunits bind better than p85 α to phosphorylated Tyr-x-x-Met motifs (14) and are preferentially recruited to immunological synapses together with ICOS (20). However, the functional meaning of these differences is far from clear.

4. CLASS IA AND CLASS IB PI3KINASES: MAIN MOLECULAR MEDIATORS

In lymphocytes class I PI3Kinases are activated through different receptors ((21,22), Figure 3). The activity of Src and Syk tyrosine kinases is triggered by ligand binding to antigen receptor complexes (BCR in B lymphocytes, TCR/CD3 in T lymphocytes). This activation leads to phosphorylation of adaptor proteins like LAT and TRIM in T cells or BCAP in B cells. Class IA PI3Kinases are typically recruited to membranes and activated upon phosphorylation of Y-x-x-M motifs in these proteins (i.e. in TRIM) or by means of adaptor proteins like Grb-2 or Cbl. Co-

stimulatory molecules like CD28 and ICOS in T cells and CD19 in B cells also possess Y-x-x-M motifs that can be phosphorylated to directly recruit PI3Kinases. Cytokine receptors indirectly induce recruitment and activation of class IA PI3K by means of different adaptor proteins. For instance, in IL-2 signaling IL-2 receptors (IL-2R) recruits class IA PI3K upon phosphorylation of Tyr₃₃₈ of the β chain that allows binding of the protein adaptors SHP2 and Gab2, as well as the Shc and Grb adaptors that facilitate the formation of Grb-Gab2 or Grb-2-SHPS. On the other hand, the PI3Kinase class IB p110 γ catalytic subunits are activated by the $\beta\gamma$ subunits of G-coupled protein chemokine receptors having seven trans-membrane peptide sequences. However, this separation among PI3K subclasses is not absolute, as on one hand class IA p110 β signaling through G-coupled receptors has been observed ((23), reviewed in (5)), and in T lymphocytes tyrosine kinases like Lck and ZAP-70 can associate p110 γ class IB subunits upon antigen receptor activation (24). This is further complicated in lymphocytes, where p110 γ mediate PI3K-dependent chemokine signals in T lymphocytes, but p110 δ perform the same functions in B lymphocytes by mechanisms not well understood (25,26), but that might involve tyrosine kinases or Ras members activated by quimiokines (5).

Upon PI3K activation PtdIns(3,4,5)P₃ is generated that can be dephosphorylated by the action of SHIP phosphatases to yield PtdIns(3,4)P₂. Both PtdIns(3,4,5)P₃ and PtdIns(3,4)P₂ recruit proteins with plectstrin homology (PH) domains to cell membranes, usually the plasma membrane. Recruited proteins can then be activated to initiate signaling cascades. These proteins can vary, as PH domains have certain selectivity concerning their interaction strength with these phosphoinositides. In lymphocytes they include serine threonine kinases like the phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) or Akt (PKB), Tec family tyrosine kinases like Itk (in T lymphocytes) or Btk (in B lymphocytes), adaptor proteins like GAB2, and small GTPase positive (Guanine nucleotide exchange factors (GEF) like Vav) or negative (GTPase activating factors (GAP)) regulatory proteins.

4.a. Targets of PI3K: PDK1, Akt and mTOR.

In many cell types and in lymphocytes too, the serine threonine kinase Akt plays a key mediator role in PI3K activated signals (3,18,27-29). Membrane-recruited Akt is activated upon phosphorylation in residue Thr₃₀₈ by PDK1 that is also recruited through PH domains and activated by tyrosine kinases of the src-family kinases like Lck (30). Akt P-Thr₃₀₈ then phosphorylates substrates like Caspase 9, BAD or IKK α to prevent apoptosis, GSK3 β to favour proliferation, and the mTORC1 complex (the Rapamycin sensitive complex of mechanistic target of Rapamycin (mTOR) containing Raptor) or its negative regulator TSC1/2 to favour protein synthesis and cell growth. Akt is fully activated by phosphorylation of Ser₄₂₃ by kinases generically termed PDK2. The main PDK2 is mTORC2, the Rapamycin-insensitive complex of mTOR containing Rictor. mTORC2 activation is

also PI3K dependent and involves its association with ribosomes, yet the exact mechanisms are not known (29). At least another well established PDK2 activity for Ser₄₂₃ Akt phosphorylation is mediated by the DNA-PK (7,31,32). Doubly phosphorylated Akt P-Thr₃₀₈Ser₄₂₃ efficiently phosphorylates forkhead transcription factor/forkhead box (FOXO) transcription factors FOXO1/2 to inhibit their function, with important consequences in lymphocytes (27,33).

4.b. Targets of PI3K: GEFs and Tec.

The control by PI3Ks of the actin cytoskeleton dynamics mediated by GEF stimulation of the Rac and Rho GTPases is well established (21). One typical GEF is Vav, that is activated by Src and Syk family tyrosine kinases but also depends on its PH and Dbl-homology domains for activity (34).

With one exception, Tec family tyrosine kinases including BTK and Itk expressed in B and T lymphocytes possess an N terminus PH domain followed by TH, SH3, SH2, and kinase domains (35,36). The PH domain is determinant to recruitment of these Tec kinases to membranes, where they can further interact with specific Tyr-phosphorylated substrates and activated by Src family and autophosphorylation. Tec family tyrosine kinases have phospholipase C enzymes like PLC γ as important substrates within signalosomes generated upon receptor activation. PLC γ then splits PtdIns(4,5)P₂ into Diacylglycerol and Ins(1,4,5)P₃ that in turn are necessary to activate the Ser/Thr kinases PKC θ and hence the Ras/MAPK and the IKK/NF κ B pathways, or the Ins(1,4,5)P₃-Ca²⁺-dependent activation of NFAT family of transcription factors (Figure 3).

4.c. Targets of PI3K: PDK1-dependent, Akt-independent.

PDK1 can associate to and activate additional substrates that are not dependent on Akt including the Ser/Thr kinases PKC θ (37) and the cAMP-dependent kinase PKA (38), with important functional consequences to lymphocyte activation.

Of note, although the different pathways initiated by PI3K activation have specific targets, they can be also connected to reinforce others. For instance, PKC θ -mediated activation of IKK/NF κ B is targeted in a PI3-dependent manner through PDK1-, mTORC2- and Tec-dependent mechanisms.

5. CLASS I-PI3KINASES: RELEVANCE TO CANCER

The clues for an association of PI3K and tumor development and growth come from different sources. On one hand, some oncogenic retroviruses possess genes derived from those encoding p110 α and AKT. On the other, the PtdIns(3,4,5)P₃ phosphatase PTEN is a tumor suppressor gene frequently mutated in human tumors with the consequence of a constitutive activation of the PI3K

pathway. Another link is the observation of genomic amplification of genes coding for p110 α (PIK3CA) or its target Akt (AKT) in several types of cancer (reviewed in (39-41)).

Although all Class I PI3K subunits have oncogenic potential *in vitro*; the seminal work by Samuels et al. (42), later confirmed by abundant data, shows that the p110 α catalytic isoform but not other isoforms is mutated with high frequency in colorectal and other different human cancer cells (39-41)). These gain-of-function mutations of the *PIK3CA* gene are located in the ABD and C2 domains of p110 α , but particularly in the helical and catalytic domains. The enzymatic activity is increased by different mechanisms including altered interaction between the ABD and kinase domains of p110 α , between the C2 domain and the p85 iSH2 domain, between the p85 nSH2 domain and the helical and kinase domains, or between the kinase domain and the cell membrane, increasing accessibility to phospholipid substrates. Mutations in the *PIK3R1* gene coding the p85 α regulatory subunit have been also described in different cancer cells. They are clustered in the inter-SH2 domain of p85 that contacts the C2 domain of catalytic subunits or in the nSH2 domain that interacts with the helical domain of catalytic subunits; both might interfere inhibitory interactions between subunits. Interestingly, these cancer-derived gain-of-function mutations in p85 α function through the p110 α , but not other PI3K catalytic subunits (43). Last, the p110 α isoform of PI3K in endothelium plays a role in tumor growth through its contribution to tumor angiogenesis (44).

Gain-of-function E1021K mutations of p110 δ have been recently reported in a residue of the catalytic domain similar to those found in p110 α , but these mutations are surprisingly associated with IgM hyperglobulinemia and immunodeficiency rather than cancer (45). However, p110 δ can favour tumor growth by several documented mechanisms. Firstly, in some human ovarian and colorectal tumors *PIK3CD* transcripts can be alternatively spliced to generate a 37 kDa protein (p37 δ) that maintains the ABD and RBD domains of p110 δ . This protein can enhance the proliferation and invasive properties of transformed cells (46). In second place, p110 δ activation can indirectly inhibit the activity of the PTEN phosphatase by a mechanism involving RhoA (47). Enhanced p110 δ expression in solid tumors in fact suppresses PTEN, contributing to cell growth and -likely- to cancer progression of malignancies of hematopoietic and non-hematopoietic origin (48,49). The complexity of PI3Kinase activity regulation is further highlighted by the ability of p85 α to bind to and to activate PTEN in transformed cell lines (reviewed in (50)).

6. PI3K INHIBITORS OF BROAD AND RESTRICTED SPECIFICITY. IMPORTANCE TO CANCER.

Hence, PI3K inhibitors, or inhibitors of PI3K targets like Akt or mTOR, have been actively looked for as anti-cancer drugs (see (51), for a recent review). In these assays p110 α -, p110 β -, p110 δ -, p110 γ -, dual p110 γ/δ -specific or pan-PI3K inhibitors, as well as dual PI3K-mTOR inhibitors are under investigation in experimental tests and clinical trials.

7. ROLE OF CLASS IA AND CLASS IB PI3KINASES IN THE CONTROL OF IMMUNE RESPONSES. GENETIC MODELS AND PI3K INHIBITORS

The relevance of class IA PI3K-mediated signals to all steps of innate and adaptive immune responses immediately point to the potential relevance of inhibitors of PI3K or of PI3K effectors as immunomodulators and therapeutic tools in many socially relevant immune-mediated diseases (17,18,22,52-56). The role of PI3K in immunity has been analyzed *in vivo* by the generation of mice lacking specific regulatory and catalytic subunits, or expressing kinase-dead mutants of specific subunits, or by means of specific inhibitors of PI3K or its downstream signaling targets. *In vitro* the analysis has involved cell lines derived from the above models, specific inhibitors, and knock-down approaches using siRNA. We shall now review the genetic and pharmacological data that supports this immunomodulatory potential in the adaptive immune response mediated by B and T lymphocytes.

8. CLASS IA AND IB PI3K IN IMMUNITY: LESSONS FROM GENETIC STUDIES IN B LYMPHOCYTES.

B lymphocytes are an essential arm of the adaptive immune responses as the cells responsible of antibody responses against pathogens; antibodies are produced in great quantities by the B-cell derived plasma cells. The quality of the antibodies both in terms of their affinity for the antigen and the class of the constant regions is essential to efficient removal of parasites, and is largely determined by the cytokines in the milieu, particularly those secreted by antigen-specific T helper cells. Mature B lymphocytes exist in two major subsets, namely the B-1 cells found in body cavities like the peritoneum that have innate properties, and the B-2 cells that comprise non-recirculating MZ (marginal zone) B cells and the FO (follicular) B cells that recirculate through the blood and secondary lymphoid organs.

The role of regulatory subunits has been analyzed in pan-p85 α ^{-/-} (p85 α ^{-/-}, p55 α ^{-/-}, p50 α ^{-/-}) defective mice, lacking all p85 α isoforms. These mice have perinatal lethality, assays using RAG2 chimeric mice with hematopoietic cells

derived from mutant ES cells had less mature B cells and low serum immunoglobulins; *in vitro* activation of B cells was also impaired (57). Mice lacking p85 α subunits but not p55 α or p50 α had a similar phenotype; both phenotypes were very similar to the X-linked immunodeficiency due to Bruton tyrosine kinase (Btk) deficiency (58). No immunological defects have been described in mice lacking p55 α or p50 α subunits (59). Deletion of p85 β produced normal B cell responses (60). Last, the absence of p85 α and/or p85 β reduced basal, PI3K dependent lymphocyte motility of B lymphocytes (61). There is no data concerning the effect of class IB regulatory subunit loss in lymphocyte function, data in neutrophils indicate impaired cytokine-driven motility (62) (summarized in Table 1).

Table 1.- Effect of Class I PI3-K subunit mutations and defects in B and T lymphocyte phenotype and function.

Subunit	Phenotype, B lymphocyte	Phenotype, T lymphocyte	Other (References)
Class IA regulatory			
<i>Pik3r1</i>			
pan-p85 α ^{-/-} (p85 α ^{-/-} , p55 α ^{-/-} , p50 α ^{-/-})	Low B cell number; impaired activation and motility	Impaired motility	Perinatal lethality (57,61).
p85 α ^{-/-} only	Impaired motility	Normal development, reduced motility; enhanced response <i>in vitro</i> ; lower T-dependent secondary response	(60,61,71)..
p55 α ^{-/-} , p50 α ^{-/-}	Normal	Normal	(59).
<i>Pik3r2</i>			
p85 β ^{-/-}	Impaired motility	Impaired motility	(61)
p85 α ^{-/-} , p55 α ^{-/-} , p50 α ^{-/-} ; p85 β ^{-/-} ,	Impaired motility	Impaired motility, Th2, Treg differentiation; autoimmune syndrome	(61,72,73).
<i>Pik3r3</i>			
p55 γ ^{-/-}	n.d.	n.d.	
Class IB regulatory			
<i>Pik3r5</i>			
p101 ^{-/-}	n.d.	n.d.	Neutrophil migration impaired (62)
<i>Pik3r6</i>			
p87/84	n.d.	n.d.	

Class IA catalytic			
<i>Pik3ca</i>			
p110 α CD2Cre (lymphocyte specific deletion)	Normal development; normal responses <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	n.d.	(63)
<i>Pik3cb</i>			
p110 β CD2Cre (lymphocyte specific deletion)	Normal	n.d.	(63)
<i>Pik3cd</i>			
p110 δ ^{-/-}	Impaired B cell homeostasis activation and function	No alterations detected	(64,65)
p110 δ CD4Cre (T cell specific deletion)		Impaired Tfh, ICOS signaling	(74)
p110 δ ^{D910A/D910A}	Impaired B cell activation and function, enhanced IgE levels	Impaired T cell activation and function, inflammatory bowel disease	(66-68).
p110 α CD2Cre lymphocyte specific deletion; p110 δ ^{D910A/D910A}	p110 δ or p110 δ signal tonic BCR signaling, B cell development and survival; p110 δ essential in agonist BCR signaling	n.d.	(63)
Class IB catalytic			
<i>Pik3cg</i>			
p110 γ ^{-/-}	B cells normal	Altered thymocyte development, impaired or normal activation, impaired migration	(24,69,75-78).
p110 γ ^{-/-} p110 δ ^{-/-} p110 γ ^{-/-} p110 δ ^{D910A/D910A}	Similar to p110 δ ^{-/-} or p110 δ ^{D910A/D910A}	Blocked pre-TCR signal, severe T cell high thymocyte apoptosis, severe T cell lymphopenia, Th2-skewed responses, high IgE levels	(70,79)

The study of the effect of losing p110 α or p110 β on lymphocyte development and function has been impaired by the embryonic or early lethality after birth of null (p110 α ^{-/-} and p110 β ^{-/-}) or knock-in kinase-dead (p110 α ^{D933A} and p110 β ^{K805R}) mutant mice (reviewed in (5)). Lymphocyte-specific conditional deletion of p110 α or p110 β in floxed p110 α /CD2-Cre or floxed p110 β /CD2-Cre mice showed no defect in B lymphocytes (63). In contrast, p110 δ ^{-/-} (64,65) and p110 δ ^{D910A} mice are viable and have defects in B cell antigen receptor (BCR)-induced activation (63,66).

In p110 δ ^{-/-} mice Ig in serum and the number of mature B cells were low, B1 and marginal zone B cells were defective, yet T cell numbers and responses were normal. Responses to T-cell independent antigens are low and T-cell dependent responses are severely impaired. B cell antigen receptor (BCR)- and CD40-early signals like calcium flux, activation of phospholipase C, Akt, and Btk, as well as proliferation are impaired (64,65). These data suggested a specific, unique role for p110 δ in B cell signaling and function.

The results obtained in mice in which wild type p110 δ is substituted by the catalytically inactive form p110 δ ^{D910A} were similar concerning B lymphocytes, but in this case T cell antigen receptor (TCR) signaling was also impaired; mice developed inflammatory bowel disease (66). Furthermore, p110 δ ^{D910A} mice had high serum amounts of antigen-specific IgE antibody despite reduced levels of other isotypes like IgM or IgG1; the same was observed in antigen-specific responses or using p110 δ -specific inhibitors (67). This is due to the specific role of p110 δ -mediated signals in maintaining high levels of the transcription repressor B cell lymphoma 6 (BCL6) acting on the IgE promoter in germinal center (GC) B lymphocytes (68), where B cells actively proliferate and are induced to produce antibody responses of even higher affinity under the guidance of specialized follicular helper T (Tfh) cells.

Later work by the group of B. Alarcón has shown that, indeed p110 δ stably binds to BCR and TCR ITAM containing chains through the Ras family protein Rras2 (TC21) actively participating in tonic and ligand activation signaling (15). Paradoxically, recent data show that patients with a spontaneous dominant gain-of-function mutation of p110 δ (p110 δ ^{E1021K}) suffer primary immunodeficiency with low IgG2 serum levels, deficient responses to vaccines, lymphopenia and high sensitivity to activation-induced cell death, despite elevated levels of PtdIns(3,4,5)P₃ and phosphorylated Akt (45).

Intriguingly, mice with double lymphocyte deletion of p110 α and p110 δ ^{D910A} indicates that p110 α could substitute for p110 δ in agonist-independent tonic BCR signaling necessary for B cell development from B cell progenitors and B cell survival; however p110 α could not substitute for p110 δ in agonist BCR activation (63).

Both p110 δ and p110 γ catalytic subunits are highly expressed in lymphocytes but not in other cell types that are not of hematopoietic origin. However, mice p110 γ ^{-/-} had no B cell defects but show altered differentiation in the thymus, with decreased CD4⁺ numbers, impaired migration and survival of mature thymocyte as well as mature T cell activation, (69). Mice deficient in both p110 γ and p110 δ (p110 γ ^{-/-} p110 δ ^{D910A}) have a B cell phenotype similar to that of their p110 γ -sufficient counterparts (70).

9. CLASS IA AND IB IN IMMUNITY: LESSONS FROM GENETIC STUDIES: T LYMPHOCYTES.

In mice with hematopoietic cells lacking all p85 α ^{-/-}, p55 α ^{-/-}, p50 α ^{-/-} subunits the number and in vitro activation of T cells was largely normal (57); mice lacking p85 α subunits but not p55 α or p50 α had a similar phenotype (58). No immunological defects have been described in mice lacking p55 α or p50 α subunits (59). Deletion of p85 β induced enhanced T-lymphocyte responses (60), however loss of p85 β impaired secondary T cell dependent antigen responses by CD28-mediated mechanisms (71). Conditional deletion of the class IA regulatory subunits p85 α , p55 α , p50 α , and p85 β in the T cell lineage (p55 γ is undetectable in T lymphocytes, J.M.R., unpublished data) resulted in normal T cell development and Th1 differentiation. PI3K signals, antibody responses to T-cell dependent antigens, Th2, and Treg differentiation were impaired and the animals could develop an autoimmune Sjögren's-like syndrome (72,73). As in B lymphocytes, loss of p85 α and p85 β reduced basal lymphocyte motility (61).

In p110 δ ^{-/-} mice the number and quality of T lymphocytes appear normal; and decreased responses to T-cell dependent antibody responses might be largely due to defects in the B cell compartment (64,65). Mice where wild type p110 δ is substituted by the catalytically inactive form p110 δ ^{D910A} were similar concerning B lymphocytes, but in this case T cell antigen receptor (TCR) signaling was also impaired; mice developed inflammatory bowel disease (66). Later work has shown that the p110 δ subunit was key to ICOS-mediated costimulation of effector function in follicular helper T cells (74)

Mice with deleted p110 γ subunits show altered differentiation in the thymus, with decreased CD4⁺ numbers, impaired migration and survival of mature thymocyte as well as mature T cell activation (69,75) possibly because p110 γ binds to and is activated by TCR ligation (24). However, other groups have found no defects in CD4⁺ T cell signaling and proliferation but did show strong defects in migration and trafficking in TCR transgenic mice (76,77); Martin et al. (78) observed no effect in the migration and trafficking of naive CD8⁺ T cells, or in their proliferation and activation migration. In contrast, migration of p110 γ -deficient CD8⁺ effector T cells induced by inflammatory stimuli was impaired (78).

Double knockout mice (p110 γ ^{-/-}p110 δ ^{-/-}) deficient for both p110 γ and p110 δ have severe defects in T cell differentiation as thymocytes are blocked in the DN3-DN4 selection checkpoint of pre-TCR signaling, with low thymocyte numbers and high apoptosis (79). Mice lacking p110 γ and expressing the inactive mutant p110 δ ^{D910A} (p110 γ ^{-/-} p110 δ ^{D910A}) have similarly strong defects in thymus differentiation, but the few remaining T cells infiltrate the mucosas, show Th2-skewed responses and anomalously high IgE levels (70).

What is perhaps more surprising of the results using genetic models, is the certain selectivity of PI3K subunits in terms of the lymphocyte population(s) and processes affected. This applies not only to PI3K subunits, but also to other protein targets of PI3K, giving clues as to the possibility of selective immune intervention using PI3K inhibitors or its downstream effector molecules in autoimmune diseases or other immune-based illnesses. The importance of PI3K in different types of cancer has boosted a very active search for small pharmacological inhibitors directed at one or several PI3K subunits and/or PI3K downstream targets like Akt or mTOR. These inhibitors have the potential of being used to modulate immune responses. The use of inhibitors, though, has to take into account the harming potential to the host, particularly in long-term treatment of chronic diseases. These adverse effects can be due to off-target effects of a particular drug, but also to on-target effects of inhibitors of widely distributed enzymes fulfilling essential functions, as are PI3Ks. However, pre-clinical models and clinical trials in cancer indicate that treatments with PI3K inhibitors can be well tolerated, even when using inhibitors of the widely expressed p110 α and p110 β , or even pan-class I PI3K inhibitors (51). Another aspect to be taken into account is that, like any other immunosuppressive drug, PI3K inhibitors are likely to have undesired side effects including increased susceptibility to infection (4).

10. CLASS IA AND IB PI3K IN IMMUNITY: LESSONS FROM SPECIFIC INHIBITORS IN B LYMPHOCYTE FUNCTION

As mentioned before, genetic defects in p110 δ affect particularly B-1 and B-2 marginal zone B lymphocytes; the similarity of these defects and those of mice lacking Akt or the PI3K-recruiting costimulatory molecule CD19 might indicate a role of a CD19/p110 δ PI3K/ Akt/ Foxo1 downstream signal in B-1 and MZ B-2 differentiation (reviewed in (22)). Using the p110 δ inhibitor IC87114, Bilancio et al. (80) found strong inhibition of anti-BCR-induced proliferation of B lymphocytes, Ca²⁺ flux, or phosphorylation of downstream targets like Akt, or the Akt targets forkhead transcription factor/forkhead box O3a (FOXO3a), and p70 S6 kinase (p70 S6K), and partial inhibition of extracellular signal-regulated kinase (Erk), that mimicked p110 δ defects. In contrast, the p110 γ/α inhibitor AS-604850 had no detectable effect on these parameters (80). Despite the fact that p110 δ , rather than p110 α catalytic subunits of PI3K, had detectable effects in B lymphocytes and B cell responses, and p110 δ binds to the BCR (15), So et al. recently analyzed highly specific p110 α inhibitors to assess a possible role for the p110 α -subunit in B cell function (81). They observed a minor but clear effect of p110 α -specific inhibitors A66 and MLN1117 on early Akt activation and Ca²⁺ flux, or B cell proliferation induced by BCR stimuli *in vitro*, but not by cytokines IL-4 or BAFF. This inhibition

could add to the stronger inhibition induced by the p110 δ inhibitor IC87114 on the same phenomena, that was not complete (81).

In vivo, unlike administration of MLN1117, daily administration of a p110 δ (IC87114) or a pan-PI3K inhibitor (GDC-0941) to immunized mice strongly reduced marginal zone B cell numbers in the spleen; GDC-0941 also reduced the number of germinal centers (81). Despite these effects, antigen specific IgM, IgG1 titers in the serum of immunized mice was not significantly lower or were elevated, and in fact IgE titers were significantly enhanced by the p110 δ inhibitor IC87114 or the pan-PI3K inhibitor GDC-0941, but not by p110 α inhibitors (81). Our own results with a dual p110 α / δ inhibitor (ETP-46321) administered after initiation of antigen responses showed inhibition of antigen-specific serum IgG3, but not of IgM, IgG1, or IgG2b antibody (82).

As mentioned above, p110 α inhibition did not affect B cell Akt and FOXO signaling or survival induced by cytokines like IL-4 or BAFF, yet p110 δ inhibitors, pan-PI3K inhibitors, and to a lesser extent, also p110 β inhibitors like TGX-221 produced significant results (80,81).

It has been observed that p110 δ signals play an essential role in inhibiting excess IgE production by maintaining the levels of the BCL6 that negatively controls the IgG1 to IgE switch. These effects can be mimicked *in vitro* or *in vivo* using p110 δ -specific inhibitors like IC87114, or broad-spectrum PI3K inhibitors like PIK-90 and PI-103, or GDC-0941, but not by p110 α inhibitors like MLN1117 (67,68,81).

11. CLASS IA AND IB PI3K IN IMMUNITY: LESSONS FROM SPECIFIC INHIBITORS IN T LYMPHOCYTES

Early data by Shi et al. using the PI3K inhibitor Wortmannin indicated that the role of PI3K in (CD4⁺) T lymphocyte activation was dependent on the stimulus used. Production of IL-2 by the surrogate antigen activation anti-CD3 antibodies plus CD28 costimulus seemed largely PI3K-independent, whereas activation and Th2 differentiation of the same cells by peptide antigen and antigen-presenting cells was clearly inhibited by Wortmannin (83). Although the specificity of Wortmannin for PI3K has been questioned (see, i.e. (9,84)), later studies by Okkenhaugh et al. in mice expressing the inactive p110 δ ^{D910A} mutant also found that antigen activation, rather that activation by anti-CD3 plus anti-CD28, was impaired in the mutant mice(66,85). Furthermore, differentiation of p110 δ ^{D910A} CD4⁺ T lymphocyte into the Th1 (IFN- γ -producing) and Th2 (IL-4-producing) T helper cell subsets was also impaired. The p110 δ inhibitor IC87114 inhibited Th1 differentiation, but Th17 differentiation was even more sensitive to inhibition (86). In contrast, we found that in cultures of naive CD4⁺ T lymphocytes activated with

anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies under neutral conditions IFN- γ -production was highly sensitive to inhibition of PI3K, at doses ten-fold lower than those needed to inhibit proliferation, IL-2, or IL-10. The p110 δ inhibitor IC87114 or the dual p110 α/δ inhibitor ETP-46321, were particularly effective, whereas inhibition by A66, a p110 α inhibitor was not as marked (82). A differentially high inhibition of IC87114 on IFN- γ production versus proliferation was also observed by Okkenhaugh's group (87). Furthermore, these authors observed that isolated memory/effector cells were more sensitive to the p110 δ inhibitor IC87114 than naive cells. These results paved the way to show inhibition by IC87114 of anti-CD3 antibody-mediated T cell activation or recall responses to vaccines in human cells (87). In our experience, though, inhibition of cytokine production by CD4⁺ blast cells activation with anti-CD3 or anti-CD3 plus anti-ICOS antibodies was similar to that observed in activation of naive CD4⁺ T cells (82).

In contrast, So et al. observed no significant effect of p110 α inhibition by A66 or MLN1117 on antigen- or mitogen- induced CD4⁺ T cell proliferation, or secretion of IL-2 and IFN- γ , although there was some inhibition of Akt phosphorylation, and p110 α inhibitors enhanced the clear but not complete inhibition induced by IC87114 (81). A contribution of p110 α to TCR and costimulation signaling is also suggested in the response of the CD4⁺ T cell line D10 to anti-CD3 and anti-ICOS (14). In this system, we observed partial inhibition of early Akt phosphorylation by the p110 α inhibitor PIK-75 or by p110 α silencing (14). Intriguingly, whereas silencing p110 δ or inhibition with IC87114 clearly inhibited both Akt and Erk activation, p110 α silencing markedly enhanced Erk phosphorylation, suggesting that p110 α might exert a negative control over some p110 δ signals (14).

Follicular helper T cells (Tfh) are particularly and functionally very important to the development germinal centers and of efficient antibody responses, promoting antibody affinity maturation and differentiation of memory cells. They characteristically express the surface molecules CXCR5, PD-1 and ICOS, as well as the transcription suppressor Bcl6 (88). Although Tfh cells able of producing different antibody-promoting cytokines (IL-4, IL-10, IL-17, or IFN- γ) can be found *in vivo*, IL-21 is the most characteristic cytokine of Tfh cells. Signaling by the PI3K-binding costimulators CD28 and ICOS are needed for efficient development of Tfh and germinal centers. Work with mice expressing ICOS mutants unable to bind PI3K, or in mice expressing the inactive p110 δ ^{D910A} kinase, or inhibition with the p110 δ inhibitor IC87114, taken together indicate that PI3K p110 δ is needed for Tfh differentiation and antibody production in a ICOS dependent way; early TCR signaling or IL-21 production in differentiated Tfh is also potentiated by ICOS signaling and inhibited by IC87114 (74,89). So et al. have

recently described that IC87114 but not the p110 α inhibitor MLN1117 inhibits germinal center formation (81). Our own data indicates that ICOS enhances early TCR activating signals and IL-17A production in Tfh in a p110 δ -dependent fashion, yet IL-21 secretion is largely independent of ICOS and inhibition of both p110 δ and p110 α is needed to block IL-21 production (82).

ICOS and its PI3K associated activity intervene in yet another aspect of germinal center development, namely in the recruitment of activated T helper cells into the follicle. ICOS is directly involved in this movement, but this effect is independent on costimulation, yet is dictated by the interaction of ICOS in T cells and its ligand ICOS-L expressed in bystander B lymphocytes in a PI3K-dependent fashion (90). ICOS ligation, as ligation of other CD28 family members (CD28, CTLA-4/CD152) can induce antigen-independent, tyrosine kinase and PI3K-dependent changes in actin cytoskeleton and cell elongation and spreading (14,91-95). However, Xu et al. found that recruitment of T cells into follicles was dependent on the p110 δ PI3K subunit (90), whereas using a Th2 T helper cell line we have found that cell elongation was dependent on p110 α , rather than p110 δ (14).

Another functionally important T cells are the CD4⁺ regulatory T (Treg) cells that express the transcription factor Foxp3 and negatively control adaptive immune responses, as they expand during normal antigen responses to help in their termination. They can differentiate from immature precursors in the thymus (tTreg cells), but also from mature CD4⁺ lymphocytes in the periphery (pTreg cells). A role for p110 δ in Treg function is suggested by data from mice transgenic for the kinase-dead p110 δ ^{D910A} mutation. These mice have reduced numbers of Treg cells with reduced suppressor capability *in vitro* and *in vivo* (96). Paradoxically, this deficit in Treg function can help in producing efficient anti-parasite responses in certain cases. Unlike wild type mice, animals lacking p110 δ can efficiently clear *Leishmania* infection because of strong defects in Treg number and homing (97). It is also paradoxical that the proportion of Treg differentiated *in vitro* (iTreg) can be fostered by inhibitors of PI3K or mTOR, yet this is mainly due to p110 α , as judged by the effect of inhibitors of p110 α , p110 β or p110 δ (98,99). In contrast, IL-2 dependent PI3K signals are necessary for Treg expansion, and high PI3K signals due to PTEN deficiency do not affect Treg function *in vitro* or *in vivo* (100).

The last T cell subset to be considered is the cytotoxic, MHC class I-restricted CD8⁺ population of T lymphocytes that has a prime role in the response against intracellular pathogens like viruses as well as in anti-tumor responses. There are conflicting data on the role of PI3K in TCR-mediated activation in CD8⁺ T cells. According to Ni et al., proliferation and induction of cytotoxic activity induced by TCR/CD3 and CD28 ligands was not affected by the PI3K inhibitor Wortmannin

(101). In contrast, Phu et al. observed clear inhibition of anti-CD3-induced proliferation and cytotoxic function in CD8⁺ T lymphocytes cultured in the presence of Wortmannin or LY294002 (102). More recently, Soond et al. found a clear inhibition by LY294002 or the p110 δ inhibitor IC87114 on antigen-induced proliferation or IL-2 production in CD8⁺ T lymphocytes; inhibition was complete when IFN- γ was analyzed. D. Cantrell's group has recently analyzed the role of PI3K in IL-2-induced expansion of previously activated CD8⁺ T lymphocytes. Interestingly, although IL-2 activated PI3K-dependent activation of Akt phosphorylation in these cells, inhibitors of PI3K like IC87114 blocked IL-2-dependent Akt phosphorylation but not CD8⁺ proliferation, that was dependent on PDK1 (103). Still, blocking p110 δ or Akt enhanced the expression of molecules involved in lymph node homing and homing itself, showing their immunomodulatory potential in these cells.

12. PI3K IN PATHOLOGICAL IMMUNE RESPONSES

Given the relevant role of PI3K in immune responses, particularly the p110 γ and p110 δ of high expression in leukocytes, there has been an obvious interest in analyzing the possible use of PI3K inhibitors in both organ-specific and systemic autoimmune diseases of social impact including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, or its animal experimental models. Although we shall focus on the role of adaptive immune response in these diseases, it is important to remember that PI3K have an essential role in the function of cells of the innate arm of immunity like macrophages and dendritic cells, polymorphonuclear leukocytes, mast cells, or natural killer (NK) lymphocytes (52). So, the ultimate effect of PI3K inhibitors in immune responses *in vivo* will largely depend on their joint effects on the development, expansion, mobility, and activation of effector function in innate and adaptive immunity elements.

12.a. Rheumatoid arthritis.

Rheumatoid arthritis (RA) affects a significant fraction of the population. It is an immune-mediated, chronic inflammatory disease of the joints that are infiltrated by leukocytes. This eventually leads to the formation of pannus, the damage of cartilage and bone erosion. From many data, including those from animal experimental models it is assumed that in the development of arthritis participate immune response cellular elements from both the innate (macrophages, neutrophils, mast cells) and adaptive (T and B lymphocytes) immunity.

Data from mice lacking p110 γ catalytic subunits indicate that these mice are resistant to the development of clinical symptoms of arthritis. Oral administration of the p110 γ inhibitor AS-605240 ameliorated the symptoms in two experimental

models of arthritis, the collagen-induced arthritis (CIA) dependent on T-cell dependent cytokines and B cell help, and in the neutrophil-dependent arthritis induced by anti-collagen II monoclonal antibodies (104). Similarly, in a neutrophil-dependent model of arthritis induced by serum from arthritis K/BxN mice, clinical symptoms were dependent on p110 δ and p110 γ , and IC87114 inhibited progression of the disease (105). In the rat model of adjuvant-induced arthritis (AIA), therapeutic oral administration of the wide spectrum phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor ZSTK474 ameliorated clinical signs of the disease and inhibited the production of the effector cytokines IFN- γ and IL-17 by T cells *in vitro*, or the proliferation and prostaglandin E2 (PGE2) production by fibroblast-like synoviocytes cells (FLS) (106). PI3K γ deficiency in a model of arthritis induced by transgenic expression of human TNF reduced metalloproteinase secretion by fibroblasts, cartilage damage and clinical score, yet did not affect recruitment of inflammatory leukocytes (107). The p110 γ -specific inhibitor AS252424 also inhibited invasiveness and matrix metalloproteinase secretion by human synovial fibroblasts from patients with RA. Intriguingly, in FLS from rheumatoid arthritis patients PI3K p110 δ was specifically induced in FLS from rheumatoid arthritis patients by pro-inflammatory cytokines like tumor necrosis factor (TNF), TNF signaling as well as platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent synoviocyte growth were inhibited by PI3K p110 δ inhibitors CAL-101 or INK007, but not by p110 α inhibitors like A66 (108).

12.b. Systemic Lupus Erythematosus.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune, chronic, inflammatory, multisystemic disease with a particularly high incidence in females. SLE is due to tissue and cell damage induced by autoantibodies generated by early expansion of long-lived autoreactive T helper memory cells that trigger polyclonal hyperactivity of B lymphocyte responses and hypergammaglobulinemia; expansion of autoreactive B cells leads to enhanced levels of antibodies against a variety of self antigens, particularly nuclear antigens and DNA. Accumulation of immune complexes in the kidney leads to inflammatory reaction ultimately leading to glomerulonephritis.

There are different animal models that spontaneously develop a SLE-syndrome, including the widely used MRL-*lpr* and MRL-*gld* mice with a mutation in the expression of the apoptosis-signaling Fas molecule or its ligand, respectively. *Roquin*^{san/san} mice have a mutation that produce dysregulated expression of the PI3K binding costimulatory molecule ICOS, show progressively enhanced numbers of Tfh, of germinal centers and autoantibodies, and nephritis (109,110) with a prime role for Tfh IFN- γ (111,112).

The effect of PI3K inhibitors on lupus has been analyzed in different models. In the MRL-*lpr* model of lupus, Barber et al. described a preventive and therapeutic effect of the p110 γ inhibitor AS605240 on autoantibodies, proteinuria, and reduced number of pathogenic CD4⁺ memory T lymphocytes due to enhanced cell death (113), a finding that was also observed in the p65^{PI3K} transgene mouse model of lupus when p110 γ was deleted (114). Resistance to activation-induced cell death in T lymphocytes is an important factor to SLE development, as shown in the enhanced PI3K activity in lymphocytes from SLE patients due to higher p110 δ (115); this enhanced resistance to activation induced cell death was abolished, upon inhibition of p110 δ with IC87114, particularly in the memory T cells that are enhanced in these patients (115). Yet another model of SLE is the Lyn deficient mice. Lyn^{-/-} mice have enhanced PI3K signaling, and simple attenuation of p110 δ signals in haploinsufficient Lyn^{-/-}110 δ ^{+/-} D910A mice ameliorates the disease, with lower autoantibody levels and nephritis by a mechanism that involved lower T cell activation rather than attenuation of B lymphocyte responses (116).

12.c. Multiple sclerosis (MS) and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE).

Multiple sclerosis is an inflammatory disease characterized by demyelination of the central nervous system (CNS). Experimental autoimmune encephalomyelitis is the model of choice for MS in mice, and is induced by immunization with proteins or protein fragments in susceptible strains of mice. Inflammation and axonal damage is si accompanied by infiltration of T lymphocytes and other leukocytes, and in certain cases by the formation of structures resembling lymphoid follicles; these contain T and B cells, plus professional antigen presenting cells.

T lymphocytes specific for myelin antigens that secrete IFN- γ , IL-17, or IL-9 are able of inducing EAE, hence it is reasonable to assume that therapeutic approaches that suppress the secretion of these cytokines can be useful in controlling the evolution of the disease. Mice expressing the kinase-dead mutant 110 δ ^{D910A} had a milder form of EAE induced by the rat Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) peptide₃₅₋₅₅, and lower number of lesions and T cell inflammatory infiltration, plus enhanced apoptosis (86). As discussed in a previous section, in this study the p110 δ inhibitor IC87114 inhibited the differentiation of IFN- γ producing Th1 cells and IL-17 producing Th17 cells, yet Th17 more effectively than Th1, indicating a potential for PI3K as a target in MS therapy. We have recently used an oral therapeutic treatment with the dual p110 α and DNA-PK inhibitor PIK-75 to significantly inhibit MOG-induced EAE symptoms (117). This was accompanied by in vitro observations showing that PIK-75 induced cell death in resting or activated T and B lymphocytes, or CD4⁺ T lymphocyte proliferation and cytokine (IL-2, IFN- γ , IL-17A, or IL-21) secretion in the nanomolar range.

Intriguingly, we have later found that other, more specific p110 α inhibitors like A66 do not have a similar effect on lymphocyte apoptosis (82), and it is probably the sum of p110 α and DNA-PK inhibition that produced the effect on cell viability (unpublished data).

12.d. Experimental colitis and psoriasis.

Oral treatment with PIK-75 was previously shown to inhibit another experimental inflammation, namely colitis induced by oral administration of dextran-sulfate, a model for human inflammatory bowel disease (118). *In vitro*, PIK-75 inhibited AKT phosphorylation, IKK activation, and NF- κ B transcription in lymphoid or monocyte cells or cell lines, secretion of the inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α by activated monocytes, or reduced the expression of adhesion molecules by TNF- α in endothelial cells (118). As mentioned before, functional CD4⁺ Treg cells are essential to prevent the development of experimental colitis, and mice expressing the kinase-dead mutant 110 δ ^{D910A} cannot prevent the development of the disease, suggesting the importance of the p110 δ isoform to the effector function of Treg cells (96)

Last, PI3K have a role in the psoriasis-like dermatitis induced by imiquimod (IMQ). In this model, the T lymphocytes of the $\gamma\delta$ TCR subset produce IL-17 essential to the clinical symptoms of the disease. After establishing that mice transgenic for the 110 δ ^{D910A} inactive mutant or p110 γ ^{-/-} knockouts are not susceptible to dermatitis and have diminished production of IL-17A and F (119), Roller et al. went on to show that the p110 δ inhibitor IC87114 or p110 γ inhibitors like AS605240 inhibited IL-17 and IFN- γ production by activated peripheral blood lymphocytes from psoriatic and healthy donors, or IFN- γ production by activated blood TCR $\gamma\delta$ T lymphocytes (119).

13. PI3K AND CANCER: IMPACT OF PI3K INHIBITORS ON CANCER CELLS AND ANTI-CANCER IMMUNITY: A DOUBLE-EDGED SWORD?

Tumor cells can express tumor antigens of various kinds that can elicit efficient immunity as an extrinsic mechanism to control and suppress cancer growth (immunosurveillance), establishing a dynamic equilibrium or even complete rejection of tumor cells. However, tumor specific responses can also promote tumor growth through the selection of rare mutant tumor cells able of oppose or evade the immune mechanisms developed by the host (immunoediting) (120,121). CD8 T lymphocytes and IFN- γ seem to be major cellular and molecular mediators of anti-cancer responses. One mechanism used by tumor cells to evade immune-mediated rejection is by expressing inhibitory B7 family molecules like B7-H1 and B7-H4 that bind the inhibitory CD28 family ligand programmed death-1 (PD-1) expressed on the surface of activated T cells, B cells and macrophages

(122). A B7 family receptor expressed by melanoma and other tumor cells is the ICOS ligand that can directly induce the activation and expansion of ICOS-expressing Treg cells within the tumor, suppressing anti-tumor rejection, or alternatively induce the recruitment to the tumor of ICOS-ligand-expressing dendritic cells that favor Treg function (123-127). Another inhibitory CD28-like molecule expressed by Treg cells is CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CD152). It is not surprising, then, that antibodies blocking CTLA-4 or the PD-1/PD1 ligands are currently used in anti-cancer therapy, supposedly to unleash suppressed anti-tumor immunity (128).

Since p110 α are frequently mutated in cancer, PI3K inhibitors directed at this isoform, alone or together with other kinases, are currently being tested in antitumour therapies (51). Although in our experience inhibition of p110 α , alone or together with DNA-PK can have a significant impact in immune responses and lymphocyte viability (82,117), other data suggest minimal damage of p110 α inhibition to immune reactions and likely to anti-tumor immunity (81). Thus, it might seem that only broad PI3K inhibitors, or Akt and mTOR inhibitors, might have a significant impact on anti-tumor responses, whereas immunosuppressive p110 δ - or p110 γ -specific inhibitors would be of no interest to cancer therapy, except in hematologic malignancies where the levels of these subunits is naturally high. Interestingly, p110 δ participates in antigen, cytokine and chemokine receptor signaling in B lymphocytes, and indeed one p110 δ inhibitor CAL-101 has been used in the treatment of some relapsed or refractory B-cell malignancies including chronic lymphocytic leukemia (CLL), non-Hodgkin's lymphoma (NHL), acute myeloid leukemia (AML), and multiple myeloma (MM), with clear clinical responses in CLL and some NHL (49,129). Surprisingly, this is due in part to inhibition of signals delivered by the tumor environment that sustain leukemia and lymphoma cells.

It is yet more surprising the data showing that p110 δ inhibitors can be useful in the treatment of solid tumors that do not harbor p110 δ mutations. Tzenaki et al. have reported that breast and prostate cancer cells can possess high levels of p110 δ that not only enhance cellular PI3K activity but also indirectly inhibit the tumor suppressor phosphatase PTEN via RhoA and ROCK activation, further enhancing PtdIns(3,4,5)P₃ levels (48,49). Thus, p110 δ -selective PI3K inhibitors might be useful in certain solid tumor therapy by directly inhibiting p110 δ signaling as well as by indirectly activate PTEN to diminish general PtdIns(3,4,5)P₃ levels. At the same time, the use of p110 δ inhibitors in these cases does have a true danger for suppressing anti-tumor immune responses, but also to responses against pathogens.

14. CONCLUDING REMARKS

Research in recent years has accumulated evidence showing the essential role of class I PI3K and their molecular targets in cancer and immune responses, and the potential benefits of PI3K inhibitors to treat neoplastic and autoimmune diseases. The therapeutic potential of PI3K inhibitors in cancer has prompted the discovery of many different molecules by the pharmaceutical industry whose utility in immune-based diseases needs to be tested.

Many of the newly developed PI3K inhibitors also inhibit other molecules like mTOR or DNA-PK fulfilling important functions in different types of cells, so that chronic treatment with these drugs might produce deleterious effects on the host in the long term (129). According to currently available data, the PI3K inhibitors under clinical or preclinical study are reasonably well tolerated, and these include broad specificity PI3K inhibitors or dual PI3K and mTOR inhibitors (51). The challenge now is to determine which particular type(s) of inhibitor(s) are of real benefit to each particular disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

P.P. is a Tenured Scientist of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) at the Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Supported by Grants PI10/00650 and PI13/02153 (to JMR) and PI10/00648 and PI13/01809 (to PP) from “Acción Estratégica en Salud, Plan Estatal I+D+i”, Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Spain. The authors apologize to the many authors whose relevant data have been summarized or omitted due to space constraints.

DISCLOSURES

The authors declare no financial conflict of interest.

REFERENCES

1. Vanhaesebroeck, B.; Leever, S. J.; Ahmadi, K.; Timms, J.; Katso, R.; Driscoll, P. C.; Woscholski, R.; & al. Synthesis and function of 3-phosphorylated Inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**, 535-602 (2001).
2. Deane, J. A.; & Fruman, D. A. Phosphoinositide 3-Kinase: Diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* **22**, 563-598 (2004).
3. Hawkins, P. T.; Anderson, K. E.; Davidson, K.; & Stephens, L. R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **34**, 647-662 (2006).
4. Fruman, D. A.; & Bismuth, G. Fine tuning the immune response with PI3K. *Immunol Rev* **228**, 253-272 (2009).
5. Vanhaesebroeck, B.; Guillermet-Guibert, J.; Graupera, M.; & Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 329-341 (2010).
6. Lempiainen, H.; & Halazonetis, T. D. Emerging common themes in regulation of PI3Ks and PI3Ks. *EMBO J* **28**, 3067-3073 (2009).

7. Lees-Miller, S. P. PIKK-ing a new partner: A new role for PKB in the DNA damage response. *Cancer Cell* **13**, 379-380 (2008).
8. van der Burg, M.; Ijspeert, H.; Verkaik, N. S.; Turul, T.; Wiegant, W. W.; Morotomi-Yano, K.; Mari, P.-O.; & al. A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B⁺ SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest* **119**, 91-98 (2009).
9. Knight, Z. A.; Gonzalez, B.; Feldman, M. E.; Zunder, E. R.; Goldenberg, D. D.; Williams, O.; Loewith, R.; & al. A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in Insulin signaling. *Cell* **125**, 733-747 (2007).
10. Kurig, B.; Shymanets, A.; Bohnacker, T.; Prajwal; Brock, C.; Ahmadian, M. R.; Schaefer, M.; & al. Ras is an indispensable coregulator of the class I_B phosphoinositide 3-kinase p87/p110 γ . *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 20312-20317 (2009).
11. Huang, C.-H.; Mandelker, D.; Schmidt-Kittler, O.; Samuels, Y.; Velculescu, V. E.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; & al. The structure of a human p110 α /p85 α complex elucidates the effects of oncogenic PI3K α mutations. *Science* **318**, 1744-1748 (2007).
12. Backer, J. M. The regulation of Class IA PI 3-Kinases by inter-subunit interactions. In Rommel, C.; Vanhaesebroeck, B.; & Vogt, P. K., Editors. In *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease*; Springer Berlin Heidelberg, 2010; p. 87-114.
13. Fruman, D. A. Regulatory Subunits of Class IA PI3K. In Rommel, C.; Vanhaesebroeck, B.; & Vogt, P. K., Editors. In *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease*; Springer Berlin Heidelberg, 2010; p. 225-244.
14. Acosta, Y.; Zafra, M.; Ojeda, G.; Bernardone, I.; Dianzani, U.; Portolés, P.; & Rojo, J. Biased binding of class IA phosphatidyl inositol 3-kinase subunits to inducible costimulator (CD278). *Cell Mol Life Sci* **68**, 3065-3079 (2011).
15. Delgado, P.; Cubelos, B.; Calleja, E.; Martinez-Martin, N.; Cipres, A.; Merida, I.; Bellas, C.; & al. Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol* **10**, 880-888 (2009).
16. Rodriguez-Viciana, P.; Sabatier, C.; & McCormick, F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* **24**, 4943-4954 (2004).
17. Parry, R. V.; Riley, J. L.; & Ward, S. G. Signalling to suit function: tailoring phosphoinositide 3-kinase during T-cell activation. *Trends Immunol* **28**, 161-168 (2007).
18. Huang, Y. H.; & Sauer, K. Lipid signaling in T-cell development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002428 (2010).
19. Ward, S. G.; & Blunt, M. D. Pharmacological targeting of phosphoinositide lipid kinases and phosphatases in the immune system: Success, disappointment and new opportunities. *Front Immunol* **3**, 226 (2012).
20. Fos, C.; Salles, A.; Lang, V.; Carrette, F.; Audebert, S.; Pastor, S.; Ghiotto, M.; & al. ICOS ligation recruits the p50 α PI3K regulatory subunit to the Immunological Synapse. *J Immunol* **181**, 1969-1977 (2008).
21. Ward, S. G.; & Cantrell, D. A. Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* **13**, 332-338 (2001).
22. So, L.; & Fruman, D. A. PI3K signalling in B- and T-lymphocytes: new developments and therapeutic advances. *Biochem J* **442**, 465-481 (2012).
23. Guillermet-Guibert, J.; Bjorklof, K.; Salpekar, A.; Gonella, C.; Ramadani, F.; Bilancio, A.; Meek, S.; & al. The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ . *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 8292-8297 (2008).
24. Alcazar, I.; Marques, M.; Kumar, A.; Hirsch, E.; Wymann, M.; Carrera, A. C.; & Barber, D. F. Phosphoinositide 3 kinase γ participates in T cell receptor induced T cell activation. *J Exp Med* **204**, 2977-2987 (2007).
25. Nombela-Arrieta, C.; Lacalle, R. A.; Montoya, M. C.; Kunisaki, Y.; Megías, D.; Marqués, M.; Carrera, A. C.; & al. Differential requirements for DOCK2 and Phosphoinositide-3-Kinase γ during T and B lymphocyte homing. *Immunity* **21**, 429-441 (2004).
26. Reif, K.; Okkenhaug, K.; Sasaki, T.; Penninger, J. M.; Vanhaesebroeck, B.; & Cyster, J. G. Cutting edge: Differential roles for Phosphoinositide 3-Kinases, p110 γ and p110 δ , in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol* **173**, 2236-2240 (2004).
27. Manning, B. D.; & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274 (2007).

28. Yap, T. A.; Garrett, M. D.; Walton, M. I.; Raynaud, F.; de Bono, J. S.; & Workman, P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 393-412 (2008).
29. Chi, H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol* **12**, 325-338 (2012).
30. Dodson, L. F.; Boomer, J. S.; Deppong, C. M.; Shah, D. D.; Sim, J.; Bricker, T. L.; Russell, J. H.; & al. Targeted knock-in mice expressing mutations of CD28 reveal an essential pathway for costimulation. *Mol Cell Biol* **29**, 3710-3721 (2009).
31. Dragoi, A.-M.; Fu, X.; Ivanov, S.; Zhang, P.; Sheng, L.; Wu, D.; Li, G. C.; & al. DNA-PKcs, but not TLR9, is required for activation of Akt by CpG-DNA. *EMBO J* **24**, 779-789 (2005).
32. Bozulic, L.; Surucu, B.; Hynx, D.; & Hemmings, B. A. PKB α /Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell* **30**, 203-213 (2008).
33. Finlay, D.; & Cantrell, D. A. Phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin pathways control T cell migration. *Ann NY Acad Sci* **1183**, 149-157 (2010).
34. Bustelo, X. R. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**, 1461-1477 (2000).
35. Smith, C. I. E.; Islam, T. C.; Mattsson, P. T.; Mohamed, A. J.; Nore, B. F.; & Vihinen, M. The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *BioEssays* **23**, 436-446 (2001).
36. Readinger, J. A.; Mueller, K. L.; Venegas, A. M.; Horai, R.; & Schwartzberg, P. L. Tec kinases regulate T-lymphocyte development and function: new insights into the roles of Itk and Rlk/Txk. *Immunol Rev* **228**, 93-114 (2009).
37. Lee, K.-Y.; D'Acquisto, F.; Hayden, M. S.; Shim, J.-H.; & Ghosh, S. PDK1 nucleates T cell receptor-induced signaling complex for NF- κ B activation. *Science* **308**, 114-118 (2005).
38. Nirula, A.; Ho, M.; Phee, H.; Roose, J.; & Weiss, A. Phosphoinositide-dependent kinase 1 targets protein kinase A in a pathway that regulates interleukin 4. *J Exp Med* **203**, 1733-1744 (2006).
39. Zhao, L.; & Vogt, P. K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* **27**, 5486-5496 (2008).
40. Samuels, Y.; & Waldman, T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. In Rommel, C.; Vanhaesebroeck, B.; & Vogt, P. K., Editors. In *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease*; Springer Berlin Heidelberg, 2010; p. 21-41.
41. Gabelli, S.; Huang, C.-H.; Mandelker, D.; Schmidt-Kittler, O.; Vogelstein, B.; & Amzel, L. M. Structural effects of oncogenic PI3K α mutations. In Rommel, C.; Vanhaesebroeck, B.; & Vogt, P. K., Editors. In *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease*; Springer Berlin Heidelberg, 2010; p. 43-53.
42. Samuels, Y.; Wang, Z.; Bardelli, A.; Silliman, N.; Ptak, J.; Szabo, S.; Yan, H.; & al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**, 554 (2004).
43. Sun, M.; Hillmann, P.; Hofmann, B. T.; Hart, J. R.; & Vogt, P. K. Cancer-derived mutations in the regulatory subunit p85 α of phosphoinositide 3-kinase function through the catalytic subunit p110 α . *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 15547-15552 (2010).
44. Soler, A.; Serra, H.; Pearce, W.; Angulo, A.; Guillermet-Guibert, J.; Friedman, L. S.; Viñals, F.; & al. Inhibition of the p110 α isoform of PI 3-kinase stimulates nonfunctional tumor angiogenesis. *J Exp Med* **210**, 1937-1945 (2013).
45. Angulo, I.; Vadas, O.; Garçon, F.; Banham-Hall, E.; Plagnol, V.; Leahy, T. R.; Baxendale, H.; & al. Phosphoinositide 3-kinase δ gene mutation predisposes to respiratory infection and airway damage. *Science* **342**, 866-871 (2013).
46. Fransson, S.; Uv, A.; Eriksson, H.; Andersson, M. K.; Wettergren, Y.; Bergo, M.; & Ejleskar, K. p37 δ is a new isoform of PI3K p110 δ that increases cell proliferation and is overexpressed in tumors. *Oncogene* **30**, Adv. Online Pub. (2011).
47. Papakonstanti, E. A.; Ridley, A. J.; & Vanhaesebroeck, B. The p110 δ isoform of PI 3-kinase negatively controls RhoA and PTEN. *EMBO J* **26**, 3050-3061 (2007).
48. Tzenaki, N.; Andreou, M.; Stratigi, K.; Vergetaki, A.; Makrigiannakis, A.; Vanhaesebroeck, B.; & Papakonstanti, E. A. High levels of p110 δ PI3K expression in solid tumor cells suppress PTEN activity, generating cellular sensitivity to p110 δ inhibitors through PTEN activation. *FASEB J* **26**, 2498-2508 (2013).

49. Tzenaki, N.; & Papakonstanti, E. A. p110 δ PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer. *Front Oncol* **3**, 40 (2013).
50. Barber, D. F.; Alvarado-Kristensson, M.; Gonzalez-Garcia, A.; Pulido, R.; & Carrera, A. C. PTEN regulation, a novel function for the p85 subunit of Phosphoinositide 3-Kinase. *Science STKE* **2006**, pe49-50 (2006).
51. Downward, J.; & Weigelt, B. Genomic determinants of PI3K pathway inhibitor response in cancer. *Front Oncol* **2**, 109 (2012).
52. Rommel, C.; Camps, M.; & Ji, H. PI3K δ and PI3K γ : Partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol* **7**, 191-201 (2007).
53. Gamper, C. J.; & Powell, J. D. All PI3Kinase signaling is not mTOR: Dissecting mTOR-dependent and independent signaling pathways in T cells. *Front Immunol* **3** (2012).
54. Thomson, A. W.; Turnquist, H. R.; & Raimondi, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* **9**, 324-337 (2009).
55. Ghigo, A.; Damilano, F.; Braccini, L.; & Hirsch, E. PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *BioEssays* **32**, 185-196 (2010).
56. Okkenhaug, K.; Ali, K.; & Vanhaesebroeck, B. Antigen receptor signalling: A distinctive role for the p110 δ isoform of PI3K. *Trends Immunol* **28**, 80-87 (2007).
57. Fruman, D. A.; Snapper, S. B.; Yballe, C. M.; Davidson, L.; Yu, J. Y.; Alt, F. W.; & Cantley, L. C. Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85 α . *Science* **283**, 393-397 (1999).
58. Suzuki, H.; Terauchi, Y.; Fujiwara, M.; Aizawa, S.; Yazaki, Y.; Kadowaki, T.; & Koyasu, S. *Xid*-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* **283**, 390-392 (1999).
59. Chen, D.; Mauvais-Jarvis, F.; Blucher, M.; Fisher, S. J.; Jozsi, A.; Goodyear, L. J.; Ueki, K.; & al. p50 α /p55 α phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Mol Cell Biol* **24**, 320-329 (2004).
60. Deane, J. A.; Trifilo, M. J.; Yballe, C. M.; Choi, S.; Lane, T. E.; & Fruman, D. A. Enhanced T cell proliferation in mice lacking the p85 β subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol* **172**, 6615-6625 (2004).
61. Matheu, M. P.; Deane, J. A.; Parker, I.; Fruman, D. A.; & Cahalan, M. D. Class IA phosphoinositide 3-kinase modulates basal lymphocyte motility in the lymph node. *J Immunol* **179**, 2261-2269 (2007).
62. Suire, S.; Condliffe, A. M.; Ferguson, G. J.; Ellson, C. D.; Guillou, H.; Davidson, K.; Welch, H.; & al. G β s and the Ras binding domain of p110 γ are both important regulators of PI3K γ signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol* **8**, 1303-1309 (2006).
63. Ramadani, F.; Bolland, D. J.; Garcon, F.; Emery, J. L.; Vanhaesebroeck, B.; Corcoran, A. E.; & Okkenhaug, K. The PI3K isoforms p110 α and p110 δ are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development. *Sci Signal* **3**, ra60 (2010).
64. Clayton, E.; Bardi, G.; Bell, S. E.; Chantry, D.; Downes, C. P.; Gray, A.; Humphries, L. A.; & al. A crucial role for the p110 δ subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *J Exp Med* **196**, 753-763 (2002).
65. Jou, S.-T.; Carpino, N.; Takahashi, Y.; Piekorz, R.; Chao, J.-R.; Carpino, N.; Wang, D.; & al. Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110 δ in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* **22**, 8580-8591 (2002).
66. Okkenhaug, K.; Bilancio, A.; Farjot, G.; Priddle, H.; Sancho, S.; Peskett, E.; Pearce, W.; & al. Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110 δ PI 3-kinase mutant mice. *Science* **297**, 1031-1034 (2002).
67. Zhang, T.-t.; Okkenhaug, K.; Nashed, B. F.; Puri, K. D.; Knight, Z. A.; Shokat, K. M.; Vanhaesebroeck, B.; & al. Genetic or pharmaceutical blockade of p110 δ phosphoinositide 3-kinase enhances IgE production. *J Allergy Clin Immunol* **122**, 811-819.e812 (2008).
68. Zhang, T.-t.; Makondo, K. J.; & Marshall, A. J. p110 δ phosphoinositide 3-kinase represses IgE switch by potentiating BCL6 expression. *J Immunol* **188**, 3700-3708 (2012).
69. Sasaki, T.; Irie-Sasaki, J.; Jones, R. G.; Oliveira-dos-Santos, A. J.; Stanford, W. L.; Bolon, B.; Wakeham, A.; & al. Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **287**, 1040-1046 (2000).
70. Ji, H.; Rintelen, F.; Waltzinger, C.; Bertschy Meier, D.; Bilancio, A.; Pearce, W.; Hirsch, E.; & al. Inactivation of PI3K γ and PI3K δ distorts T-cell development and causes multiple organ inflammation. *Blood* **110**, 2940-2947 (2007).

71. Alcazar, I.; Cortes, I.; Zaballos, A.; Hernandez, C.; Fruman, D. A.; Barber, D. F.; & Carrera, A. C. p85 β phosphoinositide 3-kinase regulates CD28 coreceptor function. *Blood* **113**, 3198-3208 (2009).
72. Oak, J. S.; Deane, J. A.; Kharas, M. G.; Luo, J.; Lane, T. E.; Cantley, L. C.; & Fruman, D. A. Sjögren's syndrome-like disease in mice with T cells lacking class 1A phosphoinositide-3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 16882-16887 (2006).
73. Deane, J. A.; Kharas, M. G.; Oak, J. S.; Stiles, L. N.; Luo, J.; Moore, T. I.; Ji, H.; & al. T-cell function is partially maintained in the absence of class IA phosphoinositide 3-kinase signaling. *Blood* **109**, 2894-2902 (2007).
74. Rolf, J.; Bell, S. E.; Kovesdi, D.; Janas, M. L.; Soond, D. R.; Webb, L. M. C.; Santinelli, S.; & al. Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. *J Immunol* **185**, 4042-4052 (2010).
75. Rodríguez-Borlado, L.; Barber, D. F.; Hernández, C.; Rodríguez-Marcos, M. A.; Sánchez, A.; Hirsch, E.; Wymann, M.; & al. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the CD4/CD8 T cell differentiation ratio. *J Immunol* **170**, 4475-4482 (2003).
76. Garçon, F.; Patton, D. T.; Emery, J. L.; Hirsch, E.; Rottapel, R.; Sasaki, T.; & Okkenhaug, K. CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood* **111**, 1464-1471 (2008).
77. Thomas, M. S.; Mitchell, J. S.; DeNucci, C. C.; Martin, A. L.; & Shimizu, Y. The p110 γ isoform of phosphatidylinositol 3-kinase regulates migration of effector CD4 T lymphocytes into peripheral inflammatory sites. *J Leukoc Biol* **84**, 814-823 (2008).
78. Martin, A. L.; Schwartz, M. D.; Jameson, S. C.; & Shimizu, Y. Selective regulation of CD8 effector T cell migration by the p110 γ isoform of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* **180**, 2081-2088 (2008).
79. Webb, L. M. C.; Vigorito, E.; Wymann, M. P.; Hirsch, E.; & Turner, M. Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110 γ and p110 δ catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol* **175**, 2783-2787 (2005).
80. Bilancio, A.; Okkenhaug, K.; Camps, M.; Emery, J. L.; Ruckle, T.; Rommel, C.; & Vanhaesebroeck, B. Key role of the p110 δ isoform of PI3K in B-cell antigen and IL-4 receptor signaling: comparative analysis of genetic and pharmacologic interference with p110 δ function in B cells. *Blood* **107**, 642-650 (2006).
81. So, L.; Yea, S. S.; Oak, J. S.; Lu, M.; Manmadhan, A.; Ke, Q. H.; Janes, M. R.; & al. Selective inhibition of phosphoinositide 3-kinase p110 α preserves lymphocyte function. *J Biol Chem* **288**, 5718-5731 (2013).
82. Aragonese-Fenoll, L.; Montes-Casado, M.; Herranz, J.; Acosta, Y. Y.; Martínez, S.; Blanco-Aparicio, C.; Pastor, J.; & al. ETP-46321, a dual p110 α / δ class IA phosphoinositide 3-kinase inhibitor modulates CD28 and ICOS costimulation of CD4⁺ T lymphocyte responses, cell survival, and immune responses *in vivo* (*Submitted*) (2013).
83. Shi, J.; Cinek, T.; Truitt, K. E.; & Imboden, J. B. Wortmannin, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, blocks antigen-mediated, but not CD3 monoclonal antibody-induced, activation of murine CD4⁺ T cells. *J Immunol* **158**, 4688-4695 (1997).
84. Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C. J.; McLauchlan, H.; Klevernic, I.; & al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**, 297-315 (2007).
85. Okkenhaug, K.; Patton, D. T.; Bilancio, A.; Garçon, F.; Rowan, W. C.; & Vanhaesebroeck, B. The p110 δ isoform of phosphoinositide 3-kinase controls clonal expansion and differentiation of Th cells. *J Immunol* **177**, 5122-5128 (2006).
86. Haylock-Jacobs, S.; Comerford, I.; Bunting, M.; Kara, E.; Townley, S.; Klingler-Hoffmann, M.; Vanhaesebroeck, B.; & al. PI3K δ drives the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting effector T cell apoptosis and promoting Th17 differentiation. *J Autoimmun* **36**, 278-287 (2011).
87. Soond, D. R.; Bjorgo, E.; Moltu, K.; Dale, V. Q.; Patton, D. T.; Torgersen, K. M.; Galleway, F.; & al. PI3K p110 δ regulates T-cell cytokine production during primary and secondary immune responses in mice and humans. *Blood* **115**, 2203-2213 (2010).
88. Rolf, J.; Fairfax, K.; & Turner, M. Signaling pathways in T follicular helper cells. *J Immunol* **184**, 6563-6568 (2010).

89. Gigoux, M.; Shang, J.; Pak, Y.; Xu, M.; Choe, J.; Mak, T. W.; & Suh, W.-K. Inducible costimulator promotes helper T-cell differentiation through phosphoinositide 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 20371-20376 (2009).
90. Xu, H.; Li, X.; Liu, D.; Li, J.; Zhang, X.; Chen, X.; Hou, S.; & al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* **496**, 523-527 (2013).
91. Nukada, Y.; Okamoto, N.; Konakahara, S.; Tezuka, K.; Ohashi, K.; Mizuno, K.; & Tsuji, T. ALLIM/ICOS-mediated elongation of activated T cells is regulated by both the PI3-kinase/Akt and Rho family cascade. *Int Immunol* **18**, 1815-1824 (2006).
92. Salazar-Fontana, L. I.; Barr, V.; Samelson, L. E.; & Bierer, B. E. CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J Immunol* **171**, 2225-2232 (2003).
93. Franko, J. L.; & Levine, A. D. Antigen-independent adhesion and cell spreading by inducible costimulator engagement inhibits T cell migration in a PI-3K-dependent manner. *J Leukoc Biol* **85**, 526-538 (2009).
94. Acosta, Y. Y.; Ojeda, G.; Zafra, M. P.; Seren Bernardone, I.; Sánchez, A.; Dianzani, U.; Portolés, P.; & al. Dissociation of actin polymerization and lipid raft accumulation by ligation of the Inducible Costimulator (ICOS, CD278). *Inmunología* **31**, 4-12 (2012).
95. Schneider, H.; Valk, E.; da Rocha Dias, S.; Wei, B.; & Rudd, C. E. CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 12861-12866 (2005).
96. Patton, D. T.; Garden, O. A.; Pearce, W. P.; Clough, L. E.; Monk, C. R.; Leung, E.; Rowan, W. C.; & al. Cutting Edge: The phosphoinositide 3-kinase p110 δ is critical for the function of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* **177**, 6598-6602 (2006).
97. Liu, D.; Zhang, T.; Marshall, A. J.; Okkenhaug, K.; Vanhaesebroeck, B.; & Uzonza, J. E. The p110 δ isoform of Phosphatidylinositol 3-Kinase controls susceptibility to Leishmania major by regulating expansion and tissue homing of regulatory T cells. *J Immunol* **183**, 1921-1933 (2009).
98. Sauer, S.; Bruno, L.; Hertweck, A.; Finlay, D.; Leleu, M.; Spivakov, M.; Knight, Z. A.; & al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 7797-7802 (2008).
99. Merckenschlager, M.; & von Boehmer, H. PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. *J Exp Med* **207**, 1347-1350 (2010).
100. Walsh, P. T.; Buckler, J. L.; Zhang, J.; Gelman, A. E.; Dalton, N. M.; Taylor, D. K.; Bensing, S. J.; & al. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4⁺ CD25⁺ Tregs. *J Clin Invest* **116**, 2521-2531 (2006).
101. Ni, H.-T.; Deeths, M. J.; & Mescher, M. F. Phosphatidylinositol 3 kinase activity is not essential for B7-1-mediated costimulation of proliferation or development of cytotoxicity in murine T cells. *J Immunol* **157**, 2243-2246 (1996).
102. Phu, T.; Haeryfar, S. M. M.; Musgrave, B. L.; & Hoskin, D. W. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors prevent mouse cytotoxic T-cell development in vitro. *J Leukoc Biol* **69**, 803-814 (2001).
103. Macintyre, A. N.; Finlay, D.; Preston, G.; Sinclair, L. V.; Waugh, C. M.; Tamas, P.; Feijoo, C.; & al. Protein kinase B controls transcriptional programs that direct cytotoxic T cell fate but is dispensable for T cell metabolism. *Immunity* **34**, 224-236 (2011).
104. Camps, M.; Ruckle, T.; Ji, H.; Ardisson, V.; Rintelen, F.; Shaw, J.; Ferrandi, C.; & al. Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Medicine* **11**, 936-943 (2005).
105. Randis, T. M.; Puri, K. D.; Zhou, H.; & Diacovo, T. G. Role of PI3K δ and PI3K γ in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. *Eur J Immunol* **38**, 1215-1224 (2008).
106. Haruta, K.; Mori, S.; Tamura, N.; Sasaki, A.; Nagamine, M.; Yaguchi, S.-i.; Kamachi, F.; & al. Inhibitory effects of ZSTK474, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, on adjuvant-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* **61**, 551-562 (2012).
107. Hayer, S.; Pundt, N.; Peters, M. A.; Wunrau, C.; Kühnel, I.; Neugebauer, K.; Strietholt, S.; & al. PI3K γ regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis. *FASEB J* **23**, 4288-4298 (2009).

108. Bartok, B.; Boyle, D. L.; Liu, Y.; Ren, P.; Ball, S. T.; Bugbee, W. D.; Rommel, C.; & al. PI3 kinase δ is a key regulator of synoviocyte function in rheumatoid arthritis. *Amer J Pathol* **180**, 1906-1916 (2012).
109. Vinuesa, C. G.; Cook, M. C.; Angelucci, C.; Athanasopoulos, V.; Rui, L.; Hill, K. M.; Yu, D.; & al. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* **435**, 452-458 (2005).
110. Yu, D.; Tan, A. H.-M.; Hu, X.; Athanasopoulos, V.; Simpson, N.; Silva, D. G.; Hutloff, A.; & al. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* **450**, 299-303 (2007).
111. Lee, S. K.; Silva, Diego G.; Martin, Jaime L.; Pratama, A.; Hu, X.; Chang, P.-P.; Walters, G.; & al. Interferon- γ excess leads to pathogenic accumulation of follicular helper T cells and germinal centers. *Immunity* **37**, 880-892 (2012).
112. Sweet, R. A.; Lee, S. K.; & Vinuesa, C. G. Developing connections amongst key cytokines and dysregulated germinal centers in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **24**, 658-664 (2012).
113. Barber, D. F.; Bartolome, A.; Hernandez, C.; Flores, J. M.; Redondo, C.; Fernandez-Arias, C.; Camps, M.; & al. PI3K γ inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Medicine* **11**, 933-935 (2005).
114. Barber, D. F.; Bartolome, A.; Hernandez, C.; Flores, J. M.; Fernandez-Arias, C.; Rodriguez-Borlado, L.; Hirsch, E.; & al. Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J Immunol* **176**, 589-593 (2006).
115. Suárez-Fueyo, A.; Barber, D. F.; Martínez-Ara, J.; Zea-Mendoza, A. C.; & Carrera, A. C. Enhanced phosphoinositide 3-kinase δ activity is a frequent event in Systemic Lupus Erythematosus that confers resistance to activation-induced T cell death. *J Immunol* **187**, 2376-2385 (2011).
116. Maxwell, M. J.; Tsantikos, E.; Kong, A. M.; Vanhaesebroeck, B.; Tarlinton, D. M.; & Hibbs, M. L. Attenuation of phosphoinositide 3-kinase δ signaling restrains autoimmune disease. *J Autoimmun* **38**, 381-391 (2012).
117. Acosta, Y. Y.; Montes-Casado, M.; Aragonese-Fenoll, L.; Dianzani, U.; Portolés, P.; & Rojo, J. M. Suppression of CD4⁺ T lymphocyte activation "in vitro" and experimental encephalomyelitis "in vivo" by the phosphatidyl inositol 3-kinase inhibitor PIK-75. *Int J Immunopathol Pharmacol* **MS 1814**, (Enviado) (2013).
118. Dagia, N. M.; Agarwal, G.; Kamath, D. V.; Chetrapal-Kunwar, A.; Gupte, R. D.; Jadhav, M. G.; Dadarkar, S. S.; & al. A preferential p110 α/γ PI3K inhibitor attenuates experimental inflammation by suppressing the production of proinflammatory mediators in a NF- κ B-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C929-941 (2010).
119. Roller, A.; Perino, A.; Dapavo, P.; Soro, E.; Okkenhaug, K.; Hirsch, E.; & Ji, H. Blockade of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) δ or PI3K γ reduces IL-17 and ameliorates Imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis. *J Immunol* **189**, 4612-4620 (2012).
120. Schreiber, R. D.; Old, L. J.; & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565-1570 (2011).
121. Vesely, M. D.; Kershaw, M. H.; Schreiber, R. D.; & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* **29**, 235-271 (2011).
122. Zou, W.; & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* **8**, 467-477 (2008).
123. Strauss, L.; Bergmann, C.; Szczepanski, M. J.; Lang, S.; Kirkwood, J. M.; & Whiteside, T. L. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T regulatory cells: Implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J Immunol* **180**, 2967-2980 (2008).
124. Chen, X. L.; Cao, X. D.; Kang, A. J.; Wang, K. M.; Su, B. S.; & Wang, Y. L. In situ expression and significance of B7 costimulatory molecules within tissues of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* **9**, 1370-1373 (2003).
125. Martin-Orozco, N.; Li, Y.; Wang, Y.; Liu, S.; Hwu, P.; Liu, Y.-J.; Dong, C.; & al. Melanoma cells express ICOS ligand to promote the activation and expansion of T-regulatory cells. *Cancer Res* **70**, 9581-9590 (2010).
126. Conrad, C.; & Gilliet, M. Plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in the tumor microenvironment: A dangerous liaison. *Oncoimmunology* **2**, e23887 (2013).

127. Schreiner, B.; Wischhusen, J.; Mitsdoerffer, M.; Schneider, D.; Bornemann, A.; Melms, A.; Tolosa, E.; & al. Expression of the B7-related molecule ICOSL by human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. *Glia* **44**, 296-301 (2003).
128. Melero, I.; Hervas-Stubbs, S.; Glennie, M.; Pardoll, D. M.; & Chen, L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **7**, 95-106 (2007).
129. Fruman, D. A.; & Rommel, C. PI3K δ inhibitors in cancer: Rationale and serendipity merge in the clinic. *Cancer Discov* **1**, 562-572 (2011).

ADDENDA: ABBREVIATIONS AND LIST OF PI3K INHIBITORS

Abbreviations

ABD	Adaptor binding domain
AIA	Adjuvant-induced arthritis
Akt	Protein kinase B
ATG13	Autophagy-related protein 13
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated protein (ATM)
ATR	Ataxia- and Rad3-related protein (ATR)
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BCAP	B-cell adaptor for PI3K
BCL6	B cell lymphoma 6 transcription repressor
BCR	B cell receptor, antigen receptor of B lymphocytes
BH	BCR-homology GTPase activation domain
Btk	Bruton's tyrosine kinase
BTLA	B-and T-lymphocyte attenuator, CD272
CIA	Collagen-induced arthritis
CNS	Central nervous system
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CD152
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FLS	Fibroblast-like synoviocyte
FYVE	Fab 1 (yeast orthologue of PIKfyve), YOTB, Vac 1 (vesicle transport protein), and EEA1 domain
FOXO	forkhead transcription factor/forkhead box O transcription factors
GAP	GTPase activating factors
GC	Germinal center
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
G proteins	Heterotrimeric Guanine nucleotide-binding proteins
GPCR	G protein-coupled receptor
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
ICOS	Inducible costimulator, CD278
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based activation motif
Itk	Interleukin-2-inducible T-cell tyrosine kinase
IKK	I κ B kinase
HEAT	Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR domains
LAT	Linker of activation of T cells
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

MS	Multiple sclerosis
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mTORC1	Complex of mTOR containing Raptor
mTORC2	Complex of mTOR containing Rictor
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural killer lymphocytes
S6K	p70 S6 kinase
PD-1	Programmed death-1, CD279
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PGE2	Prostaglandin E2
PH	Pleckstrin homology domain
PIKK	PI3K-like protein kinases
PI3K	Phosphoinositide-3 kinases (PI3Ks)
PKC θ	Protein kinase θ
PKB	Protein kinase B
PLC γ	Phospholipase C γ
PROPPIN	β -propeller that bind phosphoinositide species
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue
PtdInsP	Phosphorylated inositol lipids
PX	Phox homology domain
RHEB	Ras homologue enriched in brain
SH2	Src homology region 2 domain
SH3	Src homology region 3 domain
SHP-1	SH2 domain-containing Inositol Phosphatase-1
SHP-2	SH2 domain-containing Inositol Phosphatase-2
SGK1	Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) 1
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
TCR	T cell receptor, antigen receptor of T lymphocytes
Tfh	Follicular helper T cells
TNF	Tumor necrosis factor
TSC1, TSC2	Tuberous sclerosis complex proteins 1 and 2
Treg	CD4 ⁺ regulatory T lymphocytes
TRIM	T cell receptor (TCR)-interacting molecule
WD repeat	WD40 repeat, β -transducin repeat

PI3K inhibitors

A66	PI3K inhibitor, p110 α
AS-605240	PI3K inhibitor, p110 γ
AS-604850	PI3K inhibitor, p110 α/γ

CAL-101	PI3K inhibitor, p110 δ
ETP-46321	PI3K inhibitor, p110 α/δ
GDC-0941	PI3K inhibitor, pan-PI3K
IC87114	PI3K inhibitor, p110 δ
INK007	PI3K inhibitor, p110 δ
LY294002	PI3K inhibitor, broad-spectrum
MLN1117	PI3K inhibitor, p110 α
PI-103	PI3K inhibitor, broad-spectrum
PIK-75	PI3K inhibitor, p110 α /DNA-PK inhibitor
PIK-90	PI3K inhibitor, broad-spectrum
TGX-221	PI3K inhibitor, p110 β
Wortmannin	PI3K inhibitor, broad-spectrum
ZSTK474	PI3K inhibitor, broad-spectrum

Avances en artritis reumatoide

Luis García-Sevillano

Farmacéutico comunitario. Farmacia Navarro Gómez, Valladolid.
e-mail: sevillanolg@hotmail.com

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 1 (2014), pág.126-150

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es la forma más frecuente de poliartritis crónica. Afecta al 0,5% de la población española. En los últimos años se han producido importantes avances en la patogénesis de la AR, en el diagnóstico y en el tratamiento de la enfermedad. Un diagnóstico temprano es esencial con el fin de prevenir la erosión articular y de mejorar la prognosis y la calidad de vida de los pacientes con AR. En esta revisión se presentan los últimos hallazgos en la epidemiología, etiología, fisiopatología, clínica, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad severa pero tratable.

Palabras clave: Artritis reumatoide; Fisiopatología; Tratamiento.

ABSTRACT

Pharmacist's update in rheumatoid arthritis

Rheumatoid arthritis (RA) is the most frequent form of chronic polyarthritis. It affects 0.5% of the Spanish population. In recent years there have been significant advances in the pathogenesis of RA, in the diagnosis and treatment of the disease. An early diagnosis is essential in order to prevent the joint erosion and improve the prognosis and quality of life of patients with RA. In this review are presented the latest findings in the epidemiology, etiology, pathophysiology, clinical features, diagnosis and treatment of this severe but treatable disease.

Keywords: Rheumatoid Arthritis; Pathophysiology; Treatment.

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad compleja, de naturaleza autoinmune, sistémica, crónica, del tejido conjuntivo, que afecta sobre todo a las articulaciones periféricas y cursa con dolor e inflamación en las articulaciones, a la vez que también pueden presentarse manifestaciones extra-articulares (1-3). Tiene un gran impacto en la calidad de vida del paciente y origina un coste económico y social muy importante. En la mayoría de los pacientes el curso de la enfermedad es progresivo y conduce a una lesión estructural articular, deterioro funcional, disminución de la calidad de vida, aumento de la morbilidad y de la mortalidad. Es una enfermedad de comienzo insidioso y pueden pasar meses hasta que el paciente busque consulta médica. Es muy importante un diagnóstico y un tratamiento precoces para reducir en lo posible el daño estructural.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

La prevalencia en el mundo oscila entre el 0,5% y 1,0%. En el norte de Europa y de América (4) se estima su prevalencia en torno al 1% de la población general. Existen diferencias geográficas en cuanto a la severidad de la AR, así se ha observado que es menos severa en los países mediterráneos frente a los del norte de Europa (5). La prevalencia en España según el EPISER (6) es de 0,5%. La incidencia de la AR en España se aproxima a los 10 casos/100000 habitantes (7). La AR es más frecuente en mujeres que en hombres (2-3 mujeres por cada hombre) (8) y suele aparecer entre la cuarta y sexta década de la vida.

ETIOLOGÍA

La etiología de la AR es desconocida pero se postula que se desencadena en individuos con una predisposición genética después de la exposición repetida a ciertos agentes ambientales (1, 9,10).

En estudios con gemelos se ha estimado que los factores genéticos contribuyen con aproximadamente un 50% al desarrollo de la AR y el resto se atribuye a factores ambientales (11). El factor de riesgo genético (12) más importante para la aparición de la AR está asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y en particular al “Human Leukocyte Antigen” (HLA), al cual se le atribuye entre un 30% y un 50% del riesgo genético total (13). Los alelos HLA-DRB1 comparten un “epítipo compartido”, que se corresponde a la secuencia glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina (QKRAA) y se asocia a un incremento de la susceptibilidad a AR y a la gravedad de la enfermedad. Recientemente se ha descubierto que de estos 5 aminoácidos, que se encuentran formando parte de la hendidura de unión de los antígenos al CMH, dos se encuentran asociados a los genes HLA-B y HLA-DP, y los tres restantes a los genes HLA-DR y estos 5 residuos

explican casi completamente la asociación entre el CMH y el riesgo de presentar AR (14). Parece ser que se producirían alteraciones a nivel de la regulación post-transcripcional, dando lugar a proteínas citrulinadas, que son reconocidas como extrañas, desencadenando la producción de anticuerpos (Ac) contra estas proteínas en el inicio de la enfermedad (15). Posiblemente los linfocitos T que reconocerían estos auto-antígenos citrulinados presentados a través del CMH, estimularían a las células B en la secreción de Ac contra las proteínas citrulinadas (ACPA). Sorprendentemente se ha observado que la asociación entre los alelos HLA-DRB1 y el riesgo de presentar AR solamente tuvo lugar con la presencia de los ACPA (16,17). También se han encontrado alelos HLA-DRB1*13:01 que podrían proteger frente al desarrollo de la AR(12). Fuera de la región del CMH se han identificado otros lugares en los genes relacionados con la AR como la “peptidylargininedeiminasetype 4”(PADI4), “proteintyrosinephosphatase non-receptor type 22”(PTPN22), el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico(CTLA4), “TNF Receptor Associated Factor/ Complement component 5” (TRAF1/C5), “Signal transducer and Activator of Transcription 4” (STAT4), “Tumor Necrosis Factor Alfa-Induced Protein 3” (TNFAIP3), etc. También hay una relación probable entre la AR y los genes que codifican la cascada metabólica del factor nuclear kappa B (NFK β) (CD40, CD244, CDK6, CCL21, PRKCQ, TNFRSF14, PIP4K2C, IL-1B, IL-2RB, IL-2RA) (18). Para muchos de ellos todavía no se conocen los polimorfismos funcionales (12).

En cuanto a los factores ambientales implicados en el origen de la AR, no hay consenso para ninguno de ellos (19). Algunos factores de riesgo pueden ser comunes a otras enfermedades autoinmunes. Así, en una revisión sistemática, se ha observado un incremento de la prevalencia de tiroiditis autoinmune y diabetes mellitus insulino-dependiente en los pacientes con AR y una asociación inversa entre la esclerosis múltiple y AR (20). En las mujeres la AR se desarrolla frecuentemente en períodos en los cuales las hormonas esteroideas fluctúan mucho, como por ejemplo el post-parto y la perimenopausia (21). Es probable que desde antes del nacimiento empiecen a acumularse los factores de riesgo como puede ser el peso al nacer y la composición genética del CMH de la madre, que influirán en el desarrollo de la AR (22, 23). Fumar tabaco es uno de los factores ambientales más fuertemente asociados al riesgo de presentar AR. Se ha estimado que el riesgo es aproximadamente el doble en los fumadores que en los no fumadores, especialmente en los hombres que fuman bastante y con factor reumatoide (FR) positivo (24). Además aquellos fumadores y ACPA tenían una mayor susceptibilidad genética de presentar AR (genes del epítipo compartido del CMH) (25). También estudios recientes confirman una peor respuesta al tratamiento de la AR en aquellos pacientes fumadores (26). Otros factores potenciales pueden ser factores asociados al trabajo (27), como polvo de sílice, aceites minerales, etc. Algunos datos indican que un consumo moderado de alcohol

puede reducir el riesgo de presentar AR (28). En cuanto a los factores dietéticos la ingesta de vitamina D está inversamente relacionada con el curso de la AR, aunque hay estudios en los que no se ha observado una relación entre los niveles en plasma de vitamina D y la presencia de los auto-anticuerpos en la AR (29, 30). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega 3, que se encuentran principalmente en el pescado azul, disminuyen la producción de eicosanoides, citocinas, especies reactivas de oxígeno y la expresión de moléculas de adhesión que intervienen en la inflamación (31). Los ácidos grasos omega 3 intervienen en la producción de las resolvinas (una familia de mediadores antiinflamatorios). Estudios de caso-control y de cohortes han mostrado un efecto protector modesto de los ácidos grasos omega 3 marinos en el riesgo de desarrollar AR (32). Además, el consumo de pescado también ha demostrado mejorar los síntomas de la AR y su progresión (33). Parece que los antioxidantes podrían proteger frente a la aparición de la AR, pero los resultados para los antioxidantes por separado son contradictorios (34). Otros posibles factores de riesgo que se han investigado bastante en su asociación con la AR son las infecciones víricas (virus de Epstein-Barr, parvovirus humanos B-19) y bacterianas (*Proteus mirabilis*, micobacterias, micoplasmas, etc.). Recientemente se ha investigado el papel de una bacteria causante de infecciones periodontales, *Porphyromonas gingivalis*, la cual parece ser bastante prevalente en los estadios iniciales de la AR (35). *P. gingivalis* es la única bacteria que causa infecciones en humanos y que contiene la enzima peptidil arginina deiminasa, la cual tiene la capacidad de citrulinar las proteínas (36). Estas proteínas citrulinadas podrían favorecer la producción de ACPA y desencadenar la AR, aunque se necesitan más investigaciones al respecto (37). También se ha estudiado la relación entre la obesidad y la AR por varios investigadores. Se ha observado un incremento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular en aquellos pacientes con AR (38). Ajeganova et al. (39) y Wolf y Michaud (40) mostraron que la obesidad está asociada a un empeoramiento de la clínica de la AR. Además, Stavropoulos-Kalinoglou et al. (41) pusieron de manifiesto que mientras la terapia anti-TNF (Factor de Necrosis Tumoral) mejoraba la sensibilidad a la insulina en los pacientes con AR y normopeso, no ocurría lo mismo en los pacientes con sobrepeso.

FISIOPATOLOGÍA DE LA AR

La AR se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial, seguida de la formación de un tejido que se llama “pannus” y que conduce a la destrucción del cartilago y erosión de los huesos con la consiguiente limitación funcional, junto con las manifestaciones extraarticulares.

Parece ser que una producción de auto-Ac (ACPA, FR) e inflamación sistémica precederían a la inflamación sinovial; en algunos pacientes hasta 15 años antes (42).

En la inflamación de las articulaciones intervienen una serie de cascadas inflamatorias, desencadenadas probablemente por la inmunidad adaptativa, tanto en los pacientes que presentan o no el FR o ACPA. En la AR se ha observado que las células progenitoras hematopoyéticas presentan un acortamiento telomérico inapropiado para su edad que podría producir envejecimiento prematuro y una posible restricción de la capacidad proliferativa (43). Este defecto parece estar específicamente conectado con la cascada de señalización ERK (44).

La membrana sinovial es el lugar donde se inicia el proceso inflamatorio articular y está compuesta por una población de células entre las que destacan los fibroblastos y los macrófagos. La inflamación de la membrana sinovial se produce tras la infiltración en la misma de linfocitos T (45) y B (46), células endoteliales y macrófagos activados, que van a producir una serie de mediadores solubles, en su mayoría citocinas (47, 48), pero también factores de crecimiento, quimiocinas y moléculas que participan en la señalización intracelular (Figura 1). Las vías de transducción de señales intracelulares también pueden estar implicadas en la patogénesis de la AR (vías de la quinasa Janus, quinasas proteínicas activadoras de mitógenos, NFK β , quinasa c-Jun N-terminal, RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B, etc.).

Las citocinas son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular que tienen una vida media corta, que son producidas principalmente por las células del sistema inmunológico y que actúan como mediadores fundamentales en la transmisión de señales intercelulares.

Dentro de los linfocitos T, la infiltración en particular de los linfocitos Th 17 que son secretores de la citocina con mayor efecto proinflamatorio, la IL-17; parece ser la responsable de la iniciación del proceso inflamatorio al interactuar con CD, macrófagos y linfocitos B (Figura 1). La IL-17 induce la degradación directa de los proteoglicanos del cartílago. La IL-17 induce la expresión del ligando RANKL en los fibroblastos sinoviales, que van a provocar la diferenciación de los osteoclastos, que migran hacia la zona marginal iniciando la erosión ósea (49, 50). La IL-17 desencadena un incremento en la inflamación local a través de citocinas inflamatorias como el TNF α , IL-1 e IL-6.

Las células Th1 y Th2 tienen efectos inhibitorios en la osteoclastogénesis a través de la secreción de interferon- γ (IFN- γ) e IL-4 respectivamente (Figura 2).

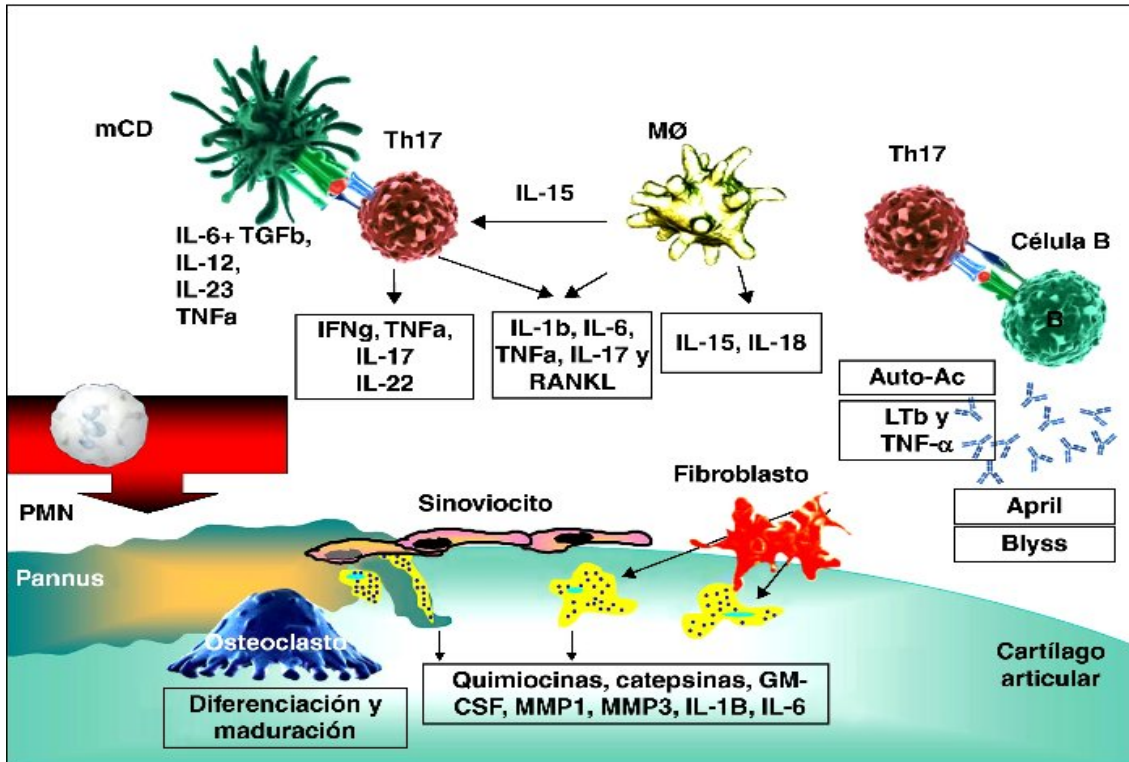


Figura 1.- Esquema de la fisiopatología de la AR. Interacción de las principales células implicadas en la fisiopatología de la sinovitis y resorción ósea, culminando en la liberación de enzimas y daño tisular (CD: células dendríticas, MΦ: macrófagos, GM-CSF: factor estimulador de la colonias de macrófagos y granulocitos, MMP: metaloproteínasa, IL: interleucina, LTB: linfotóxina beta, TGFβ: Transforming Growth Factor beta, April: ligando inductor de la proliferación del linfocito B, Blyss: factor estimulador del linfocito B) (48).

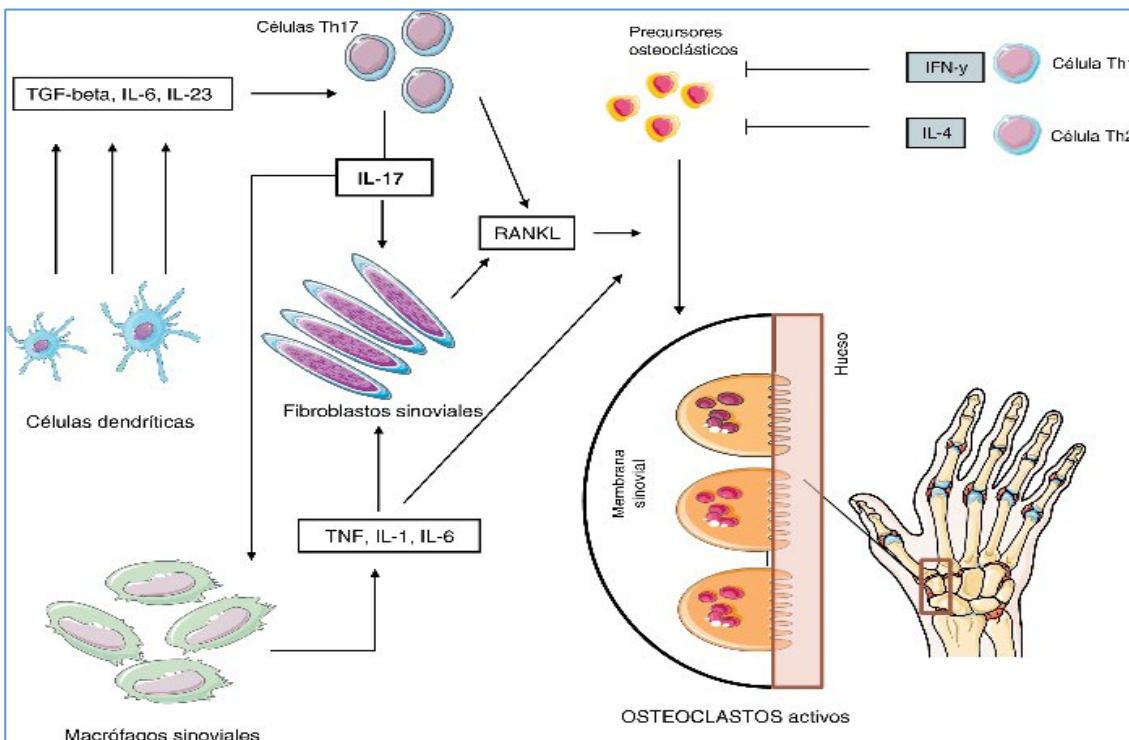


Figura 2.- Patogenia de la erosión reumatoide (IFN-γ: interferón gamma) (50).

Los macrófagos son células fundamentales implicadas en la fisiopatología, probablemente debido a la secreción de mediadores proinflamatorios claves como el TNF- α y la IL-1, que perpetúan de forma crónica la inflamación en la AR (51). Los fibroblastos sinoviales son activados por este microambiente local transformándose y dando lugar a un fenotipo pseudomaligno con regulación al alta de oncogenes, inhibición de la apoptosis y secreción de citocinas, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz y catepsinas, que median el proceso inflamatorio crónico y la destrucción articular (52) (Figura 2). Los linfocitos B actúan mediante la producción de auto-Ac (FR, ACPA); como células activadoras de los linfocitos T actuando como células presentadoras de antígeno (APC) y de activación de los fibroblastos a través de la secreción de TNF- α y linfoxina β . La activación de los linfocitos T sólo tiene lugar en presencia de señales co-estimuladoras mediadas por la familia de receptores CD28-B7 (CD80/86). Los neutrófilos presentes en el fluido sinovial, sintetizan prostaglandinas inflamatorias, proteasas y especies reactivas de oxígeno. Además, se produce una hiperplasia y activación de los mastocitos a nivel articular. Los mastocitos son las células que presentan más receptores para la IL-17a en la membrana sinovial (53). La función de las células T CD4+ reguladoras está disminuida, lo que contribuye al desequilibrio entre los brazos efector y regulador de la inmunidad.

La angiogénesis (formación de nuevos capilares o neovascularización) es un proceso precoz y crítico en la fisiopatología de la AR. La IL-17 es capaz de incrementar la vascularización promoviendo directamente el crecimiento de los vasos sanguíneos, estimulando los fibroblastos sinoviales que van a secretar el factor de crecimiento endotelial vascular y activando las células endoteliales que migrarán por quimiotaxis y darán por resultado la neovascularización.

El TNF- α y la IL-6 son citocinas proinflamatorias que actúan sinérgicamente como moléculas efectoras fundamentales y son los principales componentes del proceso inflamatorio. El TNF- α es un mediador importante para la producción de citocinas, metaloproteinasas, óxido nítrico, prostaglandina E2, etc. La IL-6 es una citocina proinflamatoria pleiotrópica con efectos variados sobre las líneas hematopoyéticas, como la inducción de la producción de Ig por las células B, proliferación de las células T, inducción de la síntesis de las proteínas de fase aguda hepáticas y diferenciación en las células T citotóxicas.

La IL-1 β participa en la destrucción del cartílago y hueso a través de la secreción de metaloproteinasas, disminución de la síntesis de glucosaminoglicanos, etc. (54). Los inhibidores fisiológicos de las citocinas proinflamatorias tales como el antagonista del receptor de la IL-1 (IL1-Ra), sIL1-RI, sIL1-RII, sTNFRI, sTNF-RII se encuentran en mayor cantidad pero no la suficiente como para contrarrestar la inflamación.

La IL-23 es uno de los factores esenciales para la supervivencia y/o expansión de los linfocitos Th17 y, por otra parte, induce la secreción de IL-17 por células no T. La interacción entre la IL-23 y la IL-17 desempeña un papel fundamental tanto en las fases precoces de la AR como en la fase destructiva, ya que induce la expresión del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) en precursores mieloides y de su ligando RANKL en linfocitos colaboradores (Th). Además, la IL-23 estimula la producción de IL-1 β y TNF- α .

La IL-18 induce la activación de los linfocitos T citotóxicos y células Natural Killers (NK) (55), induciendo a su vez la secreción de INF- γ por dichas células.

La IL-27 se produce en las APC en presencia de infección e INF- α . Induce efectos pleiotrópicos sobre diversas células del sistema inmunológico y tiene propiedades pro- y anti-inflamatorias (56).

La IL-32 es una citocina proinflamatoria que se ha encontrado en células NK y en linfocitos T activados.

La IL-35 es una citocina perteneciente a la familia de la IL-12; se produce en los linfocitos T CD4+ reguladores y se ha visto que in vitro es capaz de inhibir la actividad de los linfocitos Th 17.

Otras citocinas importantes en la patogenia de la AR son el factor estimulador del linfocito B (BLyS) y el ligando inductor de la proliferación del linfocito B (APRIL). El bloqueo de estas citocinas podría ser importante en el tratamiento de la AR.

PRESENTACIÓN CLÍNICA

La presentación clínica de la AR es extremadamente variable, mostrando un amplio espectro de manifestaciones clínicas variando desde manifestaciones de la enfermedad moderadas a rápidamente presentar inflamación progresiva, destrucción articular y una discapacidad física severa.

La enfermedad comienza con dolor y tumefacción articular que se puede instaurar en semanas o meses. Las articulaciones más afectadas al inicio de la enfermedad son las metacarpofalángicas (MCF), interfalángicas proximales (IFP) de las manos, muñecas y metatarsofalángicas (MTF) de los pies. A medida que avanza la AR se afectan otras articulaciones como hombros, codos, rodillas y tobillos. La rigidez matutina es característica de la AR activa y se define como la dificultad al movimiento de las articulaciones al levantarse de la cama o después de permanecer un tiempo en reposo. La afectación articular es simétrica y la rigidez matutina de más de 1 hora de duración. Además de estos síntomas articulares el paciente puede tener síntomas generales como fiebre, fatiga, pérdida de peso, mialgias y afectación emocional (57). La fatiga es un estado fisiológico causado por

la acción directa de citocinas proinflamatorias (en particular la IL-1 e IL-6) sobre receptores de citocinas en las células endoteliales del cerebro (58). Por tanto, la fatiga debe ser medida como una parte del estado del paciente, y así se ha observado un efecto beneficioso disminuyendo la fatiga en los nuevos tratamientos con antagonistas de citocinas (59). La afectación extraarticular puede afectar al 50% de los pacientes. La manifestación más frecuente es el síndrome de Sjögren (35%), que se caracteriza por sequedad bucal y ocular. Los nódulos reumatoides se presentan sobre superficies de presión como codos, tendón de Aquiles y dedos. El 7% de los pacientes en el momento del diagnóstico de la AR tienen nódulos y aproximadamente un 30% de los pacientes tendrán nódulos en algún momento de la enfermedad. Los nódulos reumatoides aparecen más frecuentemente en aquellos pacientes que tienen el FR. Las manifestaciones extra-articulares más severas como vasculitis, enfermedad pulmonar intersticial, pericarditis y pleuritis son más frecuentes en aquellos pacientes con nódulos reumatoides. Otras manifestaciones son neuropatía asociada a vasculitis, alteraciones de la fórmula sanguínea y de las transaminasas, atrofia muscular, síndrome de Felty, glomerulonefritis y escleritis (3).

DIAGNÓSTICO

Entre los factores predictivos para el diagnóstico de la AR desde una artritis inflamatoria periférica tenemos la edad avanzada, sexo femenino y rigidez articular. La artritis inflamatoria evoluciona a AR cuando se ven afectadas un número elevado de articulaciones dolorosas y tumefactas, tanto grandes como pequeñas articulaciones, tanto de extremidades superiores como inferiores y simétricamente (60). No hay ningún test específico para el diagnóstico de la AR. El diagnóstico se lleva a cabo en base del fenotipo clínico (poliartritis simétrica crónica) y con la ayuda de datos analíticos o radiográficos (erosión articular). Los criterios de clasificación diagnóstica para la AR se desarrollaron en 1987 (61) por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y hasta ahora se han usado principalmente para estudios epidemiológicos o ensayos clínicos más que para la práctica clínica. Estos criterios surgieron a partir de pacientes con una AR establecida y tenían una muy pobre sensibilidad para el diagnóstico de AR en pacientes con comienzo reciente de la artritis (62).

Un diagnóstico y un tratamiento precoz efectivo en las primeras fases de la enfermedad reducen el daño estructural (63,64). La mayoría de los pacientes tienen un daño radiológico en los primeros 2 años de la enfermedad y es en este período cuando el daño estructural avanza con más rapidez. Toda artritis de más de 4 semanas de duración debe ser referida a atención especializada y en caso de sospecha de una artritis séptica la derivación será inmediata.

En 2010 se han establecido nuevos criterios de clasificación para el diagnóstico de la AR gracias al consenso entre la ACR y la liga europea contra el reumatismo (EULAR) (65). Algunos ítems incluidos en los criterios ACR de 1987, como por ejemplo los nódulos reumatoides, la presencia de erosiones radiográficas y la presencia de artritis simétrica, no se han incluido dentro de las últimas recomendaciones en 2010; sin embargo otros, como la presencia de ACPA, han sido incorporados. Estos nuevos criterios tienen una mayor sensibilidad en el diagnóstico de la AR de reciente comienzo pero una menor especificidad y por tanto una mayor cantidad de falsos positivos (66, 67). Por lo tanto se debe llevar a cabo un diagnóstico diferencial entre la AR de reciente comienzo y otras variantes de la artritis como el lupus eritematoso sistémico, artritis psoriásica, artritis microcristalina y osteoartritis entre otras. Sin embargo, más de la mitad de los pacientes con artritis temprana no desarrollarán la AR y en algunos casos de artritis no clasificable podría remitir espontáneamente (68). La investigación se ha centrado en identificar aquellos factores en pacientes con artritis inflamatoria de comienzo reciente, que puedan predecir la instauración de una artritis persistente o una verdadera AR. Alguno de estos factores ha sido identificado, siendo la presencia de ACPA uno de los más importantes (69). Recientemente se ha descubierto que el genotipo TT del polimorfismo STAT4 rs7574865 está asociado a una actividad alta de la enfermedad y discapacidad en pacientes con artritis temprana (70).

CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE ARTRITIS REUMATOIDE 2010 ACR/EULAR

La población objetivo está formada por aquellos pacientes que tienen al menos una articulación con sinovitis clínica definitiva (edema) y aquellos pacientes con sinovitis no explicada mejor por otra enfermedad. Para clasificar a un paciente con AR definitiva se necesita una puntuación $\geq 6/10$ (suma de las categorías A-D, ver Tabla 1). Aquellos pacientes con una puntuación $< 6/10$ no pueden clasificarse como AR, su condición debe ser reevaluada y los criterios pueden cumplirse acumulativamente con el tiempo.

Tabla 1. -Criterios para la clasificación de Artritis Reumatoide 2010 ACR/EULAR.

A. Compromiso articular	
1 articulación grande	0
2-10 articulaciones grandes	1
1-3 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de articulaciones grandes)	2
4-10 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de grandes articulaciones)	3
>10 articulaciones (al menos 1 articulación pequeña)	5
B. Serología (al menos 1 resultado de la prueba es necesario para la clasificación)	
FR negativo y anti-CCP negativo	0
FR débil positivo o anti-CCP débil positivo	2
FR fuerte positivo o anti-CCP fuerte positivo	3
C. Reactantes de fase aguda (al menos 1 prueba es necesaria para la clasificación)	
PCR normal y VSG normal	0
PCR elevada o VSG elevada	1
D. Duración de los síntomas	
<6 semanas	0
≥6 semanas	1

ANÁLISIS DE LABORATORIO.

Las enfermedades autoinmunes como la AR se suelen caracterizar por la presencia de auto-Ac. El FR es un anticuerpo IgM dirigido contra la IgG. El FR no es específico para la AR y puede estar presente en pacientes con otras enfermedades, tales como infecciones (hepatitis C), procesos inflamatorios y en personas mayores saludables. Se detecta en el 75-85% de pacientes durante el curso de la enfermedad. Su sensibilidad oscila entre el 40-80%. El ACPA es más específico para la AR (63-100%) y podría jugar un papel importante en la patología de la enfermedad (71). Aproximadamente del 50 al 80 por ciento de las personas con AR tienen FR, ACPA o ambos (2). La positividad del ACPA en AR temprana incrementa el riesgo de progresión del daño articular y pueden predecir mejor que el FR una enfermedad erosiva. Recientemente, aparte de los factores de riesgo genéticos, como los alelos del epítipo compartido HLA-DRB1, PTPN22 y fumar en el desarrollo de la AR, se ha observado la presencia de ACPA alfa-enolasa y vimentina (72). Los pacientes con AR podrían tener un anticuerpo antinuclear, sobre todo en las formas de AR juvenil (73).

Los reactantes de fase aguda: el volumen de sedimentación globular (VSG) y la proteína C Reactiva (PCR) reflejan la actividad inflamatoria, tanto la presencia como la intensidad de ésta, pero no tienen valor diagnóstico. Se ha observado una

relación entre los niveles elevados de reactantes de fase aguda especialmente la PCR, de forma mantenida y peor pronóstico de la enfermedad (74).

Recientemente se han descubierto Ac contra las proteínas carbamiladas en pacientes con AR. Estos Ac también están presentes en alrededor del 20% de aquellos pacientes con AR y negatividad frente a ACPA (75).

INDICES DE ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

Tanto la evaluación inicial como las de seguimiento de la AR se apoyarán en la valoración sistemática de un conjunto mínimo de parámetros que permitan evaluar el grado de actividad inflamatoria, de discapacidad funcional y de daño estructural. Este conjunto mínimo de parámetros para evaluar la AR recomendada por OMERACT (76) (outcome measures in rheumatoid arthritis clinical trials) son:

Número de articulaciones dolorosas.

Número de articulaciones tumefactas.

Dolor (mediante escala horizontal analógica visual de 10 cm).

Evaluación global de la enfermedad por el paciente y por el médico (escala analógica horizontal visual de 10 cm con indicador en los extremos que marquen “0” muy bien y “10” muy mal).

Reactantes de fase aguda que incluyen la VSG y PCR.

Capacidad funcional física mediante cuestionarios validados como el HAQ (Health Assessment Questionnaire) (77).

Daño radiológico.

La utilización de índices de actividad que resuman la información de varios parámetros en un solo indicador es un procedimiento útil y válido en la evaluación de la actividad de la enfermedad (78). El DAS (Rheumatoid Arthritis Disease Activity Score) es uno de ellos e inicialmente incluía 44 articulaciones. El DAS28 (79) es un DAS modificado basado en el recuento de 28 articulaciones dolorosas y tumefactas (NAD28/NAT28). El DAS28 es mucho más útil en la práctica clínica e incluye además la evaluación global de la enfermedad por el paciente (EGP) y la VSG. Se calcula mediante una fórmula matemática: $DAS28=0,56(\sqrt{NAD28})+0,28(\sqrt{NAT28})+0,70(\ln VSG)+0,014(EGP)$.

En fechas recientes se ha propuesto otro índice similar, el SDAI (Simplified Disease Activity Index). Se calcula mediante una simple suma aritmética del número de articulaciones dolorosas y tumefactas, con índices reducidos de 28 articulaciones, valoración de la actividad por el paciente y el médico (medidos de 0 a 10) y la concentración de PCR en mg/L. $SDAI= NAD28+NAT28+EGP+EGM+PCR$ (mg/dl).

CDAI (Clinical Disease Activity Index) es igual que el SDAI con la diferencia de que no se incluye la PCR.

Criterios de ACR para medir la actividad de la enfermedad (80). Se basan en 7 puntos: número de articulaciones inflamadas/tumefactas, actividad de la enfermedad evaluada por el médico y por el paciente, valoración del dolor/función física por parte del paciente y niveles de los reactantes de fase aguda. El ACR 20 supone una mejora igual o mayor al 20% en los anteriores criterios en la actividad de la enfermedad.

TRATAMIENTO

El objetivo terapéutico según la Sociedad Española de Reumatología (SER) es conseguir la remisión de la enfermedad o, en su defecto, disminuir la actividad inflamatoria de tal manera que el paciente experimente una mejoría significativa de sus síntomas, su capacidad funcional y laboral y su calidad de vida y que al mismo tiempo se retrase la lesión estructural articular.

Aunque no hay cura para la AR en el momento actual, varios estudios recientes confirman que un número significativo de pacientes podrían lograr la remisión clínica (ausencia de dolor e inflamación en las articulaciones) después de una terapia antirreumática efectiva. En algunos estudios, la tasa de remisión es alta (50-65%) (81), aunque la tasa oscila entre el 20 y el 35% en la mayoría de los estudios observacionales (82); en el caso de la remisión permanente las cifras son más bajas (83). La definición de remisión es controvertida, ya que las tasas de remisión van a depender del método empleado para estudiar la remisión (84). Sin embargo, se conoce que una significativa proporción de pacientes en remisión clínica tienen sinovitis subclínica confirmada por ultrasonidos; lo cual explicaría por qué en un 10-20% de los pacientes en remisión clínica hay una progresión en el daño articular radiológico (85).

En España, aunque hay una guía de práctica clínica en AR, se ha observado que existe variabilidad en cuanto a su manejo (86).

Tratamiento no farmacológico

La educación de los pacientes acerca de las características fisiopatológicas de la enfermedad, habilidades para manejarse en el día a día y la protección de las articulaciones conducen a una mejoría en la salud de los pacientes (87). También la terapia ocupacional es beneficiosa, ya que se instruye al paciente acerca de cómo proteger las articulaciones y en el uso de material ortopédico para aumentar su calidad de vida (88). La terapia cognitiva-conductual también puede beneficiar a los pacientes con fatiga, enseñándoles cómo manejarse por sí mismos y reduciendo su dependencia (89). El paciente debe ser tratado por un equipo multidisciplinar en el que intervengan reumatólogos, enfermeras, farmacéuticos, psicólogos, etc.

Estas medidas se pueden recomendar a cualquier paciente con AR controlada por el reumatólogo.

-Descanso nocturno de diez horas como mínimo. Durante el día también es necesario descansar y hacer una hora de siesta.

-Dormir en una cama dura para evitar posibles deformaciones.

-Dormir sin almohada o con una delgada y dura, ya que así se consigue mantener todos los segmentos corporales extendidos.

-Cuando haya inflamación articular se puede recurrir a las férulas de reposo para garantizar la inmovilidad articular.

-Mover las articulaciones afectadas para mantener la flexibilidad. Realizar ejercicio físico de forma regular, adaptado a las necesidades de cada caso, sin forzar las articulaciones (natación, bicicleta, etc.) es muy saludable (90).

-Ducharse con agua caliente después de levantarse porque así se relaja la musculatura, y se consigue disminuir el periodo de rigidez matutina y favorece el movimiento.

-Dieta mediterránea y saludable, tomando al menos 3 raciones/semana de pescado azul (91).

-Suplementación con probióticos sobre todo tras tratamientos antibióticos prolongados, infecciones por hongos, gastroenteritis, etc. Se está investigando cómo el microbioma podría desempeñar un papel importante en la patogénesis de las enfermedades reumáticas (92).

Tratamiento farmacológico

El tratamiento de la AR incluye:

-Analgésicos/AINES. Actúan inhibiendo la ciclooxigenasa, reducen el dolor y la inflamación. Se deben utilizar a las dosis más bajas posibles y durante el menor tiempo posible de acuerdo a la situación del paciente. Se asociará gastroprotección si es necesaria en caso de presentar factores de riesgo y se prescribirán teniendo en cuenta su perfil de toxicidad gástrica y cardiovascular.

-Corticoides (93). Tienen propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras que resultan de la inhibición de cascadas de mediadores inmunológicos como el NF- κ B. Se deben utilizar dosis bajas asociadas a fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME), en periodos cortos (<10 mg de prednisona o equivalente) para aliviar los síntomas y más a largo plazo para minimizar el daño radiológico. En cuanto a la vía intraarticular produce alivio rápido en articulaciones centinela. No se recomienda más de 3-4 infiltraciones al año en la misma articulación. Sin embargo sólo se recomienda en aquellos

pacientes con factores de riesgo quirúrgicos significativos o con leves lesiones de la articulación tras fallo de la terapia conservadora (94).

-FAME: son los que en estudios controlados han demostrado que enlentecen o detienen la progresión de la enfermedad. El metotrexato (MTX) y leflunomida (LEF) destacan por su eficacia, rapidez de acción, influencia en la evolución de las lesiones radiográficas y tolerabilidad. Los efectos clínicos del MTX pueden atribuirse a que actúa promoviendo la apoptosis de linfocitos activados (aquellos que median los efectos a través de especies reactivas de oxígeno y dependientes de la quinasac-JunN-terminal); a un efecto antiinflamatorio dependiente de la adenosina (p. ej. reducción de la activación de los neutrófilos, disminución de la permeabilidad vascular y aumento de la función barrera endotelial); a la modulación de citocinas debido a la inhibición competitiva de la dihidrofolatoreductasa (reducción de los niveles de IL-4, IL-6, IL-13, TNF- α , IFN- γ y del GM-CSF). Se emplea a dosis bajas a las que los efectos secundarios como citotoxicidad y citopenia son mínimos. Además, se recomienda utilizar ácido fólico (5 mg/semanales) para contrarrestar los efectos adversos del MTX (95). El tratamiento inicial debe incluir uno de los FAME relevantes como el MTX en escalada rápida: 7,5 mg semanales durante 1 mes y si al mes persiste la artritis se aumenta a 15 mg y si al mes todavía persiste se aumenta a 20 mg. En caso de respuesta insatisfactoria a MTX (96), alcanzadas las dosis máximas y asegurada la biodisponibilidad del agente, se recomienda utilizar LEF ó Sulfasalazina (SSZ) o un agente anti-TNF como segundo escalón terapéutico, en terapia de sustitución o en adición al MTX. En caso de toxicidad relevante al MTX que obligue a su suspensión, se recomienda utilizar LEF o SSZ o un agente anti-TNF como segundo escalón terapéutico.

No se excluye la utilización de otros FAME (antipalúdicos, ciclosporina o azatioprina), pero no se considera indispensable su uso antes de iniciar un tratamiento biológico. Todos los FAME han demostrado ser más eficaces que el placebo. Sin embargo, no existen ensayos clínicos que hayan comparado todas las combinaciones posibles de fármacos en monoterapia o terapia combinada. No hay evidencia de que una combinación sea superior a otra (97).

Terapia biológica

Se considera candidato a terapia biológica todo paciente que no haya conseguido el objetivo terapéutico con al menos un FAME relevante, preferiblemente MTX o LEF, en monoterapia o combinación y a dosis óptimas. Esto se debe a alguno de los inconvenientes de la terapia biológica como son la administración intravenosa con alguno de ellos, su elevado coste y a los efectos adversos asociados a estas terapias (98).

Según el consenso de la SER (2010) sobre la terapia biológica, el tratamiento más aconsejable es un FAME (MTX) en combinación con fármacos biológicos como los anti-TNF y tocilizumab desde el momento más precoz posible.

Las dianas terapéuticas más comunes son citocinas, células B y moléculas co-estimuladoras. Dentro de las anti-citocinas tenemos el TNF- α , IL-1, IL-6. En el tratamiento contra las células B tenemos Ac anti-CD20 y moduladores de los receptores de las células B como los estimuladores de los linfocitos B.

El tratamiento precoz con estos fármacos es capaz de inducir remisión en una proporción considerable de pacientes (50-60%), evitar el desarrollo de lesiones radiográficas o detener su progresión. Por ello se pueden usar de inicio en combinación con MTX o en monoterapia en pacientes con AR de menos de 1 año de evolución si se sospecha una evolución especialmente grave. Sin embargo hay que tener en cuenta que no se consigue una respuesta óptima en alrededor de un 40-50% de los pacientes, además muchos de estos fármacos dejan de ser eficaces con el tiempo. Algunos fármacos biológicos son específicos del tratamiento de la AR y otros no. En la actualidad existen 9 agentes biológicos comercializados en España, 5 anti-TNF y otros 4 dirigidos a otras dianas terapéuticas (99).

Anti-TNF:

Infliximab: Ac monoclonal IgG1 humano-murino quimérico recombinante frente al TNF- α . Se administra por vía intravenosa (i.v.) a dosis de 3 mg/kg cada 8 semanas. Utilizado concomitante con el MTX produce mejoría clínica en pacientes con enfermedad activa resistente a fármacos convencionales y además se reduce la inmunogenicidad del Infliximab (100).

Etanercept: proteína de fusión humana recombinante compuesta por el receptor p75 del factor de necrosis tumoral y la porción Fc de la IgG1 humana. Bloquea al TNF- α a través de una unión competitiva a su receptor. Se administra de forma subcutánea 40 mg 2 veces por semana demostrando efecto positivo en AR activa.

Adalimumab: Ac monoclonal humano recombinante (IgG1) que se administra en inyección subcutánea quincenal (40 mg). Adalimumab bloquea el TNF- α a través de la interacción con las moléculas p55 y p75 de la superficie celular de los receptores 1 y 2 del TNF. También en presencia del complemento puede provocar la lisis de las células que expresan el TNF. Además el adalimumab disminuye la producción de otras citocinas proinflamatorias como la IL-6, IL-8 y el GM-CSF. En combinación con metotrexato, está indicado para el tratamiento de la AR activa de moderada a grave en adultos, cuando la respuesta a un FAME incluido MTX haya sido insuficiente. También está indicado para el tratamiento de la AR activa, grave y progresiva en adultos no tratados previamente con MTX.

Golimumab: Ac monoclonal IgG1 humano recombinante anti-TNF- α que actúa uniéndose a las moléculas p55 y p75 de la proteína de fusión del receptor del TNF- α y neutraliza la expresión, inducida por el TNF- α en la superficie de las células endoteliales humanas, de la molécula de adhesión selectina-E, de la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y de la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1). Consigue mejoría sostenida de los signos y síntomas de los pacientes con AR activa de moderada a severa. Ha demostrado eficacia en pacientes con fracaso al MTX o que no habían usado MTX y en pacientes que previamente habían utilizado otro agente anti-TNF. Administración subcutánea una vez al mes.

Certolizumab: inhibidor selectivo del TNF- α , formado por un fragmento de un Ac humanizado recombinante conjugado con polietilenglicol (pegilación). La pegilación aumenta el tiempo de vida media de la molécula al reducir su aclaramiento renal, reduce la proteólisis y la inmunogenicidad. No contiene fracción Fc, por lo tanto no activa el complemento ni inicia la citotoxicidad dependiente del complemento. Es preferible para usar en el embarazo ya que no atraviesa la placenta. Se administra de forma subcutánea 200 mg cada 2 semanas. Reduce la tasa de progresión del daño articular y mejora la función física cuando se administra en combinación con MTX.

Tocilizumab(101): Ac monoclonal IgG1 humano recombinante frente al receptor de la IL-6. Inhibe la cascada de señalización de la IL-6 (102) y neutraliza totalmente las acciones derivadas de la presencia de la IL-6. Está indicado en AR activa de moderada a grave en combinación con MTX (salvo contraindicación) tras respuesta inadecuada o intolerancia a FAME/s o antagonista del TNF- α . Se administra por vía i.v. a dosis de 8 mg/Kg cada 4 semanas.

Rituximab: Ac monoclonal IgG1 humano-murino quimérico recombinante anti CD-20. CD-20 es un Ag específico que se expresa en la superficie de las células B. Rituximab produce depleción de linfocitos B sin afectar a los precursores ni a células plasmáticas. Está indicado en AR activa grave en combinación con MTX (salvo contraindicación) tras una respuesta inadecuada o intolerancia a FAME/ s, incluyendo uno o más antagonistas del TNF. Se administra en ciclos de tratamiento de 2 infusiones por vía i.v. de 1.000 mg separados 2 semanas.

Abatacept: proteína de fusión totalmente humana formada por el dominio extracelular del CTLA- 4 y el fragmento Fc de la IgG1 humana. Las células T requieren dos señales distintas para una activación completa. La primera señal es la interacción entre el péptido antigénico presentado por el CMH en la superficie de las APC y el receptor de la célula T. La segunda señal deriva de la unión entre un ligando en la APC al receptor co-estimulador en la célula T; la interacción entre de la CD28 en las células T con la CD80 o CD86 en la APC es un ejemplo clave de una señal co-estimuladora. Abatacept inhibe la unión del CD28 con el CD80 bloqueando

la señal de coestimulación de los linfocitos T. Es el primer biológico que actúa mediante la interrupción de la activación de los linfocitos T. En pacientes con respuesta insuficiente a los anti-TNF, abatacept (103) combinado con MTX ha demostrado ser clínicamente superior al MTX en monoterapia. Se administra vía i.v. cada 4 semanas.

Anakinra: es una forma recombinante no glicosilada, antagonista del receptor humano de la IL-1 (IL-1Ra). Se diferencia de la forma nativa humana en que se ha añadido un residuo de metionina en el extremo amino-terminal. Es el primer agente biológico para modificar la respuesta inmunitaria biológica de la IL-1. Anakinra bloquea la actividad de la IL-1 α y de la IL-1 β por una unión competitiva al receptor IL-1R. La IL-1 al unirse a su receptor desencadena una respuesta inflamatoria y estimula la formación de los osteoclastos que van a exacerbar la inflamación. En varios estudios se ha visto que mejora los signos y síntomas de la AR así como la progresión radiográfica. Aunque no se ha comparado con otros biológicos, hay una percepción de que su eficacia es inferior a la de los anti-TNF. Se administra por vía subcutánea una vez al día.

Otros fármacos biológicos en investigación o todavía no aprobados en Europa

Tofacitinib (104) (Xeljanz®) es el primer medicamento aprobado por la FDA como inhibidor de la quinasa Janus (JAK). Este medicamento está indicado vía oral para el tratamiento de AR activa que no responde adecuadamente al MTX y/o otros FAME incluidos los anti-TNF.

Belimumab (105) es un Ac monoclonal totalmente humanizado que inhibe el factor estimulador de los linfocitos B (BlyS) y que está siendo desarrollado para el tratamiento de la AR. El BlyS controla el desarrollo y supervivencia de las células B. En la AR parece ser que están elevados los niveles de BlyS.

Ocrelizumab es un Ac monoclonal IgG1 humanizado frente al Ag CD-20 en la superficie de las células B.

Epratuzumab es un Ac monoclonal IgG1 contra la molécula CD22. CD22 es una sialo-glicoproteína específica de las células B. Epratuzumab al unirse bloquea el receptor y acelera la apoptosis de las células B.

Ofatumumab: Ac monoclonal humano IgG1 anti CD-20, que induce la lisis de las células B. Actualmente está en ensayos clínicos en fase I/II (106).

Mavrilumabes: Ac monoclonal humanizado dirigido hacia el receptor α del GM-CSF (107).

Tabalumabes: un Ac monoclonal humanizado dirigido frente al BlyS (108).

Precauciones a seguir en los pacientes en tratamiento con terapia biológica (109).

Vacunación antineumocócica y antigripal (evitar vacunas con virus atenuados).

Vigilancia de la aparición de infecciones, citopenia grave y cáncer.

Exclusión de la existencia de tuberculosis activa o latente antes de iniciar una terapia biológica.

Precaución en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva moderada o grave.

Vigilancia de aparición de enfermedad desmielinizante.

Contraindicaciones para el uso de la terapia biológica:

Cáncer.

Enfermedad desmielinizante o neuritis óptica.

Citopenia grave.

Neumopatía intersticial nueva o agravamiento de previa u otros eventos graves relacionados con el fármaco.

Suspensión temporal si hay infección o en caso de cirugía mayor en período perioperatorio.

Valorar si hay embarazo o lactancia.

FARMACOGENÉTICA DE LA AR

Hay una gran variabilidad en la eficacia de los medicamentos así como en los efectos adversos de casi cualquier medicamento anti-reumático. A pesar de que los FAME detienen la progresión de la enfermedad en muchos pacientes (55%), hay un alto porcentaje de fracasos en la remisión de la enfermedad. Hoy por hoy, el establecer una terapia óptima para un paciente en particular es un proceso de ensayo y error, esto unido al alto coste de los fármacos biológicos, está conduciendo la investigación hacia la búsqueda de biomarcadores farmacogenéticos para optimizar el tratamiento de la AR (110).

REFERENCIAS

1. Klareskog, L.; Catrina, A. I.; Paget, S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373, 659-672 (2009).
2. Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376, 1094-1108 (2010).
3. Turesson, C. Extra-articular rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 25, 360-366 (2013).
4. Alamanos, Y.; Voulgari, P. V.; Drosos, A. A. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 36, 182-188 (2006).

5. Carmona, L.; Gonzalez-Alvaro, I.; Balsa, A.; Angel Belmonte, M.; Tena, X.; Sanmarti, R. Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis* 62, 897-900 (2003).
6. Sociedad Española de Reumatología. Estudio EPISER: Prevalencia de las enfermedades reumáticas en la población española. Merck, Sharp & Dohme España; 2001.
7. Carbonell J.; Cobo T.; Balsa A.; Descalzo M. A.; Carmona L. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1088-1092 (2008).
8. Sanmartí, R.; Ruiz-Esquide, V.; Hernández, M. V. Rheumatoid Arthritis: A Clinical Overview of New Diagnostic and Treatment Approaches. *Curr Top Med Chem* 13, 698-704 (2013).
9. Van Vollenhoven, R. F. Rheumatoid arthritis in 2012: Progress in RA genetics, pathology and therapy. *Nat Rev Rheumatol* 9, 70-72 (2013).
10. Carmona, L.; Cross, M.; Williams, B.; Lassere, M.; March, L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24, 733-745 (2010).
11. MacGregor, A. J.; Snieder, H.; Rigby, A. S.; Koskenvuo, M.; Kaprio, J.; Aho, K. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Reum* 43, 30-37 (2000).
12. Bax, M.; Heemst, J. V.; Huizinga, T. W. J.; Toes, R. E. M. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics* 63, 459-466 (2011).
13. Bowes, J.; Barton, A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology* 47, 399-402 (2008).
14. Raychaudhuri, S.; Sandor, C.; Stahl, E. A.; Freudenberg, J.; Lee, H. S.; Jia, X. et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nature Genetics* 44, 291-296 (2012).
15. Gibofsky, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care* 18 (13 Suppl), S295-302 (2012).
16. Ding, B.; Padyukov, L.; Lundström, E.; Seielstad, M.; Plenge, R. M.; Oksenberg, J. R.; et al. Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum* 60, 30-38 (2009).
17. Varadé, J.; Figueredo, M. A.; Cano, S.; Fuentes, M.; Gómez de la Concha, E.; Fernández-Gutiérrez, B.; et al. Association between shared epitope and anti-citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Inmunología* 30, 119-127 (2011).
18. O'Rielly, D. D.; Rahman, P. Pharmacogenetics of rheumatoid arthritis: Potential targets from susceptibility genes and present therapies. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 3, 15-31 (2010).
19. Karlson, E. W.; Deane, K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 38, 405-426 (2012).
20. Somers, E. C.; Thomas, S. L.; Smeeth, L.; Hall, A. J. Autoimmune diseases co-occurring within individuals and within families: a systematic review. *Epidemiology* 17, 202-217 (2006).
21. Goemaere, S.; Ackerman, C.; Goethals, K.; De Keyser, F.; Van der Straeten, C.; Verbruggen, G.; et al. Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition. *J Rheumatol* 17, 1620-1622 (1990).
22. Jacobsson, L. T.; Jacobsson, M. E.; Askling, J.; Knowler, W. C. Perinatal characteristics and risk of rheumatoid arthritis. *BMJ* 326, 1068-1069 (2003).
23. Feitsma, A. L.; Worthington, J.; van der Helm-van Mil, A. H.; Plant, D.; Thomson, W.; Ursum, J.; et al. Protective effect of noninherited maternal HLA-DR antigens on rheumatoid arthritis development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 19966-19970 (2007).
24. Sugiyama, D.; Nishimura, K.; Tamaki, K.; Tsuji, G.; Nakazawa, T.; Morinobu, A.; et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69, 70-81 (2010).
25. Klareskog, L.; Stolt, P.; Lundberg, K.; Kallberg, H.; Bengtsson, C.; Grunewald, J.; et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 54, 38-46 (2006).
26. Saevarsdottir, S.; Wedren, S.; Seddighzadeh, M.; Bengtsson, C.; Wesley, A.; Lindblad, S.; et al. Patients with early rheumatoid arthritis who smoke are less likely to respond to treatment with methotrexate and tumor necrosis factor inhibitors: observations from the

- Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis and the Swedish Rheumatology Register cohorts. *Arthritis Rheum* 63, 26-36 (2011).
27. Olsson, A.R.; Skogh, T.; Axelson, O.; Wingren, G. Occupations and exposures in the work environment as determinants for rheumatoid arthritis. *Occup Environ Med* 61, 233-238 (2004).
 28. Jin, Z.; Xiang, C.; Cai, Q.; Wei, X.; He, J. Alcohol consumption as a preventive factor for developing rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann RheumDis* (2013). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203323>
 29. Agmon-Levin, N.;Theodor, E.;Segal, R. M.; Shoenfeld, Y.Vitamin D in systemic and organ-specific autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 45, 256-266 (2013). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s12016-012-8342-y>
 30. Feser, M.; Derber, L. A.; Deane, K. D.; Lezotte, D. C.; Weisman, M. H.; Buckner, J. H.; et al. Plasma 25,OH vitamin D concentrations are not associated with rheumatoid arthritis (RA)-related autoantibodies in individuals at elevated risk for RA. *J Rheumatol*36, 943-946 (2009).
 31. Calviello, G.; Su,H. M.; Weylandt, K. H.; Fasano, E.; Serini, S.; Cittadini, A. Experimental Evidence of ω -3 Polyunsaturated Fatty Acid Modulation of Inflammatory Cytokines and Bioactive Lipid Mediators: Their Potential Role in Inflammatory, Neurodegenerative, and Neoplastic Diseases. *Biomed Res Int* 743171, (2013). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/743171>
 32. Miles, E. A.; Calder, P. C. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr Jun* 107 (Suppl S2), 171-184 (2012). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512001560>.
 33. Stamp, L. K.; James, M. J.; Cleland, L. G. Diet and rheumatoid arthritis: a review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 35,77-94 (2005).
 34. Costenbader, K.H.; Kang, J.H.; Karlson, E. W. Antioxidant intake and risks of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in women. *Am J Epidemiol* 172,205-216 (2010).
 35. Scher, J.U.; Ubeda, C.; Equinda, M.; Khanin, R.; Buischi, Y.; Viale, A.; et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 64, 3083-3094 (2012).
 36. Mangat, P.; Wegner, N.; Venables, P.J.; Potempa, J. Bacterial and human peptidyl arginase in edeiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 12, 209(2010). Disponible en: <http://arthritis-research.com/content/12/3/209>.
 37. Hitchon, C. A.; El-Gabalawy, H.S. Infection and rheumatoid arthritis: still an open question. *CurrOpinRheumatol* 23, 352-357 (2011).
 38. Van den Oever, I. A.; van Sijl, A. M.; Nurmohamed, M. T.Management of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: evidence and expert opinion. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 5, 166-81 (2013). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/1759720X13491025>.
 39. Ajeganova, S.; Andersson, M. L. &Hafström, I. Obesity is associated with worse disease severity in rheumatoid arthritis as well as with co-morbidities—a long-term follow-up from disease onset. *Arthritis Care Res* 65, 78-87 (2013). Disponible en:<http://dx.doi.org/10.1002/acr.21710>.
 40. Wolfe, F.; Michaud, K. Effect of body mass index on mortality and clinical status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 64, 1471-1479 (2012).
 41. Stavropoulos-Kalinoglou, A.; Metsios, G. S.; Panoulas, V. F.; Nightingale, P.; Koutedakis,Y.; Kitas, G. D. Anti-tumour necrosis factor α therapy improves insulin sensitivity in normal-weight but not in obese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14, R160 (2012).Disponible en: <http://arthritis-research.com/content/14/4/R160>.
 42. Isaacs, J. D. The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all?. *Nat Rev Immunol*10, 605-611 (2010).
 43. Goronzy, J. J.; Weyand, C. M. Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11, 249 (2009). Disponible en: <http://arthritis-research.com/content/11/5/249>.

44. Colmegna, I.; Pryshchep, S.; Oishi, H.; Goronzy, J. J.; Weyand, C. M. Dampened ERK Signaling in Hematopoietic Progenitor Cells in Rheumatoid Arthritis. *ClinImmunol*143, 73-82 (2012). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2012.01.007>.
45. Van Boxel, J. A.; Paget, S. A. Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes. *N Engl J Med* 293, 517-520 (1975).
46. Edwards, J. C.; Cambridge, G.; Abrahams, V.M. Do self-perpetuating B lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology* 97, 188-196(1999).
47. Astry, B.; Harberts, E.; Moudgil, K. D. A Cytokine-Centric View of the Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Arthritis. *J Interferon Cytokine Res* 31, 927-940 (2011). Disponible en:<http://dx.doi.org/10.1089/jir.2011.0094>.
48. Sánchez-Ramón, S.; López-Longo, F. J.; Carreño, L. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. *Reumatol Clin* 6(S3), S20-S24 (2011).
49. Kazuo Okamoto, K.; Takayanagi, H. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Res Ther*13, 219 (2011). Disponible en <http://arthritis-research.com/content/13/3/219>.
50. Arbolea, L.; Castañeda, S. Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *ReumatolClin* 9, 303-315 (2013).
51. Hamilton, J. A.; Tak, P. P. The dynamics of macrophage lineage populations ininflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 60, 1210-1221(2009).
52. Chang, S.K; Gu, Z.; Brenner, M. B. Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. *Immunol Rev* 233,256-266 (2010).
53. Hueber, A. J.; Asquith, D. L.; Miller, A. M.; Reilly, J.; Kerr, S.; Leipe, J.; et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 184, 3336-3340 (2010).
54. Dieguez-Gonzalez, R.; Calaza, M.; Perez-Pampin, E.; Balsa, A.; Blanco, F. J.; Canete, J. D;et al. Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor-kappaB and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Res Ther*11,R42 (2009).
55. Shegarfi, H.; Naddafi, F.; Mirshafiey, A. Natural Killer Cells and Their Role in Rheumatoid Arthritis: Friend or Foe?The Scientific World Journal 2012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/491974>
56. Yoshida, H.; Miyazaki, Y. Regulation of immune responses by interleukin-27. *Immunol Rev* 226, 234-247(2008).
57. Stack, R.J.; Sahni, M.; Mallen, C. D.; Raza K. Symptom complexes at the earliest phases of rheumatoid arthritis: A synthesis of the qualitative literature. *Arthritis Care Res* 2013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/acr.22097>
58. Ek, M.; Engblom, D.; Saha, S.; Blomqvist, A.; Jakobsson, P. J.; Ericsson-Dahlstrand, A. Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier. *Nature* 410, 430-431(2001).
59. Moreland, L. W.; Genovese, M. C.; Sato, R.; Singh, A. Effect of etanercept on fatigue in patients with recent or established rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 55, 287-293 (2006).
60. Kuriya, B.; Villeneuve, E.; Bombardier, C. Diagnostic and prognostic value of history-taking and physical examination in undifferentiated peripheral inflammatory arthritis: a systematic review. *J Rheumatol Suppl*, 87, 10-14 (2011).
61. Arnett, F. C.; Edworthy, S. M.; Bloch, D. A.; McShane, D. J.; Fries, J. F.; Cooper, N. S.; et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31, 315-324 (1988).
62. Harrison, B. J.; Symmons, D. P.; Barrett, E.M.; Silman, A. J. The performance of the 1987 ARA classification criteria for rheumatoid arthritis in a population based cohort of patients with early inflammatory polyarthritis. *American Rheumatism Association.J Rheumatol*25, 2324-2330 (1998).
63. Finckh, A.; Liang, M.H.; van Herckenrode, C.M.; de Pablo, P. Long-term impact of early treatment on radiographic progression in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Arthritis Rheum*55, 864-872 (2006).
64. Schneider, M.; Krüger K. Rheumatoid arthritis—early diagnosis and disease management. *Dtsch Arztebl Int* 110, 477-484 (2013).

65. Kay, J.; Upchurch, K. S. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford)* 51 (Suppl6), vi5-vi9 (2012). Disponible en <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/kes279>.
66. Van der Linden, M.P.; Batstra, M.R.; Bakker-Jonges, L.E.; Detert, J.; Bastian, H.; Scherer, H.U.; et al. Toward a data-driven evaluation of the 2010 American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism criteria for rheumatoid arthritis: is it sensible to look at levels of rheumatoid factor? *Arthritis Rheum* 63, 1190-1199 (2011).
67. Humphreys, J.H.; Symmons, D.P. Postpublication validation of the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: where do we stand? *Curr Opin Rheumatol* 25, 157-163 (2013).
68. Hulsemann, J. L.; Zeidler, H. Undifferentiated arthritis in an early synovitis out-patient clinic. *Clin Exp Rheumatol* 13, 37-43, (1995).
69. Mochan E, Ebell M. H. Predicting rheumatoid arthritis risk in adults with undifferentiated arthritis. *Am Fam Physician* 77, 1451-1453 (2008).
70. Lamana, A.; Balsa, A.; Rueda, B.; Ortiz, A. M.; Nuño, L.; Miranda-Carus, M. A.; et al. The TT Genotype of the STAT4 rs7574865 Polymorphism Is Associated with High Disease Activity and Disability in Patients with Early Arthritis. *PLoS ONE* 7, e43661 (2012). Disponible en <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043661>
71. Balsa A, Cabezón A, Orozco G, Cobo, T.; Miranda-Carus, E.; López-Nevot, M. A.; et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther* 12, R62 (2010). Disponible en: <http://arthritis-research.com/content/12/2/R62>
72. Lundberg, K.; Bengtsson, C.; Kharlamova, N.; Reed, E.; Jiang, X.; Kallberg, H.; et al. Genetic and environmental determinants for disease risk in subsets of rheumatoid arthritis defined by the anticitrullinated protein/peptide antibody fine specificity profile. *Ann Rheum Dis* 72, 652-658 (2013). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201484>
73. Ravelli, A.; Felici, E.; Magni-Manzoni, S.; Pistorio, A.; Novarini, C.; Bozzola, E.; et al. Patients with antinuclear antibody-positive juvenile idiopathic arthritis constitute a homogeneous subgroup irrespective of the course of joint disease. *Arthritis Rheum* 52, 826-832 (2005).
74. Yuasa, S.; Yamaguchi, H.; Nakanishi, Y.; Kawaminami, S.; Tabata, R.; Shimizu, N.; et al. Treatment responses and their predictors in patients with rheumatoid arthritis treated with biological agents. *J Med Invest* 60, 77-90 (2013).
75. Willemze, A.; Toes, R. E.; Huizinga, T. W.; Trouw, L. A. New biomarkers in rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 70, 392-399 (2012).
76. Disponible en: <http://www.omeract.org/>
77. Welsing, P. M.; van Gestel, A. M.; Swinkels, H. L.; Kiemeneij, L. A.; van Riel, P.L. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44, 2009-2017 (2001).
78. Anderson, J.K.; Zimmerman, L.; Caplan, L. ; Michaud, K. Measures of rheumatoid arthritis disease activity: Patient (PtGA) and Provider (PrGA) Global Assessment of Disease Activity, Disease Activity Score (DAS) and Disease Activity Score with 28-Joint Counts (DAS28), Simplified Disease Activity Index (SDAI), Clinical Disease Activity Index (CDAI), Patient Activity Score (PAS) and Patient Activity Score-II (PASII), Routine Assessment of Patient Index Data (RAPID), Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index (RADAI) and Rheumatoid Arthritis Disease Activity Index-5 (RADAI-5), Chronic Arthritis Systemic Index (CASI), Patient-Based Disease Activity Score With ESR (PDAS1) and Patient-Based Disease Activity Score without ESR (PDAS2), and Mean Overall Index for Rheumatoid Arthritis (MOI-RA). *Arthritis Care Res* 63(Suppl 11), S14-36 (2011).
79. Prevoo, M.L.; van 't Hof, M.A.; Kuper, H.H.; van Leeuwen, M.A.; van de Putte, L.B.; van Riel, P.L. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38, 44-48 (1995).
80. Hochberg, M. C.; Chang, R. W.; Dwosh, I.; Lindsey, S.; Pincus, T.; Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35, 498-502 (1992).
81. Emery, P.; Breedveld, F.C.; Hall, S.; Durez, P.; Chang, D.J.; Robertson, D.; et al. Comparison of methotrexate monotherapy with a combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double-blind, parallel treatment trial. *Lancet* 372, 375-382 (2008).

82. Ma, M.H.; Scott, I.C.; Kingsley, G.H.; Scott, D.L. Remission in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 37, 1444-1453 (2010).
83. Jayakumar, K.; Norton, S.; Dixey, J.; James, D.; Gough, A.; Williams, P.; et al. Sustained clinical remission in rheumatoid arthritis: prevalence and prognostic factors in an inception cohort of patients treated with conventional DMARDs. *Rheumatology (Oxford)* 51, 169-175 (2012).
84. Shammass, R.M.; Ranganath, V. K.; Paulus, H.E. Remission in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 12, 355-362 (2010).
85. Brown, A.K.; Conaghan, P.G.; Karim, Z.; Quinn, M.A.; Ikeda, K.; Peterfy, C.G.; et al. An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 2958-2967 (2008).
86. Maesea, J.; García De Yébenes, M. J.; Carmona, L.; Hernández-García, C.; el Grupo de Estudio emAR II. Estudio sobre el manejo de la artritis reumatoide en España (emAR II). Características clínicas de los pacientes. *Reumatol Clin* 8, 236-242 (2012).
87. Niedermann, K.; de Bie, R. A.; Kubli, R.; Ciurea, A.; Steurer-Stey, C.; Villiger, P. M.; et al. Effectiveness of individual resource-oriented joint protection education in people with rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Patient Educ Couns* 82, 42-48 (2011).
88. Steultjens, E. M.; Dekker, J.; Bouter, L. M.; van Schaardenburg, D.; van Kuyk, M. A.; Van den Ende, C. H. Occupational therapy for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 1,(2004). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD003114.pub2>.
89. Hewlett, S.; Ambler, N.; Almeida, C.; Cliss, A.; Hammond, A.; Kitchen, K.; et al. Self-management of fatigue in rheumatoid arthritis: a randomised controlled trial of group cognitive-behavioural therapy. *Ann Rheum Dis* 70, 1060-1067 (2011).
90. Hagen, K. B.; Dagfinrud, H.; Moe, R. H.; Østerås, N.; Kjekens, I.; Grotle, M.; et al. Exercise therapy for bone and muscle health: an overview of systematic reviews. *BMC Medicine* 10, (2012). Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/10/167>.
91. Tokuyama, S.; Nakamoto, K. Current Topics Lipid Mediators and Pain Signaling Unsaturated Fatty Acids and Pain. *BiolPharm Bull* 34, 1174-1178 (2011).
92. Yeoh, N.; Burton, J. P.; Suppiah, P.; Reid, G.; Stebbings, S. The role of the microbiome in rheumatic diseases. *Curr Rheumatol Rep* 15, 314 (2013). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11926-012-0314-y>.
93. Saag, K. G. Short-term and Long-term Safety of Glucocorticoids in Rheumatoid Arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 70(Suppl 1), S21-25 (2012).
94. Cheng, O. T.; Souzdanitski, D.; Vrooman, B.; Cheng, J. Evidence based knee injections for the management of arthritis. *Pain Med* June 13, 740-753 (2012).
95. Baggott, J. E.; Morgan, S. L. Methotrexate catabolism to 7-hydroxy methotrexate in rheumatoid arthritis alters drug efficacy and retention and is reduced by folic acid supplements. *Arthritis Rheum* 60, 2257-2261 (2009).
96. O'Dell, J. R.; Mikuls, T. R.; Taylor, T. H.; Ahluwalia, V.; Brophy, M.; Warren, S. R.; et al. Therapies for active rheumatoid arthritis after methotrexate failure. *N Engl J Med* 369, 307-318 (2013).
97. Smolen, J. S.; Aletaha, D. Forget personalized medicine and focus on abating disease activity. *Ann Rheum Dis* 72, 3-6 (2013).
98. Rosman, Z.; Shoenfeld, Y.; Zandman-Goddard, G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. *BMC Medicine* 11, 88 (2013). Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/11/88>
99. Malviya, G.; Salemi, S.; Laganà, B.; PicchiantiDiamanti, A.; D'Amelio, R.; Signore, A. Biological Therapies for Rheumatoid Arthritis: Progress to Date. *Bio Drugs* 27, 329-345 (2013).
100. Smolen, J. S.; Emery, P. Infliximab: 12 years of experience. *Arthritis Res Ther* 13 (Suppl 1), S2 (2011). Disponible en: <http://arthritis-research.com/supplements/13/S1/S2>.
101. Al-Shakarchi, I.; Gullick, N.J.; Scott, D. L. Current perspectives on tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis: a review. *Patient Preference and Adherence* 7, 653-666 (2013).
102. Smolen, J. S.; Schoels, M. M.; Nishimoto, N.; Breedveld, F.C.; Burmester, G.R.; Dougados, M. et al. Consensus statement on blocking the effects of interleukin-6 and in particular by interleukin-6 receptor inhibition in rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis* 72, 482-92 (2013). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202469>.

103. Athanasakis, K.; Petrakis, I.; Kyriopoulos, J. Investigating the Value of Abatacept in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review of Cost-Effectiveness Studies. *ISRN Rheumatology*, 2013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/256871>.
104. Kawalec, P.; Mikrut, A.; Wiśniewska, N.; Pilc, A. The effectiveness of tofacitinib, a novel Janus kinase inhibitor, in the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol* 32, 1415-1424 (2013).
105. Jin, X.; Ding, C. Belimumab - An anti-BLyS human monoclonal antibody for rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy* 13, 315-322 (2013).
106. Kurrasch, R.; Brown, J.C.; Chu, M.; Craigen, J.; Overend, P.; Patel, B.; et al. Subcutaneously administered ofatumumab in rheumatoid arthritis: a phase I/II study of safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *J Rheumatol* 40, 1089-1096 (2013).
107. Combe, B.; van Vollenhoven, R. Novel targeted therapies: the future of rheumatoid arthritis? Mavrilumab and tabalumab as examples. *Ann Rheum Dis* 72, 1433-1435 (2013).
108. Genovese, M.C.; Fleischmann, R.M.; Greenwald, M.; Satterwhite, J.; Veenhuizen, M.; Xie, L.; et al. Tabalumab, an anti-BAFF monoclonal antibody, in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to TNF inhibitors. *Ann RheumDis*72, 1461-1468 (2013).
109. Gómez Reino, J.; Loza, E.; Andreu, J. L.; Balsa, A.; Batlle, E.; Cañete, J. D.; et al. Consenso SER sobre la gestión de riesgo del tratamiento con terapias biológicas en pacientes con enfermedades reumáticas. *Reumatol Clin* 7, 284-298 (2011).
110. Umićević Mirkov, M.; Coenen, M.J. Pharmacogenetics of disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: towards personalized medicine. *Pharmacogenomics* 14,425-444 (2013).

Dry eye disease compounds currently under evaluation in clinical trials

Basilio Colligris, Jesús Pintor*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

*e-mail: jpintor@vet.ucm.es

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 1(2014), pág. 151-178

ABSTRACT

Dry eye syndrome is a common disorder provoking changes in tear quantity and composition being the most common ophthalmic manifestation of systemic inflammatory diseases. Untreated dry eye could cause increased risk of ocular infection, corneal ulcer and blindness. Only a few drugs are authorized so far for the treatment of dry eye disease and the possibilities of evolution in this sector are immense. Accordingly, the future tendency is towards the development of drugs to control the inflammation or stimulate the mucin and tear secretion. A significant number of new potential solutions are under development or placed in the pharmaceutical pipeline, promising better results and lesser side effects, but still leaving unattended the main causes of the disease. In this article, we review the corresponding literature, recent clinical trials data and patents concerning future pharmaceutical compounds for dry eye disease treatment, presenting the new strategic movements of the pharmaceutical industry.

Keywords: Dry eye; anti-inflammatory; keratoconjunctivitis sicca; keratitis sicca; xerophthalmia; mucin secretion; tear secretion; NSAID.

RESUMEN

Fármacos de la enfermedad de ojo seco actualmente en evaluación en ensayos clínicos

El síndrome de ojo seco es un trastorno bastante común, que provoca cambios en la cantidad y la composición de la lágrima, siendo la manifestación oftálmica más común de enfermedades inflamatorias sistémicas. El ojo seco no tratado puede provocar un aumento del riesgo de infección ocular, úlceras corneales y en casos extremos ceguera. Actualmente sólo unos pocos fármacos están autorizados para el tratamiento de la enfermedad y las posibilidades de evolución en este sector son inmensas. La tendencia del futuro está dirigida hacia el desarrollo de fármacos que controlan la inflamación o estimulan la secreción de las mucinas y del componente acuoso de las lágrimas. Un número significativo de nuevos compuestos están en desarrollo o ya están en ensayos clínicos, con aparentes mejores resultados y efectos secundarios menos adversos, pero una vez más dejando desatendidas las principales causas de la enfermedad. En este artículo revisamos la literatura correspondiente, los últimos datos de los ensayos clínicos y las patentes relativas a futuros compuestos farmacéuticos para el tratamiento de la enfermedad del ojo seco, desvelando los nuevos movimientos estratégicos de la industria farmacéutica.

Palabras clave: Ojo seco, anti-inflamatorios, queratoconjuntivitis sicca, queratitis seca, xeroftalmia, secreción de mucinas; secreción de lágrima; antiinflamatorios no esteroideos.

INTRODUCTION

Dry eye disease is a chronic ocular disorder affecting approximately 10-20% of the population worldwide, being relatively frequent among women especially after the menopause (1, 2). This pathology is closely related to the aging and it is progressively affecting larger parts of the population. Almost everyone experiences ocular irritation or the symptoms of dry eye under certain conditions, such as prolonged working on a computer, being in a dry environment or after using certain drugs (3-5). Patients with autoimmune diseases are prone to suffer from dry eye inflammation, which is a key factor in the onset of severe dry eye disease (6).

The pathology occurs when the ocular surface tear protective layer is weakened which could be the result of insufficient or atypical production of one or

more tear components (7). Tear film forms a moist natural barrier separating eye from the external media. This consistent film is formed mainly from a triplet of aqueous, mucous, and lipid layers providing the necessary equilibrium for the healthy maintenance of the ocular surface (Figure 1). The main functions of this film are: lubrication of the ocular surface, transfer of nutritional elements to the cornea, elimination of foreign matter and cellular debris generated on the ocular surface by the tear flow and the blink process, and acting as the first line of defense against ocular surface infections (8). In some cases, the imbalance of the tear film composite layers leads to reduced tear secretion, exposure of the eye surface, dryness and damage of the surface cells (6). The imbalance of the composite layers could be caused by Sjögren's syndrome tear secretion deficiency and/or tear film instability due to the use of contact lenses (6, 9, 10).

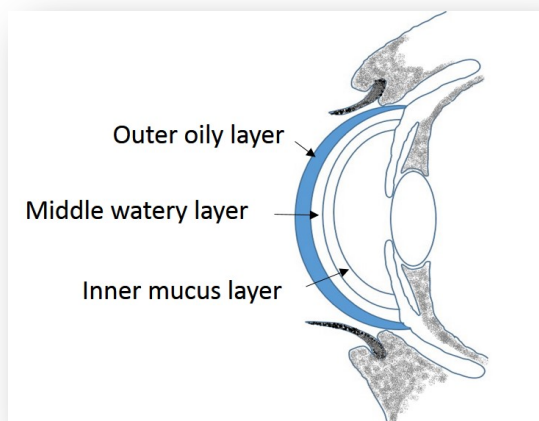


Figure 1.- Tear film layers.

Dry eye syndrome types are classified according to etiologic perspectives and environmental influences as: aqueous deficient dry eye (ADDE) and evaporative-tear dry eye (EDE) (6, 11). ADDE is divided to: related to Sjögren's syndrome (primary and secondary) and non-related to Sjögren's syndrome conditions (lacrimal disease, lacrimal obstruction and malfunctioning blinking reflex) (6). EDE conditions are: oil deficient, lid related and caused by an ocular surface alteration (6). Signs and symptoms of these complications can vary from patient to patient, sometimes with little or no correlation between them, even though they are generally related to the tear film composition. The signs and symptoms could include keratitis, conjunctival and corneal staining, redness, blurry vision, decreased tear film break-up time, decreased tear production, volume, and flow, increased conjunctival redness, excess debris in the tear film, ocular dryness, ocular grittiness, ocular burning, foreign body sensation in the eye, excess tearing, photophobia, ocular stinging, refractive impairment, ocular sensitivity, and ocular irritation (12, 13).

The clinical diagnosis of dry eye is challenging since dry eye is a pathology characterized by an extensive variety of signs and symptoms, mentioned above, related to ocular dryness and the ambiguity in the etiology and pathophysiology of

the disease is contributing to the difficulty of a precise diagnosis (14). Conventional tests include Schirmer test, tear break-up time (TBUT) and ocular surface staining, some of them considered as invasive and having a low degree of standardization. Another negative factor is the lack of knowledge on the pathophysiology of the disease and the unclear symptoms which could be confused with the symptoms of other conditions, such as conjunctivochalasis (which can easily induce an unstable tear film) or delayed tear clearance (which is a frequent cause of ocular irritation) (15). Other negative factors are the invasive nature of some of the diagnostic tests, which can make the interpretation of the results challenging or the use of the individual tests in very dissimilar scenarios, suggesting the application of different protocols. Nevertheless, tear film is a dynamic, open system subject to numerous internal and environmental variations, leading frequently to misinterpretations of the obtained results (16). In conclusion the variety of causative agents and the high number of ocular conditions with similar signs and symptoms make an accurate, differential diagnosis difficult, especially due to lack of correlation between signs and symptoms. Accurate testing and diagnosis of dry eye is crucial to the correct management of the condition and it is advisable the use of combinations of tests and sequences. Consequently, the creation of objective tests with precise diagnostic value is essential. The International Dry Eye Workshop (DEWS) diagnosis subcommittee classifies tests into five fundamental functional groups: Questionnaires, ocular surface staining tests, tear film stability tests, tear volume tests and tests to measure biological components (2).

Currently there are only a few pharmaceutical treatments for dry eye. In some countries like Japan, are commercialized more DED treatment drugs than in Europe and the USA as the approval rules are not so rigorous. Another important factor concerning DED treatment is that in most of the cases, the biotechnology companies are trying to sort out the problem based on “over the counter” strategies, trying to relieve symptoms rather than getting to the cause of the disease. Consequently, for the symptomatic relief of dry eye we could mention the following treatments currently used: Supplements called “artificial tears” which are synthetic lubricants, characterized by hypotonic or isotonic buffered solutions containing electrolytes, surfactants and several types of viscosity agents (17). The “artificial tears” permit not only the increase of tear quantity, but also to keep the ocular surface moistened and relieve discomfort. Another type of treatment is the tear retention devices/implants also known as punctal plugs. They have been

developed to occlude the lacrimal puncta and they can be absorbable and non-absorbable (18). These devices keep tears longer on the ocular surface relieving the patient's from the undesirable symptoms. Other type of treatment is the moisture chamber spectacles. It has been reported that increased periocular humidity can cause the tear film lipid layer to thicken and that spectacle wearers with dry eye have a longer inter-blink interval than the non-spectacle wearers (19). Current treatments are mainly focused on addressing inflammation and tear restoration (20). Dry eye disease is the outcome of many factors resulting in inflammation of cornea and conjunctiva. The dysfunction of the tear secretory glands leads to changes in tear composition such as hyper-osmolarity which stimulates the production of inflammatory mediators on the ocular surface. This inflammation can be initiated either by chronic irritative stress like wearing contact lens wearing or from a systemic inflammatory autoimmune disease like rheumatoid arthritis (21, 22). Anti-inflammatory drugs are widely used for the treatment of the inflammation produced by diseases. Topical corticosteroids can relieve moderate or severe dry eye symptoms and signs rapidly and effectively (23). Steroids on the other hand may cause severe side effects after prolonged use. The undesired effects vary from bacterial or fungal infection, elevated intraocular pressure and cataract formation. Additionally, steroids suppress locally the immune response in patients with already compromised ocular surface. Therefore, steroids are typically used only for a limited period of time in dry eye patients (20). Due to the above-mentioned reasons, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) credited as causing less severe side effects are recently evaluated as a potential dry eye treatment. The NSAIDs could decrease inflammation and eye discomfort due to their analgesic effect, but they might induce DED decreasing sensitivity. In 2002 U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved the drug *RESTASIS*® of the company Allergan as the first prescription medicine capable to increase tear production (24). Topical *RESTASIS*® is an ophthalmic emulsion containing cyclosporine 0.05%. Other types of drug used are the antibiotics like azithromycin, and tetracycline. Furthermore, some research groups are studying the use of serum tears and the intense pulse light as potential treatments (20). On the following pages, we present some future treatments currently passing clinical trials.

AL-2178/RIMEXOLONE

AL-2178/Rimexolone 1% (Figure 2) is a glucocorticoid steroid developed by Alcon, as a treatment for dry eye disease. Rimexolone inhibits T-cell

proliferation as well as cytokine production of activated CD4+ T-cells in a similar manner to dexamethasone (25). The compound passed successfully from Phase III clinical trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00471419) in May 2007 and now is marketed as a 1% eye drop suspension under the trade name Vexol by Alcon Laboratories (26).

LX214/VOCLOSPORIN

LX214-voclosporin (Figure 3) is an immunosuppressant drug developed by Isotechnika and Lux Biosciences. Voclosporin is a calcineurin inhibitor, analog of cyclosporin with enhanced action against calcineurin and a greater metabolic stability. It is already used as a treatment of various forms of non-infectious uveitis (27). The two companies are evaluating voclosporin ophthalmic solution as a treatment for dry eye disease in a Phase I clinical trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00851734), but did not publish results over its efficacy (28).

TOFACITINIB

Pfizer Inc. developed a JAK inhibitor called *Tofacitinib* (formerly CP-690550 - *Tasocitinib*) (Figure 4) capable to interfere the JAK-STAT signaling pathway, which transmits extracellular information into the cell nucleus, influencing DNA transcription (29). The company concluded phase I/II trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00784719) in patients for various disorders including dry eye disease. The trials demonstrated improvement in the signs and symptoms on dry eye patients and the use of the drug was well tolerated and without severe side effects (30). Huang and colleagues conducted a study to 82 patients with moderate to severe dry eye disease, treated for eight weeks with 0.0001% to 0.005% *tofacitinib* once or twice daily. The patients showed reduction in conjunctival cell surface HLA-DR expression, tear levels of pro-inflammatory cytokines and inflammation markers. The markers in tears included MMP-9, IL-15, IL-17A, and IL-12p70 (31).

NUTRILARM®-OMEGA-3 AND OMEGA 6 FATTY ACIDS-T1675

Omega-3 and omega-6 essential fatty acids (EFA) are the origin of a family of compounds called eicosanoids. Eicosanoids are signaling molecules produced by the oxidation of 20-carbon fatty acids and they are mediators of various inflammatory processes. In general, the omega-3 derived compounds, systemic

linoleic (LA) and gamma-linolenic acid (GLA) are reducing eye inflammation, and n-6 pathway eicosanoids are considered as promoting inflammation (32, 33). Omega-3 and omega-6 EFAs are used for dry eye treatment due to their anti-inflammatory effects such as the drug *Nutrilarm*® of the French company Théa Laboratoires, which is already commercialized in Europe. This medicine uses a supplementation of omega-3 and omega-6 fatty acids, which according to the company reduce expression of the conjunctival inflammatory marker human leucocyte antigen-DR (HLA-DR) and may help improving DED symptoms. The compound past in 2006 from Phase II clinical trials in US (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00357201) but the company decided to continue the pre-clinical development to resolve efficacy and doses issues (34-36).

ORAL OMEGA-3-ACID ETHYLESTERS

Pennsylvania State University and the American Society of Cataract and Refractive Surgery Foundation (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01107964) started in April 2010 a clinical study, based on the hypothesis that oral omega-3-acid ethyl esters (Lovaza, GlaxoSmithKline) will decrease the dry-eye related symptoms as well as clinical markers associated to dry eye disease. The preliminary results of the study are positive but more research is needed to define the composition and dosing of the treatment. From the results it was confirmed the relationship between EFA supplementation and improvement in dry eye symptoms in patients (37). Nevertheless before any anti-inflammatory therapy is necessary a detailed examination of a patient due to the complexity of the disease and to provide individual and successful treatment (38).

SECUKINUMAB AND CANAKINUMAB

Novartis Pharmaceuticals Inc. presented two novel antibodies, Secukinumab (AIN457) and Canakinumab (ACZ885). Secukinumab is a fully human monoclonal antibody designed to bind selectively, inhibiting the member A of interleukin 17cytokine family, a key driver of immune-mediated diseases. Canakinumab is a fully human monoclonal antibody, inhibiting solely interleukin 1 β (IL-1 β), the form of the interleukin-1 protein that is the main cause of various inflammatory diseases (39). Currently both antibodies are under development as treatments of a wide range of auto inflammatory diseases. In November 2010 Novartis started a Phase II study on effects of a single intravenous administration of Secukinumab 10 mg/kg or Canakinumab 10 mg/kg on 72 dry eye patients

(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01250171). The study reports suggest that both substances are well tolerated in most patients, and no serious adverse effects have been reported. The drugs provide significant advantages over existing competitive therapies, including bimonthly administration and an approved use in children (40-42).

MIM-D3

Mimetogen Pharmaceuticals Inc. is developing MIM-D3, a small molecule mimicking the nerve growth factor (NGF) activity (Figure 5). NGF stimulates the conjunctival cell glycoconjugate secretion and during *in vivo* trials demonstrated therapeutic efficacy on dry eye disease (43). NGF plays an important role in ocular surface maintenance, corneal wound healing, displaying a mucin secretagogue activity in conjunctival cells (44). Jain and colleagues during evaluation studies demonstrated that a 1% MIM-D3 dose increased glycoconjugate concentration, improving the quality and stability of tear film and the healing on the ocular surface in dry eye (45). Mimetogen conducted Phase II safety and efficacy studies (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01257607) from December 2010 to October 2012, on 150 patients with the application of 1% MIM-D3 and 5% MIM-D3 for 28 days. Unfortunately the target primary endpoints were not met completely. Despite this negative development the company continues the development considering MIM-D3 as a potent compound (46).

DIFLUPREDNATE

Alcon is evaluating the corticosteroid Difluprednate-Durezol, a butyrate ester of 6(alpha),9(alpha)-difluoro prednisolone acetate as a potential treatment for dry eye disease (Figure 6) (47). This corticosteroid is preventing the phospholipid release and decreases the eosinophil action. *Durezol* received approval from the FDA in 2008 as the first ophthalmic steroid for the postoperative inflammation and pain. Alcon started clinical trials Phase II (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01276223) in January 2011 for the Difluprednate ophthalmic emulsion 0.05%, one drop in each eye twice per day, on 726 patients, as an anti-inflammatory treatment of dry eye disease. Mulki and colleagues are suggesting that difluprednate 0.05% ophthalmic emulsion exhibits enhanced penetration, decent bioavailability, rapid local metabolism and strong efficacy, with a low incidence of adverse effects and a comparable safety profile (48).

CIS-UROCANIC ACID

LaurantisPharma Ltd and Kuopio University Hospital are developing eye drops containing Cis-urocanic acid (cis-UCA) as treatment for ocular surface inflammation associated with moderate to severe dry eye syndrome. Cis-urocanic acid inhibits the SAPK/JNK signaling pathway in ultraviolet B (UV-B) exposed human corneal epithelial cells *in vitro*, having important implications in the management of inflammatory eye conditions since chronic stress is directly linked to cytotoxicity in epithelial cells. During tests it was demonstrated that is inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines from human conjunctival and corneal epithelial cells after UV-B-induced stress reaction (49, 50). Preclinical studies in relevant animal models of eye inflammation also demonstrated that cis-UCA may be a safer and more effective alternative to current drugs used for acute and long-term treatment of dry eye. From November 2011 to May 2012 Laurantis conducted Phase I (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01476332), safety, tolerability and pharmacokinetics studies of 0.5% and 2.5% Cis-UCA eye drops in adult healthy volunteers. The results are not published, but the company continues the development of the compound.

THYMOSIN BETA 4

RegeneRx Biopharmaceuticals is developing RGN-259 which is a 0.1% Thymosin Beta 4 (T β 4) ophthalmic solution as a novel therapeutic treatment for dry eye (51, 52). Thymosin Beta 4 is a synthetic version of a naturally occurring peptide, used clinically as a tissue repair and regeneration peptide (53). In human body is a protein encoded by the TMSB4X gene (GenBank accession number: NC_000023.10). During preclinical evaluations it was demonstrated that T β 4 is promoting corneal epithelial intercellular adhesions following injury in animal models of dry eye (54). In June 2011 RegeneRx started Phase II safety and efficacy studies (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01387347) of the RGN-259 ophthalmic solution in patients with dry eye syndrome. The study has been completed in December 2012 and in ARVO 2012 the company presented the results, claiming the statistically significant reduction in central corneal fluorescein staining from baseline compared to placebo and also a greater reduction in exacerbation of ocular discomfort (55).

BELIMUMAB

Belimumab is a human monoclonal antibody inhibiting B-cell activating factor (BAFF) and is developed by the University of Udine as a treatment for Sjögren's syndrome. Sjögren's syndrome is a systemic autoimmune disease characterized by an increase in BAFF (BLyS) levels resulting in B cell hyperactivity. B cells are involved in the pathogenesis of SS in both systemic and glandular features, and B cell down regulation may lead to a decrease of disease activity. Moreover, pathogenesis of SS is closed to that of systemic lupus erythematosus, where *belimumab* has been proven to be effective. Currently the compound is under Phase II clinical trials evaluation (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01160666) and the initial results are promising (56).

RITUXIMAB

Rituximab (CD20) is developed by IDEC Pharmaceuticals as a treatment for Sjögren's syndrome. CD20 antigen is targeting cells of the B-cell lineage, leading to transient blood B-cell depletion, leaving aside stem cells (57). *Rituximab* is already approved by the U.S. Food and Drug Administration in 1997 as a treatment of B-cell non-Hodgkin lymphomas resistant to other chemotherapy regimens. The compound currently is tested in Phase III clinical trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00740948) to study the tolerance and efficacy of rituximab injection in Sjögren's disease (58, 59).

LOTEMAX

Bausch & Lomb, Inc. is re-purposing the already approved drug *Lotemax* with topical cyclosporine ophthalmic emulsion 0.05% (*Restasis*) as a possible treatment of dry eye. *Lotemax* (loteprednoletabonate-LE) (Figure 7) (60) is an ester corticosteroid with a high therapeutic index, containing an ester rather than a ketone, at carbon-20 of the prednisolone core structure. LE is indicated for the treatment of steroid responsive inflammatory conditions associated to the palpebral and bulbar conjunctiva, cornea, and anterior segment of the globe. Its mechanism of action is to block the inflammatory mediators treating the inflammation associated with the dry eye disease. Cyclosporine A as already mentioned above is a standard molecule against inflammation with efficacy in dry eye disease, enhancing or restoring the lachrymal gland secretion in patients suffering from this syndrome (61). An advantage of topical loteprednol

pretreatment is the reduction of Cyclosporine stinging in chronic dry eye disease (62). *Lotemax* ophthalmic suspension, 0.5% completed Phase II studies (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00560638) in July 2011. From the results it was confirmed its ability to reduce the eye inflammation rapidly, causing limited side effects. Additionally in 2012 Wan and colleagues performed a study on 34 patients, confirming the efficacy of topical 0.5% loteprednol etabonate ophthalmic suspension for the treatment of moderate dry eye (63).

ECABET-SODIUM

Bausch & Lomb Inc. is developing a prescription eye drop for the treatment of dry eye syndrome called *Ecabet* (Accession Number: DB05265). Sulfodehydroabietic acid monosodium salt pentahydrate or ecabet sodium, represents a new class of small diffusible molecules capable of increasing the quantity and quality of mucin produced by conjunctival goblet cells and corneal epithelia (Figure 8) (64). This ability makes the compound quite interesting as a treatment for muco-deficient dry eye. *Ecabet* possible mechanism of action is through the targeting of the prostaglandin E2 pathway, inhibiting the pepsin formation, increasing blood flow and downregulating the reactive oxygen species on the ocular surface. (65). It is marketed in Japan by Senju Pharmaceutical as an oral agent for gastric ulcers and gastritis treatment (66). Bausch & Lomb organized from April 2008 to January 2013 Phase II efficacy and safety studies for *Ecabet* ophthalmic solution with the purpose of treating the dry eye syndrome (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00667004) in 183 patients. Bausch & Lomb Inc. did not yet distribute results information.

BOL-303242-X

Pharmaceutical R&D, Bausch & Lomb Inc., presented the drug BOL-303242-X (mapracorat) (Figure 9) a selective glucocorticoid receptor agonist, as a possible treatment for inflammatory skin and eye diseases. This agonist is binding to the glucocorticoid receptor with an affinity similar to dexamethasone. Zhang and colleagues demonstrated during *in vitro* and *in vivo* studies that BOL-303242-X inhibited interleukin-1 β (IL-1 β) and induced decreases of inflammation in human corneal epithelial cells. It is possible that BOL-303242-X is acting as an anti-inflammatory agent in various primary human ocular cells with similar activity to classical steroids. As mechanism of action it is suggested its interference in human ocular cells MAPK (p38 and JNK) and NF κ B signaling pathways (67). Vollmer T.R.

and colleagues confirmed that mapracorat exerts its anti-inflammatory effects, at least in part, by augmenting MAPK phosphatase-1 (MKP-1) expression (68). The compound has an improved side-effect profile, compared to classical glucocorticoids. On the other hand further research is necessary due to reports of skin atrophy produced in some patients (69). Bausch & Lomb performed Phase II studies on 350 patients, to assess the safety and efficacy of 0.3%, 2% BOL-303242-X in dry eye syndrome, (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01163643) from July 2010 to November 2012 but did not publish results.

AL43546

AL43546 is an ophthalmic solution developed by Alcon. It is consisted of hydroxypropyl guar galactomannan 0.15% or 0.25% (Figure 10). Guar galactomannan is used to add viscosity to artificial tears. In September 2008 Alcon started a Phase II clinical pharmacological study of AL-43546 ophthalmic compound in subjects with shortened tear film break up time, to study the lacrimal fluid condition chronologically after a single dose of AL-43546 ophthalmic solution (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00760045) (70). The results were not published.

SIROLIMUS-RAPAMYCIN

Sirolimus is an antibiotic demonstrating immunosuppressive and anti-inflammatory properties. Its mechanism of action is to block T-cell activation and proliferation, to activate p70 S6 kinase and to inhibit significantly the production of Th1 cytokines (IFN γ , IL-2 and TNF) (71). Its name is derived from a native word from Easter Island, Rapi Nui (Figure 11). Santen Pharmaceutical is working with subconjunctival injections of sirolimus as a mTOR inhibitor to treat dry eye (72). It is reported that the activation of rapamycinmTOR signaling mediates nerve growth factor (NGF) inducing cell migration (73). From December 2008 to July 2010, Santen realized a Phase II dose-ranging clinical study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00814944) to assess the safety and efficacy of subconjunctival injection of sirolimus on 143 patients with dry eye in a controlled adverse environmental (CAE) model. The doses applied were 220, 440 and 880 micrograms of rapamycin. The results indicated that sirolimus is safe and tolerable with no systemic adverse events noted, demonstrating bioactivity as immunomodulatory and corticosteroid-sparing agent. It is proved capable to reduce vitreous haze and cells, improving visual acuity (74).

ISV-101

ISV-101 is a new drug of the company InSite Vision incorporating a low dose of the non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) bromfenac (Figure 12) and a flow-able mucoadhesive polymer of *DuraSite* technology (75). This combination enables a slow release of bromfenac over a longer period of time. Consequently the eye aqueous humor is absorbing and retains a higher dose of bromfenac. The extension of the duration of drug residence on the surface of the eye enables better penetration, improving efficacy, safety and dosing. Initial data from previous clinical studies evaluating this combination demonstrated a favorable safety profile. The company started Phase II clinical trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01478555) in July 2012 on 150 patients to evaluate the safety, tolerability, and efficacy in topical administration of different dose regimens of the ISV-101.

ESBA-105

ESBATEch developed ESBA-105 a single-chain antibody fragment that targets tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (76). Selective inhibition of TNF- α has the potential of modulating the inflammatory and immune response. Preclinical studies demonstrated that topically administered ESBA105 attains therapeutic levels in both the anterior and posterior segments of the eye without a need of a penetration enhancer. Consequently, its drug penetration and ocular bio-distribution appear highly attractive for clinical use to treat TNF- α connected eye diseases (77). Alcon after the fusion with ESBATEch conducted Phase II clinical trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01338610) in April 2011 up to February 2012 to evaluate the efficacy of ESBA-105 10 mg/mL in 90 patients with severe dry eye experiencing persistent ocular discomfort. The results demonstrated that the compound topically applied penetrated into the anterior chamber of the human eye at therapeutic levels (78).

DA-6034

Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd is developing a MMP-9 inhibitor called DA-6034, consisting of 7-carboxymethoxy-3',4',5-trimethoxy flavone monohydrate (Figure 13) as possible treatment for dry eye. DA-6034 is a synthetic derivative of eupatilin, a pharmacologically active flavone, capable to increase secretion of mucin-like glycoprotein. It may increase as well the secretion of some mucin species in conjunctiva and cornea. Mucin is a glycoprotein lubricating component of tear film able to weaken moisture loss from tear evaporation. Choi and

colleagues verified that DA-6034 at concentrations above 100 microM increased mucin-like glycoprotein levels in animal models, in conjunctival and corneal epithelial cells (79). Furthermore in human conjunctival epithelial cells, DA-6034 treatment in doses of 200 microM increased mucin secretion between the transmembrane mucins MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, and MUC16 (79). Seo and colleagues investigated the inhibiting effect of DA-6034 MMP-9 on inflammatory cytokines and the activation of the MAPK signaling pathway on rabbit inflammation models. It was demonstrated that DA-6034 could restore tear function and inhibit inflammatory responses reducing the phosphorylation of Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK, inhibiting the nuclear factor kappa B cells (NF-κB) activation in corneal epithelial cells (80). The NF-κB is a key transcription factor pathway, responsible for many key biological processes, such as inflammation, apoptosis, stress response, corneal wound healing, and angiogenesis (81). The company Dong-A started a Phase II study of DA-6034 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01670357) in January 2012 to determine the efficacy and safety of 3% or 5% DA-6034 eye drops on 150 patients with doses of one drop/each eye, four times/day, for four weeks.

RX-10045

Resolvix Pharmaceuticals developed RX-10045 (Figure 14) a small lipid mediator as a product candidate for the treatment of ocular surface and anterior segment diseases (82). In 2010 Celtic Therapeutics and Resolvix Pharmaceuticals started to collaborate in the development of the compound. RX-10045 is a synthetic resolvin E1 (RvE1) analog formulated for topical application treatment of eye disease as a potent mediator of inflammatory resolution, endogenously produced by the human body from omega-3 fatty acid (83). In pre-clinical dry eye models, RX-10045 has demonstrated potent efficacy. The compound successfully completed a Phase II study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00799552) in dry eye patients and according to the companies it demonstrated significant symptom improvement from baseline (as assessed in subject diaries), and performed significantly better than placebo on the primary endpoint of the worst symptom score with a 75% reduction in controlled adverse environment-induced central corneal staining from baseline (84). RX-10045 was evaluated in another Phase II study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01675570) from August 2012 to February 2013 on 150 patients for the treatment of dry eye disease but the results are not yet published.

TOBRADEX

TobraDex was approved by FDA as dry eye treatment in 1988. *TobraDex* is a combination of tobramycin and dexamethasone (Figure 15). Tobramycin is an aminoglycoside antibiotic-antibacterial derived from streptomycetenebrarius and is used to treat various types of eye infections. It is working through binding to a site on the bacterial 30S and 50S ribosome, preventing formation of the 70S complex, inhibiting mRNA to be translated into protein (85). Dexamethasone is a potent synthetic member of the glucocorticoid class of steroid drugs used to reduce the inflammation and relieve the symptoms of the inflammatory eye (86). The combination of tobramycin/dexamethasone might be an interesting solution for dry eye problems caused by inflammation and infection. Lately Alcon is evaluating a reformulation of *TobraDex* decreasing the amount of the steroid (from 0.1% to 0.05%) adding an inactive agent (xanthan gum), to stabilize the combination and to deliver more of each drug to the eye. The composition provides longer ocular retention for enhanced ocular bioavailability of tobramycin and dexamethasone and improved suspension of dexamethasone (87). Alcon executed Phase III clinical trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00576251) in June 2007 for *TobraDex* ophthalmic suspension, containing 0.3% of tobramycin and 0.05% and now is marketing the product as an antibiotic to treat bacterial infections.

SYL1001

The Spanish biotechnology company Sylentis is developing the compound SYL1001, which is decreasing the pain related to dry eye disease, is acting by targeting the TRPV1 gene expression on the ocular surface (interference RNA, RNAi) (84, 85). This is an interesting approach as gene silencing is an attractive aspect avoiding the activity of some proteins by inhibiting its synthesis. In November 2010 Sylentis started a Phase II safety/efficacy study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01776658) on patients with common mild to moderate dry eye symptoms and persistent daily symptoms for more than three months. The study is still ongoing but the initial results are very promising.

R932348

Rigel Pharmaceuticals is working on R932348 2,4-pyrimidinediamine, a small JAK3 molecule inhibitor, as a possible treatment for autoimmune diseases (Figure 16) (88). During trials it was observed that systemic levels of IL-17, IL-22, IL-23, and TNF- α were significantly lower in mice receiving the compound, and T

cells isolated from R932348-treated mice also showed reduced phosphorylation of Stat5 after stimulation with IL-2 (89). The company in July 2013, started Phase II safety, tolerability and pharmacokinetics studies (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01900249) for 0.2% and 0.5% R932348 ophthalmic solution in patients with dry eye disease.

EBI-005

Eleven Biotherapeutics is developing chimeric IL-1 receptor type I agonists and antagonists as dry eye treatment. These non-naturally occurring cytokine domains can modulate cellular signaling response to interleukin-1 receptor I (IL-1 RI), and to detect and or even bind on cellular receptors(90). The drug started in December 2012 Phase I multi-center clinical trials (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01745887) with the name EBI-005-2, an IL-1 receptor blocker, single-domain protein, optimized for topical ocular delivery. The EBI-005 has been validated in clinical proof-of-concept studies in which IL-1 blockage was shown to be safe and well tolerated without adverse side effects. According to the results presented in ARVO 2012 (91) it was created by combining the IL-1 receptor binding the sub-domains IL-1 β and IL-1Ra. During the pre-clinical trials EBI-005 was shown more active than topical Cyclosporine (the active ingredient of *Restasis*[™] ophthalmic emulsion eye drops) in mouse models. Topical delivery resulted in distribution to multiple eye compartments, but very low systemic exposure in rabbits (F < 0.2%). EBI-005 was 9°C more thermally stable than anakinra an interleukin-1 receptor antagonist (92). Eleven Biotherapeutics presented promising preliminary clinical data from the trials.

CONCLUDING REMARKS

Many of the above mentioned potential drugs are anti-inflammatory compounds and some are mucin secretagogue, promoting mucin and water production, and also there are a few eye lubricants. Most of the anti-inflammatories are corticosteroids because of their noteworthy anti-inflammatory properties and rapid action. Normally they are used for a limited period of time and depending on the severity of the case, after treatment the patient returns to the initial inflammatory condition. This limitation makes them unsuitable for chronic dry eye therapy as steroidal compounds present important side effects, such as increase in intraocular pressure and posterior sub-capsular cataract (93).

A critical point to highlight is that all of the above-mentioned potential new drugs are centering their action mainly towards symptoms, controlling inflammation or restoring the normal amount of tears but none of them is addressing the causative mechanisms of the disease leaving its cause unattended. Developing a new drug for the treatment of DED has become a key target for the pharmaceutical industry. Even though dry eye is the most widespread eye disorder, there is limited offer of effective therapeutic agents. Dry eye disease is not a life-threatening disorder and its symptoms are not severe, but the overarching complexity of the syndrome makes it challenging to manage. Many of the candidate dry eye agents are failing FDA testing, even though some of them are approved in Asia and Europe, mainly because of the tight clinical trials regulations in the USA. Other reasons for this frequent failure are the nature of the syndrome and the lack of an objective test for the diagnosis of the severity of the disease, because usually symptoms evaluation is insufficient as a measurement factor. There are several proposals for new, objective tests such as molecular markers (94, 95) and tear film osmolarity tests (96, 97) but at the moment none of them has advanced beyond the pre-clinical evaluation. Dozens of companies have placed under development a vast variety of new drug candidates in their pharmaceutical pipelines and most of these drugs have already approved as treatment for other diseases as identical biological pathways can be active in different ways in various diseases. Discovering new uses for old drugs can ensure important financial benefits, for patients as well as for biotechnology companies, lowering costs and shortening the approval timelines.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Spanish Ministry of Economy and Competition (Project SAF2010-16024) and the Ministry of Health Social Services and Equality (Project RETICS RD12/0034/0003) for their funding contribution to this publication.

Table 1.- Drugs and properties.

Drug	Company	Properties	Phase
AL-2178/Rimexolone	Alcon/Novartis	Anti-inflammatory	Phase III
LX214/Voclosporin	Isotechnika and Lux Biosciences	Anti-inflammatory	Phase I
Tofacitinib	Pfizer Inc.	Anti-inflammatory	Phase II
Nutrilmarm®-Omega-3 and Omega 6 fatty acids	ThéaLaboratoire	Anti-inflammatory	Phase II
Omega-3-acid ethyl esters	Lovaza, GlaxoSmithKline	Anti-inflammatory	Phase I
Secukinumab and Canakinumab	Novartis Pharmaceuticals	Anti-inflammatory	Phase II
MIM-D3	Mimetogen Pharmaceuticals	Mucin secretagogue	Phase II
Difluprednate-Durezol	Alcon/Novartis	Anti-inflammatory	Phase II
Cis-urocanic acid	LaurantisPharma	Anti-inflammatory	Phase I
Thymosin Beta 4	RegeneRx Biopharmaceuticals, Inc.	Anti-inflammatory	Phase II
Belimumab	University of Udine	Anti-inflammatory	Phase II
Rituximab	IDEC Pharmaceuticals	Anti-inflammatory	Phase III
Lotemax	Bausch & Lomb Inc.	Anti-inflammatory	Phase II
Ecabet sodium	Bausch & Lomb Inc.	Mucin secretagogue	Phase II
BOL-303242-X (mapracorat)	Bausch & Lomb Inc.	Anti-inflammatory	Phase II
AL43546	Alcon/Novartis	Artificial tears	Phase II
Sirolimus-Rapamycin	Santen Pharmaceutical	Anti-inflammatory and immunosuppressive	Phase II
ISV-101	InSite Vision	Anti-inflammatory	Phase II
ESBA-105	Alcon and ESBATech	Anti-inflammatory	Phase II
DA-6034	Dong-A Pharmaceutical Co.	Mucin secretagogue	Phase II
RX-10045	Resolvix Pharmaceuticals	Anti-inflammatory	Phase II
Tobradex (tobramycin/dexamethasone)	Alcon/Novartis	Anti-inflammatory	Phase I
SYL1001	Sylentis	Lowers dry-eye related pain	Phase II
R932348	Rigel Pharmaceuticals	Anti-inflammatory	Phase II
EBI-005	Eleven Biotherapeutics	Anti-inflammatory	Phase I

Table 2.- Drug Chemical Structures.

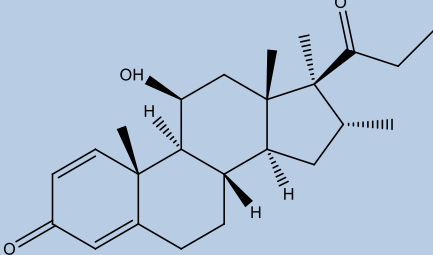
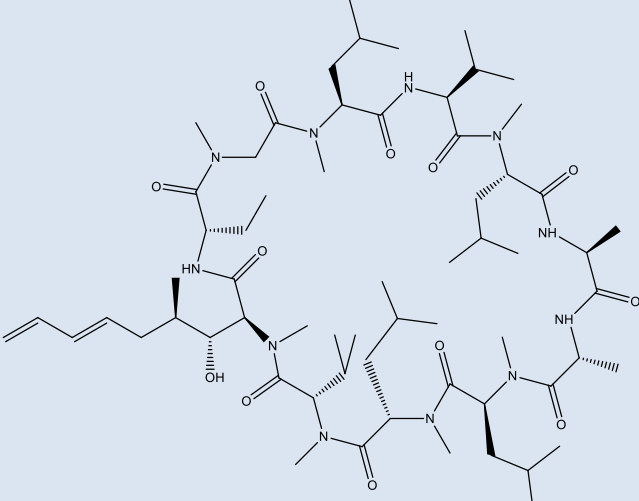
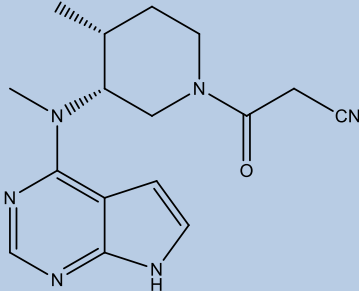
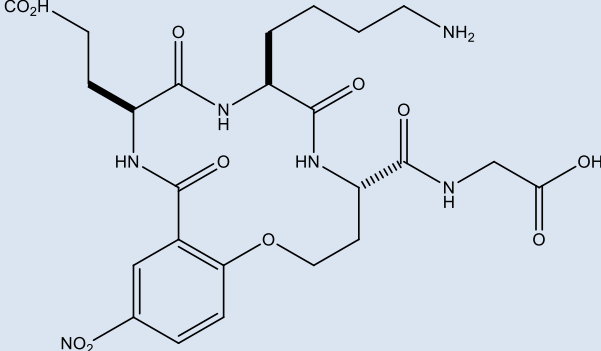
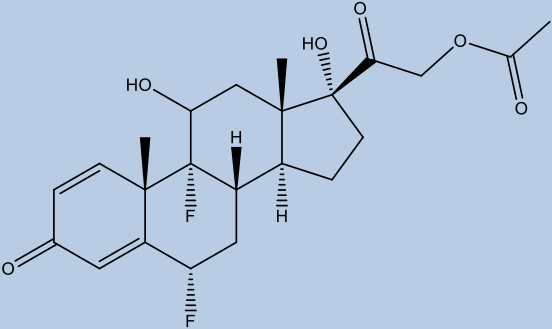
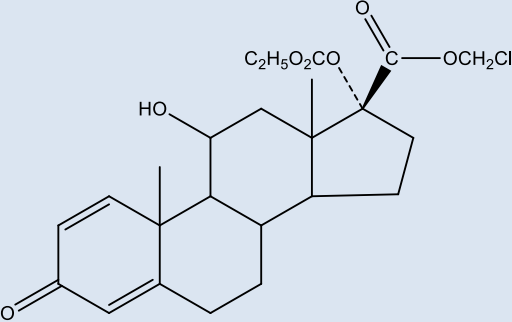
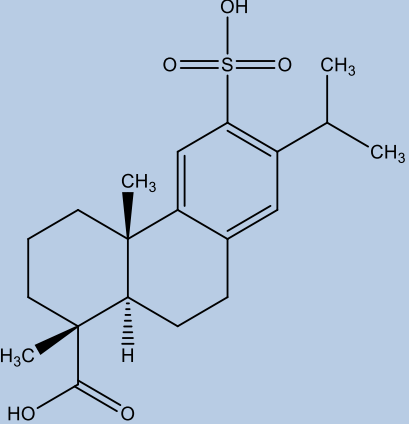
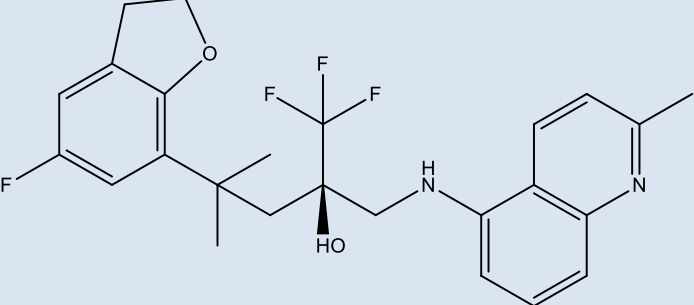
Fig. 2	Drug	Chemical structure
	AL-2178/ Rimexolone	 <p>The chemical structure of Rimexolone (AL-2178) is a complex polycyclic molecule. It features a central piperidine ring fused to a pyridine ring, which is further fused to a cyclohexane ring. The structure includes several stereocenters, a hydroxyl group, and a propyl ester group.</p>
	LX214/ Voclosporin	 <p>The chemical structure of Voclosporin (LX214) is a large, complex macrocyclic molecule. It consists of a 14-membered ring containing multiple amide bonds, several stereocenters, and a terminal diene group. The structure is highly symmetrical and complex.</p>
	Tofacitinib	 <p>The chemical structure of Tofacitinib is a bicyclic molecule. It features a fused pyridine and imidazole ring system. The structure includes a piperidine ring, a methyl group, and a nitrile group.</p>
	MIM-D3	 <p>The chemical structure of MIM-D3 is a complex molecule with multiple amide bonds and a nitro group. It features a central benzene ring with a nitro group, a carboxylic acid group, and several amide linkages connecting various side chains.</p>

Fig. 6	Difluprednate-Durezol	 <p>The chemical structure of Difluprednate-Durezol is a corticosteroid. It features a four-ring steroid nucleus with a ketone group at C3, a double bond between C4 and C5, and a hydroxyl group at C11. At C17, there is a side chain consisting of a hydroxyl group, a methyl group, and a propyl ester group (acetate). Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>
Fig. 7	Lotemax	 <p>The chemical structure of Lotemax (betamethasone) is a corticosteroid. It has a four-ring steroid nucleus with a ketone at C3, a double bond between C4 and C5, and a hydroxyl group at C11. At C17, there is a side chain with a hydroxyl group, a methyl group, and a propyl ester group (ethyl chloroacetate). Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>
Fig. 8	Ecabet sodium	 <p>The chemical structure of Ecabet sodium is a steroid. It features a four-ring steroid nucleus with a ketone at C3, a double bond between C4 and C5, and a hydroxyl group at C11. At C17, there is a side chain with a hydroxyl group, a methyl group, and a propyl ester group (sulfonamide). Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>
Fig. 9	BOL-303242-X (mapracorat)	 <p>The chemical structure of BOL-303242-X (mapracorat) is a steroid. It features a four-ring steroid nucleus with a ketone at C3, a double bond between C4 and C5, and a hydroxyl group at C11. At C17, there is a side chain with a hydroxyl group, a methyl group, and a propyl ester group (sulfonamide). Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>

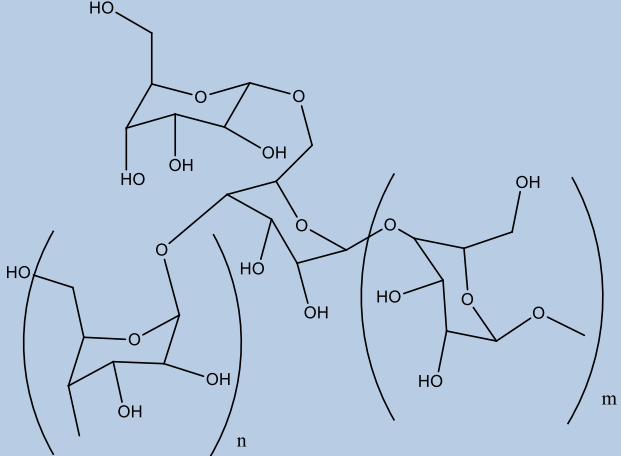
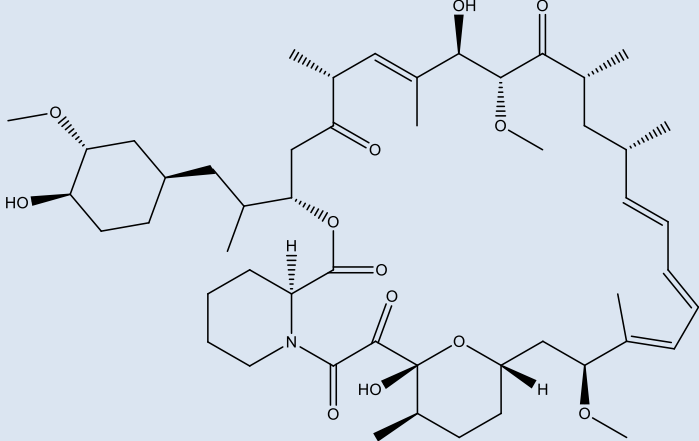
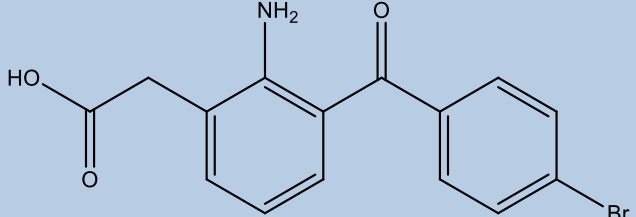
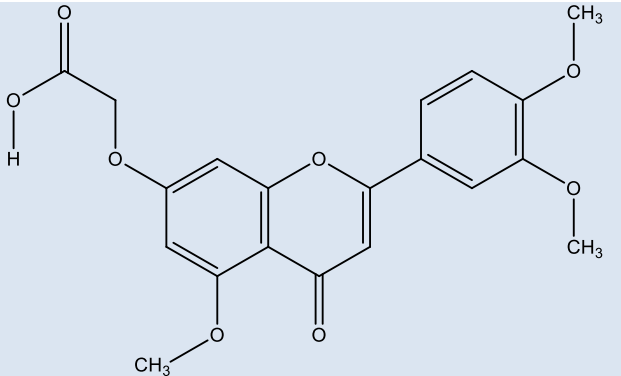
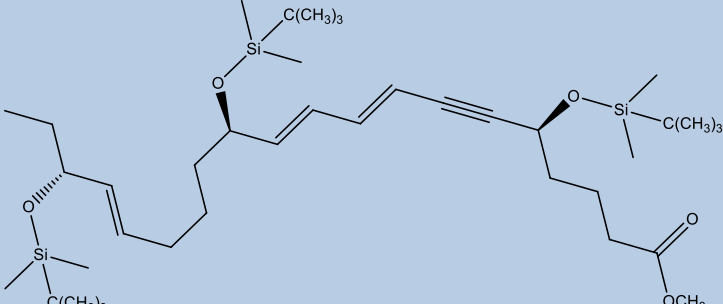
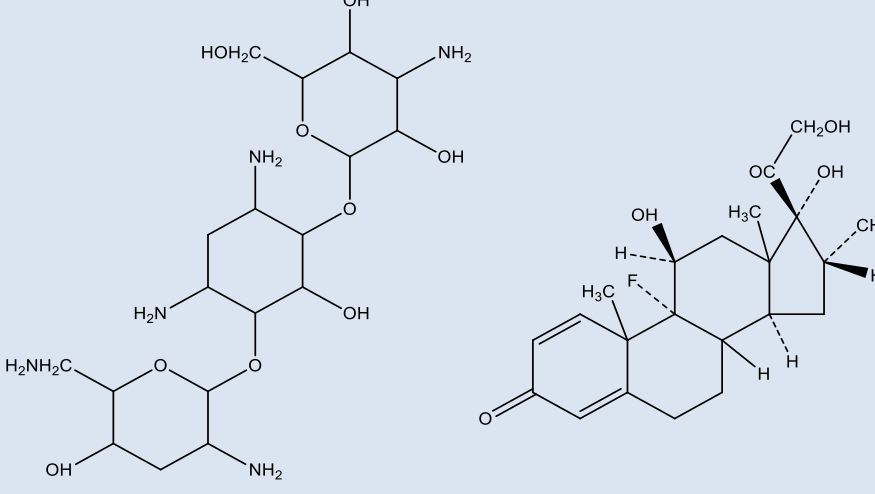
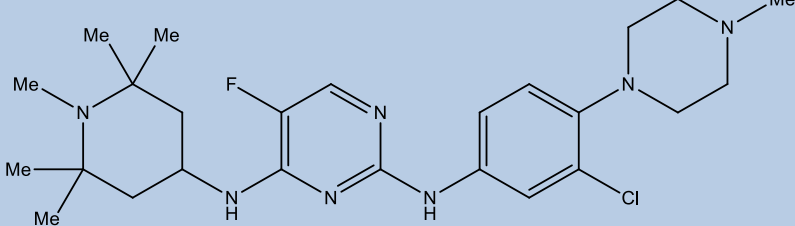
<p>Fig. 10</p>	<p>AL43546/ galactomannan</p>	 <p>The structure shows a complex branched polysaccharide. It features a central mannose unit (n) linked to several galactose units (m). The galactose units are further branched, forming a tree-like structure. Hydroxyl groups are explicitly shown on the sugar rings.</p>
<p>Fig. 11</p>	<p>Sirolimus</p>	 <p>The structure is a large, complex macrocyclic molecule. It consists of a long chain of carbon atoms with various functional groups, including hydroxyl groups, ketone groups, and a piperidine ring. The molecule is highly substituted and has a complex three-dimensional conformation.</p>
<p>Fig. 12</p>	<p>ISV101/ bromfenac</p>	 <p>The structure is a benzofuran derivative. It features a central benzene ring with an amino group (-NH₂) and a propionic acid side chain. This ring is linked to another benzene ring that has a bromine atom (-Br) at the para position.</p>
<p>Fig. 13</p>	<p>DA-6034</p>	 <p>The structure is a flavonoid molecule. It consists of a central chromone core (a benzene ring fused to a pyrone ring). The pyrone ring has a carbonyl group and a methoxy group (-OCH₃). The benzene ring has a methoxy group (-OCH₃) and a propionic acid side chain (-CH₂-CH₂-COOH).</p>

Fig. 14	RX-10045	 <p>The chemical structure of RX-10045 is a long-chain molecule. It features a central chain with a trans-double bond, a cis-double bond, and a triple bond. The chain is substituted with a propyl group, a trimethylsilyloxy group, and a methyl ester group. The trimethylsilyloxy groups are attached to the chain via ether linkages.</p>
Fig. 15	Tobradex (tobramycin/ dexamethasone)	 <p>The chemical structures of Tobradex components are shown. On the left is the structure of tobramycin, a 2-deoxystreptamine glycoside. It consists of a central tobramycin core linked to a 2-deoxyribose sugar, which is further linked to a 2-amino-2,3,6-trihydroxy-4-hydroxymethyl-D-glucopyranose sugar. On the right is the structure of dexamethasone, a corticosteroid. It features a four-ring steroid nucleus with a ketone group at C3, a double bond at C4, and various hydroxyl and methyl groups at C11, C13, C14, and C17. A dexamethasone acetic acid ester is also shown at C17.</p>
Fig. 16	R932348	 <p>The chemical structure of R932348 is a complex molecule. It features a central pyrimidine ring substituted with a fluorine atom and two amino groups. One amino group is linked to a piperazine ring substituted with three methyl groups. The other amino group is linked to a benzene ring substituted with a chlorine atom and another piperazine ring substituted with a methyl group.</p>

REFERENCES

1. Fauchais AL, Martel C, Vidal E. (Epidemiology and physiopathology of Sjogren's syndrome). *Rev Prat.* **62**(2), 218-20 (2012).
2. The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop. *Ocul Surf.* **5**(2), 93-107 (WorkShop in Epidemiology of Dry Eye 2007).
3. Abusharha AA, Pearce EI. The Effect of Low Humidity on the Human Tear Film. *Cornea.* (2012).
4. Portello JK, Rosenfield M, Bababekova Y, et al. Computer-related visual symptoms in office workers. *Ophthalmic Physiol Opt.* **32**(5), 375-82 (2012).
5. Thorud HM, Helland M, Aaras A, et al. Eye-related pain induced by visually demanding computer work. *Optom Vis Sci.* **89**(4), E452-64 (2012).
6. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop. *Ocul Surf.* **5**(2), 75-92 (Dry Eye WorkShop Definition and Classification 2007).
7. Linsen C, Missotten L. Physiology of the lacrimal system. *Bull Soc Belge Ophthalmol.* **238** 35-44 (1990).
8. Dilly PN. Structure and function of the tear film. *Adv Exp Med Biol.* **350** 239-47 (1994).
9. Nichols KK, Nichols JJ, Mitchell GL. The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease. *Cornea.* **23**(8), 762-70 (2004).
10. Kastelan S, Lukenda A, Salopek-Rabatic J, et al. Dry eye symptoms and signs in long-term contact lens wearers. *Coll Antropol.* **37 Suppl 1** 199-203 (2013).
11. Lemp MA. Epidemiology and classification of dry eye. *Adv Exp Med Biol.* **438** 791-803 (1998).
12. Glasson MJ, Stapleton F, Keay L, et al. Differences in clinical parameters and tear film of tolerant and intolerant contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **44**(12), 5116-24 (2003).
13. Donate J, Benitez del Castillo JM, Fernandez C, et al. (Validation of a questionnaire for the diagnosis of dry eye). *Arch Soc Esp Oftalmol.* **77**(9), 493-500 (2002).
14. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease. 2007 Report of the International Dry Eye Workshop. The Ocular Surface 2007. 2007.
15. Savini G, Prabhawat P, Kojima T, et al. The challenge of dry eye diagnosis. *Clin Ophthalmol.* (2008).
16. Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The repeatability of clinical measurements of dry eye. *Cornea.* **23**(3), 272-85 (2004).
17. Albietz JM, Bruce AS. The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: effect of preserved and non-preserved topical treatments. *Curr Eye Res.* **22**(1), 8-18 (2001).
18. Yaguchi S, Ogawa Y, Kamoi M, et al. Surgical management of lacrimal punctal cauterization in chronic GVHD-related dry eye with recurrent punctal plug extrusion. *Bone Marrow Transplant.* (2012).
19. Korb DR, Greiner JV, Glonek T, et al. Effect of periocular humidity on the tear film lipid layer. *Cornea.* **15**(2), 129-34 (1996).

20. Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf.* **5**(2), 163-78 (2007).
21. Luo L, Li DQ, Corrales RM, et al. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens.* **31**(5), 186-93 (2005).
22. Luo L, Li DQ, Doshi A, et al. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**(12), 4293-301 (2004).
23. Yang CQ, Sun W, Gu YS. A clinical study of the efficacy of topical corticosteroids on dry eye. *J Zhejiang Univ Sci B.* **7**(8), 675-8 (2006).
24. Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, et al. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology.* **107**(4), 631-9 (2000).
25. Spies CM, Gaber T, Hahne M, et al. Rimexolone inhibits proliferation, cytokine expression and signal transduction of human CD4+ T-cells. *Immunol Lett.* **131**(1), 24-32 (2010).
26. AL-2178. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00471419 <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00471419?term=AL-2178+Rimexolone&rank=1>. (2008).
27. Anglade E, Yatscoff R, Foster R, et al. Next-generation calcineurin inhibitors for ophthalmic indications. *Expert Opin Investig Drugs.* **16**(10), 1525-40 (2007).
28. LX214. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00851734 <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00851734?term=LX214&rank=1>. (2012).
29. Uckun FM, Malavia R, Sudbeck EA. JAK-3 inhibitors for treating allergic disorders. US20006080747 (2000)
30. Liew SH, Nichols KK, Klamerus KJ, et al. Tofacitinib (CP-690,550), a Janus kinase inhibitor for dry eye disease: results from a phase 1/2 trial. *Ophthalmology.* **119**(7), 1328-35 (2012).
31. Huang JF, Yafawi R, Zhang M, et al. Immunomodulatory effect of the topical ophthalmic Janus kinase inhibitor tofacitinib (CP-690,550) in patients with dry eye disease. *Ophthalmology.* **119**(7), e43-50 (2012).
32. Rosenberg ES, Asbell PA. Essential fatty acids in the treatment of dry eye. *Ocul Surf.* **8**(1), 18-28 (2010).
33. Barabino S, Rolando M, Camicione P, et al. Systemic linoleic and gamma-linolenic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component. *Cornea.* **22**(2), 97-101 (2003).
34. Creuzot C, Passemard M, Viau S, et al. (Improvement of dry eye symptoms with polyunsaturated fatty acids). *J Fr Ophtalmol.* **29**(8), 868-73 (2006).
35. Creuzot-Garcher C, Baudouin C, Labetoulle M, et al. (Efficacy assessment of Nutrilarm(R), a per os omega-3 and omega-6 polyunsaturated essential fatty acid dietary formulation versus placebo in patients with bilateral treated moderate dry eye syndrome). *J Fr Ophtalmol.* **34**(7), 448-55 (2011).
36. Brignole-Baudouin F, Baudouin C, Aragona P, et al. A multicentre, double-masked, randomized, controlled trial assessing the effect of oral supplementation of

- omega-3 and omega-6 fatty acids on a conjunctival inflammatory marker in dry eye patients. *Acta Ophthalmol.* **89**(7), e591-7 (2011).
37. Rand AL, Asbell PA. Nutritional supplements for dry eye syndrome. *Curr Opin Ophthalmol.* **22**(4), 279-82 (2011).
38. Steven P, Cursiefen C. (Anti-inflammatory treatment in dry eye disease). *Klin Monbl Augenheilkd.* **229**(5), 500-5 (2012).
39. Axtell RC, Steinman L, Han MH, et al. Markers for determination of patient responsiveness. US20110250206, US20110243893 (2011)
40. Dhimolea E. Canakinumab. *MAbs.* **2**(1), 3-13 (2010).
41. Hueber W, Patel DD, Dryja T, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med.* **2**(52), 52ra72 (2010).
42. Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, et al. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* (2012).
43. Cumberlidge G, Lama T, Meerovitch K. Beta-turn peptidomimetic cyclic compounds for treating dry eye. US20128293713 (2012)
44. Wang ZX, Sun XG. (The effect of nerve growth factor on proliferation and expression of mucin gene in human conjunctival goblet cells). *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* **43**(10), 928-31 (2007).
45. Jain P, Li R, Lama T, et al. An NGF mimetic, MIM-D3, stimulates conjunctival cell glycoconjugate secretion and demonstrates therapeutic efficacy in a rat model of dry eye. *Exp Eye Res.* **93**(4), 503-12 (2011).
46. Meerovitch K, Torkildsen G, Lonsdale J, et al. Safety and efficacy of MIM-D3 ophthalmic solutions in a randomized, placebo-controlled Phase 2 clinical trial in patients with dry eye. *Clin Ophthalmol.* **7** 1275-85 (2013).
47. Boltralik JJ. Anti-inflammatory compounds for ophthalmic use. US19955446177 (1995)
48. Mulki L, Foster CS. Difluprednate for inflammatory eye disorders. *Drugs Today (Barc).* **47**(5), 327-33 (2011).
49. Viiri J, Jauhonen HM, Kauppinen A, et al. Cis-urocanic acid suppresses UV-B-induced interleukin-6 and -8 secretion and cytotoxicity in human corneal and conjunctival epithelial cells in vitro. *Mol Vis.* **15** 1799-805 (2009).
50. Jauhonen HM, Kauppinen A, Paimela T, et al. Cis-urocanic acid inhibits SAPK/JNK signaling pathway in UV-B exposed human corneal epithelial cells in vitro. *Mol Vis.* **17** 2311-7 (2011).
51. Sosne G, Crockford D. Methods and compositions for stabilizing polypeptides. WO2008108927 (2008)
52. Golstein AL, Sosne G. Methods of treating disorders of the eye and surrounding tissue with thymosin beta 4 (Tb4), analogues, isoforms and other derivatives US20110020449 (2011)
53. Philp D, Kleinman HK. Animal studies with thymosin beta, a multifunctional tissue repair and regeneration peptide. *Ann N Y Acad Sci.* **1194** 81-6 (2010).
54. Sosne G, Qiu P, Ousler GW, 3rd, et al. Thymosin beta4: a potential novel dry eye therapy. *Ann N Y Acad Sci.* **1270** 45-50 (2012).
55. Sosne G, Crockford D, Finkelstein JJ, et al., editors. Single-Center Study Evaluating the Safety and Efficacy of 0.1% Tβ4 Ophthalmic Solution Compared to

Vehicle on the Signs and Symptoms of Dry Eye in the Controlled Adverse Environment (CAE) Model (abstract) 2012 ARVO E-Abstract 577/A45.

56. Belimumab. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01160666
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01160666?term=Belimumab+Sjogren&rank=1>. (2012).

57. Cornec D, Saraux A, Devauchelle-Pensec V, et al. The future of B cell-targeted therapies in Sjogren's syndrome. *Immunotherapy*. **5**(6), 639-46 (2013).

58. Rituximab. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00740948
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00740948?term=Rituximab+Sjogren&rank=1>. (2013).

59. Moerman RV, Arends S, Meiners PM, et al. EULAR Sjogren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI) is sensitive to show efficacy of rituximab treatment in a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis*. **73**(2), 472-4 (2014).

60. Bartels PS. Use of loteprednol etabonate for the treatment of dry eye. WO2005094836A2 (2005)

61. Pavesio CE, Decory HH. Treatment of ocular inflammatory conditions with loteprednol etabonate. *Br J Ophthalmol*. **92**(4), 455-9 (2008).

62. Sheppard JD, Scoper SV, Samudre S. Topical loteprednol pretreatment reduces cyclosporine stinging in chronic dry eye disease. *J Ocul Pharmacol Ther*. **27**(1), 23-7 (2011).

63. Wan PX, Wang XR, Song YY, et al. (Study on the treatment of dry eye with Loteprednol Etabonate). *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. **48**(2), 142-7 (2012).

64. Ogawa T, Watanabe N, Okumura Y. Method for preventing or treating dry eye or disease caused therefrom. US19985830913 (1998)

65. Munakata W, Liu Q, Shimoyama T, et al. Ecabet sodium attenuates reactive oxygen species produced by neutrophils after priming with bacterial lipopolysaccharides. *Luminescence*. **18**(6), 330-3 (2003).

66. Shimoyama T, Fukuda Y, Fukuda S, et al. Ecabet sodium eradicates *Helicobacter pylori* infection in gastric ulcer patients. *J Gastroenterol*. **31 Suppl 9** 59-62 (1996).

67. Zhang JZ, Cavet ME, VanderMeid KR, et al. BOL-303242-X, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, with full anti-inflammatory properties in human ocular cells. *Mol Vis*. **15** 2606-16 (2009).

68. Vollmer TR, Stockhausen A, Zhang JZ. Anti-inflammatory effects of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, is partially mediated by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). *J Biol Chem*. **287**(42), 35212-21 (2012).

69. Schoepe S, Schacke H, Bernd A, et al. Identification of novel in vitro test systems for the determination of glucocorticoid receptor ligand-induced skin atrophy. *Skin Pharmacol Physiol*. **23**(3), 139-51 (2010).

70. AL-43546. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00760045
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00760045?term=AL43546&rank=1>. (2010).

71. Caballero-Velazquez T, Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, et al. The novel combination of sirolimus and bortezomib prevents graft-versus-host disease but maintains the graft-versus-leukemia effect after allogeneic transplantation. *Haematologica*. **97**(9), 1329-37 (2012).

72. Dor JP, Nivaggioli T, Reilly P, et al. mTOR pathway inhibitors for treating ocular disorders. WO2010129622 (2010)
73. Cao GF, Liu Y, Yang W, et al. Rapamycin sensitive mTOR activation mediates nerve growth factor (NGF) induced cell migration and pro-survival effects against hydrogen peroxide in retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **414**(3), 499-505 (2011).
74. Nguyen QD, Ibrahim MA, Watters A, et al. Ocular tolerability and efficacy of intravitreal and subconjunctival injections of sirolimus in patients with non-infectious uveitis: primary 6-month results of the SAVE Study. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* **3**(1), 32 (2013).
75. Bowman ML, Hosseini K, Pham S, et al. Non-steroidal anti-inflammatory ophthalmic compositions. WO2010102192 (2010)
76. Urech DM. Functionalized polypeptides. WO2010006454 (2010)
77. Ottiger M, Thiel MA, Feige U, et al. Efficient intraocular penetration of topical anti-TNF-alpha single-chain antibody (ESBA105) to anterior and posterior segment without penetration enhancer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **50**(2), 779-86 (2009).
78. Thiel MA, Wild A, Schmid MK, et al. Penetration of a topically administered anti-tumor necrosis factor alpha antibody fragment into the anterior chamber of the human eye. *Ophthalmology.* **120**(7), 1403-8 (2013).
79. Choi SM, Seo MJ, Lee YG, et al. Effects of DA-6034, a flavonoid derivative, on mucin-like glycoprotein and ocular surface integrity in a rabbit model. *Arzneimittelforschung.* **59**(10), 498-503 (2009).
80. Seo MJ, Kim JM, Lee MJ, et al. The therapeutic effect of DA-6034 on ocular inflammation via suppression of MMP-9 and inflammatory cytokines and activation of the MAPK signaling pathway in an experimental dry eye model. *Curr Eye Res.* **35**(2), 165-75 (2010).
81. Lan W, Petznick A, Heryati S, et al. Nuclear Factor-kappaB: central regulator in ocular surface inflammation and diseases. *Ocul Surf.* **10**(3), 137-48 (2012).
82. Gjorstrup P. Compositions and methods for the treatment of ophthalmic conditions. US2009011824 (2009)
83. Therapeutics C. Developing therapies for critical unmet medical needs. RX 10045 - Dry Eye and Allergic Conjunctivitis. <http://www.celtitherapeutics.com/RX100452012>.
84. Pharmaceuticals R. RX-10045 <http://www.resolvix.com/products/rx-10045.asp2013>.
85. Hong W, Yan S. Engineering *Streptomyces tenebrarius* to synthesize single component of carbamoyl tobramycin. *Lett Appl Microbiol.* **55**(1), 33-9 (2012).
86. Wang H, Pang B, Li Y, et al. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* **14**(4), 423-30 (2012).
87. Kabra B. Topical ophthalmic compositions containing tobramycin and dexamethasone. US20107795316 (2010)
88. Wong B. JAK kinase inhibitors and their uses. US20060270694 (2006)
89. Chang BY, Zhao F, He X, et al. JAK3 inhibition significantly attenuates psoriasisiform skin inflammation in CD18 mutant PL/J mice. *J Immunol.* **183**(3), 2183-92 (2009).

90. Barnes TM, Hou J, King BM. Chimeric IL-1 receptor type I agonists and antagonists. WO2012016203 (2012)
91. Furfine ES, Hou J, Collins K, et al., editors. EBI-005: an Interleukin-1 Receptor Inhibitor Designed for the Treatment of Dry Eye Syndrome, 2012 Poster: 2340/A3572012.
92. So A, De Smedt T, Revaz S, et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther.* **9**(2), R28 (2007).
93. Fel A, Aslangul E, Le Jeunne C. (Eye and corticosteroid's use). *Presse Med.* **41**(4), 414-21 (2012).
94. Carracedo G, Peral A, Pintor J. Diadenosine polyphosphates in tears of Sjogren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **51**(11), 5452-9 (2010).
95. Pintor J. (A molecular marker for dry eye). *Arch Soc Esp Oftalmol.* **82**(3), 129-30 (2007).
96. McGinnigle S, Naroo SA, Eperjesi F. Evaluation of dry eye. *Surv Ophthalmol.* **57**(4), 293-316 (2012).
97. Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* **151**(5), 792-8 e1 (2011).

Propuesta biotecnológica para el tratamiento del cáncer de cérvix uterino, empleando liposomas

Rosalva Rangel-Corona¹, Ramón Soto-Vázquez¹, Benito Weiss-Steider¹, María Esther Gil-Alegre^{2*}, María Teresa Corona-Ortega^{1*}

¹FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). ²Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM)

*e-mail: megil@ucm.es, tcvaldes05@yahoo.com.mx

An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 1 (2014), pág. 179-191

RESUMEN

Los nanotransportadores de fármacos son una excelente opción para formar sistemas farmacéuticos eficientes y seguros. Interleucina 2 (IL-2) es eficaz en la terapia antitumoral, sin embargo su administración sistémica se ha limitado por su alta toxicidad. En el presente trabajo se aborda la investigación en animales del tratamiento antitumoral con IL-2 transportada en liposomas frente a IL-2 libre, y se aborda un paso imprescindible para el futuro uso de los liposomas con IL-2 como terapia biotecnológica para pacientes con carcinoma de cérvix: los primeros estudios de estabilidad farmacéutica.

Palabras clave: Interleucina 2; Liposomas; Estabilidad.

ABSTRACT

Biotechnological proposal for cervical cancer treatment using liposomes.

Drug nanosystems are an excellent option to form efficient and safe pharmaceutical systems. Our team has developed methodology based on the use of Interleukin 2 (IL-2) which has proven very effective in antitumor therapy, but systemic administration is limited by its high toxicity. The present work discusses in vivo evaluation of the tumor using IL-2 carried in liposomes against IL-2 free, and also addresses an important and necessary step for the future use of IL-2 liposomes in biotechnology therapy for patients with carcinoma of the cervix: the early pharmaceutical stability studies.

Keywords: Interleukin 2; Liposomes; Stability.

1. INTRODUCCIÓN

Los liposomas son nanotransportadores constituidos por bicapas concéntricas de lípidos anfipáticos separadas por un compartimiento acuoso. Los liposomas se forman cuando los lípidos anfipáticos se dispersan en agua y las partes hidrofóbicas de estas moléculas se acomodan en bicapas para liberarse del agua, dejando compartimientos acuosos en el interior y exterior. En la parte acuosa se pueden transportar diversas moléculas hidrofílicas de diferente naturaleza como ácidos nucleicos, fármacos inorgánicos, citocinas, antígenos o anticuerpos. Si el material que se desea transportar son moléculas hidrofóbicas, estas pueden ser incluidas dentro de las bicapas lipídicas del liposoma. Es importante mencionar que el número de bicapas lipídicas concéntricas, la composición de lípidos, la carga eléctrica de estos y la vía de administración pueden ser variadas para favorecer que los liposomas lleguen al lugar del organismo deseado (órgano, tejido, célula...).

Las sustancias encapsuladas en liposomas pueden ser administradas in vivo por diferentes vías de acuerdo a la diana deseada. Existe la posibilidad de llegar al sitio deseado modificando a los liposomas para no ser ingeridos por los macrófagos; sin embargo, si la diana son los macrófagos, existe una muy alta probabilidad de que las sustancias encapsuladas en liposomas entren en ellos y modifiquen su función. Con este enfoque, se ha avanzado mucho en la vehiculización de fármacos optimizando la vía de administración y la dosis necesaria. De hecho, los liposomas se han convertido en herramientas de gran utilidad, debido a que garantizan que pequeñas concentraciones de cualquier sustancia lleguen al blanco adecuado reduciendo la toxicidad o efectos colaterales causados por el paso de las sustancias por el torrente sanguíneo. En la actualidad estas partículas han sido ampliamente utilizadas en una diversidad de aplicaciones; tales como vehículos para la transfección de material genético, liberadores de fármacos en sitios específicos y como modelos de diferentes tipos de membranas biológicas normales y transformadas (1).

Nuestro grupo de trabajo empezó utilizando liposomas para activar exitosamente a macrófagos con diferentes citocinas y evaluando la viabilidad tecnológica de este modelo utilizando la curva S de Gompertz (2). Posteriormente, se investigó in vivo la posibilidad de usar estos nanotransportadores para la liberación de una citocina inmunorreguladora, evitando que los liposomas pudieran ser fagocitados. Consecuencia de estos trabajos, se ha elegido, caracterizado y patentado (3-4) una formulación de liposomas que no es reconocida por los macrófagos y que además es capaz de transportar una molécula inmunorreguladora muy eficaz: el factor estimulador de linfocitos llamado Interleucina 2 (IL-2).

La IL-2 ha sido aprobada por la FDA como fármaco efectivo para la terapia de tumores humanos por su activación del sistema inmunológico, en particular de

los linfocitos T citotóxicos y de las células asesinas (5). Sin embargo, su administración vía sistémica se ha limitado debido a su alta toxicidad (6). Por esta razón se han buscado diversos métodos para liberar IL-2 a los tumores in situ, tal es el caso del uso de diversos tipos de liposomas (7); además estas partículas se han diseñado buscando su afinidad a las membranas de las células tumorales (8), ya sea llevando la IL-2 en su interior o unida covalentemente al exterior buscando su unión a las células diana (9-11).

Recientemente se ha descrito que diversas células tumorales poseen receptores funcionales para IL-2 (IL-2R), lo que ha convertido a este receptor en un blanco potencial para inmunoterapia (12). En este sentido, nuestro equipo ha informado de la presencia del receptor funcional para IL-2 en diversas líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino provenientes de pacientes mexicanas (13); así como del uso de nanotransportadores con IL-2 para la reducción de tumores de células humanas inducidos en ratones (14).

Los buenos resultados obtenidos en estos estudios han llevado al equipo a abordar un proyecto internacional con el objetivo final de alcanzar una terapia biotecnológica para pacientes con carcinoma de cerviz uterino, mediante la investigación y el desarrollo de un medicamento basado en liposomas con IL-2.

En el presente trabajo se aborda la investigación en animales del tratamiento antitumoral de IL-2 transportada en liposomas frente a IL-2 libre. Para ello, se emplean los liposomas con IL-2 diseñados y desarrollados por el equipo y se evalúa su capacidad para vectorizar a tumores de cáncer cérvico-uterino por la presencia del receptor funcional para IL-2 en los mismos.

En el presente trabajo también se aborda un paso importante y necesario para el uso futuro de nuestro sistema nanotransportador como terapia biotecnológica para pacientes con carcinoma de cérvix: los primeros estudios de estabilidad farmacéutica con fines de preformulación del medicamento biotecnológico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de liposomas con IL-2

Los liposomas transportadores de IL-2 objeto del trabajo son liposomas catiónicos, fabricados utilizando Espermidil-Colesterol (Esp-CH), un lípido catiónico que aunque es sintético, sus componentes están presentes en la naturaleza y se ha comprobado que no es citotóxico (15).

Para la preparación de los liposomas catiónicos se usó una mezcla que contenía el lípido catiónico Espermidil-Colesterol (Esp-CH) (sintetizado por el Dr. Miguel Ibáñez, México DF) y Fosfatidilcolina (PC) (Sigma Chemical, USA) usando

una relación molar 1:1. La mezcla de lípidos (10 μ mol) fue disuelta en cloroformo, el disolvente fue evaporado utilizando un flujo de nitrógeno a presión reducida, los liposomas se formaron por la hidratación de la película de lípidos en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (liposomas vacíos) o con IL-2 (R&D Systems, USA) (100 UI/mL) en PBS (liposomas con IL-2) mediante tres ciclos de sonicación (sonicador Lab Supply G112SOI) de 5 segundos separados por períodos de descanso de 30 segundos. Los liposomas formados fueron lavados por sedimentación a 200.000g durante 40 minutos en PBS, y después fueron resuspendidos en PBS.

2.2 Aspecto de los liposomas con IL-2: Microscopía electrónica

Para determinar la morfología y tamaño de nuestro sistema transportador se recurrió a la microscopía electrónica. Los liposomas con IL-2 se colocaron en rejillas de cobre con 200 mallas que estaban cubiertas con Formvar, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se eliminó el líquido por decantación con papel filtro. Posteriormente, las muestras se tiñeron con una solución acuosa de acetato de uranilo al 4% durante 5 minutos, se eliminó el exceso de líquido y se dejaron secar durante 24 horas.

2.3. Evaluación in vivo, en animales de experimentación

2.3.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CBA/ca de 18 a 24 meses de edad. Se mantuvieron en cajas especiales con ambiente controlado (esterilidad y 21°C), en grupos de cuatro, y se les suministró alimento y agua ad libitum, según los protocolos aprobados por la Comisión de Ética para animales de experimentación de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México), la cual cumple con los códigos para el cuidado y uso de animales de experimentación.

2.3.2. Inducción de tumores en ratones

Para el modelo de inducción de tumores y evaluación del efecto biológico de los liposomas con IL-2 obtenidos se utilizó la técnica desarrollada por Rangel et al. (14). Brevemente, se utilizaron ratones singénicos de la cepa CBA, se inmunodeprimieron utilizando hidrocortisona, se les inyectaron las células tumorales de la línea INBL, se continuó la inmunodepresión en un tiempo total de seis semanas. Asumiendo que cada tumor es similar a una esfera, se calculó la masa tumoral de cada uno con la fórmula $\frac{4}{3} \pi r^3$ y se sumó la masa tumoral total. Además se evaluaron los efectos adversos visibles generados por la masa tumoral.

2.3.3. Evaluación del efecto de los liposomas con IL-2 sobre el tamaño de la masa tumoral.

Una vez inducidos los tumores en los ratones y determinado su tamaño inicial, se establecieron 3 grupos:

- grupo control
- grupo tratado con IL-2
- grupo tratado con liposomas transportadores de IL-2

El tratamiento se aplicó diariamente, durante 5 días, después de los cuales se sacrificó a los animales y se realizó una inspección minuciosa. Se cuantificaron los tumores, se extrajeron y se calculó la masa tumoral total.

2.3.4. Evaluación del efecto protector de los liposomas con IL-2 frente a los posibles efectos adversos causados por IL-2 libre (no transportada)

Se emplean los mismos grupos de ratones del estudio anterior. Después de sacrificarles, se realiza una inspección minuciosa para evaluar los posibles efectos adversos visibles derivados del tumor (grupo control), del tratamiento con IL-2 libre y del tratamiento con IL-2 transportado en liposomas.

2.3.5. Evaluación del efecto de los liposomas con IL-2 sobre las células tumorales.

Para la observación de los posibles cambios morfológicos de las células de los tumores inducidos en los ratones, debido al tratamiento con liposomas con IL-2, se sacrificaron, lotes de ratones después de una y dos horas de la administración de los liposomas con IL-2. Los tumores extraídos de los ratones sacrificados fueron fijados con glutaraldehído al 2.5% durante 1 hora y postfijados con solución Osmio-Milloning al 1% durante 1 hora. Las muestras fueron deshidratadas y embebidas en Epon® para proceder a cortar secciones finas de los tumores que se colocan en rejillas de cobre recubiertas con Formvar y se contrastan con citrato de plomo para su evaluación por microscopía electrónica de transmisión (microscopio electrónico JEOL-JEM-1010, JEOL USA, Inc., MA, USA).

2.4 Estudios de estabilidad física de los liposomas en el marco de la preformulación del medicamento biotecnológico.

Para la evaluación de la estabilidad física de los liposomas, se procedió a realizar la medición inicial de su tamaño y su complejidad en el citómetro de flujo (16), para después analizar sus posibles cambios físicos debidos a la exposición a diferentes causas de inestabilidad durante un determinado periodo de tiempo.

Los cambios en el tamaño y la complejidad de los liposomas se determinaron mediante la evaluación de las diferencias entre los histogramas obtenidos en la citometría para el tamaño y la conformación de los liposomas recién preparados y tras el almacenamiento. Se utilizó la estadística de Kolmogorov-Smirnov (K-S), de forma que, un valor de D (Diferencia) de 0 indicaría un total solapamiento y por tanto una total igualdad de los histogramas, y un valor de 1 indicaría que ningún punto está en concordancia, por lo que los histogramas serían totalmente diferentes. Para establecer la existencia de una

diferencia significativa en el tamaño o complejidad de los liposomas, el valor de D debe ser mayor a 0,5.

2.4.1. Fotosensibilidad

El estudio de fotoestabilidad se llevó a cabo siguiendo normativa ICH (17). Se tomaron muestras cada 15 minutos durante 45 minutos, a fin de detectar si se producían cambios significativos en conformación y tamaño de los liposomas, mediante citometría de flujo.

2.4.2. Efecto del pH

Con la finalidad de determinar el efecto del pH del medio sobre la estabilidad del sistema farmacéutico, se colocaron diferentes muestras en diferentes soluciones acuosas amortiguadoras con un intervalo de valores de pH comprendido entre 4 y 10. Las muestras se evaluaron después de una hora por citometría de flujo para detectar si se producían cambios significativos en la conformación y tamaño de los liposomas.

2.4.3. Efecto de la temperatura

A fin de observar el efecto de la temperatura sobre el sistema farmacéutico, los liposomas fueron sometidos a 3 temperaturas diferentes, en estufas de estabilidad estandarizadas (18), realizando un muestreo semanal durante un periodo de 5 semanas, para su evaluación por comparación con las especificaciones iniciales de complejidad y tamaño.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aspecto de los liposomas con IL-2: Microscopía electrónica.

La tinción negativa del sistema nanotransportador observada al microscopio electrónico (Figura 1) muestra liposomas con tamaños comprendidos entre 30 y 80 nm.

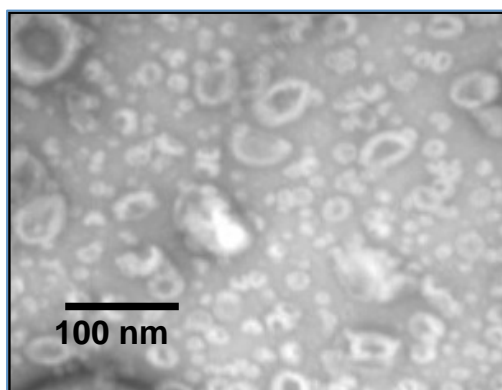


Figura 1.- Fotografía de los liposomas IL-2 (microscopio electrónico).

3.2. Inducción de tumores en ratones

Se inyectaron células de la línea INBL a un grupo de ratones inmunodeprimidos y después de 20 días fueron sacrificados, encontrando masas tumorales con una suma total en promedio de 20 mm³. Por tanto, se establece que 20 días es el tiempo suficiente para tener un modelo animal de utilidad para la evaluación in vivo del tratamiento biotecnológico basado en los liposomas con IL-2.

Este modelo será de utilidad para la evaluación de la estabilidad biológica del medicamento biotecnológico basado en los liposomas con IL-2.

3.3. Evaluación in vivo del efecto de los liposomas con IL-2 sobre el tamaño de la masa tumoral.

Los resultados obtenidos en los tres grupos de ratones (grupo control, grupo tratado con IL-2 libre y grupo tratado con IL-2 transportada en los liposomas) indican un promedio de masa tumoral total de 20,5 mm³ para los ratones control, 2 mm³ para los tratados con IL-2 en el sistema nanotransportador y 3 mm³ para los tratados con IL-2 libre. La total ausencia de tumores en algunos ratones y el pequeño tamaño de los existentes en otros ratones indican el fuerte efecto de la IL-2 ya sea libre o transportada en liposomas.

Cabe señalar que aunque la IL-2 libre es igualmente eficiente que la IL-2 nanotransportada para la reducción del crecimiento tumoral, los efectos adversos causados por la citocina libre, como son la inflamación y el goteo capilar, no se observan en los ratones tratados con la citocina transportada en los liposomas (Figura 2).

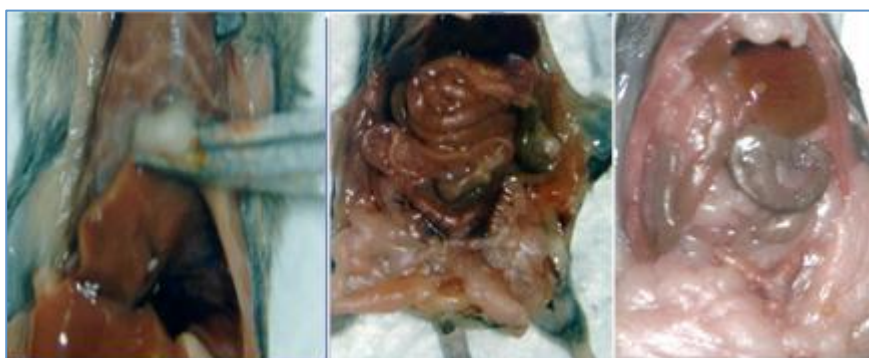
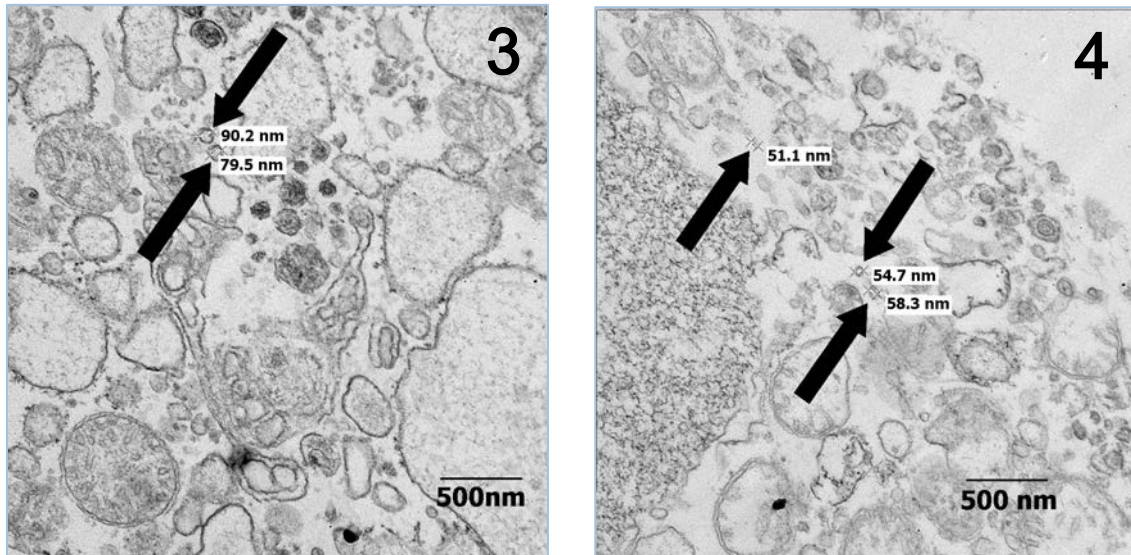


Figura 2.- Comparación de efectos adversos usando: Vehículo (a), IL-2 libre (b) y encapsulada en liposomas (c).

3.5. Evaluación del efecto de los liposomas con IL-2 sobre las células tumorales.

Para evaluar los posibles cambios en los tumores después de administrarles los liposomas con IL-2, se extrajeron tumores una y dos horas después del tratamiento. Se procedió a fijarlos, postfijarlos, deshidratarlos, incluirlos en resina, cortarlos, contrastarlos y observarlos con un microscopio electrónico. Los

resultados indican la posible presencia de los liposomas en la masa tumoral (Figuras 3 y 4).



Figuras 3 y 4.- Microscopía electrónica de tumores. Microfotografías que muestran la posible presencia de nuestras partículas dentro de los tumores tratados.

Es necesario destacar que tan sólo una hora después de la administración de los liposomas con IL-2, las células tumorales empiezan a sufrir daños severos perdiendo la integridad de sus membranas (Figuras 5 y 6).

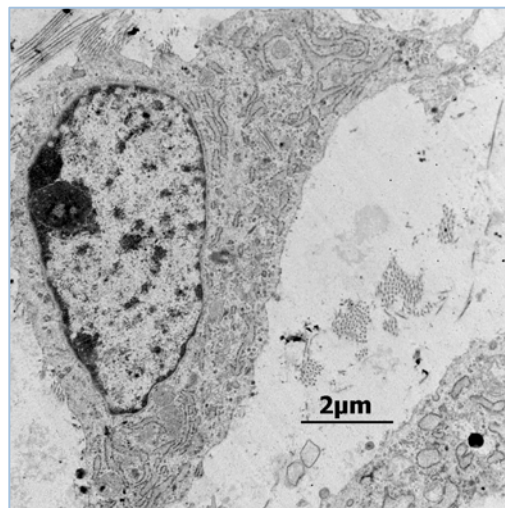


Figura 5.- Microscopía electrónica de tumores. Microfotografía que muestra una célula tumoral no tratada con liposomas con IL-2.

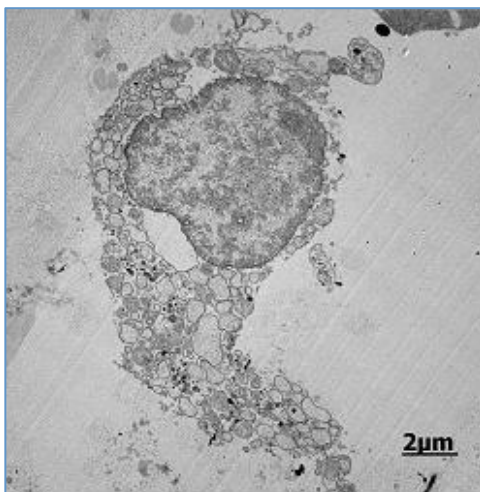


Figura 6.- Microscopía electrónica de tumores. Microfotografía que muestra una célula tumoral tratada con liposomas con IL-2.

3.6. Estudios de estabilidad física de los liposomas en el marco de la preformulación del medicamento biotecnológico.

La estabilidad física de los liposomas se evaluó determinando por citometría de flujo su tamaño y complejidad iniciales, de tal forma que se tenga un referente para comparar los posibles cambios en tamaño, debido al posible reacomodo de las bicapas, al hinchamiento/lisis, y comparar los posibles cambios de complejidad debidos a la conglomeración de las partículas.

Los resultados de comparación de histogramas obtenidos indican que el sistema farmacéutico no es sensible a la luz (Figura 7), que existe solo un pH de máxima estabilidad (Figura 8) y que existen dos temperaturas de máxima estabilidad (Figura 9). Cabe aclarar que no se mencionan los valores de pH y de temperatura de máxima estabilidad porque la estabilidad y la formulación de los liposomas con IL-2 diseñados y desarrollados por el equipo de investigación se encuentran en fase de desarrollo tecnológico para la obtención de la patente de formulación.

Este modelo de evaluación de la estabilidad física de los liposomas con IL-2 será de utilidad para la evaluación de la compatibilidad de dichos liposomas con sus posibles vehículos, constituyentes del medicamento biotecnológico final.

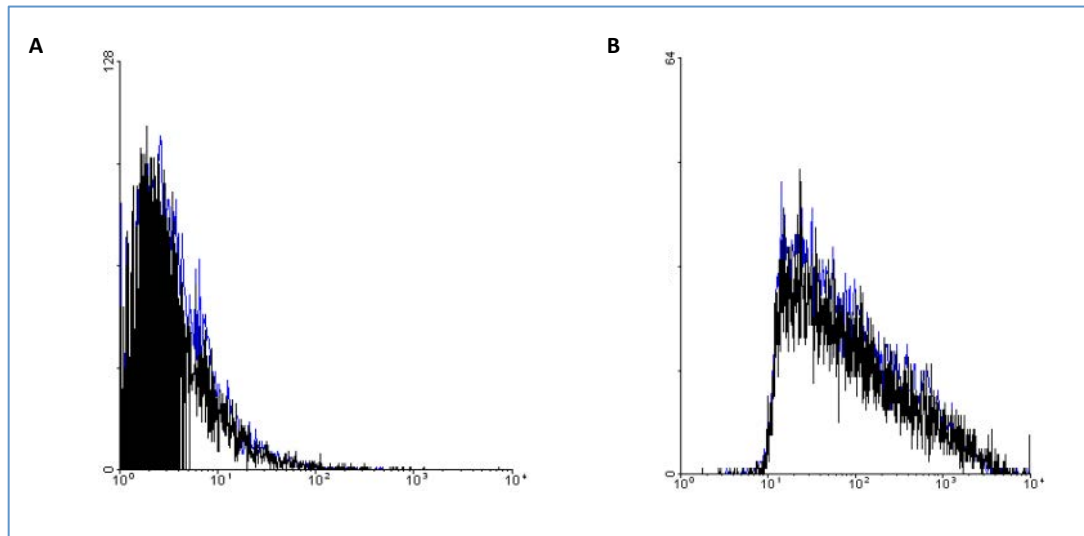


Figura 7.- Estudio de fotoestabilidad: comparación de histogramas tras 45 minutos de exposición. A) Complejidad (SSC-A), B) Tamaño (FSC-A). Se realizó la sobreposición del histograma control (azul) y el histograma de cada condición (negro) y se realizó la prueba estadística K-S para establecer que no existen diferencias significativas.

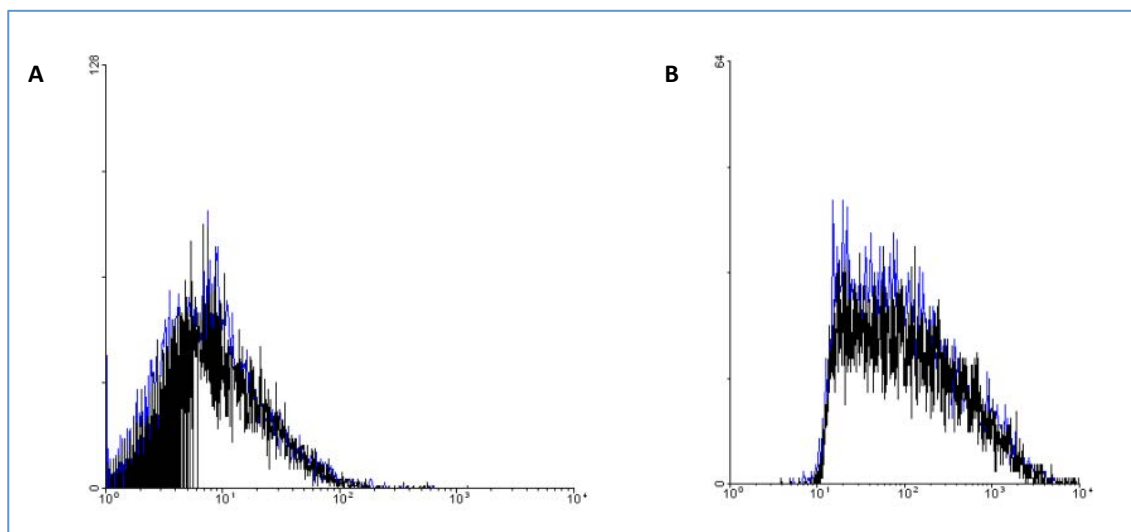


Figura 8.- Comparación de histogramas para el único pH que no mostró diferencia significativa con la conformación inicial. A) Complejidad (SSC-A), B) Tamaño (FSC-A). Se realizó la sobreposición del histograma control (azul) y el histograma de cada condición (negro) y se realizó la prueba estadística K-S para establecer que no existen diferencias significativas.

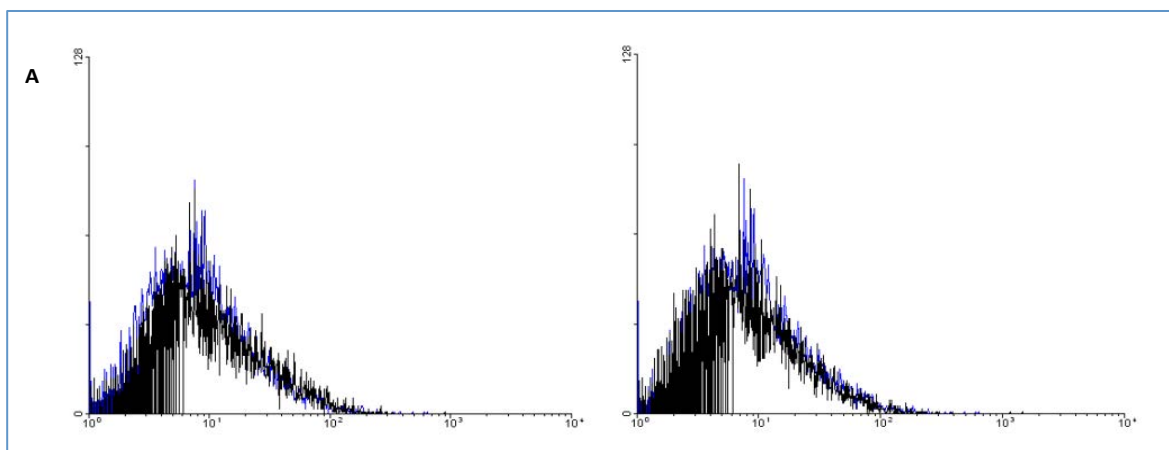


Figura 9.- Comparación de histogramas para dos temperaturas que no mostraron diferencia significativa con la conformación inicial. A) Complejidad (SSC-A), B) Tamaño (FSC-A). Se realizó la sobreposición del histograma control (azul) y el histograma de cada condición (negro) y se realizó la prueba estadística K-S para establecer que no existen diferencias significativas.

4. CONCLUSIONES

Recientemente, diferentes partículas liposomales han sido diseñadas a fin de transportar moléculas con actividad biológica. IL-2 es un potente estimulador inmune que podría ser liberado en el sitio tumoral por liposomas con el fin de ayudar al organismo a montar una respuesta inmune antitumoral mediante la activación de células asesinas.

Los linfocitos presentan receptores para la IL-2 y es mediante esta citocina que se activan a células citotóxicas o asesinas, por lo que se esperaría que la IL-2 transportada por los liposomas los active convirtiéndolos en células asesinas. De esta manera se podrían diseñar estrategias para que estos vectores liposomales puedan transportar las dosis necesarias de la molécula de IL-2 in situ y tener una posible actividad terapéutica, sin los fuertes efectos tóxicos que se producen en el organismo cuando IL-2 libre es administrada a las dosis necesarias para un efecto terapéutico vía sistémica.

La línea celular de cáncer cérvico uterino INBL tiene la característica particular de expresar el receptor para IL-2 como los linfocitos y células NK. La razón por la cual estas células epiteliales expresan un receptor típico de linfocitos es desconocida; sin embargo, creemos que representa una oportunidad para intervención en la respuesta inmune. La razón de construir liposomas que puedan presentar moléculas de IL-2 en su superficie es no solo para favorecer que se unan a células del sistema inmunológico que tienen un receptor para este factor, sino que también esperaríamos que puedan servir como un puente de unión simultánea a las células tumorales ya que también presentan el receptor y de esta forma al

tener a las células inmunocompetentes y a las tumorales en cercana proximidad se podría promover la activación del sistema inmune contra el tumor (Figura 10).

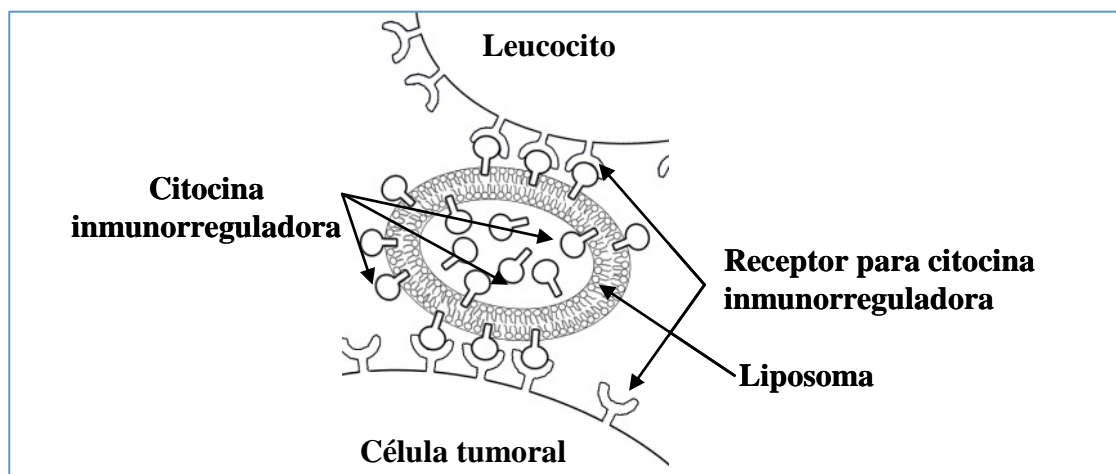


Figura 10.- Representación gráfica del posible puente entre el liposoma, la célula tumoral y una célula del sistema inmune.

Se esperaría que la unión entre las células tumorales y los linfocitos promovida por los liposomas que expresan IL-2 en su superficie externa pueda contribuir a favorecer el reconocimiento de posibles antígenos tumorales y a la activación de células citotóxicas específicas. En este trabajo presentamos evidencias de que los liposomas son capaces de reducir alrededor del 90% el crecimiento tumoral en un modelo de inducción de tumores en ratones.

Además nuestros resultados de estabilidad física y el modelo para la evaluación de la estabilidad biológica nos serán de gran utilidad para la evaluación de la compatibilidad de los liposomas IL-2 con sus posibles vehículos, necesaria como paso previo a las pruebas de fase preclínica en humanos. En este momento, los resultados de estabilidad para preformulación de los liposomas IL-2 nos indican que tenemos dos temperaturas y un pH de máxima estabilidad que son ideales para su formulación en diferentes vehículos farmacéuticos, los cuales serán patentados en breve.

5. AGRADECIMIENTOS

Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, proyectos PAPIIT 220108 y 222108 y por el proyecto ICyT PIUTE 10-100.

6. REFERENCIAS

1. Corona-Ortega, M. T.; *Inducción a la aparición de receptores Fc y a la secreción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales de ratón utilizando liposomas como acarreadores de las citocinas IL-1 β e INF γ* ; Tesis Doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México; México D.F., 2000.

2. Soto-Vázquez, R.; *Análisis epistemológico de la construcción conceptual a partir del modelo de curvas para un desarrollo biotecnológico*; Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México; México D.F., 2000.
3. Patente presentada: Rangel-Corona, R., et al. Composición de un producto antineoplásico e inmunorregulador y su uso para el tratamiento de cáncer cérvico uterino. Expediente: MX/a/2008/008681.
4. Corona, T.; Rangel, R.; Hernández, M.; Baeza, I.; Ibáñez, M.; Weiss, B. Characterization of cationic liposomes having IL-2 expressed on their external surface, and their affinity to cervical cancer cells expressing the IL-2 receptor. *Journal of Drug Targeting*, **17(7)**, 496-501 (2009).
5. Mule, J.; Shu, S.; Rosenberg, S. The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin 2 in vivo. *Journal of Immunology* **135**, 646-652 (1985).
6. Kondapaneni, M.; McGregor, J.; Salvemini, D.; Laubach, V.; Samlowski, W. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is not required for IL-2-induced hypotension and vascular leak syndrome in mice. *Journal of Immunotherapy* **31**, 325-333 (2008).
7. Bao, A.; Phillips, W.; Goins, B.; Zheng, X.; Sabour, S.; Natarajan, M. F.; Woolley, F.; Zavaleta, C.; Otto, R. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. *International Journal of Pharmacy* **316**, 162-169 (2006).
8. Kepczyński, M.; Nawalany, K.; Kumorek, M.; Kobierska, A.; Jachimska, B.; Nowakowska, M. Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency?. *Chemical Physical Lipids* **155**, 7-15 (2008).
9. Pellequer, Y.; Ollivon, M.; Barratt, G. Formulation of liposomes associated with recombinant interleukin-2: effect on interleukin-2 activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **58**, 162-167 (2004).
10. Fahr, A.; Van Hoogevest, P.; May, S.; Bergstrand, N.; Leigh, M. Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: Consequences for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **26**, 251-265 (2005).
11. Konigsberg, P.; Godtel, R.; Kissel, T.; Richer, L. The development of IL-2 conjugated liposomes for therapeutic purposes. *Biochemical and Biophysics Acta* **1370**, 243-251 (1998).
12. Bien, E.; Balcerska, A. Serum soluble interleukin 2 receptor alpha in human cancer of adults and children: a review. *Biomarkers* **13**, 1-26 (2008).
13. Rangel-Corona, R.; Rodríguez-Cruz, L.; Flores-Flores, G.; Gómez-Ruiz, C.; Soto-Cruz, I.; Mendoza-Rincon, J.F.; Weiss-Steider, B. Differential expression of the two components of the Interleukin-2 receptor in cervical cancer cells. *Monduzzie Editors* **3**, 1239-1243 (1998).
14. Rangel-Corona, R.; Corona-Ortega, T.; del Río-Ortiz, I.; Nieves-Ramírez, M.; Morán-Bañuelos, H.; González-Tenorio, O.; Cáceres-Cortés, J.; Weiss-Steider, B. Cationic liposomes bearing IL-2 on their external surface induced mice leukocytes to kill human cervical cancer cells in vitro, and significantly reduced tumor burden in immunodepressed mice. *Journal of Drug Targeting* **19(2)**, 79-85 (2011).
15. Ibáñez, M.; Gariglio, P.; Chávez, P.; Santiago, R.; Wong, C.; Baeza, I. Spermidine-condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and expression of exogenous DNA transfer by liposomes. *Biochemical Cellular Biology* **74**, 633-643 (1996).
16. Acosta Gutiérrez, J.; Juárez López, R.; Velasco Lomas, I.; Gil Alegre, M. E.; Rangel-Corona, R.; Weiss-Steider, B.; Soto Vázquez, R.; Corona Ortega, T. Estudios de estabilidad farmacéutica de un sistema constituido por un producto antineoplásico e inmunoregulador para el tratamiento del cáncer cérvico uterino. *Revista Portuguesa de Farmácia*, P-B 21 (2011).
17. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Q1B. Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products ICH harmonised tripartite guideline. 1996
18. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products. 2003.

Los libros sobre las drogas americanas en la Biblioteca Histórica de la Farmacia Suiza

Sabine Anagnostou¹, Sarah-Vanessa Schneider, François Ledermann^{2*}

¹Presidente de la Sociedad Alemana de Historia de la Farmacia. ²Responsable de la Biblioteca Histórica de la Farmacia Suiza, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, Spain

*e-mail: francois.ledermann@img.unibe.ch

An. Real Acad. Farm. Vol 80, nº 1(2014), pág. 192-200

RESUMEN

Fundada en el año 2008, la Biblioteca Histórica de la Farmacia Suiza, situada en el instituto de Historia de la Medicina de la Universidad de Berna, tiene un fondo de más de 6000 obras. Entre ellas se encuentran algunos libros que se dedican a las drogas sudamericanas. Aparte de las obras de Nicolás Monardes, también existen otras de la farmacognosia europea de finales del siglo XIX y principios del XX. Este trabajo ilustra la importancia de la transferencia de conocimientos usando la Biblioteca Histórica helvética como ejemplo.

Palabras clave: Farmacognosia; Biblioteca; América; Suiza.

ABSTRACT

Books on American drugs in the historical library of the Switzerland pharmacy

Institute houses the Historical Library of the Swiss Pharmacy, founded in 2008, for the History of Medicine of the University of Berne provides an impressive collection of more than 6000 works. Among them are some books that deal with South American drugs. Besides the famous works by Nicolás Monardes and their translations, there are also a corpus of books representing the European pharmacognosy by the end of the 19th and the beginning of the 20th century. This paper is dedicated to the transfer of scientific knowledge reflected by the works in the Helvetic historical library.

Keywords: Pharmacognosy; Library; America; Switzerland.

1. Historia de la Biblioteca Histórica de la Farmacia Suiza

El 25 de noviembre de 2008 fue fundada la institución denominada *Biblioteca Histórica de la Farmacia Suiza*. La erección del nuevo centro la patrocinó la *Asociación Suiza de Farmacéuticos PharmaSuisse* y la *Sociedad Suiza de Historia de la Farmacia*. Los fondos consisten en más de 6000 libros que se almacenan en el Instituto de Historia de la Medicina de la Universidad de Berna. Han sido catalogados y pueden ser consultados en el catálogo de la biblioteca de la mencionada universidad¹. La institución persigue la conservación de obras farmacéuticas, como libros y periódicos de diversas procedencias y épocas. Desea resaltar su interés para la investigación científica y ponerlos a la disposición del público y de los investigadores para su estudio, acentuar y destacar su valor, de acuerdo con lo expresado en los estatutos de la misma².

La Biblioteca nació gracias a la ola de “*academización*” o institucionalización de la Materia Farmacéutica en la Universidad de Berna. Fue mérito del gran *farmacognosta* suizo Friedrich August Flückiger el que la Farmacia, como asignatura, se estableciera definitivamente en la Universidad de Berna a partir de 1860. Anteriormente había sido explicada, sin estructura propia, en forma de varias clases³. Aparte de una vasta colección de Farmacognosia con un inventario detallado⁴, que todavía existe hoy en día, Flückiger adquirió numerosas obras científicas muy relevantes para la Farmacia, que al principio fueron guardadas por él mismo en la *Farmacia municipal* que dirigía. Después de que la región de Alsacia cayera de nuevo bajo el dominio de los alemanes, al final de la guerra franco-prusiana, Flückiger abandonó Berna para acceder a la jefatura del Instituto Farmacéutico de Estrasburgo. Solo la vocación de Alexander Tschirch, un farmacéutico y científico alemán, y la fundación del Instituto Farmacéutico en el año 1890 insuflaron vida nuevamente a la Farmacia académica en Berna⁵. Tschirch, que ya era un *farmacognosta* destacado durante ese tiempo, con una fama excelente en Berlín, llegó a Berna con grandes proyectos para la Farmacia, que no solamente incluían la ciencia en sí, sino también aspectos históricos y culturales. El nuevo profesor fue una persona de una consistencia científica asombrosa. No solamente se dedicaba a sus estudios farmacológicos y a sus numerosas publicaciones, sino también a investigaciones sobre la historia de la Farmacia⁶. Era un apasionado aficionado a los libros, por lo cual adquirió numerosos escritos históricos de Medicina y Farmacia, parcialmente valiosos. A menudo comentó la compra en la portada y los proveyó con su *ex libris*. Por tanto, podemos reconstruir, hoy en día, cuáles de las obras de la Biblioteca suiza proceden de su biblioteca particular⁷.

El Instituto Farmacéutico también adquirió obras farmacéuticas, que se fueron integrando en la biblioteca, igual que los libros de la Asociación Suiza de Farmacéuticos, junto con las colecciones de la Sociedad de Farmacia Suiza. Un total de más de 6000 obras que han sido divididas en la actualidad en diferentes

categorías .

Una parte inmensa y valiosa se encuadran bajo la denominación de *Raras*, que fueron impresas antes de 1800, junto a los manuscritos. Parte de ellos lo constituyen los escritos de los autores clásicos, como los del médico griego Dioscórides y del científico árabe conocido bajo la denominación de Mesue, igual que las farmacopeas históricas, por ejemplo la redactada por Moïse Charas y los textos del farmacéutico francés Nicolas Lémery.

2. La exploración de las drogas exóticas, principalmente americanas, en Europa

Puede decirse en favor de la visión de investigador de Tschirch, que él también dotó a la Biblioteca con obras antiguas acerca de los primeros conocimientos sobre las plantas medicinales americanas, que han enriquecido significativamente la Materia Médica europea y que proveyeron de nuevos agentes activos, como la quinina extraída a partir de la quina. En la ola del denominado descubrimiento de América y de la expansión europea durante la temprana Edad Moderna, los sabios europeos se dedicaron a la exploración de una flora hasta ese momento desconocida y prometedora a causa de su diversidad, que ofreció numerosas plantas medicinales a la Materia Médica europea⁸. Uno de los primeros sabios que se dedicó a la investigación de nuevas drogas de América fue el médico español Nicolás Monardes (1493-1578/88) de Sevilla⁹. Con su famosa obra *Primera y segunda y tercera partes de la historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en la medicina* (Sevilla 1574) estableció los primeros conocimientos acerca de las drogas medicinales de América; entre ellas la pasionaria, la capuchina, la planta de tabaco y el guayaco, que fue considerado un remedio contra la sífilis, enfermedad terrible hasta el descubrimiento de la **Salvarsan** y después de la penicilina. Su libro, además, contiene una descripción temprana de la obtención del bálsamo de Perú. Sin embargo, Monardes no hizo ningún estudio propio en América. Debió sus ejemplares de las drogas e, incluso, la información sobre el uso de las mismas, a agentes y viajeros por la América española. Su obra ha sido traducida a diferentes idiomas y reeditada en diversas ocasiones. Hasta hoy en día es una de las obras más significativas acerca de la Farmacognosia temprana de América.

El médico portugués Garcia da Orta, en cambio, trabajó en Goa y se dedicó a estudiar las plantas curativas del sureste asiático sobre el terreno¹⁰. Documentó los resultados de sus extensos estudios en su gran obra *Coloquios dos simples e drogas e cousas medicinais da India* (Goa 1563), escrito en forma dialogada, que es considerado como una de las tempranas pruebas y referencia contemporánea acerca de la Materia Médica del sureste asiático. En esta famosa obra el autor representó las drogas exóticas bajo diversos aspectos, como el hábitat, la morfología, la recolección, las vías comerciales, los principales centros del comercio y las falsificaciones. Así se encuentran, por ejemplo, informes sobre la

canela, el clavo, la nuez moscada, la cúrcuma, la pimienta, la galanga y la nuez de Areca. Los *Coloquios* fueron traducidos al inglés, francés, italiano y latín, en donde la forma dialogada de exposición se abandonó. Tschirch hizo referencia a ambos sabios. Apreció sus obras y méritos con todo detalle en su famoso *Handbuch der Pharmakognosie (Manual de Farmacognosia)*¹¹.

3. Los libros de la Biblioteca en los que se trata de plantas medicinales americanas.

A continuación presentamos y analizamos brevemente algunos escritos de la *Biblioteca Histórica Suiza*, en donde se refleja la influencia del descubrimiento de América sobre el desarrollo del tesoro medicinal europeo. Tanto obras de los siglos XVI y XVII como libros representativos de la Farmacognosia clásica del siglo XIX y de principios del siglo XX.

Salvo la obra *Dreyhundert auserlesene amerikanische Gewächse nach Linneischer Ordnung*, publicada en tres tomos, que fue impresa en 1785 en Núremberg, dedicada principalmente a cuestiones botánicas, los libros de la Biblioteca Histórica, que incluyen asuntos sobre drogas no europeas, especialmente iberoamericanas, se pueden clasificar en dos categorías. Por una parte, se trata de obras de los siglos XVI y XVII, principalmente las escritas por Monardes, que contienen información temprana sobre las plantas medicinales¹². Por otra parte, son trabajos del siglo XIX y de principios del XX, que representan la Farmacognosia suiza y alemana y su nivel de conocimiento acerca de las drogas iberoamericanas, y que proporcionan información sobre el establecimiento de las drogas americanas en la Materia Médica europea.

La *Biblioteca Histórica de la Farmacia Suiza* posee tres obras del siglo XVI y de principios del XVII con textos del médico de Sevilla. El más antiguo fue impreso en el año 1574 por Christophorus Plantinus en Amberes (Figura 1) y consiste en dos escritos reunidos, traducidos en latín por el botánico neerlandés Carolus Clusius (también conocido como Charles de l'Ecluse)¹³. Después del *Aromatum et simplicium aliquot medicamentorum apud Indos nascentium, historia* del médico portugués Garcia da Orta, residente en Goa, sigue el *De simplicibus medicamentis ex Occidentali India delatis, quorum in Medicina usus est*, escrito por Nicolás Monardes. La versión española está descrita de la siguiente manera: *De esta obra hacen mención Arana de Varflora y Don Nicolás Antonio con el título siguiente: De las drogas de la India. Dos tomos: Nosotros poseemos un ejemplar, que dice así: "Primer aparte del libro que trata de las cosas que se traen de la Indias Occidentales que sirven al uso de Medicina y de la orden que se ha de tener la raíz del Mechoacan... Hecho e copilado por el doctor Monardes Médico en Sevilla. En Sevilla en casa de Alonso Escriuano Impresor en la calle de la Sierpe 1574*¹⁴. *La Primera impresión en 1565*"¹⁵.

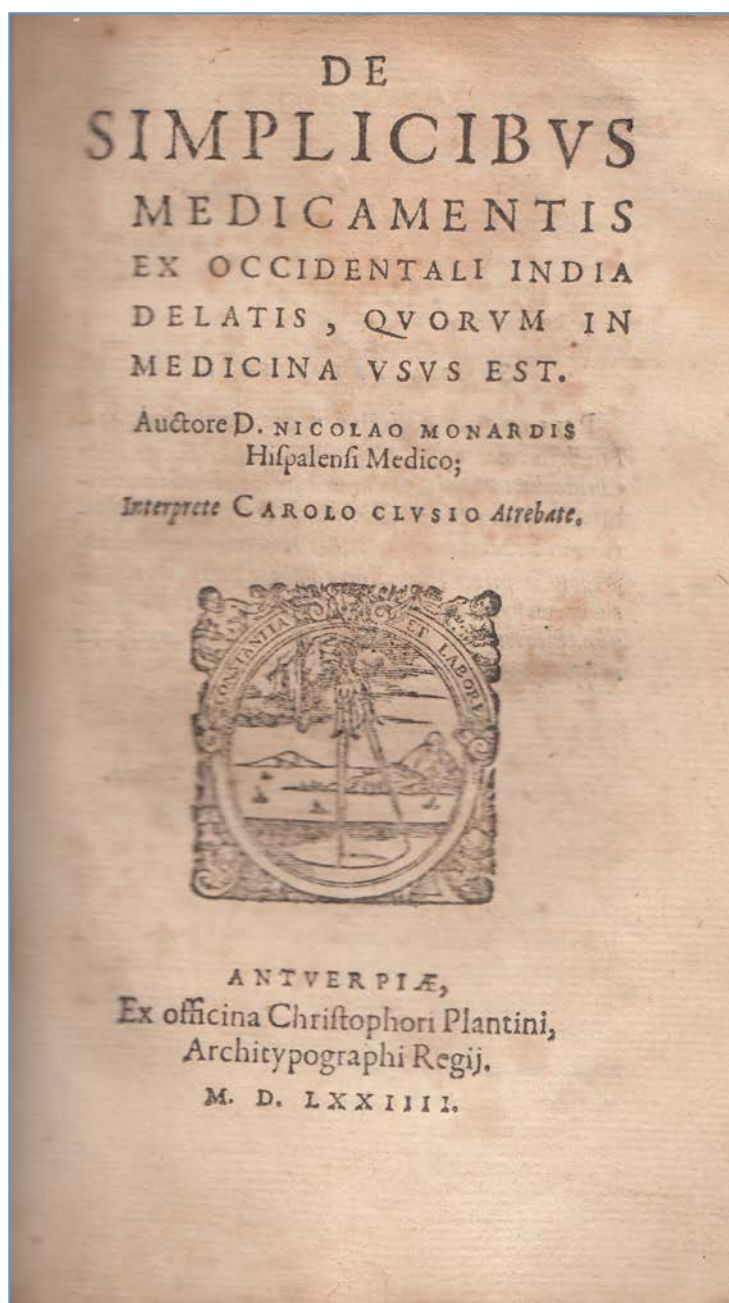


Figura 1.- Nicolás Monardes, *De simplicibus medicamentis...* Amberes, 1574.

Además, la biblioteca bernesa alberga una edición italiana (Venecia 1576) (Figura 2)¹⁶ y una alemana que tiene su origen en la traducción latina de Clusius de la *Historia medicinal* de Monardes¹⁷ del año 1579 con el título *Die Schrift des Monardes: "Simplicium medicamentorum ex novo orbe delatorum, quorum in medicina usus est, historia, übersetzt ins Deutsche und mit Commentar versehen"* (1895).

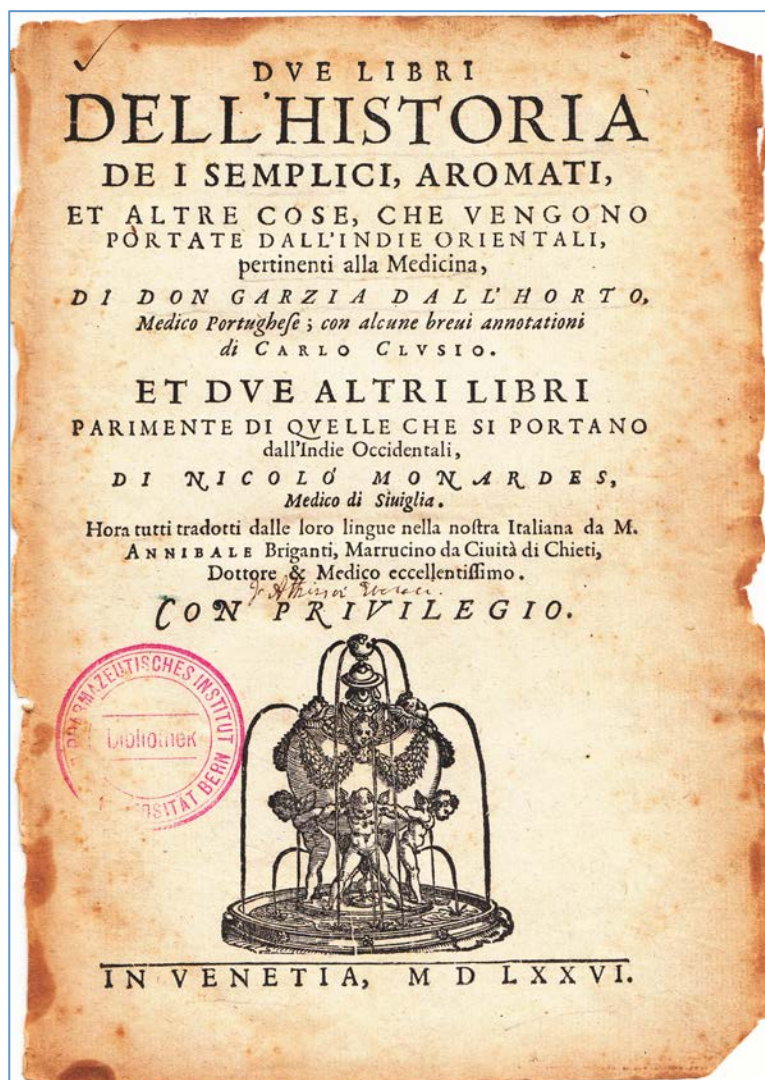


Figura 2.- García da Orta, Nicolás Monardes, *Due libri dell'istoria de i semplici...* Venecia, 1576.

Con científicos como Flückiger, Tschirch, Zörnig y Hartwich la Farmacognosia suiza experimentó un gran apogeo a partir de la segunda mitad del siglo XIX y hasta principios del siglo XX. Una literatura técnica inmensa, incluso numerosas tesis doctorales de más de doscientos doctorandos, tanto como colecciones *farmacognósicas*, no solamente reflejan la actividad de investigación intensiva de aquellos grandes sabios, sino también la internacionalización de la Farmacognosia. Alexander Tschirch emprendió un largo viaje de estudios al sureste asiático que influyó persistentemente en su trabajo. Las drogas americanas también fueron objeto de la investigación científica y forman un campo propio en la Farmacognosia. Están presentes en las colecciones *farmacognósicas* de drogas; aparecen en varias ediciones de la *Pharmacopoea Helvetica* como plantas medicinales oficinales y fueron objeto de diferentes tesis doctorales y libros de texto, los cuales también se conservan en la Biblioteca Histórica. Las bibliografías clásicas de Friedrich August Flückiger y de Alexander Tschirch también se ocupan del tesoro de plantas medicinales americanas.

Sin embargo fue Carl Hartwich, futuro profesor de Farmacia en Zúrich¹⁸, quien publicó un estudio, dedicado únicamente a este tema. En su contribución *Die Bedeutung der Entdeckung von Amerikafür die Drogenkunde*¹⁹ analiza la significancia temporal y permanente de varias drogas americanas para la Farmacia y la Medicina europea en base a fuentes contemporáneas desde el descubrimiento de América y hasta la literatura técnica de la Farmacognosia del siglo XIX y las bibliografías especializadas farmacéuticas²⁰.

4. Conclusión

El interés de los farmacólogos de la Suiza alemana por las drogas iberoamericanas, que se refleja en los fondos de la Biblioteca Histórica, demuestra la continuidad de la importancia de los remedios exóticos para la Farmacia y la Medicina entre la fase de los descubrimientos del siglo XVI y el período alrededor del año 1900. Hasta hace cien años los medicamentos a base de plantas, como la quina, el guayaco, las hojas de coca y muchas otras, desempeñaron un papel importante en la terapia, y hoy en día se puede observar otra vez un nuevo interés por estos remedios. Simultáneamente también se manifiesta otro fenómeno, que influye en diversos científicos y con ello en el desarrollo de la Materia Médica europea: la fascinación por lo exótico que, por ejemplo, se expresa en los viajes de estudios de Flückiger, Tschirch y Hartwich, y en numerosos escritos sobre productos extra europeos²¹.

¹ aleph.unibas.ch. (acceso 09.12.2013).

² Biblioteca Histórica de la Farmacia Suiza, Estatutos.

³ Haug, T.; *Friedrich August Flückiger (1828-1894) Leben und Werk*; Stuttgart, 1985. (Quellen und Studienzur Geschichte der Pharmazie, 32). Hörmann, U.; *Die akademische Ausbildung der ApothekerimKanton Bern*; Bern, 1998 (Veröffentlichungen der Schweizerischen Gesellschaftfür Geschichte der Pharmazie, 18).

⁴ Ledermann, F.; Hörmann, U. A short history of the pharmacognostic collection of the University of Berne (Switzerland). *Pharmacy in History*, **41**, 60-64 (1999). www.img.unibe.ch (acceso 09.12.2013)

⁵ Hörmann, U.; op. cit. ut supra.

⁶ Bork, K.; *Alexander Tschirch. Eine Studieüber das Leben Eines Wegweisenden Pharmakognosten*, Würzburg, 2003. Müller-Jahncke, W.-D, *Alexander Tschirchals Historikeren: 50 Jahre Tschirch*; Ledermann F., y Zerobin, C., Ed.; Schwyz, 2007. (Veröffentlichungen der Schweizerischen Gesellschaft für Geschichte der Pharmazie, 28), 125-134. Schramm, G. *Prof. Dr. Alexander Tschirch (1856-1939), Bern, als Pharmazie historiker*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **52**, 383-400 (1977)

⁷ Ledermann, F; *Die Bibliothek ist doch unser Stolz“ - Alexander Tschirch als Bücher sammler*; en preparación para *Geschichte der Pharmazie*.

⁸ Vieca T., C.; El mutuo influjo de la terapéutica en ambos mundos, *Ciencia y técnica en Latinoamérica en el periodo virreinal*, Puerto, J. ed., s.l., Tf. Editores, n.d., 150-177. Folch Jou, G., *Historia de la Farmacia*, Madrid, 1972, p. 227. Valverde, J. L., *Evaluation of Latin America Materia Medica and its Influence on Therapeutic*, Granada, 2010.

⁹ Sobre la vida y los trabajos de Nicolás Monardes, cf. Hirsch, A. (Ed.); *Biographisches Lexikon der hervorragenden Ärzte aller Zeiten und Völker. Dritte, unveränderte Auflage*; durchgesehen und ergänzt von W. Haberling, F. Hübötter, H. Vierordt. 5 Bde. und 1 Ergbd., München/Berlin 1962, Bd. 4, p. 236sq. Tudela J. (Ed.); *El legado de España a América*. 2 vols. Madrid 1954, p. 287 sq. Elferink, J. (1979): The significance of the Pre-Columbian pharmaceutical knowledge for European medicine in the XVth century. *Pharmaceutica Acta Helvetica* **54**, 299-301 (1979). Barrera, A.; *Local herbs, global medicines*, in Smith, P. H. y Findlen, P. (Eds.): *Merchants and Marvels: Commerce, Science, and Art in Early Modern Europe*. New York 2002, 163-181.

¹⁰ Sobre la vida y los trabajos de Garcia da Orta, cf. Gillispie, C. G.; *Dictionary of Scientific Biography*. New York 1970-1990, vol. 10; 236-238. M. de Jong: *Garcia da Orta et son livre sur les simples et drogues de l'Inde*, in Garcia da Orta: *Aromatum, et simplicium aliquot medicamentorum apud Indos nascentium historia par Carolus Clusius. Etant la traduction latine des Coloquios dos simples e drogas e cousas medicinais da India de Garcia da Orta*. Facsimile de l'édition Antwerpen 1567 avec une introduction du M. de Jong et du D. A. WittopKoning. Nieuwkoop 1963 (Dutch ClassicsonHistory of Science; 6), pp. 7-23. Liberato, M. C.; Contribuição para o conhecimento de Garcia de Orta. *Revista de Ciências Agrárias* **34** (1), 110-119 (2011). http://www.scielo.oces.mctes.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2011000100010 (Acceso 19.1.2014).

¹¹ Tschirch, A.; *Handbuch der Pharmakognosie*. Vol. 1/2; Tauchnitz; Leipzig, 1910 ; p.735-738 y p. 779-782.

¹² Rodríguez Marín, F.; *La verdadera biografía de Nicolás Monarde*; Padilla Libros; Sevilla, 1988.

¹³ Sobre las obras y la significación de Carolus Clusius, cf. Florike / Paul Hoftijzer / Robert Visser: *CarolusClusius: Towards a cultural history of a Renaissance naturalist*; Koninklijke Nerderlandse Akademie van Wetenschappen, Amsterdam, 2007 (History of Science and Scholarship in the Netherlands, 8).

¹⁴ De esta edición existe una reproducción facsimilar; cf. NicolasMonardes; *Historia Medicinal de la Cosas que se traende nuestras Indias Occidentales que sirven en Medicina*; Padilla Libros; Sevilla, 1988.

¹⁵ Lasso de La Vega y Cortezo, J.; *Biografía y estudio critico de la obras del médico Nicolás Monardes*; Padilla Libros; Sevilla, 1988, p. 27.

¹⁶ *Due libri dell'Historia de i Semplici Sevilla, Aromati et altre Cose, che Vengono portate dall'Indie Orientali, pertinenti alla Medicina di Don Garzia Dall'Horto, Medico Portuguese; con alcune brevi annotationi di Carlo Clusio. Et Due Altri Libri parimente di Quelle che si portano dall'Indie Occidentali, di Nicolo Monardes, Medico di Siviglia. Hora tutti tradotti dalle loro lingue nella nostra Italiana, da M. Annibale Briganti, Marrucino da Cività di Chieti, Dott. & Medico eccellentissimo*; In Veneta, MDLXXVI.

¹⁷ Stünzner, K.; *Die Schrift des Monardesüber die Arzneimittel Americas*; Max Niemeyer, Halle a.S., 1895.

¹⁸ Kokoschka, K.; *Carl G.E.V. Hartwich*; Tesis doctoral; Berlin, 1989.

¹⁹ Hartwich, C.; *Die Bedeutung der Entdeckung von Amerikafür die Drogenkunde*; Julius Springer; Berlin, 1892.

²⁰ Para el traslado de la Materia médica entre Europa y América, ver: Valverde, J. L.; *Evaluation of Latin American Materia Medica and Its Influence on Therapeutics*; Granada, 2010. Anagnostou, S.; *Missions pharmazie. Konzepte, Praxis, Organisation und wissenschaftliche Ausstrahlung*; Stuttgart, 2011 (Sudhoffs Archiv, Beihefte; 60).

²¹ Ledermann, F.; *Iter pharmaceuticum*; Bern, 2003 (Veröffentlichungen der Schweizerischen Gesellschaft für Geschichte der Pharmazie, 24).

Novel Compounds containing 1,3,4-oxadiazole and pyrazole-3-one Nuclei – Synthesis and *in vitro* Antimicrobial Evaluation

Krishna Naik¹, Aluru Raghavendra Guru Prasad^{2*}, Yadati Narasimha Spoorthy¹, Mokkapati Pariplavi³, Lakshmana Rao Krishna Rao Ravindranath¹

¹Sri Krishnadevaraya University, Anantapur, A.P., India. ²ICFAI Foundation for Higher Education, Hyderabad, A.P., India. ³Osmania Medical College, Osmania University, Hyderabad, A.P., India.
*e-mail: guruprasadar@yahoo.co.in

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 1(2014), pág. 201-213

ABSTRACT

New series of heterocycles containing 1,3,4-oxadiazole and pyrazole-3-one moiety have been synthesized and evaluated *in vitro* against *Staphylococcus aureus* NCCS 2079, *Bacillus cereus* NCCS 2106, *Escherichia coli* NCCS 2065, *Pseudomonas aeruginosa* NCCS 2200, *Aspergillus niger* NCCS 1196 and *Candida albicans* NCCS 2106. The compounds demonstrated moderate antimicrobial activity against selected fungal and bacterial strains.

Keywords: Synthesis; 1,3,4-Oxadiazoles; Pyrazole-3-ones; Antimicrobial activity.

RESUMEN

Nuevos compuestos que contienen núcleos 1,3,4-oxadiazol y pirazol-3-ona. Síntesis y actividad antimicrobiana "in vitro"

Nuevas series de compuestos heterocíclicos que contienen 1,3,4-oxadiazol y pirazol-3-ona han sido sintetizadas y evaluadas *in-vitro* contra *Staphylococcus aureus* NCCS 2079, *Bacillus cereus* NCCS 2106, *Escherichia coli* NCCS 2065, *Pseudomonas aeruginosa* NCCS 2200, *Aspergillus niger* NCCS 1196 y *Candida albicans* NCCS 2106. Los compuestos demostraron actividad antimicrobiana moderada contra estirpes fúngicas y bacterianas seleccionadas.

Palabras clave: Síntesis; 1,3,4-Oxadiazol; Pirazol-3-uno; Actividad antimicrobiana.

1. INTRODUCTION

Heterocycles bearing nitrogen, oxygen and sulphur atoms in their structure have received remarkable attention because of their biological and pharmacological applications [1-3]. Among the wide variety of heterocycles that were explored for developing pharmaceutically important molecules, compounds containing 1,3,4-oxadiazole nucleus [4-7] and pyrazole nucleus [8-13] constitute the important class of compounds exhibiting diverse and extensive spectrum of biological activities. This scenario led us to synthesize the novel compounds VII and IX containing 1,3,4-oxadiazole and pyrazole nuclei and evaluate their antibacterial and antifungal activities.

2. MATERIALS AND METHODS

All chemicals used were analytical grade obtained from Merck India Limited, India. All the glass ware used were of borosilicate grade. The standard bacterial and fungal stains were procured from National Centre for Cell Science, Pune, India. UV-Visible spectrophotometer manufactured by Shimadzu Corporation, Japan was used for absorption measurements. The IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer 983 IR spectrometer. The ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300F (200 MHz) NMR spectrometer using DMSO – d₆ as solvent and TMS as an internal standard. Mass spectra of the compounds were recorded on a Jeol JMS-D300 mass spectrometer operating at 70 eV.

2.1. General Synthetic Procedures

The novel compounds were synthesized by specified procedures and the critical intermediate compounds were characterized by elemental analysis and spectral data.

2.1.1. Synthesis of {4-[3-Methyl-5-oxo-4-(4^l-substituted phenyl hydrazono)-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-phenoxy}-acetic acid hydrazide (V).

a. Synthesis of substituted phenyl diazonium chloride (I)

The required primary amine was dissolved in a suitable volume of water containing 2.5–3.0 equivalents of hydrochloric acid (or sulphuric acid). The solution was cooled to 0 °C. To the crystals of amine hydrochloride (or sulphate) so obtained, an aqueous solution of sodium nitrite was added portion wise. An excess of acid was necessary to stabilize the diazonium chloride. Similar procedure was adopted for the preparation of other substituted phenyl diazonium chlorides.

b. Synthesis of substituted phenyl diazonium ethyl acetoacetic ester (II)

To an ice-cold solution of mixture of sodium acetate (1.0 g) in 100 mL of aqueous alcohol and ethyl acetoacetate (0.1 mol) in 50 mL of ethanol, the corresponding diazonium chloride was added till yellow crystals were separated

out. These crystals were filtered, washed with water and dried.

c. Synthesis of 3-methyl-4-(substituted phenyl hydrazono)-pyrazoline-5-one (III)

3-methyl-4-(4^l-substituted phenyl hydrazono)-pyrazoline-5-one (**III**) was synthesized by the condensation of 4-substituted phenyl hydrazono acetoacetic ester (**II**) and hydrazine in the presence of required amounts of dimethylformamide. The mixture was subjected to microwave irradiation at 150W intermittently at 30 sec intervals for 2 minutes. After complete conversion as indicated by TLC, the reaction mixture was cooled and washed with cold water. The precipitated **III** was filtered and recrystallized from ethanol.

d. Synthesis of {4-[3-Methyl-5-oxo-4-(substituted phenyl hydrazono)-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-phenoxy}-acetic acid ethyl ester (IV)

A mixture of **III**, anhydrous K₂CO₃ and DMF was stirred at room temperature for 8 hours. The reaction mixture was diluted with ice cold water. The separated solid was filtered and recrystallized from ethanol.

e. Synthesis of {4-[3-Methyl-5-oxo-4-(4^l-aryl-hydrazono)-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-phenoxy}-acetic acid hydrazides (V)

A mixture of **IV** and hydrazine hydrate in ethanol was refluxed for five hours. The reaction mixture was cooled to room temperature and poured in ice cold water with continuous stirring. The separated solid was filtered, washed with water and recrystallized from ethanol. Other members of the series **V** were prepared on the same lines. The reaction scheme is depicted in Scheme 1.

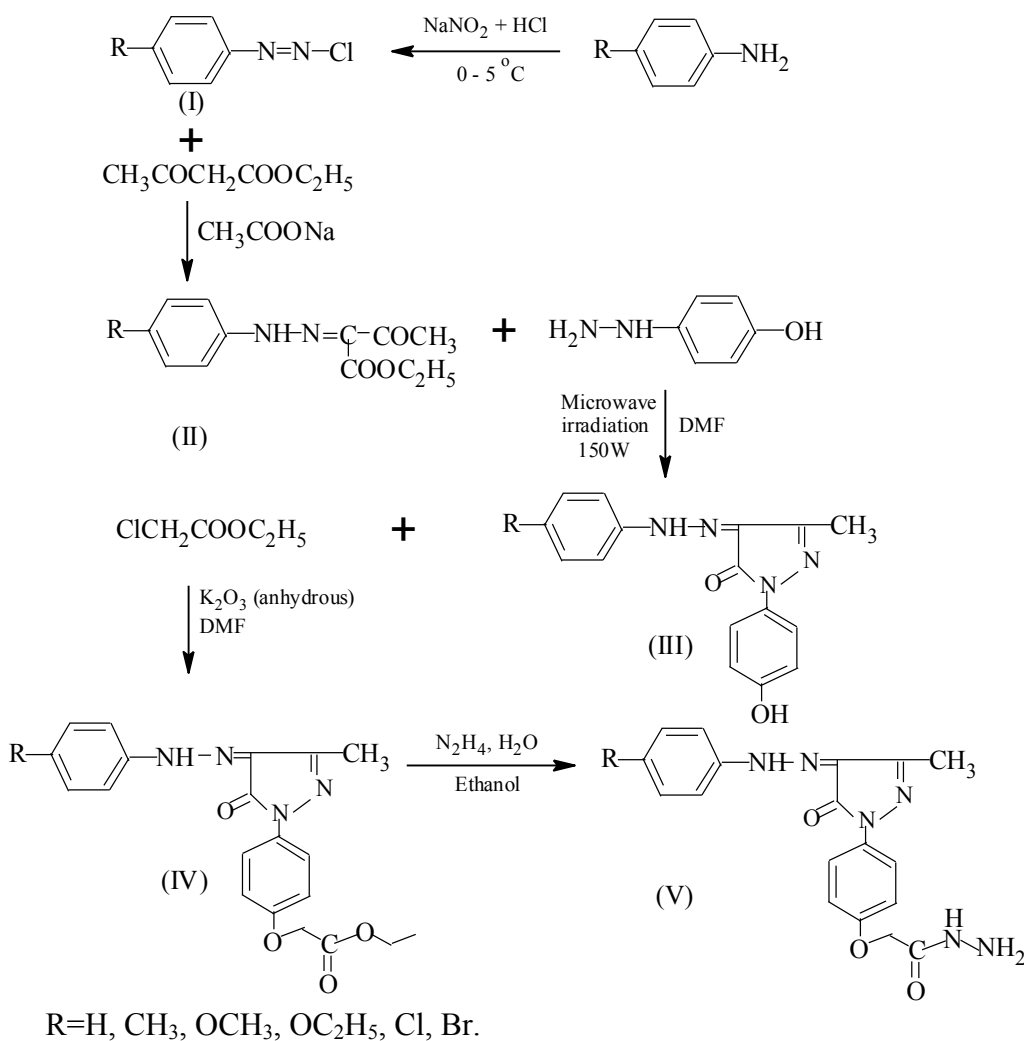
2.1.2. Synthesis of 2-(4-acetyl-5,5-disubstituted 4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazole-2-yl(methoxyphenyl)-5-methyl-4(aryl hydrazono)-pyrazol-3-ones (VII)

a. Synthesis of {4-[3-methyl-5-oxo-4-(4^l-phenyl hydrazono)-4,5-dihydro-pyrazol-1-yl]-phenoxy}-acetic acid (1-phenyl-ethylidene)-hydrazide (VI)

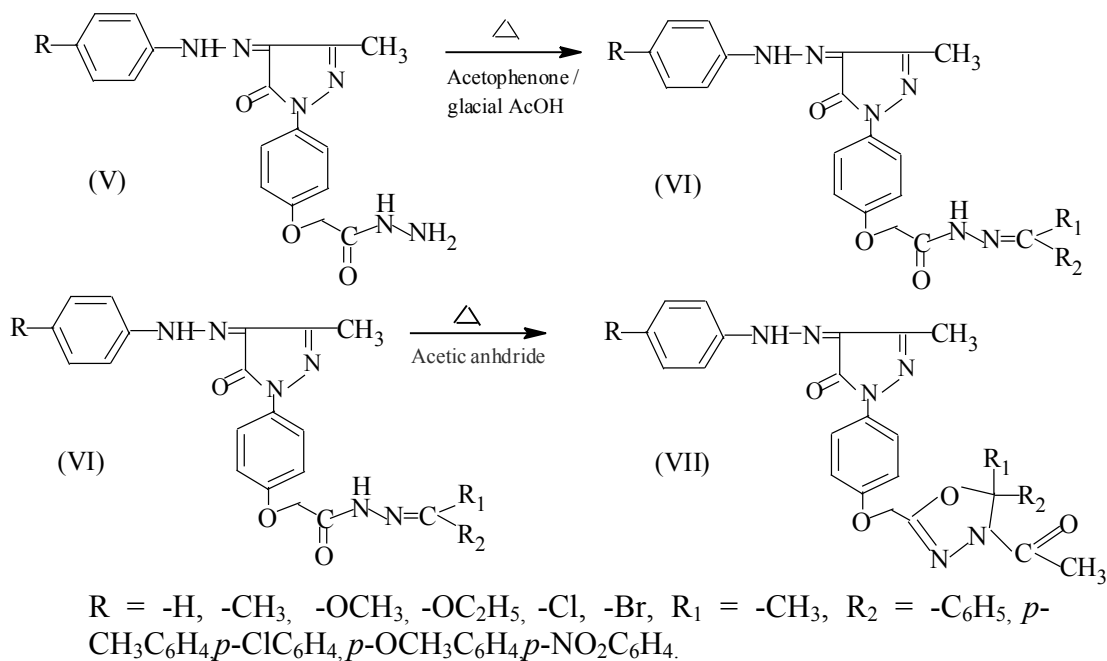
A mixture of **V** (0.01 mol) in hot methanol (25 mL), acetophenone (0.01 mol) and a drop of glacial acetic acid were refluxed for 3 hours. The solid separated was filtered, washed with cold methanol and recrystallized from methanol to give **VIa**. Compounds **VI b-h** were synthesized on similar lines.

b. Synthesis of 2-(4-acetyl-5,5-disubstituted 4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazole-2-yl(methoxyphenyl)-5-methyl-4(4^l-substituted phenyl hydrazono)-pyrazol-3-ones (VII)

A mixture of **VIa** (0.01 mol) and an excess of acetic anhydride (10 mL) were refluxed for 2 hours. The excess acetic anhydride was distilled off and the residue was poured on to crushed ice. The solid obtained was filtered, washed with water and recrystallized from aqueous methanol to get **VIIa**. The cyclization reaction was extended to other hydrazones **VI b-j** and in each case the respective compound was isolated. The reaction scheme is given in Scheme 2.



Scheme 1.-Synthesis of {4-[3-Methyl-5-oxo-4-(4-substituted phenyl hydrazono)-4,5-dihydropyrazol-1-yl]-phenoxy}-acetic acid hydrazide (V).



Scheme 2.- Synthesis of 2-(4-acetyl-5-methyl-5-phenyl-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazole-2-yl(methyl))-5-methyl-4(4-phenyl hydrazono)-2,4-dihydrazono-pyrazol-3-one (VII).

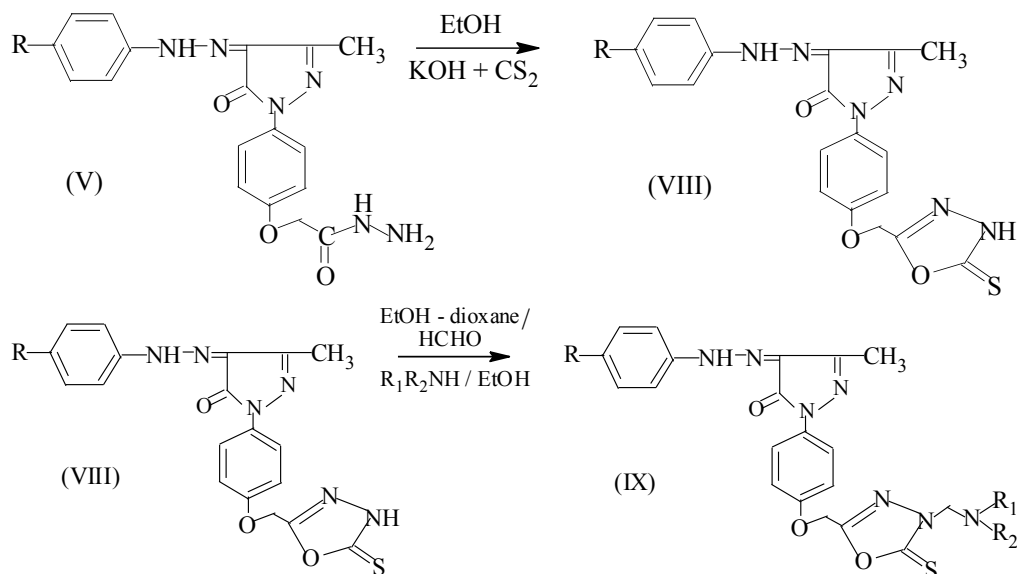
2.1.3. Synthesis of Mannich bases containing [1,3,4] oxadiazole and pyrazol-3-one nuclei (IX)

a. 5-methyl-4-(4'-substituted phenyl hydrazono)-2-(5-thioxo-[1,3,4]oxadiazole-2-yl-methoxyphenyl)-2,4-dihydro-pyrazol-3-one (VIII)

A mixture of **V** (19.9 g, 0.1 mol), KOH (5.5 g, 0.1 mol), ethanol (100 mL) and carbon disulphide (6.02 mL, 0.1 mol) was refluxed in a water bath till the evolution of hydrogen sulphide is ceased. The excess of alcohol was removed by distillation. The reaction mixture was cooled to room temperature, poured into ice cold water and neutralized with dilute hydrochloric acid. The precipitate so formed was filtered, washed with water, dried and recrystallized from ethanol-dioxane mixture (1:1) to give **VIII**.

b. 5-methyl-4-(4'-substituted phenyl hydrazono)-2-[5-thioxo-4-[alkyl/phenyl/heterocyclic amino methyl]-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl-methyl]-2,4-dihydro-pyrazol-3-ones (IX)

A mixture of **VIII** (0.01 mol) in ethanol and dioxane (20 mL) was treated with formaldehyde (40%, 1.5 mL). Appropriate amine (0.01 mol) in ethanol (10 mL) was added to the reaction mixture and stirred over night. The precipitated Mannich base was filtered, dried and recrystallized from ethanol-DMF mixture (1:1). The reaction sequence is outlined in Scheme 3.



NHR₁R₂ = morpholinyl, piperazinyl, *N*-methylpiperazinyl; R₁ = -H, R₂ = *p*-Tolyl, *p*-anisyl, *p*-fluorophenyl, *p*-chlorophenyl, *p*-bromophenyl, *p*-nitrophenyl; R₁ = R₂ = ethyl or phenyl.

Scheme 3. Synthesis of Mannich bases containing [1,3,4] oxadiazole and pyrazol-3-one moiety.

2.2. Antimicrobial activity

a. Antibacterial activity

The antibacterial activity of synthesized compounds (250 µg/mL in DMSO) was preliminarily studied by disc diffusion method. The procedure followed for the disc diffusion method is given below.

A suspension of *Staphylococcus aureus* was added to sterile nutrient agar at 45°C. The mixture was transferred into sterile petri-dishes to a depth of 3 mm and allowed to solidify. Sterile discs of 5 mm in diameter (made of Whatmann Filter paper) were immersed in solutions of synthesized compounds. Sterile discs immersed in DMSO were used as control. Both chemical-treated and DMSO-treated discs were laid down onto bacteria mixed agar plates. The plates were allowed to stand for 1 hour at room temperature followed by incubation at 37°C for 24 hours and observed for antibacterial activity. The diameter of the zone of inhibition was measured in each plate. The average zone of inhibition was calculated. A similar procedure was adopted for the antibacterial activity studies against other organisms.

b. Antifungal activity

The procedure described above was followed for antifungal activity against *Aspergillus niger* NCCS 1196 and *Candida albicans*. Compounds were treated at several different concentrations using DMSO as a solvent.

c. Determination of Minimum Inhibitor Concentration

The procedure followed to find out MIC by Broth Dilution Method is given below.

Standardized inoculum (matched to McFarland BaSO₄ standard) of suspension of organisms was prepared. A series of glass tubes containing different concentrations of test compounds dissolved in DMSO and spillover in nutrient broth were incubated with one drop of inoculum and shaken gently to mix the contents. Two growth control tubes were also prepared by mixing 0.1 mL of control and 0.9 mL of sterile saline and its optical density was determined. The control contained 1×10^5 colony forming units /mL which is equivalent to 20 colonies.

Tubes were incubated for 24 hours at 37°C in air. The turbidity developed in each tube was recorded by UV-Visible spectrophotometer. The turbidity produced by the broth (without inoculum) was considered as 100 % transparency. The minimum inhibitory concentration (MIC) was noted as the concentration of the test sample which completely inhibits the growth of the microorganism i.e. 100 % transparency.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Characterization of synthesized compounds

a. Elemental analysis details of compounds V (-R, M.P., Yield, Molecular formula, Element: Found %, (Calc %))

Va: H, 152 °C, 65 %, C₁₈H₂₂N₆O₃, C:58.37(58.25), H:5.94(5.86), N:22.70(22.65), O:12.97(12.85).

Vb: CH₃, 153 °C, 60 %, C₁₉H₂₄N₆O₃, C:59.37(59.26), H:6.25 (6.17), N:21.87(21.76), O:12.23(12.14).

Vc: OCH₃, 156 °C, 75%, C₁₉H₂₄N₆O₃, C:57.00(55.85), H:6.00 (5.68), N:21.00 (19.85), O:16.00 (15.85).

Vd: OC₂H₅, 168 °C, 80 %, C₂₀H₂₆N₆O₄, C:57.97(57.85), H:6.28(6.18), N:20.28(20.20), O:15.45(15.35).

Ve: Cl, 174 °C, 75 %, C₁₈H₂₁N₆O₃Cl, C:53.39(53.29), H:5.19(5.10), N:20.76(20.66), O:11.86(11.76), Cl:8.77(8.66).

Vf: Br, 169 °C, 65 %, C₁₈H₂₁N₆O₃Br, C:48.11(47.98), H:4.71(4.60), N:18.17(18.07), O:10.89(10.78), Br:17.69(17.58).

b. IR (KBr) Spectral data (ν_{max} in cm⁻¹)

Va: 3445, 3425 (NH₂), 3305 (NH), 1665 (C=O), 1620 (C=N).

Vb: 3400, 3420 (NH₂), 3285 (NH), 1665 (C=O), 1610 (C=N).

Vc: 3425, 3405 (NH₂), 3200 (NH), 1615 (C=N), 1555 (C=O).

Vd: 3435, 3415 (NH₂), 3300 (NH), 1615 (C=N), 1660 (C=O).

Ve: 3420, 3400 (NH₂), 3275 (NH), 1645 (C=O), 1610 (C=N).

Vf: 3444, 3424 (NH₂), 3290 (NH), 1650 (C=O), 1605 (C=N).

c. ¹H NMR (DMSO - d₆) Spectral data (δ in ppm)

Va: 1.2 (s, 3H, CH₃), 2.1 (s, 2H, NH₂), 3.85 (s, 2H, O-CH₂-CO) 6.8 (s, 1H, Ar-NH) 7.1-7.3 (m, 5H, C₆H₅), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7(d, 2H,C₆H₄), 8.4 (s,1H,NH)

Vb: 0.9 (s, 3H, CH₃), 1.16 (s, 3H, CH₃), 2.06 (s, 2H, NH₂), 3.80(s, 2H, O-CH₂-CO) 6.8(s,1H,Ar-NH) 7.1-7.3 (m, 4H, C₆H₄),7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7(d, 2H,C₆H₄), 8.36 (s, 1H, N, CONH)

Vc: 1.12 (s, 3H, CH₃), 2.02 (s, 2H, NH₂), 3.24 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 2H, O-CH₂-CO), 6.8 (s, 1H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 4H, C₆H₄), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 8.32 (s, 1H, NH)

Vd: 0.9 (s, 3H, CH₃), 1.11 (t, 3H, CH₃), 2.06 (s, 2H, NH₂), 3.14 (q, 2H, O-CH₂), 3.8 (s, 2H, O-CH₂-CO), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 4H, C₆H₄), 7.4 (d, 2H,C₆H₄), 7.7(d,2H,C₆H₄), 8.36 (s,1H,NH)

Ve: 1.08 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 2H, NH₂), 3.82 (s, 2H, O-CH₂-CO) 6.8 (s, 1H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 4H, C₆H₄), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 8.38 (s, 1H, NH)

Vf: 1.04 (s, 3H, CH₃), 2.04 (s, 2H, NH₂), 3.78 (s, 2H, O-CH₂-CO), 6.8 (s, 1H Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 4H, C₆H₄), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 8.34 (s, 1H, NH)

d. Elemental analysis details of compounds VI (-R, -R₁, -R₂, M.P., Yield, Molecular formula)

VIa: -H, -H, -C₆H₅, 240 °C, 75 %, C₂₆H₂₈N₆O₃, C:66.10(65.95), H:5.93(5.83), N:17.93(17.80), O:10.16(10.02).

VIb: -CH₃, -CH₃, -C₆H₅, 245 °C, 77 %, C₂₇H₃₀N₆O₃, C:66.66(66.50), H:6.17(6.05), N:17.28(17.12), O:9.87(9.72).

VIc: OCH₃, CH₃, C₆H₅, 35 °C, 72 %, C₂₇H₃₀N₆O₄, C:64.54(64.42), H:5.97(5.83), N:16.73(16.58), O:12.74(12.62).

VI d: OC₂H₅, CH₃, C₆H₅, 250 °C, 73 %, C₂₈H₃₂N₆O₄, C:65.11(64.95), H:6.20(6.05), N:16.27(16.12), O:12.40(12.22).

VIe: Cl, CH₃, C₆H₅, 230 °C, 75, C₂₆H₂₇N₆O₃Cl, C:61.59(61.42), H:5.33(5.23), N:16.58(16.46), O:9.47(9.33), Cl:7.00(6.86).

VI f: Br, CH₃, C₆H₅, 255 °C, 78 %, C₂₇H₂₇N₆O₃Br, C:56.63(56.52), H:4.90(4.78), N:15.24(15.07), O:8.71(8.58), Br:14.50(14.37).

VIg: H, CH₃, CH₃C₆H₄, 260 °C, 72 %, C₂₇H₃₀N₆O₃, C:66.64(66.48), H:6.17(6.05), N:17.20(17.07), O:9.87(9.70).

VIh: H, CH₃, ClC₆H₄, 265 °C, 76 %, C₂₆H₂₇N₆O₃Cl, VIh: C:61.59(61.45), H:5.33(5.19), N:16.58(16.45), O:9.47(9.32), Cl:7.00(6.85).

VIi: H, CH₃, OCH₃C₆H₄, 270 °C, 70 %, C₂₇H₃₀N₆O₄, C:64.54(64.42), H:5.97(5.81), N:16.73(16.59), O:12.74(12.60).

VIj: H, CH₃, NO₂C₆H₄, 272 °C, 72 %, C₂₆H₂₇N₇O₅, C:60.34(60.20), H:5.22(5.07), N:18.95(18.82), O:15.47(15.30).

e. IR (KBr) Spectral data (ν_{max} in cm⁻¹)

VIa: 3185 (NH), 1665 (C=O), 1600 (C=N)

VIb: 3175 (NH), 1670 (C=O), 1602 (C=N)

VIc: 3200 (NH), 1665 (C=O), 1605 (C=N)

VI d: 3190 (NH), 1670 (C=O), 1604 (C=N)

VIe: 3210 (NH), 1650 (C=O), 1605 (C=N)

VI f: 3215 (NH), 1660 (C=O), 1602 (C=N)

VIg: 3195 (NH), 1670 (C=O), 1605 (C=N)

VIh: 3190 (NH), 1675 (C=O), 1604 (C=N)

VIi: 3205 (NH), 1660 (C=O), 1605 (C=N)

VIj: 3180 (NH), 1660 (C=O), 1604 (C=N)

f. ¹H NMR (DMSO-d₆) Spectral data (δ in ppm)

VIa: 1.52 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, N=C-CH₃), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.0 (s, 2H, O-CH₂-CO), 7.1 – 7.3 (m, 10H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.58 (d, 2H, Ar-H), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 10.92 (s, H, NH)

VIg: 1.50 (s, 3H, CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, N=C-CH₃), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.23 (s, 2H, O-CH₂-CO), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, Ar, C₆H₄), 10.90 (s, H, NH),

VIh: 1.58 (s, 3H, CH₃), 2.39 (s, 3H, N=C-CH₃), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.27 (s, 2H, O-CH₂-CO), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 10.94 (s, H, NH)

VIi: 1.53 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 3H, N=C-CH₃), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.26 (s, 2H, O-CH₂-CO), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 10.93 (s, H, NH)

VIj: 1.48 (s, 3H, CH₃), 2.30 (s, 3H, N=C-CH₃), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.20 (s, 2H, O-CH₂-CO), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 10.89 (s, H, NH)

g. Elemental analysis data of compounds VII (-R, -R₁=CH₃, -R₂, M.P., Yield, Molecular formula, Element: Found %, (Calc %))

VIIa: H, 4I-C₆H₅, 240 °C, 75 %, C₂₈H₃₀N₆O₄, C:65.36(65.23), H:5.83(5.70), N:16.34(16.21), O:12.45(12.30).

VIIb: CH₃, 4I-C₆H₅, 245 °C, 77 %, C₂₉H₃₂N₆O₄, C:65.90(65.72), H:6.06(5.92), N:15.90(15.75), O:12.12(12.00).

VIIc: OCH₃, 4I-C₆H₅, 235 °C, 72 %, C₂₉H₃₂N₆O₄, C:63.91(63.76), H:5.88(5.74), N:15.44(15.30), O:14.70(14.56).

VII d: OC₂H₅, 4I-C₆H₅, 250 °C, 73 %, C₃₀H₃₄N₆O₅, C:64.51(64.37), H:6.09(5.94), N:15.05(14.92), O:14.33(14.18).

VII e: Cl, 4I-C₆H₅, 230 °C, 75 %, C₂₈H₂₉N₆O₄Cl, C:61.25(61.10), H:5.28(5.12), N:15.31(15.19), O:11.66(11.44), Cl:6.47(6.33).

VII f: Br, 4I-C₆H₅, 255 °C, 78 %, C₂₈H₂₉N₆O₄Br, C:56.67(56.50), H:4.89(4.66), N:14.16(14.02), O:10.79(10.52), Br:13.47(13.30).

VIIg: H, 4I-CH₃C₆H₄, 260 °C, 72 %, C₂₉H₃₂N₆O₄, C:65.90(65.72), H:6.06(5.87), N:15.90(15.78), O:12.12(11.95).

VIIh: H, 4I-ClC₆H₄, 265 °C, 76 %, C₂₈H₂₉N₆O₄Cl, C:61.36(61.21), H:5.11(5.00), N:15.34(15.20), O:11.68(11.47), Cl:6.17(6.02).

VIIi: H, 4I-OCH₃C₆H₄, 270 °C, 70 %, C₂₇H₃₀N₆O₄, C:64.34(64.17), H:5.97(5.78), N:16.73(16.58), O:12.74(12.60).

VIIj: H, 4I-NO₂C₆H₄, 272 °C, 72 %, C₂₆H₂₇N₆O₅, C:60.34(60.15), H:5.22(5.08), N:18.95(18.80), O:15.74(15.62).

h. IR (KBr) Spectral data (ν_{max} in cm^{-1})

VIIa: 3206 (NH), 1685 (C=O), 1620 (C=N)

VIIb: 3195 (NH), 1690 (C=O), 1622 (C=N)

VIIc: 3230 (NH), 1685 (C=O), 1625 (C=N)

VIId: 3215 (NH), 1695 (C=O), 1624 (C=N)

VIIe: 3230 (NH), 1675 (C=O), 1630 (C=N)

VIIf: 3210 (NH), 1685 (C=O), 1627 (C=N)

VIIg: 3180 (NH), 1695 (C=O), 1627 (C=N)

VIIh: 3195 (NH), 1700 (C=O), 1629 (C=N)

VIIi: 3245 (NH), 1705 (C=O), 1630 (C=N)

VIIj: 3240 (NH), 1685 (C=O), 1630 (C=N)

i. 1H NMR (DMSO- d_6) Spectral data (δ in ppm)VIIa: 2.22 (s, 3H CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.46 (s, 3H, COCH₃), 5.26 (s, 2H, OCH₂), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄).VIIg: 2.20 (s, 3H CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.44 (s, 3H, COCH₃), 5.24 (s, 2H, OCH₂), 6.8 (s, H, Ar - NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄).VIIh: 2.19 (s, 3H, CH₃), 2.37 (s, 3H, COCH₃), 2.24 (s, 2H, CH₃), 4.92 (s, 2H, OCH₂), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄).VIIi: 2.18 (s, 3H CH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 3H, COCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 5.24 (s, 2H, OCH₂), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄).VIIj: 2.16 (s, 3H CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, COCH₃), 5.22 (s, 2H, OCH₂), 6.8 (s, H, Ar - NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄).**j. Elemental analysis data of compounds VIII (M.P., Yield, Molecular formula, Element: Found %, (Calc %))**VIII: 150 °C, 65 %, C₁₉H₂₀N₆O₃S, C:55.33(55.19), H:4.85(4.68), N:20.38(20.21), O:16.50(16.35), S:7.76(7.62).**k. IR (KBr) Spectral data (ν_{max} in cm^{-1})**

VIII: 3126 (oxadiazole NH), 3180 (NH), 1603 (C=N), 1670 (C=O), 1134 (C=S).

l. 1H NMR (DMSO- d_6) Spectral data (δ in ppm)VIII: 2.3 (s, 3H CH₃), 5.45 (s, 2H, OCH₂), 6.8 (s, H, Ar - NH), 7.1-7.3 (m, 5H, Ar - H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 14.7 (s, H, thiol-thione tautomeric proton NH)**m. Elemental analysis data of compounds IX (R₁=H, R₂, M.W., M.P., Yield, Molecular formula, Element: Found %, (Calc %))**IXa: *p*-tolyl, 240°C, 75 %, C₂₇H₂₅N₇O₃S, C:61.48(61.32), H:4.47(4.30), N:18.59(18.45), O:9.10(8.93), S:6.07(5.90).IXb: *p*-anisyl, 245°C, 77 %, C₂₇H₂₅N₇O₄S, C:59.66(59.48), H:4.60(4.56), N:18.04(17.85), O:11.78(11.62), S:5.89(5.69).IXc: *p*-fluorophenyl, 235°C, 78 %, C₂₆H₂₂N₇O₃SF, C:58.76(58.65), H:4.14(3.98), N:18.45(18.33), O:9.04(8.86), S:6.02(5.80), F:3.55 (3.38).IXd: *p*-chlorophenyl, 250°C, 73 %, C₂₆H₂₂N₇O₃SCl, C:56.98(56.75), H:4.01(3.83), N:17.88(17.69), O:8.76(8.61), S:5.84(5.69), Cl:6.48(6.31).IXe: *p*-bromophenyl, 230°C, 80 %, C₂₆H₂₃N₇O₃Br, C:52.71(52.58), H:3.71(3.59), N:16.55(16.38), O:8.10(7.92), S:5.40(5.23), Br:13.49(13.30).IXf: *p*-nitrophenyl, 255°C, 83 %, C₂₆H₂₂N₈O₅S, C:55.91(55.74), H:3.94(3.78), N:20.07(19.87), O:14.33(14.21), S:5.73(5.57).IXg: diethyl, 260°C, 72 %, C₂₈H₃₇N₈O₃S, C:59.46(59.28), H:6.54(6.39), N:19.82(19.70), O:8.49(8.32), S:5.66(5.44).IXh: diphenyl, 266 °C, 70 %, C₃₂H₂₇N₇O₃S, C:65.29(65.18), H:4.52(4.62), N:17.01(16.63), O:8.03(8.14), S:5.27(5.44).IXi: morpholinyl, 270°C, 70 %, C₂₀H₁₈N₇O₄S, C:53.09(52.89), H:3.98(3.76), N:21.68(21.52), O:14.15(13.98), S:7.07(6.84).IXj: piperazinyl, 272°C, 72 %, C₂₂H₂₀N₇O₃S, C:57.14(56.98), H:4.32(4.17), N:21.21(21.07), O:10.38(10.23), S:6.92(6.76).

IXk: N-methyl piperizynyl, 267°C, 68 %, C₂₂H₂₁N₇O₃S, C:57.01 (56.63), H:4.53 (4.38), N:21.16 (21.02), O:10.36 (10.12), S:6.91 (6.83).

n. IR (KBr) Spectral data (ν_{max} in cm⁻¹)

IXa: 1608 (C=N), 1665 (C=O), 1156 (C=S), 2939 (C-HStr), 3140 (NH), 3250 (Ar - NH).

IXb: 1620 (C=N), 1660 (C=O), 1150 (C=S), 2925 (C-HStr), 3130 (NH), 3240 (Ar - NH).

IXc: 1610 (C=N), 1670 (C=O), 1160 (C=S), 2945 (C-HStr), 3145 (NH), 3255 (Ar - NH).

IXd: 1608 (C=N), 1663 (C=O), 1158 (C=S), 2940 (C-HStr), 3172 (NH), 3253 (Ar - NH).

IXe: 1609 (C=N), 1665 (C=O), 1155 (C=S), 2943 (C-HStr), 3143 (NH), 3254 (Ar - NH).

IXf: 1605 (C=N), 1655 (C=O), 1145 (C=S), 2930 (C-HStr), 3135 (NH), 3245 (Ar - NH).

IXg: 1590 (C=N), 1645 (C=O), 1135 (C=S), 2925 (C-HStr), 3125 (NH), 3230 (Ar - NH).

IXh: 1593 (C=N), 1667 (C=O), 1107 (C=S), 2940 (C-HStr), 3150 (NH), 3250 (Ar - NH).

IXi: 1610 (C=N), 1675 (C=O), 1165 (C=S), 2955 (C-HStr), 3150 (NH), 3265 (Ar - NH).

IXj: 1610 (C=N), 1670 (C=O), 1160 (C=S), 2945 (C-HStr), 3145 (NH), 3260 (Ar - NH).

IXk: 1605 (C=N), 1655 (C=O), 1145 (C=S), 2935 (C-HStr), 3140 (NH), 3255 (Ar - NH).

o. ¹H NMR (DMSO-d₆) Spectral data (δ in ppm)

IXa: 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), 5.0 (s, 2H, NCH₂), 5.64 (s, 2H, N-CH₂-N), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 11.2 (s, H, Ar-NH).

IXb: 2.40 (s, 3H, CH₃), 3.82 (s, 3H, CH₃), 5.06 (s, 2H, N-CH₂), 5.62 (s, 2H, N-CH₂-N), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 11.1 (s, H, Ar-NH).

IXf: 2.50 (s, 3H, CH₃), 4.96 (s, 2H, N-CH₂), 5.50 (s, 2H, N-CH₂-N), 6.8 (s, 1H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 10.23 (s, 1H, NH).

IXi: 2.60 (s, 3H, CH₃), 2.62 (t, 4H CH₂-N-CH₂), 3.70 (t, 4H, CH₂-O-CH₂), 4.50 (s, 2H, N-CH₂-N), 5.24 (s, 2H, N-CH₂), 5.48 (s, 2H, N-CH₂-N), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 10.20 (s, 1H, NH).

IXj: 2.56 (t, 4H CH₂-N-CH₂), 2.58 (s, 3H, CH₃), 4.45 (s, 2H, N-CH₂-N), 5.20 (s, 2H, N-CH₂), 5.45 (s, 2H, N-CH₂-N), 4.45 (s, 2H, N-CH₂-N), 6.8 (s, H, Ar-NH), 7.1-7.3 (m, 9H, Ar-H), 7.4 (d, 2H, C₆H₄), 7.7 (d, 2H, C₆H₄), 10.19 (s, H, NH).

3.2. Antimicrobial activity

All synthesized compounds were subjected to preliminary antibacterial screening by disc diffusion method against *Staphylococcus aureus* NCCS 2079, *Bacillus cereus* NCCS 2106, *Escherichia coli* NCCS 2065 and *Pseudomonas aeruginosa* NCCS 2200. As shown in Table 1, VII series showed moderate activity against tested organism. In this series chloro, bromo and nitro substituted compounds showed more activity than other compounds. Whereas among the compounds of IX series, fluoro, chloro, bromo, nitro, morphonilyl, piperizynyl, N-methylpiperazine showed more activity than other compounds.

All synthesized compounds were subjected to preliminary antifungal screening by disc diffusion method against *Aspergillus niger* NCCS 1196 and *Candida albicans* NCCS 2106. Among the compounds of VII series, Chloro, bromo and nitro substituted compounds showed more activity against *Aspergillus niger* NCCS 1196 and *Candida albicans* NCCS 2106. The compounds of IX series have demonstrated good antifungal activity particularly fluoro, chloro, bromo, nitro, morphonilyl, piperizynyl and N-methyl piperazine showed good antifungal activity. The details are given in Table 1 and 2.

Table 1.- Antifungal activity of novel compounds synthesized.

Compound	-R	-R ₁	-R ₂	Zone of inhibition in mm (MIC in µg/mL)	
				<i>Aspergillus niger</i> NCCS 1196	<i>Candida albicans</i> NCCS 2106
VIIa	H	CH ₃	C ₆ H ₅	2.25 (55)	1.75(52.5)
VIIb	CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅	1.75(45)	1.25(52.5)
VIIc	OCH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅	1.5(52.5)	1.5(52.5)
VIIId	OC ₂ H ₅	CH ₃	C ₆ H ₅	1.5(47.5)	1.25(50)
VIIe	Cl	CH ₃	C ₆ H ₅	1.75(40)	2(120)
VIIIf	Br	CH ₃	C ₆ H ₅	1.75(40)	1.75(42.5)
VIIg	H	CH ₃	CH ₆ C ₆ H ₅	1.25(52.5)	1.25(50)
VIIh	H	CH ₃	ClC ₆ H ₄	2(37.5)	1.75(33.75)
VIIi	H	CH ₃	OCH ₃ C ₆ H ₄	1.5(195)	1.5(>50)
VIIj	H	CH ₃	NO ₂ C ₆ H ₄	1.75(41.25)	1.75(41.25)
IXa	H	H	<i>p</i> -tolyl	2.5(45)	2.25(45)
IXb	H	H	<i>p</i> -anisyl	2.25(47.5)	2(45)
IXc	H	H	<i>p</i> -fluoro phenyl	3.5(35)	3(37.5)
IXd	H	H	<i>p</i> -chloro phenyl	3.25(37.5)	3.5(36.25)
IXe	H	H	<i>p</i> -bromo phenyl	3.25(37.5)	3(37.5)
IXf	H	H	<i>p</i> -nitro phenyl	3.75(32.5)	3.25(36.25)
IXg	H	H	diethyl	2(47.5)	1.75(47.5)
IXh	H	H	di phenyl	2(47.5)	2(47.5)
IXi	H	H	morphonilyl	3.5(35)	3.25(35)
IXj	H	H	Piperizinylyl	3.25(37.5)	3(35)
IXk	H	H	<i>N</i> -methyl piperizine	3.25(35)	3.25(32.5)

Table 2.- Antibacterial activity of novel compounds synthesized.

Compound	Zone of inhibition in mm (MIC in µg/mL)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> NCCS 2079	<i>Bacillus Cereus</i> NCCS 2106	<i>Escherichia coli</i> NCCS2065	<i>Pseudomonas aeruginos</i> NCCS 2200
VIIa	1.5(50)	1.25(52.5)	1.25(52.5)	1.75(45)
VIIb	1.5(50)	1.25(52.5)	1(55)	1.5(50)
VIIc	1(50)	1.25(50)	1(55)	1.25(52.5)
VIIId	2(42.5)	1.5(47.5)	1(50)	1.75(47.5)
VIIe	2(31.25)	2.25(35)	1.5(47.5)	2(32.5)
VIIIf	1.75(35)	2(35)	1.5(45)	1.25(47.5)
VIIg	1(55)	1.25(55)	1(60)	1.25(60)
VIIh	2(31.25)	2(36.25)	1.5(40)	1.75(32.5)
VIIi	1(50)	1.5(47.5)	1.5(45)	1.25(50)
VIIj	1.75(33.75)	2(35)	1.5(38.75)	1.75(41.25)
IXa	1.5(52.5)	1.75(57.5)	1.25(57.5)	1.5(60)
IXb	1.75(50)	1.5(52.5)	1.5(55)	1.25(57.5)
IXc	2.5(36.25)	2.75(38.75)	2.25(38.75)	2.5(38.75)
IXd	3(35)	2.5(38.75)	2.25(38.75)	2.75(36.25)
IXe	2.5(37.5)	2.75(38.75)	2(40)	2.25(37.5)
IXf	2.75(36.25)	2.5(38.75)	2.5(35)	2.5(35)
IXg	1.75(50)	2(52.5)	1.5(57.5)	5(57.5)
IXh	1.75(50)	1.75(50)	5(60)	1.5(55)
IXi	2.5(37.5)	3(35)	2.5(37.5)	2.75(35)

Compound	Zone of inhibition in mm (MIC in µg/mL)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> NCCS 2079	<i>Bacillus Cereus</i> NCCS 2106	<i>Escherichia coli</i> NCCS2065	<i>Pseudomonas aeruginos</i> NCCS 2200
IXj	2.75(32.5)	2.5(37.5)	2.25(40)	2.5(37.5)
IXk	2.5(35)	2.75(35)	2.25(37.5)	2.75(35)

4. CONCLUSION

All the novel compounds have demonstrated moderate antimicrobial activity against selected of fungal and bacterial stains.

5. REFERENCES

- Ericsson, J.M.; Sherris, J.C.; Antibiotic sensitivity testing. Report of an International Collaborative Study. *Acta Pathol Microbiol Scand.*, 1971;217, 1-90
- Brown, B.A.; Wallace Jr., R.J.; Onyi, G.O. Activities of clarithromycin against eight slowly growing species of nontuberculous mycobacteria, determined by using a broth microdilution MIC system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992; 36, 1987-1990
- El-Kashef, H.S.; Abd-Alla, M.A.; Bayoumi, B E.; El-Timawy, A. A. M.; Synthesis and antibacterial activity of some new pyrazolone dyes. *J. Chem. Technol. Biot.*,1983; 33, 294-298
- Fan, X.; Zhang, X.; Zhou, L.; Keith, K.A.; Kernb, E. R.; Torrencea, P. F.; A pyrimidine-pyrazolone nucleoside chimera with potent in vitro anti-orthopoxvirus activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*,2006;16, 3224-3228
- Guckian, K.; Carter, M.B.; Lin, E.Y.; Choi, M.; Sun, L.; Boriack-Sjodin, P. A.; Chuaqui, C.; Lane B.; Cheung, K.; Ling, L.; Lee, W. C. Pyrazolone based TGFbetaR1 kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*,2010; 20, 326-329
- Jignesh, P.R.; Arpita, B.S.; Nilesh, H.P.; Hemul, V.P.; Pradip, S.P.; Kashyap, K. B.; Kishor, R.D. Synthesis and anti-tubercular activity of novel pyrazol-5(H)-one derivatives. *Eur. J. Chem.*, 2011;2, 238-242
- Manojkumar, P.; Ravi, T.K.; Gopalakrishnan, S. Antioxidant and antibacterial studies of arylazopyrazoles and arylhydrazonopyrazolones containing coumarin moiety. *Eur. J. Med. Chem.*,2009; 44, 4690-4694
- Chandrakantha, B.; Shetty, P.; Nambiyar, V.; Isloor, N.; Isloor, A.M. Synthesis, characterization and biological activity of some new 1,3,4-oxadiazole bearing 2-flouro-4-methoxy phenyl moiety. *Eur. J. Med. Chem.*,2010; 45, 1206-1210
- Farshori, N.N.; Banday, M.R.; Ahmad, A.; Khan, A U.; Rauf, A. Synthesis, characterization, and in vitro antimicrobial activities of 5-alkenyl/hydroxyalkenyl-2-phenylamine-1,3,4-oxadiazoles and thiadiazoles. *Bioorg. Med. Chem.Lett.*,2010; 15, 1933-1938
- Hussain, A.; Ajmal, M. Synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives and their biological properties. *Acta Pharm.*, 2009; 59, 223-233
- Rakesh, S.; Awani, K.R.; Kesari, A.N.; Yar, M.S. Synthesis and biological evaluation of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole. *Asian J. Res. Chem.*, 2009; 2, 34-42
- Rakesh, C.; Anshu, A.; Manoj Kumar, P.; Chander Sharma, P.; Sukumar, M.; Thengungal Ravi, K.Synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives as potential antimicrobial agents. *Acta Pol. Pharm.*, 2010; 67, 247-253

13. Ravitas, D.; Jha, A.K.; Alok Singh, T.; Dhansay, D. Synthesis and antibacterial activity of some 1,3,4-oxadiazole derivatives and their thione analogues. *Intl. J. Biomed. Pharma.Sci.*, 2011; 2, 215-219.

INFORMACIÓN ACADÉMICA



Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia
e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el primer trimestre del año 2014, tuvieron lugar un total de 10 sesiones científicas.

Las actividades se iniciaron después de las vacaciones de Navidad, con la celebración de la Solemne Sesión Inaugural del Curso Académico 2014, a las 19 horas, el día 16 de enero. Al Acto acudieron numerosas personalidades del mundo Académico, farmacéutico y de las instituciones del Estado. En la mesa presidencial acompañando al nuevo Presidente de la RANF, estuvieron: la Secretaria de General de Universidades, D. Federico Morán Abad y el presidente de las R. A. de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, y del Instituto de España, el Excmo. Sr. D. Alberto Galindo y el Vicepresidente de la R.A. Nacional de Medicina, Excmo. Sr. D. Manuel Escudero Fernández.

La Sesión Inaugural terminó, tras la lectura de la memoria de Secretaria 2013, por el Dr. Ribas Ozonas y el Discurso reglamentario a cargo del Dr. Martínez Fernández, y con la entrega de los Premios del Concurso Científico.

El 23 de enero, tuvo lugar la conferencia acerca de "Nuevas respuestas de la investigación de la enfermedad de Alzheimer: clínica, diagnóstico, patogenia y terapéutica" impartida por el Académico Correspondiente Dr. Adolfo Toledano Gasca.

I nvolución del SNC en la senilidad normal y patológica:

1) Estudio de biomarcadores amiloideos y no amiloideos (marcadores de estrés oxidativo, citoquinas, elementos de sistemas proinflamatorios, etc.) en sangre periférica de humanos con enfermedad de Alzheimer, y otras demencias (Vascular, Frontotemporal, MCI). Se estudian, mediante técnicas histoquímicas, bioquímicas y microespectroscópicas, biomarcadores sanguíneos amiloideos (APP; ABeta -40, -42, -43; Oligómeros) en células y fracciones sanguíneas acelulares en diversas situaciones de senilidad y demencia. Se correlacionan con la clínica y con la situación de otros marcadores (Citoquinas; Marcadores de Estrés Oxidativo; etc.) con el fin de desarrollar protocolos de diagnóstico y de seguimiento del curso de la enfermedad. Se están desarrollando dos patentes.

2) Estudio de Biomarcadores centrales y periféricos en primates no humanos y modelos experimentales de Alzheimer (ratones transgénicos). Se estudian, mediante técnicas histoquímicas y bioquímicas biomarcadores cerebrales y sanguíneos, amiloideos y no-amiloideos (Citoquinas; Marcadores de Estrés Oxidativo; etc.) con el fin de entender el curso de la patogenia y desarrollar protocolos de diagnóstico y tratamiento.

3) Características de la corteza cerebelosa humana en la involución senil, en las Enfermedades de Alzheimer (EA), Creutzfeldt-Jakob (ECJ) e Insomnio Familiar Fatal (IFF), así como en el scrapie. Se estudian los cambios morfológicos e histoquímicos de las neuronas y las células gliales para detectar los primeros cambios patológicos (sistemas pro-inflamatorios, reacciones gliales, apoptosis neuronal, etc.) así como posibles mecanismos de neuroprotección (cambios en proteínas sinápticas y sistemas neurotróficos, etc.)

4) Caracterización de los modelos experimentales de Alzheimer obtenidos por lesión/ disfunción del núcleo basal de la rata blanca. Evolución a largo plazo (tres años). Los modelos animales experimentales de Alzheimer se han obtenido por la inyección unilateral estereotáxica de soluciones de neurotoxinas (ácidos iboténico, quisquálico y NMDA -7,5 a 100nmols-). Se estudian los cambios involutivos y adaptativos en el sistema colinérgico basalo-cortical y en la corteza.

5) Efectos en el SNC de la activación de los receptores nicotínicos en animales jóvenes y seniles normales y en modelos de Alzheimer experimental. Su relación con el estrés oxidativo, el curso patogénico y los posibles tratamientos. Se estudian, mediante técnicas histológicas, histoquímicas, bioquímicas y microespectroscópicas, diversos tipos de efectos, adaptativos e involutivos, inducidos en el SNC por la administración de nicotina (en tratamientos agudos y crónicos) en los diversos grupos de ratas mencionados más arriba. Su fin es demostrar las posibilidades terapéuticas preventivas o paliativas de los agonistas nicotínicos en la enfermedad de Alzheimer y en otros trastornos cognoscitivos más leves. El contenido de diversos péptidos neurotróficos (VIP, NGF, etc.) aumenta con algunos tratamientos nicotínicos. La activación nicotínica puede inducir estrés oxidativo pero antagoniza los efectos inducidos por otras sustancias que aumentan el estrés oxidativo (anfetaminas, ácido kainico).

El 30 de enero la RANF albergó una nueva conferencia "La melatonina para el tratamiento de las patologías oculares: ¡No la perdamos de vista!" pronunciada por el Académico de Número electo, el Dr. Jesús Pintor Just.

El 6 de febrero tuvo lugar la conferencia a cargo del Vicepresidente de la de la RANF, el Dr. Juan Ramón Lacadena Calero quien trató el tema de la genética con su disertación "Un divertimento académico: Sabiduría popular y Genética".

El 13 de febrero, se celebró la Toma de Posesión como Académico Extranjero del Ilmo. Sr. D. Jean Martínez, Head of "Institut des Biomolécules Max Mousseron", quien pronunció su conferencia titulada: "Characterization of a New Peptide Exhibiting Dopamine Effects by Targetting Brain Angiotensin Converting Enzyme ". Fue presentado por la Excm. Sra. Dña. Carmen Avendaño López, Académica de Número de la RANF.

El 20 de febrero, tomó posesión como Académico Correspondiente del Dr. Miguel Ladero Álvarez quien pronunció la conferencia titulada: "Salamanca y sus peculiaridades Botánicas" y que fue presentado por el Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez.

La provincia de Salamanca, ubicada en el extremo suroccidental de la Comunidad de Castilla y León, tiene una extensión de 12.351,1 Km². La riqueza florística y la diversidad de las biocenosis vegetales, son algunos de los motivos que nos ha animado a presentar este trabajo para optar al ingreso como Académico Correspondiente en la Real Academia Nacional de Farmacia.

Los datos florísticos y fitosociológicos, unidos a los bioclimáticos, geológicos y edafológicos del territorio, nos permitirán delimitar las distintas unidades biogeográficas existentes en la provincia de Salamanca. Este capítulo quedaría incompleto, sino se intentara comparar el areal de las unidades biogeográficas propuesto por RIVAS-MARTINEZ (2007), con el estudio sobre las Comarcas salmantinas realizado por V. CABERO & al. (1995).

Dentro de la vegetación climatófila, dedicaremos especial atención a los melojares, alguno de ellos endémico, como sucede con el rebollar de la penillanura occidental, definido por la asociación *Pyro bourgaenae-Quercetum pyrenaicae*. Los encinares salmantinos ocupan dos tercios de la superficie provincial. El hombre, mediante un manejo adecuado de los mismos, ha generado un ecosistema de origen antrópico conocido como dehesa. La importancia económica de estas biocenosis se pone de manifiesto por la carga ganadera que mantienen, alrededor de 300.000 cabezas de ganado vacuno. Dedicaremos especial atención a la génesis, mantenimiento y tipos de aprovechamiento.

La densa red hidrográfica, nos permite estudiar los distintos tipos de vegetación riparia, que se asientan en sus orillas, y la acuática, que coloniza los cursos de agua.

Finalmente, dedicaremos un apartado especial a los saladares salmantinos en peligro de extinción, son el resultado de una ordenación inadecuada del territorio.

El 27 de febrero, se celebró una Mesa Redonda, patrocinada en colaboración por la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, sobre: "Células madre y aplicaciones clínicas" Presentada y Coordinada por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF, con las ponencias del Dr. Pedro Guillén García, Especialista en Traumatología y Ortopedia, Presidente y Fundador de la Clínica CEMTRO de Madrid y del Dr. Manuel Serrano Marugán, Director del Programa de Oncología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

Al Acto acudieron numerosos miembros de diversas asociaciones relacionadas.

Uno de los mayores hitos en la reciente investigación biomédica fue el protagonizado por Shinya Yamanaka en 2006, cuando consiguió crear en el laboratorio células madre embrionarias (células madre pluripotentes inducidas o iPSCs) a partir de células adultas mediante un cóctel de cuatro genes. El hallazgo de Yamanaka, por el que se le concedió el Premio Nobel de Medicina en 2012, abrió un nuevo horizonte en la medicina regenerativa. En nuestro laboratorio hemos conseguido dar un paso más al demostrar que la reprogramación también se puede conseguir dentro de las condiciones de un organismo. En concreto, la activación de los genes de Yamanaka dentro de un organismo es capaz de producir la pérdida de diferenciación de las células de muchos tejidos y eventualmente la reprogramación completa. Desde el punto de vista de la medicina regenerativa, el objetivo es precisamente conseguir la pérdida de diferenciación para así facilitar la regeneración de tejidos. El realizar este proceso directamente en los tejidos afectados evita el problema de injertar células producidas in vitro. En la conferencia de las RANF presentaré los últimos avances en este campo y nuestras contribuciones más recientes.

El 6 de marzo, la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil celebraron la Mesa Redonda sobre el Balneario de Villa de Olmedo (Valladolid) y que contó con las siguientes ponencias: Excma. Sra. Dña. M^a del Carmen Francés Causapé, Dr. José López Guzman y Dra. María López González: "Historia y Generalidades"; Dr. Antonio Mestre Barceló: "Estudio de la Climatología"; Dra. Esperanza Torija Isasa: "Estudio físico-químico de las aguas del Balneario"; Dr. Juan Antonio López Geta: "Estudio Hidrogeológico de las aguas del Balneario"; Dra. M^a Carmen de las Heras Iñiguez y Dra. M^a Antonia Simón Arauzo: "Análisis de la Radiactividad en las aguas del Balneario".

El 13 de marzo tuvo lugar la tertulia Científica: "Aspectos bioéticos y jurídicos del aborto en la actualidad española" con la moderación del Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero, Vicepresidente de la RANF y Presidente de su Comisión de Bioética.

Así mismo a las 19 horas del día 13 tuvo lugar la conferencia titulada: "El origen de los Eucariotas: hechos y controversias" que fue pronunciada por la Dra. Purificación López García, Directora de investigación del CNRS de la Universidad Paris Sur y presentada por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández.

El 20 de marzo, la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil celebraron la Conferencia titulada: "Lípidos y Enfermedad Cardiovascular. 2014 Update" pronunciada por el Dr. Juan José Badimon quien fue presentado por el Académico de Número el Excmo. Sr. D. Juan Tamargo Menéndez.

La conferencia presentó el Impacto socioeconómico de las Enfermedad cardiovasculares; Manifestaciones clínicas de la enfermedad; Papel de los lípidos en la génesis y progresión de las enfermedades cardiovasculares y las Posibilidades terapéuticas para controlar los niveles elevados de lípidos. LDL y HDL.

El 27 de marzo se celebró la Conferencia titulada: "Reflexiones sobre los avances y obstáculos en la lucha contra el cáncer" que será pronunciada por la Excm. Sra. Dña. Carmen Avendaño López, Académica de Número de la RANF.

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos, hay que destacar:

Que la Comunidad ha concedido el Premio de Investigación Miguel Catalán 2013 a la catedrática de química inorgánica y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Dña. María Vallet Regí, en reconocimiento a su trayectoria profesional.

Para la concesión del Premio de Investigación Miguel Catalán a la química María Vallet Regí (Las Palmas de Gran Canaria, 1946) se ha tenido en cuenta que es una de las investigadoras pioneras en el área de los biomateriales en España. Además, como docente ha creado escuela al introducir de forma innovadora la asignatura de biomateriales en el currículo de los títulos universitarios relacionados con esta área y al contribuir a la apertura de nuevas líneas de actuación.

Además la Academia ha albergado y participado en sesiones y actos extraordinarios relevantes para el mundo de la ciencia y la investigación.

El 10 de febrero, en los locales de la Casa de Iberoamérica de Cádiz, se reunió el tribunal encargado de la concesión de la quinta edición del Premio Iberoamericano de Botánica José Celestino Mutis, Cortes de Cádiz. Presidido por el Vicepresidente de la RANF, Dr. Martínez Fernández, estuvo formado por el Académico Secretario, Dr. Ribas Ozonas y el Académico Correspondiente Dr. González de Posada, así como tres miembros designados por la Academia Iberoamericana y el Excmo. Ayuntamiento de Cádiz. Tras la correspondiente

deliberación se acordó por unanimidad conceder el Premio al Real Jardín Botánico de Madrid, por la custodia, promoción y difusión del legado de Celestino Mutis", presentado por el Director Prof. Dr. Gonzalo Nieto Feliner y el equipo de trabajo de dicho Real Jardín Botánico de Madrid.

El 25 de febrero de 2014 tuvo lugar la Reunión de Trabajo entre la Real Academia Nacional de Farmacia y la Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia. A la misma asistieron por parte de la RANF, su presidente, D. Mariano Esteban y su Secretario Gral. D. Bartolomé Ribas.

El 27 de febrero la Real Academia Nacional de Farmacia albergó la rueda de Prensa del Grupo COFARES en la que publicaron los resultados del ejercicio 2013. Con la bienvenida del Presidente de la RANF D. Mariano Esteban Rodríguez y del Académico Secretario D. Bartolomé Ribas Ozonas.

El pasado 4 de marzo de 2014 la Real Academia Nacional de Farmacia albergó el acto de presentación del libro: "Investigación Traslacional: Aprendiendo a Escuchar". El acto presentado por el Presidente de la RANF Excmo. Sr. D. Mariano Esteban y fue clausurado por la Secretaria de Estado de I+D+, Dña. Carmen Vela.

El 12 de marzo la RANF asistió a la presentación del Daflón 500 por parte de los Laboratorios SERVIER.

El 19 de marzo, se hizo entrega de dicho Premio. El acto, como es tradicional, se realizó en la gala de entrega de premios que tiene lugar cada mes de marzo conmemorando el aniversario de la Constitución de Cádiz de 1812. Fue entregado, junto con el Diploma, por el Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández.

El 20 de marzo dio comienzo la primera de las conferencias que el Instituto de Formación Cofares y la RANF van a impartir. En este caso fue sobre Intervención Farmacéutica en Patologías Prevalentes.

La dispensación es el mayor valor de la farmacia comunitaria, una dispensación de calidad es mucho más que el acceso al medicamento, es el acceso a los conocimientos necesarios para su correcto uso y también toda la información necesaria sobre su efectividad y seguridad.

SESIÓN INAUGURAL DEL CURSO ACADÉMICO 2014

ORDEN DEL DÍA

1. Salutación del Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.
2. Memoria de Secretaría, comprensiva de la labor Académica en el año 2013 por el Excmo. Señor Don Bartolomé Ribas Ozonas.
3. Lectura del discurso reglamentario por el Excmo. Señor Don Antonio Ramón Martínez Fernández, Académico de Número, titulado «Parasitismo. Origen e interés biológico».
4. Entrega de la Medalla de Académico Supernumerario y Placas de agradecimientos a los Académicos de Número.
5. Entrega de Premios del Concurso Científico 2013.
6. Clausura del Acto

CRÓNICA DE LA SESIÓN INAUGURAL DEL CURSO ACADÉMICO 2014



Mesa de la Presidencia de izda. A dcha.): D. Federico Morán Abad, D. Alberto Galindo Tixaire, D. Mariano Esteban Rodríguez, D. Manuel Escudero Fernández, D. Bartolomé Ribas Ozonas

El 16 de enero de 2014, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró la inauguración de su Curso Académico en un acto que revistió de gran solemnidad. Presidido por el Presidente de la Corporación Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, quien estuvo acompañado en la presidencia por el Excmo. Sr. D. Alberto Galindo Tixaire, Presidente de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales y del Instituto de España; el Excmo. Sr. D. Manuel Escudero Fernández, Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Medicina y por el Secretario General de Universidades, D. Federico Morán Abad y el Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

De acuerdo con el Orden del Día, el Presidente de la RANF hizo la salutación primero y explicó los éxitos obtenidos por la Academia en 2013. El Académico Secretario leyó la Memoria de Actividades Académicas correspondientes al año 2013, con la novedad este año de acompañarla con una dinámica presentación, en la que destacó el alto nivel científico alcanzado en las sesiones científicas de la Academia, durante el curso pasado; así como de las publicaciones. Destacó el convenio firmado con la Universidad Francisco de Vitoria, además de las tomas de posesión de académicos de número del Profesor Sánchez Muniz y del Profesor Sentandreu, además de otras trece de Académicos Correspondientes y dos de Académicos extranjeros. A continuación, el Excmo. Señor Don Antonio R. Martínez leyó el preceptivo discurso inaugural del Curso sobre « Parasitismo. Origen e interés biológico ». Posteriormente, se entregaron la Medalla de Académico Supernumerario al Excmo. Sr. D. Alberto Giraldez Dávila y las placas de agradecimiento a los Excmos. Sres. D. Antonio R. Martínez por la labor ejercida como Vicepresidente, D. José Miguel Ortiz Melón por su labor como vicesecretario, D. Bernabe Sanz por su labor como Presidente de la Sección quinta y a D. Antonio L. Doadrio por su trabajo como Director de los Anales de la RANF. Seguidamente se entregaron los Premios de Investigación, respectivamente, Premio de la Real Academia Nacional de Farmacia, Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid, Premio Alcalá-Iberoamerica, Premio Cinfa, Premio Juan Abelló, Premio y Premio Antonio Doadrio López, a los jóvenes investigadores que los jurados eligieron merecedores. El acto contó con una masiva asistencia y la presencia, entre otras personalidades de Don Josep Ventura, Presidente de la Real Academia de Farmacia de Cataluña; Don Isaac Arias Santos, Presidente de la Academia de Galicia; Don Alberto Ramos Comenzana, Presidente de la Academia Iberoamericana de Farmacia; Don Carlos González Canga-Argüelles, Presidente de la Academia de Farmacia de Castilla y León y de Don Santiago Andrés Magallón vicepresidente de la Academia de Farmacia del Reino de Aragón. Clausuró el acto el Presidente de esta Real Corporación, declarando inaugurado el Curso Académico 2014 en nombre de S. M. el Rey.

DISCURSO DE APERTURA DEL CURSO ACADÉMICO 2014

DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

16 DE ENERO DE 2014

Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez,
Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Excmo Sr Presidente del Instituto de España y de la Real Academia de Ciencias, Exactas Físicas y Naturales, Excmo Sr Vicepresidente de la Real Academia Nacional de Medicina, Excmo Sr Secretario General de Universidades del Ministerio de Educación, Cultura y Deportes, Srs Presidentes de las Academias Regionales de Farmacia de España, Presidentes de las Reales Academias de Doctores y Veterinaria, Presidentes de distintos entes Farmacéuticos, Excmos Sras y Sres Académicos, Sras y Sres:

Al inicio de este curso Académico quiero en primer lugar testimoniar el recuerdo hacia aquellos Académicos que nos han dejado, pero que con su esfuerzo y dedicación han contribuido al buen hacer de esta Real Academia y su memoria estará siempre entre todos nosotros. Hace un año que tuve el honor de ser elegido Presidente de esta corporación y la verdad es que ha sido muy gratificante el trabajo continuado en el tiempo, sobre todo gracias a la labor del equipo Directivo y de los Académicos que me han ayudado y facilitado el trabajo semanal. Especialmente quiero agradecer al Secretario Excmo Sr D. Bartolomé Ribas Ozonas por su entrega y dedicación a la Academia, así como al Vicepresidente saliente el Excmo Sr D Antonio Martínez Fernández por sus sabios consejos y ayuda en la elaboración de informes y de mis sustituciones como Presidente. El trabajo excelente realizado por mi predecesora en el cargo la Excma Sra Dñ^a María Teresa Miras Portugal y anteriores Presidentes, me han marcado las pautas a seguir, pues los puentes y logros se construyen y consiguen con la suma de todos. Ni que decir tiene que está en la mente de todos nosotros la palabra que mas se ha utilizado este año 2013, que es “crisis”, que ha llegado a todos los estamentos y especialmente a las Reales Academias, que hemos visto reducir los presupuestos a una cotas impensables hace tres años. Somos conscientes de que el sacrificio y ajustes en la economía nos corresponde a todos los españoles y que tenemos que contribuir a reducir el déficit, que como una losa pesada retrasa nuestro progreso y futuro científico. No obstante, a pesar de las dificultades económicas nuestro

Tesorero el Excmo Sr D Fidel Ortega Ortíz de Apodaca, ha sabido distribuir y ajustar de forma eficaz los presupuestos disponibles para, con el esfuerzo y colaboración de todos, seguir llevando a cabo lo que nos distingue, que son las actividades científicas y académicas sobre la farmacia y el medicamento. Especial mención, al personal administrativo de la Academia por su constante dedicación y cumplimiento de las obligaciones diarias.

¿Que es lo que hemos hecho en este año 2013? Como indicará de forma detallada y visual el Secretario en su presentación hemos llevado a cabo numerosas actividades, entre las que quisiera destacar, el 1er encuentro entre Congresistas y Senadores de la Comisión de Sanidad en la RANF junto con la Real Academia de Medicina, la reunión de ideas (*brain-storm*) entre los Académicos de la que emanaron nuevos retos, los seminarios y mesas redondas sobre los temas mas actuales del sector farmacéutico y biomédico, el 1er encuentro entre las tres Reales Academias mas afines en la investigación biomédica sobre un tema de interés común como es el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) en el día mundial del Sida, y varios encuentros con la participación del Consejo General, Colegios Farmacéuticos y Sociedades Farmacéuticas. Mención especial para la Fundación José Casares-Gil por su apoyo económico para la celebración de seminarios y mesas redondas, así como la sesión conmemorativa de los Premios Nobel en Medicina y Química de 2013.

Además quiero destacar que estas actividades han estado en consonancia con los logros científicos alcanzados en 2013. Como han reseñado las revistas científicas Science y Nature entre los logros mas importantes del 2013, destacan: la obtención y clonación de células madre embrionarias con la misma dotación genética que un adulto, lo que permitirá generar células madre para pacientes con órganos o tejidos dañados; el sistema de imágenes CLARITY, "claridad" que permite ver a través de los tejidos biológicos como si fueran transparentes; una vacuna contra el virus respiratorio sincitial (VRS), que es la principal causa de hospitalización de niños; la creación de miniórganos, como los minicerebros, minirriñones a partir de un cultivo de células de estos órganos, lo que abre esperanzas para regenerar órganos enfermos; la identificación del virus cepa A/H7N9 de la gripe aviar, que había mutado a una forma susceptible de infectar a personas (ahora circula mayoritariamente el virus de la cepa A/H1N1); la viróloga (Deborah Persaud) que ayudó a demostrar que un bebé estadounidense nacido con VIH estaba libre del virus casi un año después de comenzar con el tratamiento. No obstante 2013 se ha despedido en el mundo del VIH con una mala noticia: de los tres hombres que hace seis meses se creía que habían conseguido erradicar el virus de su cuerpo, en dos, los pacientes de Boston, el patógeno ha reaparecido, según han comunicado sus médicos.

¿Qué es lo que queremos hacer a lo largo de este curso Académico?

Lógicamente continuar con lo que ya estamos haciendo bien como, la celebración de conferencias, mesas redondas, coloquios, reuniones con distintas asociaciones del sector farmacéutico, celebración de congresos/Workshops (muchas ya programadas a lo largo de 2014), con un incremento en el número de actividades. En palabras de su Majestad el Rey en su reunión con los Presidentes de las Reales Academia en el mes de octubre, la Reales Academias deben de mantenerse abiertas a la sociedad, y en su discurso de fin de año 2013, resaltó la importancia de la investigación e innovación para aumentar la competitividad y productividad de España. Indudablemente la RANF juega un papel importante en la misión del fomento de la investigación básica y aplicada, asesoramiento al Gobierno e instituciones públicas y privadas en el ámbito de las ciencias farmacéuticas y del Medicamento. Queremos crear estímulos para que los programas y actividades de la RANF alcancen a todo el sector farmacéutico, a través de una mayor colaboración con el Consejo General y Colegios Farmacéuticos, mayor acercamiento con los farmacéuticos e industria del medicamento, llevando a cabo actividades conjuntas y de asesoramiento, potenciando la visibilidad a nivel social a través de la Web y revistas del sector, elaborando informes en temas de interés farmacéutico-sanitario, incrementando acuerdos con Universidades y centros de investigación nacionales e internacionales, incorporando a la Academia nuevos Académicos de Número y Correspondientes que aporten nueva sabia, potenciando la Fundación Casares-Gil de Amigos de la Farmacia, incrementando las ayudas económicas de la RANF a través de búsqueda de otros ingresos externos, incrementando las publicaciones e índice de impacto de los Anales de la RANF, fomentando los premios de investigación farmacéutica de la Academia, e incorporando jóvenes investigadores en las actividades de la RANF a través de distinciones. Hemos asistido con tristeza a una reducción considerable en las ayudas a la I+D española lo que está provocando una erosión de la capacidad investigadora e innovadora de nuestro país. Los jóvenes se ven obligados a emigrar y los no tan jóvenes ven disminuir sus grupos y la pérdida de ese potencial humano nos está pasando factura, al reducirse el potencial científico y competitivo de nuestro país. Por ello debemos de poner todo el esfuerzo posible en tratar de minimizar este bache temporal para poder salir del mismo con nuevas ideas y empuje.

Finalmente quiero agradecer a la Junta de Gobierno, Junta General, Secciones y Comisiones el trabajo realizado que ha contribuido a mantener los niveles de excelencia que todos nos exigimos en la RANF. También a los nuevos cargos electos, al nuevo Vicepresidente el Excmo Sr D. Juan Ramón Lacadena Calero, y Vicesecretario Excmo Sr D. Francisco Sanchez Muniz por su incorporación al equipo Directivo.

Con todos los mejores deseos a todos para el nuevo año 2014, he dicho.

MEMORIA DE SECRETARÍA. CURSO 2013

MEMORIA ANUAL DE SECRETARÍA

CORRESPONDIENTE AL AÑO 2013

Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia



Excmo Sr. Presidente de la Real Acad. Nal. de Farmacia; Excmo. Sr. Presidente del Instituto de España y de la Real Academia de Ciencias, Exac. Fís. y Naturales; Excmos. Sres. Vicepresidente y Secretario de la Real Acad. Nal. de Medicina; de la Real Academia de Doctores y de Ciencias Veterinarias, Ilmo. Sr. Secretario General de Universidades del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Excmos. Sras. y Sres. Académicos, Ilmos. Sres. Presidentes de las Academias de Farmacia de Cataluña, Galicia,

Iberoamericana, Reino de Aragón, Castilla y León; Ilma. Sra. Vicerrectora de la Universidad de Navarra; Sr. Presidente del Laboratorios Cinfa; Sras. y Sres.

La Real Academia Nacional de Farmacia, inició oficialmente las actividades correspondientes al Curso Académico 2013, con la celebración de la Solemne Sesión Inaugural el día 17 de enero, contando con la presencia de la Secretaria de Estado de Educación, Cultura y Deporte, de los Excmos, Sres, Presidentes de las Reales Academias: de Ciencias Exactas Físicas y Naturales; y Nacional de Medicina; y el Secretario de la misma Luis Pablo Rodríguez Rodríguez; y el Excmo. Sr. Don Anselmo Gomes de Oliveira, en representación de la Academia Nacional de Farmacia de Brasil.

Tras unas palabras de salutación de la Presidente, Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, tomó posesión de la Presidencia de nuestra Academia, el Excmo. Sr. Don Mariano Esteban Rodríguez; quien pronunció unas palabras de salutación y agradecimiento, trazando varias líneas de actuación, contagiando al auditorio de entusiasmo para el futuro de esta Real Academia. Seguidamente el Académico Secretario que les habla, procedió a la lectura de la Memoria de Secretaria del año 2012.

A continuación efectuó la lectura del discurso reglamentario, titulado **“Fármacos, Farmacología y Farmacia”** el Excmo. Sr. Don Ángel María Villar del Fresno.

Y para finalizar la Sesión solemne, se procedió a la entrega de los Premios del Concurso Científico 2012.

“In Memoriam!

Hemos de lamentar la pérdida por el fallecimiento de los Académicos de Número de esta Corporación Excmos. Sres. Don Gaspar González González y de Don Miguel Rubio Huertos, y asimismo de los Académicos Correspondientes, Ilmos. Sres. Don Mariano Turiel de Castro, Don Antonio Abrisqueta Zarrabé, Doña Irene Da Silveira, Don Félix Álvarez de la Vega, Don Álvaro Domínguez Gil, y de Don José Antonio Muñoz-Delgado Ortiz.

Actividades científicas

En relación a la Actividad Científica, como es tradicional en nuestra Corporación, se han llevado a cabo Sesiones los jueves de cada semana, intercalando en otros días conferencias y tomas de posesión con el fin de dar curso y fluidez a la actividad desarrollada por los miembros de nuestra institución. Ha sido intensa la actividad llevada a cabo que se traduce en: treinta y cinco sesiones celebradas, distribuidas como sigue: Sesión Inaugural, 15 Tomas de Posesión, entre ellas dos de nuevos Académicos de Número, 2 Jornadas científicas, 8 conferencias, 5 Mesas Redondas, 1 Congreso, 2 Presentaciones de Monografías, y 1 Sesión conmemorativa.

De los Académicos



Manuel Arias de Saavedra y Alías, Don Carlos Alonso Bedate, Don Jorge Gallardo



Durante el año recién acabado, ha tenido lugar, la incorporación de nuevos miembros a nuestra Corporación. Como Académicos de Número tomaron posesión el Excmo. Sr. Don Francisco José Sánchez Muniz, Medalla 19; y el Excmo. Sr. Don Rafael Sentandreu Ramón, Medalla 18. Y como Académicos Correspondientes se produjeron 13 incorporaciones, 11 de ellas de españoles, los Dres: Dn Manel Esteller Badosa, Don José Carlos Rodríguez Rey, Doña Elena de la Cuesta Elósegui, Don José Manuel Arias de Saavedra y Alías, Don Carlos Alonso Bedate, Don Jorge Gallardo Ballart, Don Antonio Alcamí Pertejo, Doña Mercedes Salaíces Sánchez, Doña Rosa María Ortega Anta, Don Antonio M^a. Rabasco Álvarez, Don Francisco Sánchez Madrid y Doña María Blasco Marhuenda **y de dos extranjeros**, los Dres: Patrick Couvreur y Dan Alain Lerner.

Se pronunciaron conferencias sobre diversos temas de actualidad, el Dr. José Manuel Giménez Amaya, trató el tema “Ciencia y Religión en el Siglo XXI”; el magistrado Don José Soriano Guzmán nos deleitó con la temática sobre “Propiedad intelectual y patentes en la legislación española”; el Dr. José María Casasnovas nos ilustró con su conferencia acerca de “Prevenir la entrada de

virus en la célula, un eficiente proceso de neutralización viral por anticuerpos”; Nuestro compañero Académico de Número, Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo nos habló sobre el “Riesgo potencial por nuevas variantes del virus de la gripe (u otros agentes biológicos) que podrían aplicarse con fines terroristas o bélicos”; el Dr. Basilio Valladares Hernández disertó sobre el tema “Amebas de vida libre ¿Patógenos emergentes?; el Dr. José Antonio Gutiérrez Fuentes nos hizo reflexionar en el ámbito de la Investigación, Desarrollo e Innovación, con el título: “Investigar en España, ¿una apuesta con futuro?”; y la profesora Dolores Prieto Ocejo, nos actualizó de una manera clara y profunda sobre el tema “Disfunción endotelial, resistencia a la insulina y obesidad”.

Reuniones y Encuentros.

Cabe destacar entre las actividades en nuestra sede, el “Primer Encuentro entre Diputados y Senadores con Académicos de las Reales Academias Nacionales de Farmacia y Medicina”, en concreto los responsables de las Comisiones de Sanidad del Congreso y del Senado, organizada por nuestro Académico correspondiente Don Honorio Carlos Bando Casado. En dicho acto se debatieron los diferentes aspectos en los cuales se podría converger y colaborar en beneficio de la sociedad española y construir un futuro mejor para la ciencia y la innovación en España.



Acto del cincuentenario de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, en el que nuestra compañera Académica de Número, la Excm. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal también nos impactó con su conferencia extraordinaria: “La aventura extracelular del ATP: nuevos receptores, nuevos fármacos y nuevas ideas”.

Otro acontecimiento relevante, fue el que celebramos conjuntamente con las RR. AA. de Ciencias y de Medicina, con motivo del día mundial del SIDA. Esta primera reunión tuvo lugar en la sede de la Real de Medicina, y contó con la participación como ponente de nuestro Presidente, Excmo. Sr. Don Mariano Esteban Rodríguez.

Enseñanza y futuro de la Farmacia

La Real Academia Nacional de Farmacia fue sede de dos Sesiones, a propuesta del delegado español en Bruselas, profesor Don Antonio Sánchez Pozo, sobre difusión de la formación y de las futuras competencias de los farmacéuticos en Europa. Todo ello, en el marco del proyecto “Farmine-Aseguramiento de la Calidad” (PHAR-QA). Proyecto bajo los auspicios de la Unión Europea, dentro del programa ERASMUS “Lifelong Learning”. La primera a cargo del delegado de Bruselas prof. Jeffrey Atkinson; y la segunda del delegado español prof. Antonio Sánchez Pozo, de la Universidad de Granada.

Mesas Redondas y Fundación José Casares Gil

La Fundación José Casares Gil ha contribuido con su patronazgo al desarrollo de las actividades científicas, Mesas Redondas y difusión de la ciencia y la cultura, en numerosas Sesiones.

Describimos las **Mesas Redondas** celebradas por Secciones:

En la Primera, su Presidente, el Excmo. Sr. Don Antonio Monge Vega presentó a diversos conferenciantes cuyos nombres y temas han sido mencionados.

La Sección 2^a nos acercó a la “Simbiogénesis y Bacteriomas” coordinada por su Presidente, el Excmo. Sr. D. Antonio Ramón Martínez Fernández.

Impulsada por la **Sección Tercera**, como cada año y previstas hasta 2015, tuvimos el ciclo de conferencias en colaboración con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, sobre “Garantía en la Continuidad Asistencial. Plan terapéutico”. Coordinada por el Excmo. Sr. Don Nicolás Víctor Jiménez Torres.

La **Sección 4^a** dirigida por el Excmo. Sr. Don Juan Tamargo Menéndez, trató el tema de “Productos naturales, diterpenos y patologías con base inflamatoria”, coordinada por el Académico de Número, el Excmo. Sr. Don Ángel M^a Villar del Fresno. Contó con las ponencias de la Prof. Dra. Beatriz de las Heras Polo; y del Prof. Dr. Lisardo Boscá Gomar.



La **Sección 5^a** organizó varias Mesas Redondas entre ellas la denominada: “Gluten y enfermedades relacionadas”, coordinada por su Presidente y también de esta Real Academia, el Excmo. Sr. Don Mariano Esteban Rodríguez.

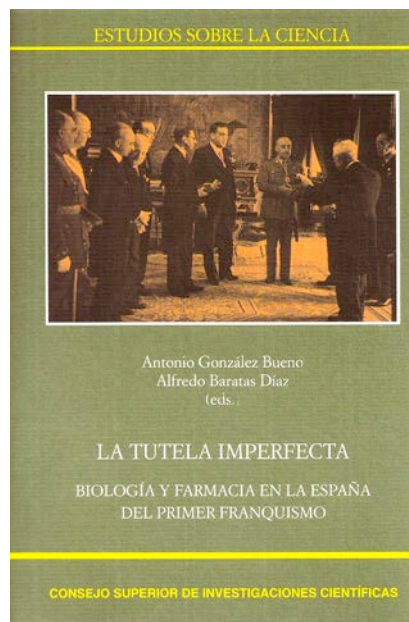
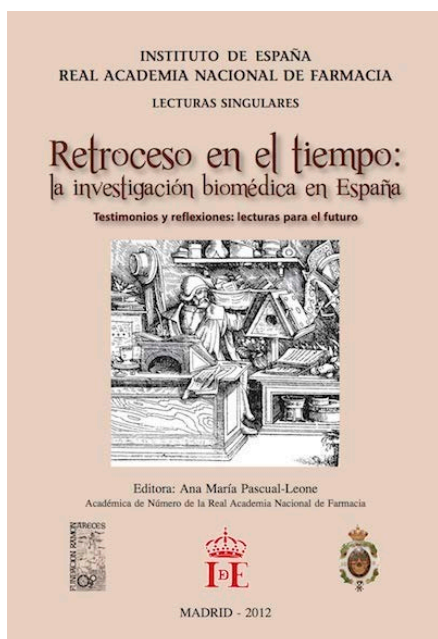
La **Sección 6^a** que actualmente dirige la Excma. Sra. Dña. Rosa María Basante Pol, aportó luz sobre “Financiación de Medicamentos: aspectos jurídico, social y ético”. Y otra Mesa Redonda, con la intervención de los Académicos Excmo. Sr. D. Javier Puerto Sarmiento y los Ilmos. Sres. D. Antonio González Bueno y D. Alfredo Baratas Díaz, cuyo título citaremos más tarde en el epígrafe de libros.

Y finalmente se celebró la Mesa Redonda conmemorativa de los Premios Nobel 2013, coordinada por el Excmo. Sr. Don Juan Ramón Lacadena Calero.

Presentación de libros.

Tuvieron lugar las presentaciones de los libros “**Retroceso en el tiempo: la investigación biomédica en España**”, editado por la [Excma. Sra. Dña. Ana M^a Pascual-Leone Pascual](#), a cuyo acto acudió la Excma. Sra. Secretaria de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación Doña Carmen Vela Olmo; y el libro titulado:

“La tutela imperfecta. Biología y Farmacia en la España del primer franquismo”
acto presentado por el Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento.



Reuniones académicas internas.

La Actividad Académica se complementa con las reuniones de las Secciones y Comisiones. Las Secciones se reunieron en 20 ocasiones y las Comisiones en 12. Además la Junta de Gobierno tuvo 12 sesiones, y la Junta General se reunió 3 veces de manera Ordinaria y otras 3 en Sesión Extraordinaria.

Durante el año 2013, se han producido elecciones en los cargos de Vicepresidente y Vicesecretario, siendo elegido para el primero el Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, y para el segundo el Excmo. Sr. D. Francisco José Sánchez Muniz, a la vez que despedimos a los Excmos. Sres. D. Antonio R. Martínez Fernández y D. José Miguel Ortíz Melón, que terminaban su segundo mandato y que con tanta eficacia y generosidad lo han ejercido.

Los Excmos. Sres. D. Nicolás Victor Jiménez y D. César Nombela Cano, Presidentes de las secciones 3ª de Tecnología Farmacéutica y 6ª de Historia Legislación y Bioética respectivamente, han sido sucedidos por los Excmos. Sres. D. Antonio Doadrio Villarejo y Dña. Rosa Basante Pol. Se agradece a los Dres. Jiménez Torres y Nombela Cano, la excelente labor que han realizado durante su mandato.

Premios y distinciones.

Es gratificante comentar en esta ocasión solemne, los puestos de responsabilidad en algunas instituciones y organismos estatales otorgados a algunos compañeros Académicos, que ha llegado a nuestro conocimiento y que citamos a continuación.

Debe felicitarse esta Academia, por el nombramiento de nuestro compañero, el **Excmo. Sr. Don César Nombela Cano** como Rector de la “Universidad Internacional Menéndez Pelayo”, y que tuvo durante el año 2013, una acusada actividad intelectual, desfilando por ella numerosas personalidades de la cultura española y mundial.

Al Excmo. Sr. Don Salvador Rivas Martínez le fue otorgado uno de los Premios anuales de la Sociedad Geográfica Española, considerado uno de los más importantes que se conceden en nuestro país, vinculados a la aventura, la exploración y la investigación geográfica.

El **Excmo. Sr. Don Mariano Esteban Rodríguez**, fue nombrado Miembro del Comité Científico Asesor del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y Académico de Honor de la Sociedad Española de Odontología.

Al **Excmo. Sr. Don Juan Ramón Lacadena Calero**, nuestro Vicepresidente, le fue concedida por la Universidad Pontificia Comillas de Madrid, la Medalla honorífica de agradecimiento por su labor y colaboración en el ámbito de la Bioética.

A La **Excma. Sra. Doña María Cascales Angosto**, le fue condecorada la medalla de socia de Honor de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular; y leyó su discurso de académica de número Fundadora de la Acad. de Farmacia Santa María de España, de la región de Murcia.

La **Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal** leyó el correspondiente discurso de Dra. “honoris causa” por la Universidad Rey Juan Carlos, vinculada a la Comunidad de Madrid.

El **Excmo. Sr. Don Juan Tamargo Menéndez**, por sus relevantes estudios experimentales en Farmacología, ha sido nombrado “Fellow” de la British Pharmacological Society, en su sede de Londres.

El **Excmo. Sr. Don Francisco Javier Puerto Sarmiento**, Académico de Número también de la **Real Academia de Historia**, ha sido nombrado recientemente, Académico Correspondiente de la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas de México.

La **Excma. Sra. Doña María José Alonso Fernández** ha recibido el premio “Josefa Wonenburger” de la Unidad Muller de Ciencia de la Xunta de Galicia. También ha sido nombrada miembro de la Junta Directiva de la “Controlled Release Society”, sociedad internacional de sistemas de liberación de Fármacos.

La Excm. Sra. Doña Rosa María Basante Pol ha sido elegida Vicepresidenta del Instituto de Estudios Madrileños, adscrito al CSIC como miembro de la Confederación Española de Centros de Estudios Locales.

La Excm. Sra. Doña María Vallet Regí, fue nombrada Doctora "honoris causa" por la Universidad del País Vasco (UPV/EHU); "Distinguished Women in Chemistry and Chemical Engineering" por la International Union of Pure and Applied Chemistry y "premio de investigación Miguel Catalán" de la Comunidad de Madrid 2013.

Entre los Académicos correspondientes

El Excmo. Sr. Don Manuel López Pérez, Rector de la Universidad de Zaragoza y Presidente de la Academia de Farmacia "Reino de Aragón", el pasado día 29 de noviembre 2013, fue elegido Presidente de la Conferencia de Rectores de las Universidades Españolas.

A nuestro Académico correspondiente Don Manel Esteller Badosa, **se le ha concedido el "Premio Jaime I de Investigación"**, vinculado a la Comunidad Valenciana.

El Académico Correspondiente y de Número de la Real de Medicina Excmo. Sr. **Don Francisco González de Posada**, como complemento de sus estudios de la licenciatura en Filosofía en la Universidad Pontificia de Salamanca, ha alcanzado el doctorado en Teología por su tesis "Teología de la Creación del Universo y de la relación de Dios con su obra cósmica".

El Académico correspondiente **Don Honorio Carlos Bando Casado**, ha sido nombrado Secretario de la Fundación José Casares Gil, Académico Correspondiente de la Real Academia de Jurisprudencia y Legislación y Profesor Honorario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Finalmente señalar, que nuestro Académico correspondiente y de la Real de Medicina, **Don Pedro Guillén García**, Director de la CLÍNICA CEMTRO, ha organizado varios encuentros internacionales en febrero y noviembre, al que hemos asistido 4 Académicos de Número y varios correspondientes, el último el "XII Simposio Internacional sobre Avances y Actualizaciones en Traumatología y Ortopedia", y promotor del implante de los cultivos celulares específicos de condrocitos y mioblastos en terapéutica humana, aceptadas por la Food and Drug Administration, de EE.UU. En el que han intervenido eminentes personalidades científicas, españolas, de EE.UU. y Méjico, entre ellas nuestro compañero Acad. Don Guillermo Giménez Gallego. Y la Empresa GOOGLE le transmitió con Google Glass y por primera vez en el mundo, una operación quirúrgica de rodilla, con el "artroscopio sin cables" de su invención, a 271 puntos hospitalarios de numerosos

países, dando relevancia y brillantez a la “**marca España**”, en un momento clave de nuestro país.

Felicitemos a todos nuestros eminentes Académicos, por su elevado nivel y prestigio en los ambientes científicos de nuestro país e internacionales, por su esfuerzo, dedicación y entrega, que realza el de esta Academia y de España, así como el desarrollo de la ciencia en beneficio de la humanidad.

Convenios de colaboración.



Esta Real Academia mantiene activos diversos “Convenios” con varias instituciones, y este año se ha firmado un nuevo **Convenio de colaboración con la Universidad Francisco de Vitoria**, por el que ambas instituciones podrán prestarse asesoramiento mutuo, información, y apoyo en cuantos asuntos sean de interés común. El Convenio refleja e incide primordialmente en la enseñanza, el incremento de la calidad, y la formación de profesores y estudiantes, lo que beneficiará el nivel y la calidad de formación de nuestros estudiantes y redundará en el prestigio internacional de nuestro país, hoy en la cola de Europa.

En colaboración con el Excmo. Ayuntamiento de Cádiz, y promovido por nuestro Académico correspondiente, y numerario de la Real de Medicina Excmo. Sr. Don Francisco González de Posada, esta Academia forma parte del tribunal que selecciona los trabajos presentados al [Premio anual “José Celestino Mutis de Botánica Cortes de Cádiz”](#), que en su edición 2013, le fue otorgado al Prof. Wolfredo Wildpret de las Islas Canarias, y por cuya calidad y por su ingente labor en la geobotánica de aquellas Islas, se le nombró Académico Correspondiente electo de nuestra Academia.

Difusión de la Ciencia y del Conocimiento, es uno de los objetivos primordiales de las Reales Academias, y destacamos que en el Curso 2013, la nuestra, ha procedido a la renovación de los portales web de la misma, con la implementación de un nuevo interfaz, optimizando los recursos e inscribiéndonos al servicio “Amazon”, para relanzar la difusión de la ciencia a nivel nacional e internacional en beneficio de la formación de la sociedad actual y de la humanidad.

En el **portal publicaciones**, se han editado “on line” los 4 números de “Anales” correspondientes al año 2013, y se ha conseguido que esté referenciada en el “JCR Science edition 2012”. Asimismo se han publicado “on line” y en DVD las Monografías siguientes. La número [37 en “Homenaje a Don Ángel Santos Ruiz en su centenario de nacimiento \(1912-2012\)”](#). Y la Monografía 32 de la serie de

“Aguas Minerales y Mineromedicinales” correspondiente al “Balneario El Raposo”. En la serie de “**Lecturas Singulares**” se publicaron los números 11 y 12. Y los ya mencionados dos libros en el epígrafe de su nombre.

A toda la relación acabada de mencionar, deben sumarse dos obras singulares: el libro resumen de las jornadas científicas sobre “*Fármacos, nanomedicina y biomateriales: Un objetivo común*” y el de “*Seguridad del paciente oncológico: casos de éxito*”, de la Mesa Redonda del mismo nombre que tuvo lugar en nuestra sede. Esta última y la “Historia de la Real Academia Nacional de Farmacia” del Académico Don Francisco Javier Puerto Sarmiento, antes mencionada, se ha editado en colaboración con la Fundación de esta Academia José Casares Gil.

Y como todos los años, se ha publicado en papel, el Discurso de la Sesión Inaugural ya mencionado, y el “Anuario” nº 64 de nuestra institución.

Todas estas obras antes mencionadas, coordinadas por nuestro Acad. Excmo. Sr. Antonio Luis Doadrio Villarejo, se publicaron también en un lujoso formato de libro electrónico o “e-book” en edición “on line” y digital DVD para PC Windows y Mac.

En la Biblioteca, gracias a la ayuda concedida por el Ministerio de Educación Cultura y Deporte se continuó con el proyecto de digitalización del fondo antiguo e histórico, con más de 45.000 imágenes de 95 volúmenes que se pueden consultar en el Catálogo virtual de esta Academia. Se ha recibido nueva ayuda para continuar el proceso para este año 2014. Se ha continuado con el proyecto de “Recuperación, catalogación, digitalización y archivo del fondo fotográfico antiguo” con 1.100 fotografías de los siglos XIX y XX. Se expurgan numerosas ediciones a disponibilidad. Se recibieron varias donaciones; y la Biblioteca de esta Academia es una de las que más aporta al Catálogo internacional de la Federación Española de Asociaciones de Archiveros Bibliotecarios, Arqueólogos, Museólogos y Documentalistas (la ANABAD).

Nuestro **Museo de la Farmacia** ha sido muy visitado, como en años anteriores, lo mismo que la “Sala Utagawa” de grabados japoneses, única en nuestro país, que además fue visitada por los miembros de la Real Academia de Bellas Artes de San Fernando, con su Director el Excmo. Sr. Don Antonio Bonet Correa, y otros especialistas de pintura japonesa.

Con motivo de la celebración del año cultural de Japón en España, se celebrará en el mes de mayo próximo, una exposición conjunta con la Real Academia de Bellas Artes de San Fernando sobre arte japonés, en la cual la RANF cede un conjunto de obras de arte de la colección de nuestra Sala Utagawa.



En cuanto al **Edificio y Obras de Restauración**, no podemos señalar obra importante alguna, al carecer de capítulo de “Inversiones” por época de crisis, y señalamos que las realizadas en el curso anterior soslayaron y evitaron definitivamente inundaciones y goteras

Agradecimientos.

Por último queremos expresar nuestro agradecimiento al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, ya que gracias a la subvención presupuestaria recibida en el Curso 2013, hemos podido realizar las actividades científicas programadas, el mantenimiento imprescindible del edificio, el de la página web, la digitalización de la Biblioteca y de su personal.

Agradecemos a todos los patrocinadores del Concurso Científico, puesto que con su contribución y estimulante donación, posibilitan discernir los mejores trabajos presentados y premiar la labor científica de quienes participan en el mismo. Asimismo agradecemos a los Patronos, miembros y socios de la “Fundación José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, su importante contribución a la actividad científica de nuestra Real Corporación. Y a la Fundación Ramón Areces, que ha auspiciado diversos cursos de relevancia

internacional, sin cuya ayuda no hubieran podido tener lugar, y son trascendentales para la formación científica y humana de nuestra juventud y de nuestra sociedad.

Termino dando las gracias a todos los Académicos de Número y Correspondientes por la colaboración prestada, tanto a aquellos que han participado día a día a las actividades realizadas en nuestra sede, a los que han organizado e intervenido con interesantes conferencias, como a los que han permitido con su asistencia y contribución, colocar nuestra Academia en lo más alto del nivel científico y de mayor prestigio entre las instituciones españolas; y al personal contratado, que mantiene día a día el funcionamiento de la misma, y por su exquisito trato a los Académicos.

Muchas gracias por su atención.

Madrid, 16 de enero de 2014

El Académico Secretario
Dr. Bartolomé Ribas Ozonas



PUBLICACIONES ELECTRÓNICAS DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA