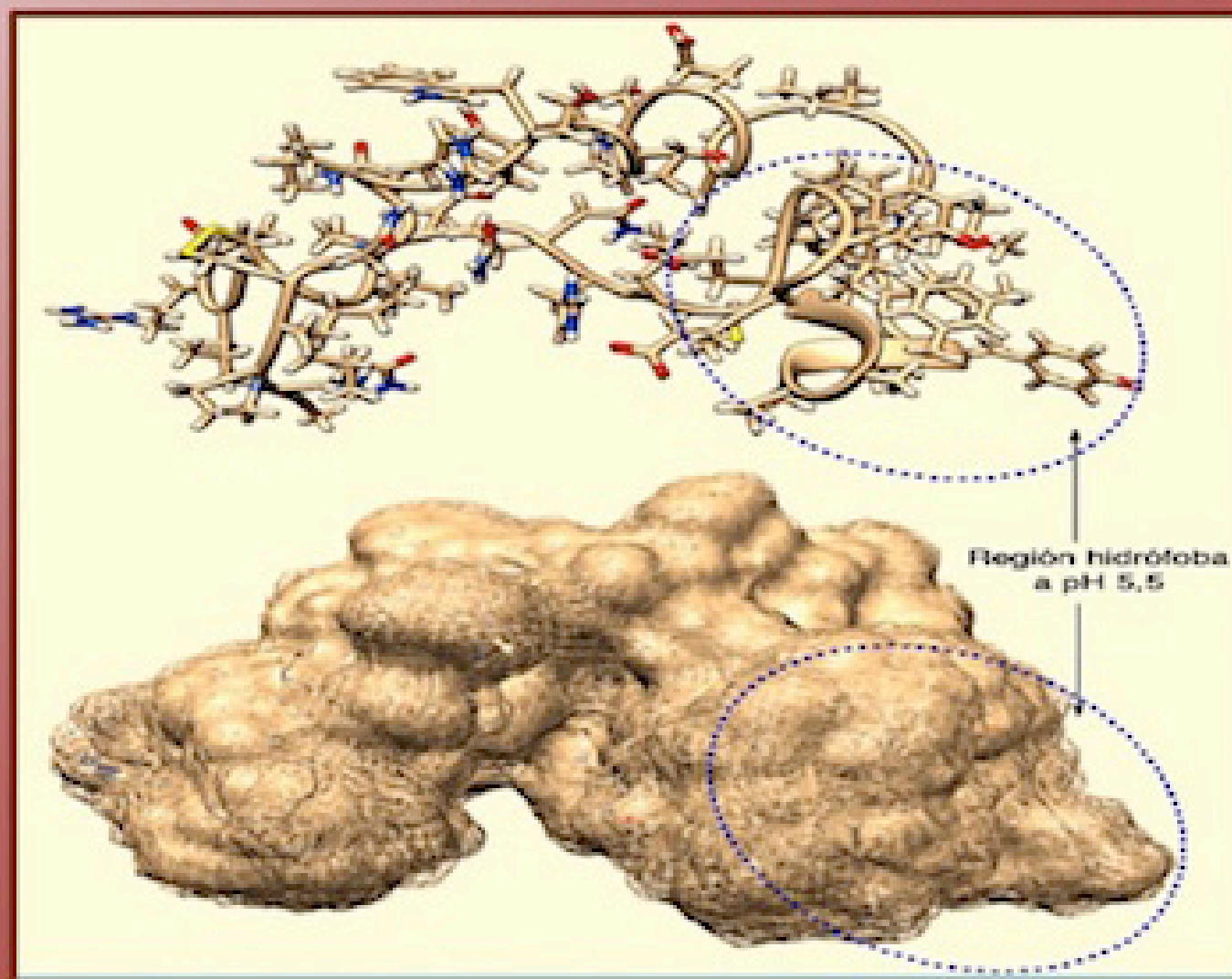


# ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

Volumen 80 | Número 4 | Octubre-Diciembre 2014 | Páginas 641-774



[www.analesranf.com](http://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



### ¿Un paso adelante hacia la clonación humana con fines terapéuticos?: una adenda

Juan-Ramón Lacadena

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid.  
e-mail: jrlgbucm@bio.ucm.es

*An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 4 (2014), pag. 644-648*

#### RESUMEN

En el presente trabajo se analiza el estado actual de las investigaciones para la obtención de embriones humanos clónicos por transferencia nuclear de células somáticas y de las células troncales embrionarias (células NT-ES) y su posible utilización con fines terapéuticos y su comparación con las células troncales pluripotentes inducidas (células iPS). Se hace referencia también a la reprogramación directa como método alternativo. El texto se presenta como una adenda a una revisión anterior del propio autor.

**Palabras clave:** Clonación en humanos; transferencia nuclear; embrión humano clónico; embrión somático; células troncales embrionarias clónicas; reprogramación directa.

#### ABSTRACT

##### *A step forward towards human cloning for therapeutic purposes?: an addendum*

Present investigations carried out to produce human embryos by somatic cell nuclear transfer (SCNT embryos) and nuclear transfer human embryo stem cells (NT-ESC) and their use in regenerative medicine are analyzed and compared with the induced pluripotent cells (iPS). A reference to the direct reprogramming technique is made. The text is presented as an addendum to an author's previous review.

**Keywords:** Human cloning; somatic cell nuclear transfer; clone human embryo; SCNT embryo, somatic embryo; human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer; NT-ESC; direct reprogramming.

## **1. ADENDA: UNA JUSTIFICACIÓN**

Hace poco más de un año publiqué en esta misma revista (1) una amplia revisión sobre la posible utilización de la clonación humana con fines terapéuticos. Unos meses después, a lo largo de este año 2014, se han publicado varios artículos científicos que, en mi opinión, sería conveniente incluir su comentario como una adenda al artículo original. El contenido de este texto debería leerse o añadirse a continuación del anterior como una estricta adenda.

## **2. LOS NUEVOS DATOS CIENTÍFICOS**

Cuando se hizo pública la investigación realizada por el grupo de investigación del Dr. Mitalipov sobre la clonación humana con fines terapéuticos que fue comentada por el autor en esta misma revista en 2013 (1), hubo algunas voces críticas que veían sospechoso que la revista *Cell* hubiera publicado el trabajo en un tiempo récord (2) alentado por posibles intereses extracientíficos, llegando a poner en duda, incluso, la validez de la investigación. Sin embargo, un año más tarde, en 2014, se publicaron dos trabajos realizados por distintos grupos de investigación utilizando como donantes individuos adultos, lo que viene a confirmar la posible aplicación práctica de la clonación humana por transferencia nuclear con fines terapéuticos.

Así, Chung y colaboradores (3), siguiendo la técnica de Mitalipov con alguna modificación, obtuvieron células troncales embrionarias vía transferencia nuclear de células somáticas (NT-ESCs) a partir de fibroblastos de piel de dos varones adultos de 35 y 75 años.

Por su parte, Egli y colaboradores (4) obtuvieron células NT-ES a partir de células somáticas de una mujer adulta de 32 años que padecía una diabetes tipo 1 desde hacía 10 años. Con la técnica utilizada mejoraron el protocolo de activación del ovocito utilizando el tratamiento con kinasas e inhibidores de la traducción y de histona desacetilasa que promueven el desarrollo del estadio de blastocisto. La eficiencia del desarrollo variaba entre las diferentes donadoras de ovocitos, siendo inversamente proporcional al número de días de tratamiento hormonal necesarios para la maduración del ovocito. Puesto que el uso para la fusión celular de virus Sendai concentrado produce la activación prematura del ovocito al aumentar la concentración intracelular de calcio, utilizaron una concentración diluida de virus Sendai en un medio libre de calcio. Desde el punto de vista clínico, es importante señalar que de las células NT-ES derivaron, además de neuronas y células duodenales, células pancreáticas productoras de insulina.

Los dos trabajos mencionados han vuelto a poner sobre el tapete la controversia bioética entre la utilización de la técnica de Yamanaka para obtener las células troncales pluripotentes inducidas (células iPS) frente a la obtención de

células troncales a partir de embriones obtenidos por fecundación *in vitro* o por transferencia nuclear (células IVF-ES y células NT-ES).

Dada la potencialidad que las células troncales representan para la Medicina Regenerativa del futuro, el grupo del Dr. Mitalipov (5) ha planteado la comparación de las limitaciones que plantean entre sí las células troncales embrionarias obtenidas a partir de un proceso de fecundación *in vitro* (células IVF-ES) -que representan el “patrón oro”, aunque tienen el inconveniente de su alogenicidad en relación al paciente y el posible rechazo inmunológico- frente a las posibles aberraciones epigenéticas y transcripcionales de las células pluripotentes embrionarias obtenidas por transferencia somática nuclear (células SCNT) o por pluripotencia inducida sin pasar por la fase embrionaria (células iPS). Para determinar si tales aberraciones son consecuencia intrínseca del proceso de reprogramación de las células somáticas o más bien debidas al método de reprogramación, realizaron el análisis genómico de los tres tipos de células.

Los resultados obtenidos al comparar genéticamente las células IVF-ES con las células iPS y las células NT-ES derivadas de las mismas células somáticas llevaron a la conclusión de que tanto las células NT-ES como las iPS contenían una cantidad comparable de variaciones en el número de copias *de novo*. Sin embargo, los perfiles de metilación del ADN y del transcriptoma de las células NT-ES se correspondían estrechamente con los de las células IVF-ES, mientras que las células iPS diferían y mantenían patrones residuales de metilación del ADN típicos de las células somáticas de las que procedían. La conclusión a la que llegaban, por tanto, es que en las células somáticas humanas pueden ser reprogramadas a la pluripotencia con mayor fiabilidad mediante la utilización de las células NT-ES y, por tanto, consideran que la clonación con fines terapéuticos es ideal para la terapia celular de la Medicina Regenerativa.

En esta controversia hay que tener en cuenta un cuarto elemento: la *reprogramación directa* que permite obtener un tipo de células diferenciadas directamente a partir de otro tipo de células diferencias sin pasar por la fase embrionaria (células IVF-ES y células NT-ES) ni tan siquiera por la fase de pluripotencia (células iPS): se trata de una verdadera “alquimia celular” (6).

En 2008, el grupo de Douglas A. Melton (7) reprogramó *in vivo* células adultas de ratón (células exocrinas del páncreas) transformándolas directamente en células beta pancreáticas capaces de producir insulina (islotas de Langerhans). Las células obtenidas son indistinguibles de las células beta pancreáticas endógenas, tanto en tamaño como en su forma y estructura. El experimento realizado con ratones *in vivo* mostró que las células beta obtenidas mejoraban sensiblemente la condición de hiperglicemia de los ratones diabéticos. No cabe duda que estos resultados son esperanzadores para tratar de curar en el futuro la enfermedad de la diabetes tipo 1 en humanos.

En enero de 2010, Wernig y colaboradores (8), partiendo de la hipótesis de que la expresión combinatorial de factores de transcripción específicos del linaje neural podría convertir directamente fibroblastos en neuronas, utilizaron un conjunto de 19 genes candidatos de los que solamente tres factores (*Ascl3*, *Brn2* también denominado *Pou3f2* y *Myt1l*) eran suficientes para convertir con rapidez y eficacia fibroblastos embrionarios y postnatales de ratón directamente en neuronas funcionales *in vitro*. Las células neuronales inducidas (iN) expresan múltiples proteínas específicas de neurona, generan potenciales de acción y forman sinapsis funcionales. Los autores señalaban que la generación de células iN a partir de linajes no neurales podría tener importantes implicaciones tanto en el estudio del desarrollo neural como en el diseño de modelos de enfermedades neurológicas y la Medicina Regenerativa.

En noviembre de 2010, Bhatia y colaboradores (9) lograron la conversión directa de fibroblastos humanos en células progenitoras hematopoyéticas que daban lugar a linajes granulocíticos, monocíticos, megacariocíticos y eritroides, abriendo una posible puerta a la futura aplicación clínica en la terapia celular autóloga sin pasar por la fase pluripotente de las células iPS.

En octubre de 2014, Yoo y colaboradores (10) obtenían neuronas espinosas medianas a partir de fibroblastos humanos de individuos postnatales y adultos. En su investigación utilizaron dos tipos de microARN (miR-9 y miR-124) que modifican el empaquetamiento de la cromatina y, por tanto, el silenciamiento de determinados genes con lo que cambian la diferenciación de fibroblastos en neuronas. Posteriormente, utilizando factores de transcripción específicos, obtuvieron el subtipo de neuronas espinosas medianas deseado. Estas células son las principales neuronas afectadas en la enfermedad de Huntington, de donde se deduce la posible importancia clínica de esta investigación. Pasos adicionales inmediatos en la investigación serán, por un lado, obtener por reprogramación directa neuronas espinosas medianas procedentes de fibroblastos de personas con la enfermedad de Huntington para estudiar las propiedades celulares asociadas con la enfermedad y, por otro lado, inyectar las neuronas obtenidas por reprogramación de fibroblastos de personas sanas en ratones modelo de la enfermedad de Huntington para comprobar si ello permite combatir la enfermedad.

Es evidente que se ha abierto un nuevo y esperanzador campo para la Medicina Regenerativa del futuro. Además, como en el caso de la utilización de las células troncales adultas (AS) y las células troncales pluripotentes inducidas (iPS), se obvian los problemas éticos que plantea la utilización de las células troncales pluripotentes embrionarias (células IVF-ES o NT-ES ).

### 3. REFERENCIAS

1. Lacadena, J.R. ¿Un paso adelante hacia la clonación humana con fines terapéuticos? *An. Real Acad. Farm.* **79**, 241-252 (2013).
2. Tachibana, M.; Amato, P.; Sparman, M.; Marti Gutierrez, M.; Tippner-Hedges, R.; Ma, H.; Kang, E.; Fulati, A.; Lee, H-S.; Sritanandomchai, H.; Masterson K.; Larson, J.; Eaton, D.; Sadler-Fredd, K.; Battaglia, D.; Lee, D.; Wu, D.; Jansen, J.; Patton, P.; Gokhale, S.; Stouffer, R.L.; Woll, D.; Mitalipov, S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, **153**, 1-11 (2013).
3. Chung, Y.G.; Eum, J.H.; Lee, J.E.; Shim, S.H.; Sepillan, V.; Hong, S.W.; Lee, Y.; Treff, N.R.; Choi, Y.H.; Kimbrel, E.A.; Dittman, R.E.; Lanza, R.; Lee, D.R. Human somatic cell nuclear transfer using adult cells. *Cell Stem Cell* **14**, 1-4 (2014).
4. Yamada, M.; Johannesson, B.; Sagi, I.; Burnett, L.C.; Kort, D.H.; Prosser, R.W.; Pauli, D.; Nestor, M.W.; Freeby, M.; Greenberg, E.; Goland, R.S.; Leibel, R.L.; Solomon, S.L.; Benvenisty, N.; Sauer, M.V.; Egli, D. Human oocytes reprogramm adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*, (published online 29 abril 2014 doi:10.1038/nature 13287).
5. Ma, H.; Morey, R.; O'Neil, R.C.; He, Y.; Daughtry, B.; Schultz, M.D.; Hariharan, M.; Nery, J.R.; Castanon, R.; Sabatini, K.; Thiagarajan, R.T.; Tachibana, M.; Kang, E.; Tippner-Hedges, R.; Ahmed, R.; Marti Gutierrez, N.; Van Dyken, C.; Polat, A.; Sugawara, A.; Sparman, M.; Gokhale, S.; Amato, P.; Wolf, D.P.; Ecker, J.R.; Laurent, C. et al. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature*, **511**, 177-183 (2014).
6. Lo que sigue está basado en: Lacadena, J.R.; *Genética y Sociedad. Discurso leído en la Solemne Sesión Inaugural del Curso celebrada el 13 de enero de 2011*; Real Academia Nacional de Farmacia; Madrid, 2011; p. 139-140.
7. Zhou, Q.; Brown, J.; Kanarek, A.; Rajagopal, J.; Melton, D.A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to  $\beta$ -cells. *Nature* **455**, 627-632 (2008).
8. Vierbuchen, T.; Ostermeier, A.; Pang, Z.P.; Kokubu, Y.; Sudohf, T.C.; Wernig, M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature online* (27 January 2010) doi: 10.1038/nature 08797.
9. Szabo, E.; Rampalli, S.; Risueño, R.M.; Schnerch, A.; Mitchell, R.; Fiebig-Comyn, A.; Levadoux-Martin, M.; Bhatia, M. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature on line* (7 November 2010) doi:10.1038/nature 09591.
10. Victor, M.B.; Richner, M.; Hermanstynne, T.O.; Ransdell, J.L.; Sobieski, C.; Deng, P-Y.; Klyachko, V.A.; Nerbonne, J.M.; Yoo, A.S. Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron*, **84**, 311-323 (2014).





## Tratamientos experimentales contra el virus Ébola Zaire

M<sup>a</sup> del Carmen Avendaño López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Real Academia Nacional de Farmacia, Académica de Número  
e-mail: avendano@ucm.es

*An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 4 (2014), pag.649-665*

### RESUMEN

Se analizan las características de los filovirus, en especial del virus Ebola Zaire, así como varios tratamientos experimentados hasta el momento. Se incluyen vacunas, anticuerpos monoclonales, proteína C activada, proteína c2 recombinante de nematodos, interferones, RNAs de interferencia, oligonucleótidos antisentido (fósforodiamidato morfolino oligómeros), y antimetabolitos (inhibidores de RNA polimerasa RNA-dependiente). Hacemos hincapié en los fundamentos, dianas erapéuticas, mecanismos de acción, objetivos y situación actual. También se comentan algunos antivirales descubiertos por métodos de cribado al azar y proyectos para un futuro inmediato.

**Palabras clave:** Ébola; vacunas; tratamientos experimentales.

### ABSTRACT

#### *Experimental treatments against Zaire Ebola virus*

The characteristics of filoviruses of the genus *Ebolavirus*, especially of Zaire Ebola virus, as well as several experimental treatments are analyzed. We include vaccines, monoclonal antibodies, recombinant human activated protein C, recombinant nematode anticoagulant protein c2, interferons, RNA interference, antisense oligonucleotides (phosphorodiamidate morpholino oligomers), and antimetabolites (RNA polymerase RNA-dependent inhibitors). We emphasize the fundamental principles, drug targets, action mechanisms, aims, and actual situation. We also comment some antiviral compounds found by throughput screening and near projects.

**Keywords:** Ebola virus; vaccines; experimental treatments.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El jueves 30 de octubre de 2014, la Real Academia Nacional de Farmacia celebró una tertulia científica con el tema: "EBOLA: breve recapitulación sobre etiología, epidemiología, patogenia, tratamiento y control", en la que actuó como ponente el Prof. Dr. Rafael Rotger Anglada, Catedrático de Microbiología y Director del Centro de Análisis Sanitarios de la UCM. En su documentada intervención mencionó el tratamiento que según fuentes sanitarias se administró a la auxiliar de clínica Teresa Romero, la primera europea contagiada fuera de África que, afortunadamente, fue felizmente curada. Este acto, así como la avalancha de información producida como consecuencia del actual brote de Ébola (1), nos ha impulsado a elaborar una revisión que contemple gran parte de los esfuerzos realizados para la prevención y el tratamiento de esta epidemia.

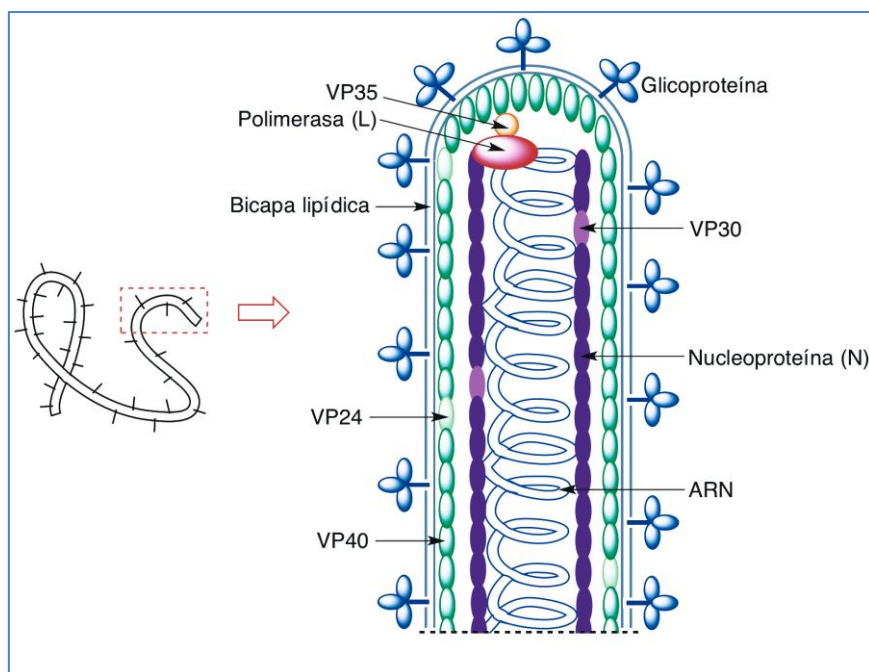
## **2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS ÉBOLA ZAIRE**

Dentro de los filovirus, denominados así por su aspecto filamentosos, el género *Ebolavirus* comprende cinco serotipos o especies. A excepción de la especie *Ebola Reston* encontrada en Filipinas, todas las demás producen fiebre hemorrágica y una alta tasa de mortalidad en las personas. La especie *Ebola Zaire* (EBO-Z) tiene un periodo de incubación de 3-21 días, tras el cual los pacientes presentan síntomas gripales hasta que se produce una progresión muy rápida caracterizada por hemorragias y finalmente un fracaso multiorgánico (2). El primer brote documentado de esta especie se produjo en 1976 en la República Democrática del Congo, anteriormente denominada Zaire, y aunque desde entonces ha causado 34 epidemias en distintos países del África sub-Sahariana, ninguna ha causado la alarma de la actual por su posible diseminación al resto del mundo.

Un grave problema a la hora de estudiar vacunas o fármacos contra este virus es disponer de modelos animales adecuados ya que, aunque esta especie es letal para los ratones recién nacidos, los ratones adultos (que suelen ser los modelos más comunes para los estudios *in vivo*) son resistentes a la infección, por lo que si se utilizan para estos propósitos hay que manipularlos (3). Los macacos son por el momento el mejor modelo animal.

El genoma del virus Ébola consiste en una molécula única de ARN monocatenario lineal de polaridad negativa, por lo que no sirve directamente de ARN mensajero sino que mediante una RNA polimerasa vírica debe originar primero una copia complementaria que traduce las siete proteínas que posee el virión. Este está formado por un nucleoide con forma tubular rodeado por una cápsida helicoidal (Figura 1). El nucleoide está constituido por una nucleoproteína (N) y la mencionada RNA polimerasa (L). La cápsida está

recubierta de una membrana en la que se integra una glicoproteína (GP), y en ella se encuentran también la proteína VP30 (que permite al virión desdoblarse dentro de una célula hospedadora), la VP35, y las proteínas VP24 y VP40 (que forman una matriz que mantiene unidos el nucleoide y la cápsida).



**Figura 1.- Representación de un virión Ébola.**

Los filovirus penetran en el citoplasma de la célula hospedadora a través de la fusión de su membrana externa con la membrana de endosomas, compartimentos de transporte desde la membrana plasmática a los lisosomas. En este proceso son especialmente importantes las glicoproteínas presentes en dicha membrana que, al experimentar procesos de proteólisis y de reordenamiento, facilitan dicha fusión y la posterior internalización del virus. El éxito obtenido en el desarrollo de antivirales y anticuerpos que tienen como objetivo impedir la entrada al interior celular de virus patógenos, incluyendo los virus de la gripe o el HIV, ha requerido un conocimiento detallado de los correspondientes mecanismos de entrada. Este conocimiento ha demostrado que muchas de las proteínas virales que intervienen en la fusión e internalización de distintos virus poseen lazos con residuos hidrófobos (*fusion loops*, FL). En el caso del virus Ébola Zaire se ha determinado la estructura de estos lazos (4) (Figura 2) y cuáles son los residuos de aminoácidos que son críticos (5).

Estudios *in vitro* también han demostrado que un receptor de la glicoproteína vírica es la proteína Niemann-Pick C1 (NPC1), conocida por su importante papel en el transporte de colesterol (6). En estos estudios se utilizaron como inhibidores de NPC1 derivados de adamantano, por ejemplo el compuesto **1**,

observándose que cuanto menor es la capacidad para transportar el colesterol mayor es la capacidad para resistir la infección del virus del Ébola.

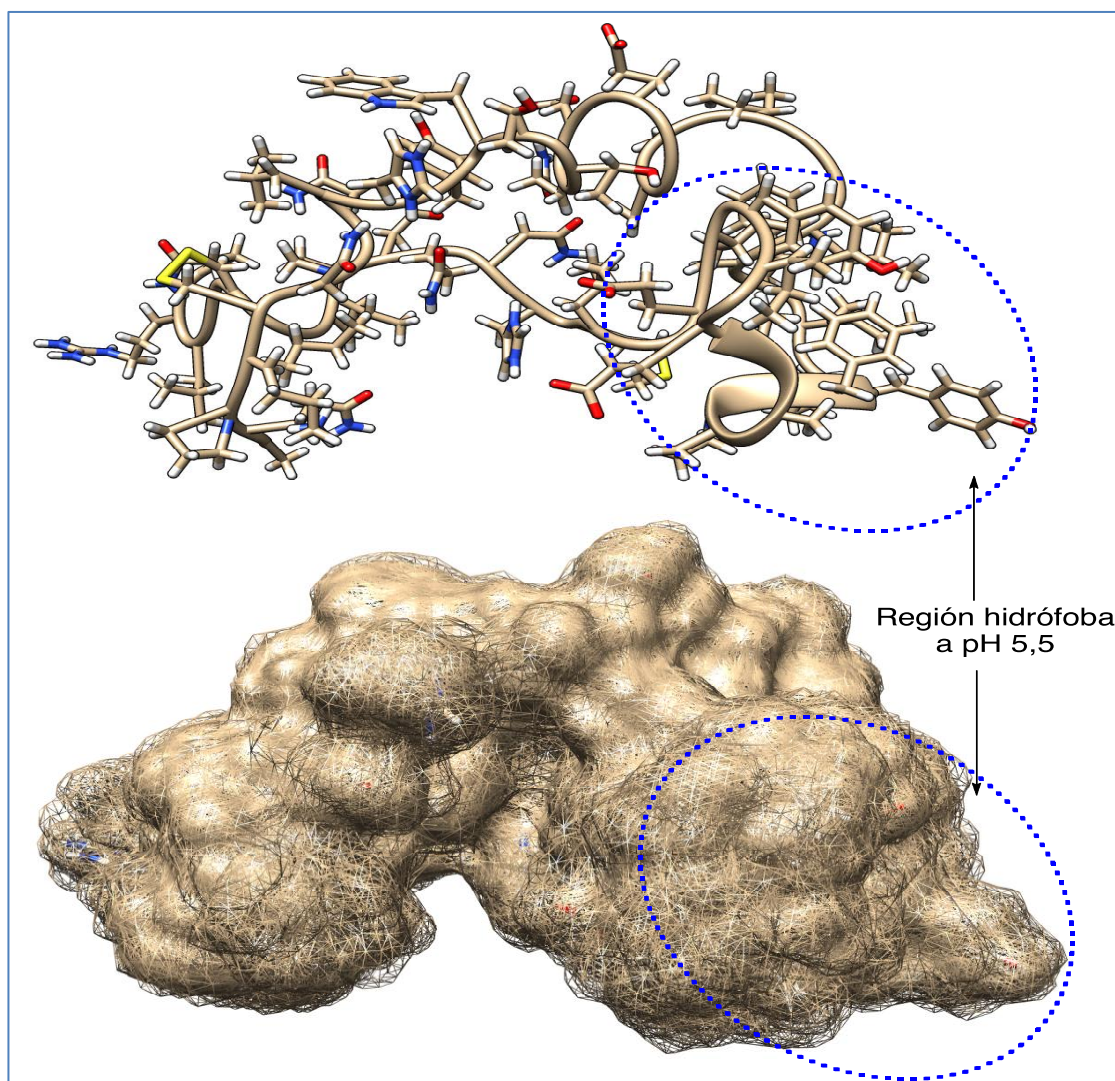
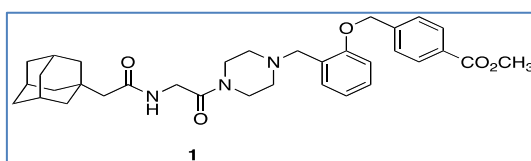


Figura 2.- Estructura de un lazo de fusión del virus Ébola, generada a partir de pdb 2LCY y representada con Chimera 1.81.

Sin embargo, este hallazgo no ha conducido por el momento a ninguna actuación terapéutica, ya que el uso de estos inhibidores induciría la enfermedad denominada Niemann-Pick de tipo C, una enfermedad rara de origen hereditario con una prevalencia de un caso por cada 150.000 habitantes que es consecuencia de mutaciones en las proteínas NPC1 y NPC2. Esta enfermedad afecta fundamentalmente a niños de edad escolar y conduce a un desenlace fatal por la acumulación de colesterol en los lisosomas de tejidos y órganos (7).



Tras la entrada en el citoplasma, el genoma vírico se replica y transcribe, se sintetizan las correspondientes proteínas y brotan nuevos viriones al exterior (Figura 3).

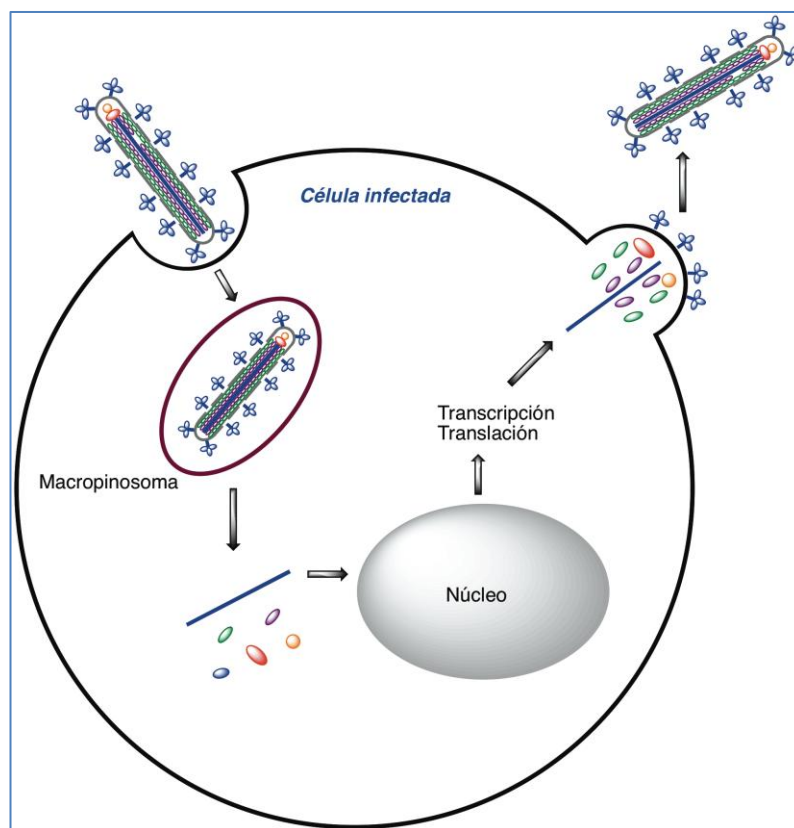


Figura 3.- Ciclo vital del virus Ébola.

### 3. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES. VACUNAS

El desarrollo de vacunas eficaces es la mejor manera de contener y atajar la epidemia e incluso podría ser más fácil que para otros virus ARN como el VIH (8). Hasta el momento se han desarrollado múltiples vacunas experimentales que han demostrado su eficacia utilizando primates como animales modelo, pero no hay todavía ninguna aprobada para uso humano (Figura 4).

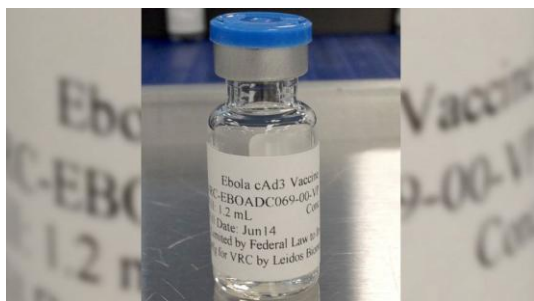


Figura 4.- Vacunas frente al virus Ébola Zaire

Dos de ellas, que empezaron a estudiarse hace más de 15 años, son actualmente las que más probabilidades tienen para ser utilizadas en fecha no muy lejana: la denominada cAd3-ZEBOV, que está siendo desarrollada por GlaxoSmithKline (GSK) en colaboración con el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos (NIAID) y la denominada rVSV-



ZEBOV, impulsada por la Agencia de Salud Pública de Canadá cuya licencia de comercialización pertenece a la empresa estadounidense NewLink Genetics. La cAd3 utiliza el adenovirus Ad3, un virus del resfriado común de chimpancés que contiene la glicoproteína de las cepas Zaire y Sudán de Ébola. Se están ensayando dos formas: la divalente basada en ambas cepas (ClinicalTrials.gov number, NCT02231866) y la monovolante basada en la cepa Zaire (NCT02240875). Por su parte, la vacuna rVSV contiene el virus de la estomatitis vesicular (VSV) que infecta al ganado atenuado o debilitado, uno de cuyos genes se ha reemplazado por el gen que codifica la glicoproteína de la cepa Zaire del Ébola. Ambas han demostrado una eficacia del 100% en primates, pero se desconoce si serán efectivas en humanos. Si los primeros resultados que se obtengan tras los ensayos clínicos de fase I ya iniciados son satisfactorios, se espera lanzar en marzo de 2015 un ensayo en fase II dirigido al personal médico y sanitario que trata a los enfermos en África con la vacuna cAd3 (9).

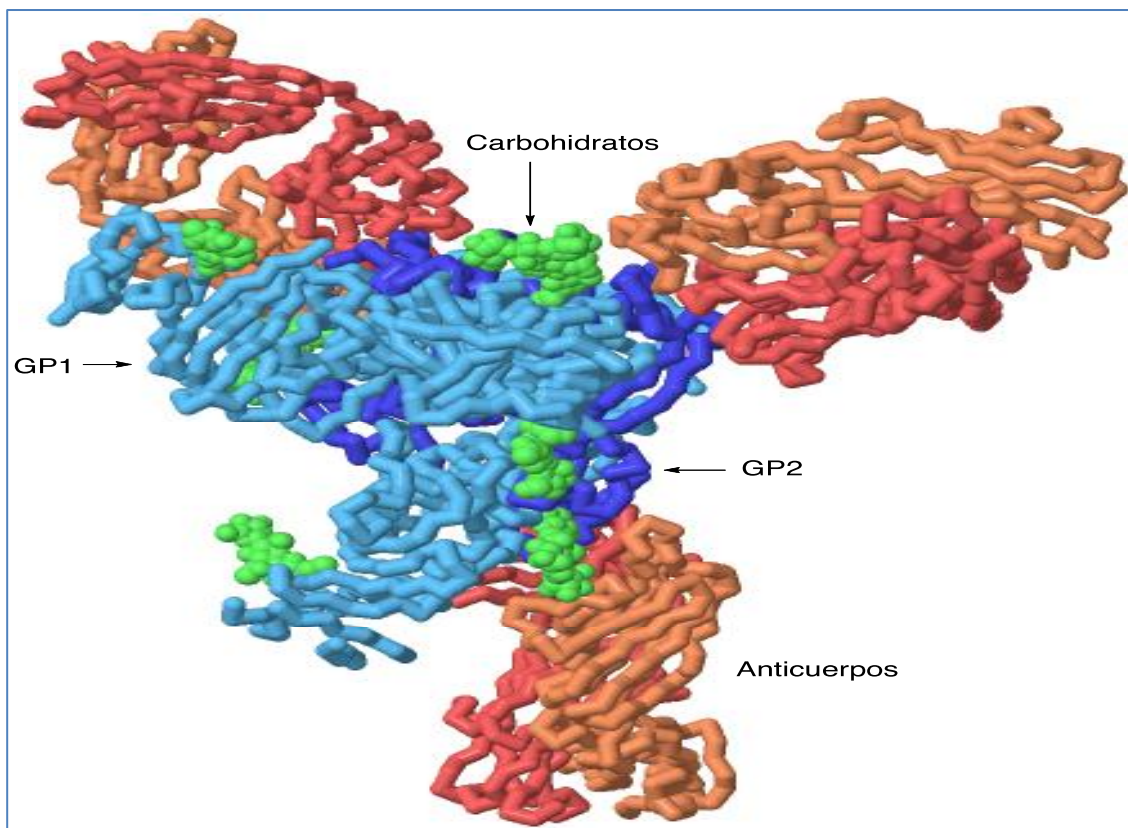
Tampoco se ha aprobado hasta el momento ningún fármaco, ya sea molécula pequeña o biológica. Aunque se han investigado varios, muy pocos han iniciado ensayos clínicos en humanos. Por ello, el tratamiento de los enfermos en África se ha limitado al uso de cuidados paliativos. Estos cuidados, junto a los métodos empleados para prevenir la transmisión, todavía no han resuelto el actual brote. Comentaremos algunos de los tratamientos estudiados, centrándonos en los fundamentos en que se han basado.

#### **4. ANTICUERPOS MONOCLONALES**

El desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-Ébola está basado en el mismo principio que las vacunas: la administración de anticuerpos que estimulen el sistema inmune del paciente para que responda de forma más rápida y eficaz al virus. Entre ellos se incluyen los mAbs quiméricos humanizados de ratón c13C6, h-13F6, y c6D8, cuya mezcla se denomina MB-300. Tras la administración de MB-300 a macacos una hora después de la infección por virus Ébola, estos animales mostraron una viremia baja o nula (10). Por otra parte, tres mAbs murinos: m1H3, m2G4 y m4G7, componentes de otro cóctel denominado ZMAb, se humanizaron para originar el cóctel de mAbs c1H3, c2G4 y c4G7 denominado cZMAb. Estos anticuerpos, producidos en la planta *Nicotiana benthamiana*, dieron lugar a la mezcla denominada ZMapp, que ataca a proteínas de la superficie del virus (Figura 5).

ZMapp se desarrolla por la empresa Mapp Biopharmaceuticals y parece ser la mezcla de anticuerpos más eficaz hasta el momento, ya que es capaz de rescatar al 100% de los macacos cuando el tratamiento se inicia 5 días después de la infección (11). Sin embargo, su proceso de producción es muy lento, ya que depende del crecimiento y aislamiento de una planta, por lo que se han obtenido y

utilizado hasta ahora cantidades tan pequeñas que no se sabe si las personas que han sobrevivido al tratamiento lo han hecho gracias a ZMapp o a sus propias defensas.



**Figura 5.- Estructura del complejo que forma la glicoproteína del virus Ébola con anticuerpos humanos, aislado de un superviviente de la enfermedad.** La estructura se ha generado a partir de pdb 3CSY y se ha representado con Jmol. Se observan dos cadenas en la glicoproteína, GP1 que participa en la unión a receptor y GP2 que se encarga de la fusión a la célula infectada. La estructura incluye algunas moléculas de carbohidratos, que en condiciones fisiológicas recubren completamente la proteína.

## **5. PROTEÍNA C ACTIVADA, PROTEÍNA C2 RECOMBINANTE DE NEMATODOS, E INTERFERONES**

Además de las vacunas y de los cócteles de mAbs, diversas aproximaciones estudiadas en primates en la última década han demostrado ser de interés como posibles tratamientos del Ébola, aunque es su mayoría sólo producen efectos beneficiosos si se administran antes del segundo día post-infección. Estas aproximaciones incluyen la administración de la proteína C activada recombinante humana (rhAPC) o de la proteína c2 recombinante de nematodos (rNAPc2), y la administración de interferones.

La proteína C activada recombinante humana (rhAPC, Xigris®), fabricada

por la empresa Eli Lilly, estaba autorizada cuando existía grave riesgo de muerte por sepsis severas (12). En estas circunstancias, hay una rápida disminución de los niveles de proteína C activada, al igual que ocurre en la fiebre hemorrágica causada por filovirus. Por esta razón, se suministró a macacos una infusión intravenosa de rhAPC a los 30-60 minutos del contagio y se continuó el tratamiento durante 7 días, demostrándose que la fiebre hemorrágica de origen vírico y las sepsis severas pueden beneficiarse de tratamientos comunes (13).

Por su parte, el estudio de la proteína c2 recombinante de nematodos (rNAPc2) pretendía averiguar si esta enzima, que es una proteasa de serina inhibidora del factor VII iniciador de la coagulación de la sangre, es capaz de evitar la coagulación intravascular diseminada que produce el virus. Su administración a macacos infectados tras 10 minutos o tras 24 horas de la infección prolongó el tiempo de supervivencia, lo que se interpretó como un punto de partida de los tratamientos dirigidos al contrarrestar los efectos de la enfermedad en vez de los dirigidos a inhibir la replicación vírica (14).

En cuanto al uso de interferones, hemos de recordar que los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  son citocinas que al interactuar con su receptor (*interferon- $\alpha/\beta$  receptor*, IFNAR) activan la vía de señalización JAK/STAT y producen una respuesta inmunológica especialmente dirigida contra los virus (Figura 6) (15).

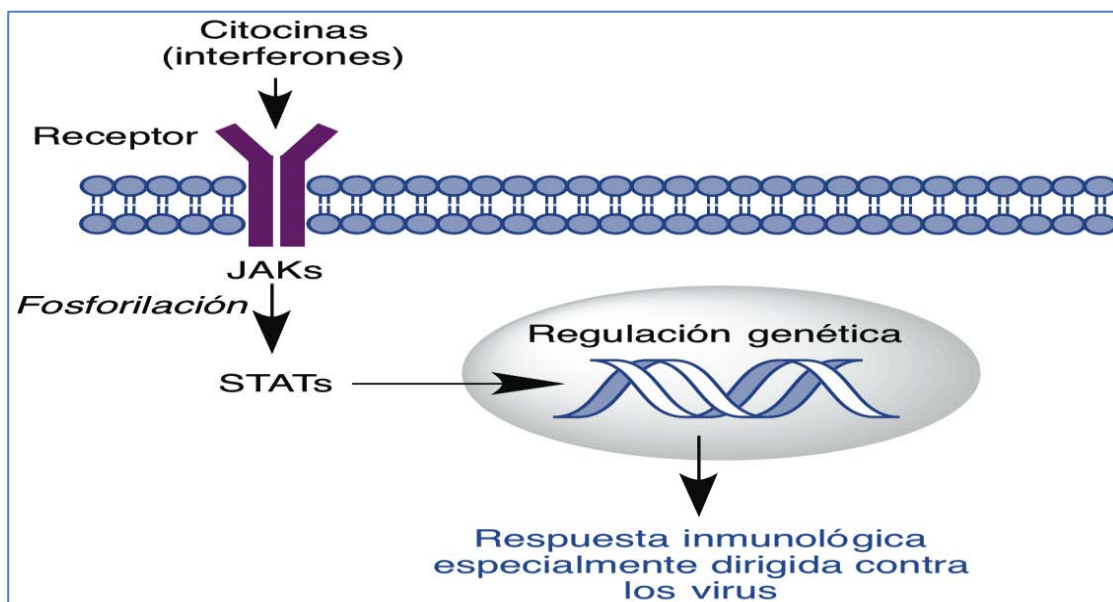


Figura 6.- Respuesta inmune inducida por la unión de los interferones  $\alpha/\beta$  a su receptor transmitida por la vía de señalización JAK/STAT.

En la fiebre hemorrágica producida por filovirus se observan concentraciones de interferón  $\beta$  en plasma que son 60-100 veces superiores a las que existen en otras infecciones víricas, junto a una baja producción del mismo.



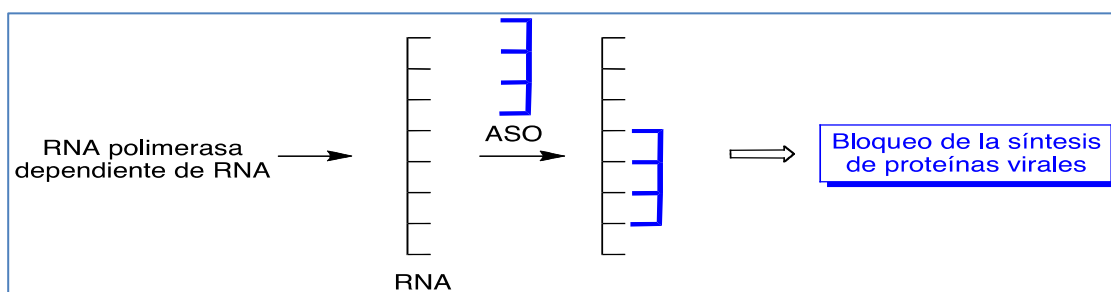
Estos datos sugieren que la terapia con interferón podría utilizarse en el tratamiento de las infecciones causadas por estos virus y, en efecto, la administración de interferón  $\beta$  a macacos recientemente infectados prolongó su supervivencia (16). Por otra parte, la combinación de Zmab con interferón  $\alpha$  (Ad-IFN) utilizando adenovirus como vectores del mismo, ha demostrado ser eficaz en primates si el tratamiento se inicia pasados 3 días desde la infección. Este aumento en la ventana terapéutica permitiría su uso en el momento en que la viremia y sus síntomas son detectables (17).

## 6. RNAS DE INTERFERENCIA Y OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

Hay otros enfoques terapéuticos que están basados en la administración de RNAs de interferencia (siRNA) y oligonucleótidos antisentido (ASOs) de tipo PMOplus (*positively-charged phosphorodiamidate morpholino oligomers*).

El uso de RNAs de interferencia (siRNA) contra la RNA polimerasa (L) viral se ensayó primero en cobayas, a los que se administró una formulación estable de aquéllos inmediatamente después de la infección. Los resultados favorables indujeron a un posterior estudio en primates utilizando una combinación de siRNAs formulados de la misma manera que tenían como diana a las proteínas víricas polimerasa (L), VP24 y VP35. Un grupo de macacos, a los que se administró esta mezcla a los 30 minutos de la infección y en los 6 días siguientes, experimentó una protección del 66%. Estos datos se interpretaron como una demostración del potencial de los RNA de interferencia (18).

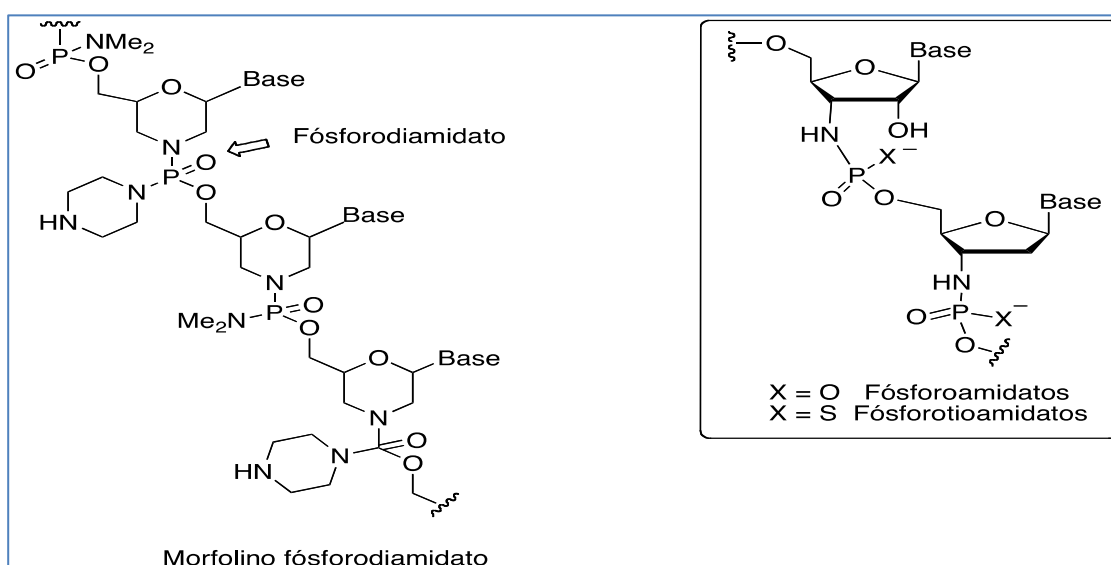
Por su parte, los oligonucleótidos antisentido tienen aquí como diana determinadas secuencias de RNA, copia del RNA viral, que son capaces de traducirse en proteínas. Por consiguiente, la inhibición de esta secuencias produce el bloqueo de este proceso (Figura 7).



**Figura 7. Bloqueo de la síntesis de proteínas virales producido por la acción de los nucleótidos antisentido (ASOs).**

Dentro de esta aproximación hay que mencionar dos combinaciones de oligómeros de morfolino fósforodiamidato para al tratamiento de los virus Ébola y Marburg, respectivamente. Tras un estudio previo en primates, estas

combinaciones han sido objeto de ensayos clínicos de fase I. AVI-6002 está dirigida a evitar la expresión de las proteínas de la matriz VP24 y VP35, mientras que AVI-6003 está dirigida a evitar la expresión de las proteínas VP24 y NP) (19). En ambos casos se ha utilizado la metodología química denominada PMOplus,<sup>®</sup> desarrollada por la firma Sarepta Therapeutics. Los componentes de AVI-6002 son AVI-7537 y AVI-7539, cada uno de los cuales es un oligómero de morfolino fósfordiamidato en el que ciertos agrupamientos de tipo dimetilamina se han sustituido por anillos de piperazina (ver la Figura 8). Recordemos que los oligonucleótidos con potencial terapéutico, además de tener una afinidad selectiva con la secuencia de RNA a la que se dirigen, tienen que evitar su degradación por las enzimas denominadas nucleasas. AVI-7537 y AVI-7539, debido a la presencia de residuos de piperazina, contienen cargas positivas que favorecen su interacción con el RNA vírico, que está negativamente cargado.

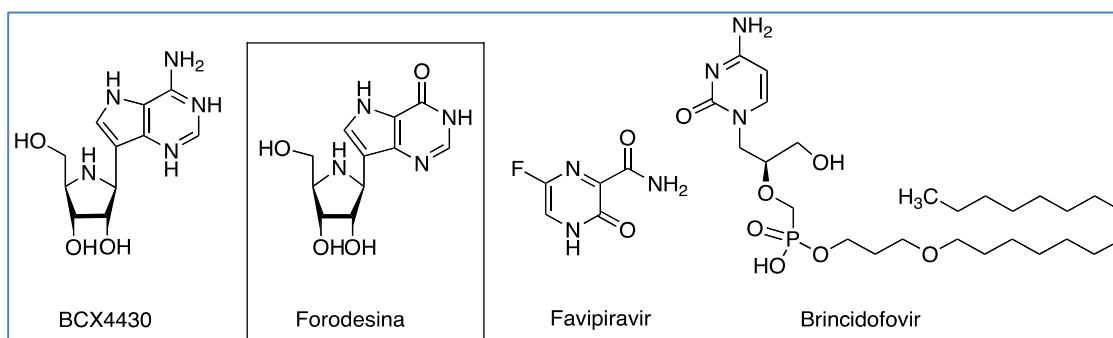


**Figura 8.- Estructura general de algunos oligonucleótidos. Morfolino fósfordiamidatos componentes de AVI-7537 y AVI-7539.**

## **7. ANTIMETABOLITOS INHIBIDORES DE RNA POLIMERASA RNA-DEPENDIENTE**

El uso de antimetabolitos que inhiban la RNA polimerasa RNA-dependiente, o causen mutagénesis letales cuando se incorporen al RNA viral, es otro enfoque terapéutico de interés aunque, dada la facilidad de estos virus para sufrir mutaciones, estos fármacos podrían desarrollar resistencias y quizás requerirían su uso en combinación. Se conocen varios profármacos de estos antimetabolitos, como BCX4430, favipiravir y brincidofovir, que inhiben la polimerase de RNA dependiente de RNA de filovirus (Figura 9). El compuesto BCX4430 es un azanucleósido análogo de forodesina, un fármaco huérfano indicado para el tratamiento de varios tipos de leucemia, que se desarrolló primero como posible

tratamiento de la hepatitis C y luego en infecciones por filovirus con la colaboración del NIAID. En estos estudios, BCX4430 demostró su actividad *in vitro* como terminador de cadena. Ensayos con roedores y macacos han demostrado que protege frente a virus Ébola y Marburg cuando se administra antes del tercer día tras la infección (20).



**Figura 9.- Algunos profármacos de antimetabolitos que inhiben la polimerase de RNA dependiente de RNA de filovirus.**

Favipiravir, también conocido como T-705, se descubrió en los laboratorios de investigación de la empresa Toyama Chemical Co., Ltd. Basándose en su actividad para inhibir la replicación del virus influenza en ratones, demostrada en estudios realizados en colaboración con el Profesor Kimiyasu Shiraki de la Universidad de Toyama, se seleccionó para ser estudiado clínicamente. También fue activo frente a diferentes tipos de virus ARN, entre otros el virus de la fiebre amarilla y el virus del Nilo Occidental. Su interés aumentó debido a que su novedoso mecanismo de acción (21) le permitió proteger a ratones de una infección letal de virus H5N1 altamente patógenos resistentes al inhibidor de neuraminidasa oseltamivir (22). Fabricado por el grupo Fuji Film, favipiravir se utiliza en Japón como antigripal con el nombre comercial Avigan,<sup>®</sup> y se encuentra en ensayos clínicos avanzados para ser aprobado para esta indicación en EEUU (23). Las enzimas de la célula huésped lo bioactivan transformándolo en el ribofuranosil-5' -trifosfato correspondiente (T-705-RTP), que actúa probablemente como un falso nucleótido incorporándose al RNA viral e inhibiendo su RNA polimerasa dependiente de RNA (Figura 10). Se ha comprobado que antes de transformarse en el trifosfato, la enzima humana hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) lo convierte en su ribosa-5' -monofosfato (T-705-RMP) (24).

Recientemente se ha empleado favipiravir experimentalmente para tratar la infección por el virus Ébola en humanos, basándose en estudios previos en los que mostró esta actividad *in vitro* e *in vivo* (25) (en los estudios *in vivo* se utilizaron ratones carentes del receptor de interferón tipo I, IFNAR<sup>-/-</sup>). Aunque se sabe que

favipiravir no produce toxicidad aparente en las células de mamífero, ni inhibe en ellas la síntesis de DNA o RNA, se desconoce su seguridad y eficacia en las dosis empleadas contra el virus Ébola. Según fuentes médicas, en España se ha utilizado favipiravir en el tratamiento de Teresa Romero a dosis mucho mayores que las que se emplean para su uso como antigripal.

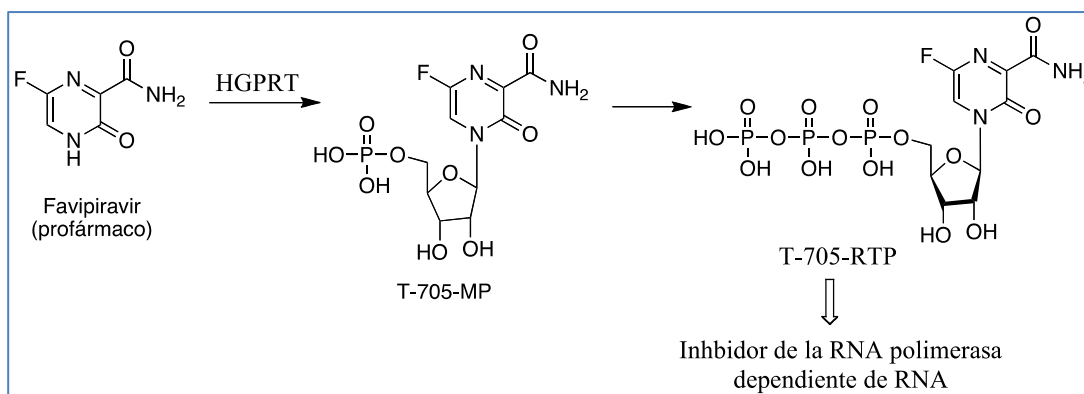
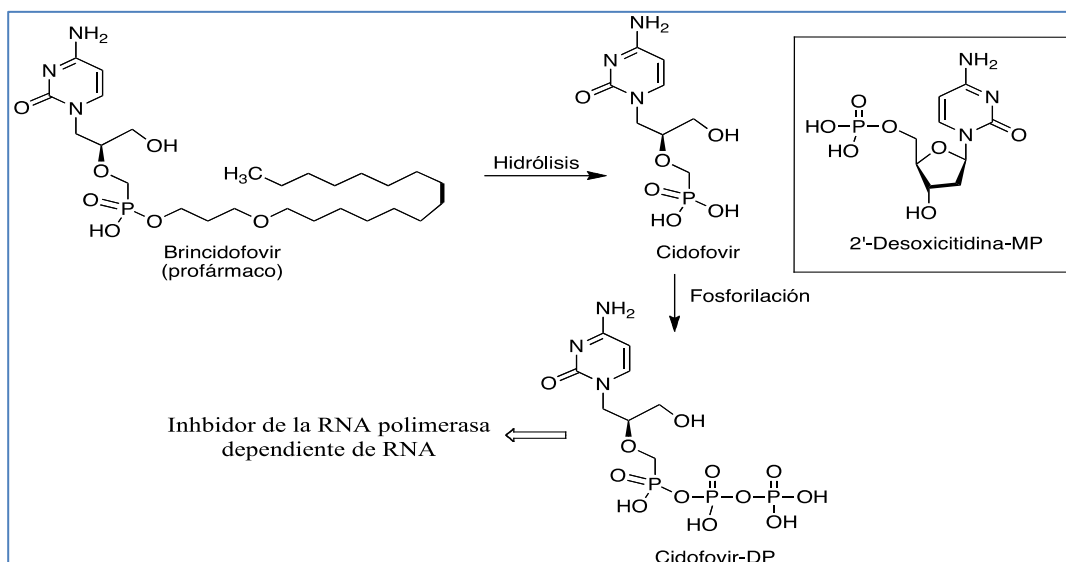


Figura 10.- Bioactivación de favipiravir y mecanismo de acción.

El liberiano diagnosticado en Dallas (Tejas) como enfermo de Ébola, se trató con brincidofovir (CMX001), un conjugado de cidofovir que se convierte intracelularmente en el antiviral activo cidofovir difosfato (cidofovir-DP). Gracias a su cadena lipídica, brincidofovir es un profármaco que puede administrarse por vía oral, siendo más potente que cidofovir porque se encuentra a mayores concentraciones intracelulares y carece de la toxicidad renal de cidofovir. Este es un análogo de 2'desoxicitidina monofosfato originalmente desarrollado para el tratamiento de infecciones por virus DNA, que cuando penetra en el interior celular se difosforila a cidofovir-DP y este, debido a su semejanza con citidina-TP, actúa como falso sustrato de polimerasas DNA inhibiendo finalmente la replicación (Figura 11) (26).

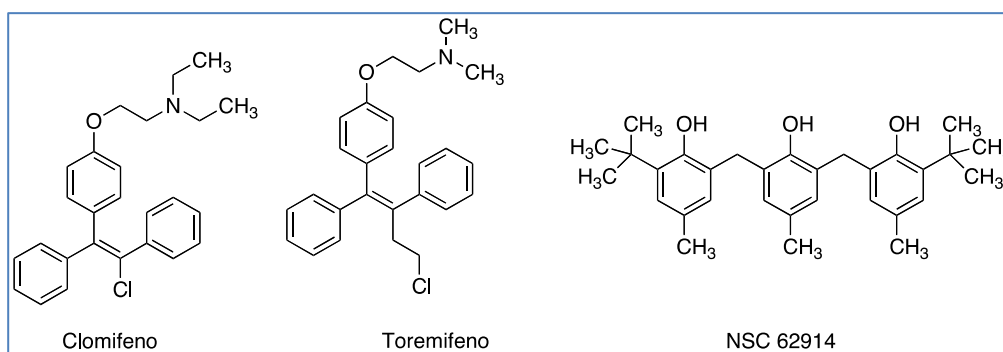


**Figura 11.- Mecanismo de acción de brincidofovir.**

Brincidofovir inhibe poxvirus, herpesvirus, y adenovirus, habiéndose estudiado en ensayos clínicos de fases II y III. Por su actividad frente a los poxvirus, se almacena en EEUU como defensa frente a un posible ataque bioterrorista con virus de la viruela. Cuando surgió la epidemia de Ébola en 2014, la firma Chimerix que lo fabrica lo puso (junto con otros de sus compuestos) a disposición de las autoridades sanitarias para averiguar si podía eliminar este virus, aunque no fuera un virus DNA. Inesperadamente, brincidofovir fue un potente inhibidor de Ébola *in vitro*, por lo que la FDA autorizó su uso con el paciente de Dallas que finalmente falleció.

## 8. ANTIVIRALES ENCONTRADOS POR CRIBADO AL AZAR

El cribado de moléculas pequeñas para observar en ellas una posible actividad antiviral ha permitido identificar varios inhibidores de filovirus. Por ejemplo, en un cribado *in vitro* de distintos fármacos conocidos, se encontró esta actividad en los moduladores del receptor estrogénico clomifeno y toremifeno (Figura 12).



**Figura 12.- Inhibidores de filovirus hallados por métodos de cribado al azar.**

Utilizando ratones modificados convenientemente modificados para poder ser utilizados como modelos de infección, estos fármacos fueron también activos *in vivo*, demostrándose que esta acción es independiente de los receptores de estrógenos y se debe a que interfieren el proceso de entrada del virus al interior celular anteriormente mencionado (27). El compuesto NSC 62914, que posee actividad *in vitro* e *in vivo* frente a los virus Ébola y Marburg entre otros, se encontró en el cribado de otras estructuras. Este compuesto es un antioxidante que atrapa especies reactivas de oxígeno, modulando así el estrés oxidativo. Sin embargo, dado que cuando se estudiaron otros compuestos antioxidantes no se observó ningún efecto antiviral, se cree que su acción antiviral debe implicar la modulación de múltiples dianas o vías de señalización (28).

## **9. PROYECTOS FUTUROS**

“Médicos Sin Fronteras” ha anunciado que pretende realizar a partir de febrero de 2015 tres proyectos de investigación en sus centros africanos. Uno en Conakry, Guinea, liderado por el Antwerp Institute of Tropical Medicine (ITM) estudiará la administración de sangre y plasma de pacientes de Ébola que han sobrevivido y que, por tanto, contienen anticuerpos específicos. Otro estudiará, en un lugar todavía sin determinar, la administración dos veces por semana durante dos semanas de formulaciones orales de brincidofovir a 140 pacientes, y estará financiado por el Wellcome Trust y liderado por la Universidad de Oxford. El tercero, liderado por el French National Institute of Health and Medical Research (Inserm), se llevará a cabo en Guekedou, Guinea, y estudiará el uso de favipiravir. En cuanto a las vacunas, aunque normalmente se requeriría más tiempo para su aprobación, se pretende que a principios del año 2015 lleguen a África y se utilicen unas 20.000 dosis de las vacuna producidas por GlaxoSmithKline (GSK) y la Agencia de Salud Pública de Canadá.

## **10. CONCLUSIONES**

Aunque no hay todavía disponible para su uso humano ninguna vacuna o tratamiento para la fiebre hemorrágica causada por el virus Ébola, los conocimientos básicos y los hallazgos experimentales que ya existen permiten ser optimistas acerca de una aplicación clínica no muy lejana. Sin embargo, parece claro que no será posible este cambio de situación sin una importante aportación de fondos públicos a la financiación de este proceso.

## **10. CONCLUSIONS**

Although neither a vaccine nor an effective antiviral treatment is currently available for use in humans, the fundamental knowledge and experimental findings already achieved, generate cautious optimism about the translation of these findings into clinical practice for prevention and treatment of Ebola hemorrhagic fever. However, it seems quite obvious that an effective progress will require public financial support.

## **11. AGRADECIMIENTOS**

La autora desea expresar su agradecimiento al Dr. J. C. Menéndez por la elaboración de algunas de las figuras.

## **12. REFERENCIAS**

1. Gatherer, D. The 2014 Ebola virus disease outbreak in West Africa. *J. Gen. Virol.* **95**, 1619-1624 (2014).
2. Feldmann, H.; Geisbert, T. W. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*, **377**, 849-862 (2011).
3. Ver, por ejemplo: (a) Bray, M.; Davis, K.; Geisbert, T.; Schmaljohn, C.; Huggins, J. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* **179**, S248-58,(1999) (b) Bausch, D. G.; Sprecher, A. G.; Jeffs, B.; Boumandouki, P. Treatment of Marburg and Ebola hemorrhagic fevers: a strategy for testing new drugs and vaccines under outbreak conditions. *Antiviral Res.* **78**, 150-161 (2008).
4. Gregory, S. M.; Harada, E.; Liang, B.; Delos, S. E.; White, J. M.; Tamm, L. K. Structure and function of the complete internal fusion loop from Ebolavirus glycoprotein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**, 11211-11216 (2011).
5. Gregory, S. M.; Larsson, P.; Nelson, E. A.; Kasson, P. M.; White, J. M.; Tamm, L. K. Ebolavirus entry requires a compact hydrophobic fist at the tip of the fusion loop. *J. Virol.* **88**, 6636-6649 (2014).
6. (a) Carette, J. E.; Raaben, M.; Wong, A. C.; Herbert, A. S.; Obernosterer, G.; Mulherkar, N.; Kuehne, A. I.; Kranzusch, P. J.; Griffin, A. M.; Ruthel, G.; Dal Cin, P.; Dye, J. M.; Whelan, S. P.; Chandran, K.; Brummelkamp, T. R. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* **477**, 340-343 (2011). (b) Côté, M.; Misasi, J.; Ren, T.; Bruchez, A.; Lee, K.; Filone, C. M.; Hensley, L.; Li, Q.; Ory, D.; Chandran, K.; Cunningham, J. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*, **477**, 344-348 (2011). (c) White, J. M.; Schornberg, K. L. A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 317-322 (2012).
7. Chang, T.-Y.; Reid, P. C.; Sugii, S.; Ohgami, N.; Cruz, J. C.; Chang, C. C. Y. Niemann-Pick Type C Disease and Intracellular Cholesterol Trafficking. *J. Biol. Chem.* **280**, 20917-20920 (2005).
8. Dhillon, R. S.; Srikrishna, D.; Sachs, J. Controlling Ebola: next steps *Lancet* **384**, 1409-1411 (2014).
9. Kanapathipillai, R.; Restrepo, A. N. H.; Fast, P.; Wood, D.; Dye, Ch.; Kieny, M.-P.; Moorthy, V. Ebola Vaccine-An Urgent International Priority. *N. Eng. J. Med.* DOI: 10.1056/NEJMp1412166 (2014).
10. Olinger, G. G.; Pettitt, J.; Kim, D.; Working, C.; Bohorov, O.; Bratcher, B.; Hiatt, E.; Hume, S. D.; Jhonson, A. K.; Morton, J.; Pauly, M.; Whaley, K. J.; Lear, C. M.; Biggins, J. E.; Scully, C.; Hensley, L.; Zeitlin, L. Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **109**, 18030-18035 (2012).
11. Qiu, X.; Wong, G.; Audet, J.; Bello, A.; Fernando, L.; Alimonti, J. B.; Fausther-Bovendo, H.; Wei, H.; Aviles, J.; Hiatt, E.; Jhonson, A.; Morton, J.; Swope, K.; Bohorov, O.; Bohorova, N.; Goodman, C.; Kim, D.; Pauly, M. H.; Velasco, J.; Pettitt, J.; Olinger, G. G.; Whaley, K.; Xu, B.; Strong, J. E.; Zeitlin, L.; Kobinger, G. P. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature* **514**, 47-53 (2014).
12. La empresa retiró este producto del mercado en octubre de 2011.



13. Hensley, L. E.; Stevens, E. L.; Yan, S. B.; Geisbert, J. B.; Macias, W. L.; Larsen, T.; Daddario-DiCaprio, K. M.; Cassell, G. H.; Jahrling, P. B.; Geisbert, T. W. Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* **196**, S390-S399 (2007).
14. Geisbert, T. W.; Hensley, L. E.; Jahrling, P. B.; Larsen, T.; Geisbert, J. B.; Paragas, J.; Young, H. A.; Fredeking, T. M.; Rote, W. E.; Vlasuk, G. P. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet* **362**, 1953-1958 (2003).
15. Uzé, G.; Schreiber, G.; Piehler, J.; Pellegrini, S. The receptor of the type I interferon family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **316**, 71-95 (2007).
16. Smith, L. M.; Hensley, L. E.; Geisbert, T. W.; Johnson, J.; Stossel, A.; Honko, A.; Yen, J. Y.; Geisbert, J.; Paragas, J.; Fritz, E.; Olinger, G.; Young, H. A.; Rubins, K. H.; Karp, C. L. Interferon-beta therapy prolongs survival in rhesus macaque models of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* **208**, 310-318 (2013).
17. Qiu, X.; Wong, G.; Fernando, L.; Audet, J.; Bello, A.; Strong, J.; Alimonti, J. B.; Kobinger, J. P. MAbs and Ad-vectored IFN-alpha therapy rescue Ebola-infected nonhuman primates when administered after the detection of viremia and symptoms, *Sci. Transl. Med.* **5**, 207 ra143 (2013).
18. Geisbert, T. W.; Lee, A. C.; Robbins, M.; Geisbert, J. B.; Honko, A. N.; Sood, V.; Johnson, J. C.; de Jong, S.; Tavakoli, I.; Judge, A.; Hensley, L. E.; Maclachlan, I. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet*, **375**, 1896-1905 (2010).
19. Heald, A. E.; Iversen, P. L.; Saoud, J. B.; Sazani, P.; Charleston, J. S.; Axtelle, T.; Wong, M.; Smith, W. B.; Vutikullird, A.; Kaye, E. Safety and Pharmacokinetic Profiles of Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers with Activity against Ebola Virus and Marburg Virus: Results of Two Single-Ascending-Dose Studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 6639-6647 (2014).
20. (a) Stock, I. Marburg and Ebola hemorrhagic fevers-pathogens, epidemiology and therapy. *Med. Monatsschr. Pharm.* **37**, 324-330 (2014). (b) Warren, T. K.; Wells, J.; Panchal, R. G.; Stuthman, K. S.; Garza, N. L.; Van Tongeren, S. A.; Dong, L.; Retterer, C. J.; Eaton, B. P.; Pegoraro, G.; Honnold, S.; Bantia, S.; Kotian, P.; Chen, X.; Taubenheim, B. R.; Welch, L. S.; Minning, D. M.; Babu, Y. S.; Sheridan, W. P.; Bavari, S. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature* **508**, 402-405, (2014).
21. Baranovich, T.; S.-S.; Armstrong, J.; Marjuki, H.; R. J.; Webster, R. G.; Govorkova, E. A. T-705 (Favipiravir) Induces Lethal Mutagenesis in Influenza A H1N1 Viruses in Vitro. *J. Virol.* **87**, 3741-3751 (2013).
22. Kiso, M.; Takahashi, K.; Sakai-Tagawa, Y.; Shinya, K.; Sakabe, S.; Le, Q. M.; Ozawa, M.; Furuta, Y.; Kawaoka, Y. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **107**, 882-887 (2010).
23. (a) Furuta, Y.; Takahashi, K.; Fukuda, Y.; Kuno, M.; Kamiyama, T.; Kozaki, K.; Nomura, N.; Egawa, H.; Minami, S.; Watanabe, Y.; Narita, H.; Shiraki, K. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 977-981 (2002). (b) Para una revisión ver: Furuta, Y.; Gowen, B. B.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* **100**, 446-454 (2013).
24. Naesens, L.; Guddat, L. W.; Keough, D. T.; van Kuilenburg, A. B.; Meijer, J.; Vande Voorde, J.; Balzarini, J. Role of human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in activation of the antiviral agent T-705 (favipiravir). *Mol. Pharmacol.* **84**, 615-629 (2013).
25. (a) Smither, S. J.; Eastaugh, L. S.; Steward, J. A.; Nelson, M.; Lenk, R. P.; Lever, M. S. Post-exposure efficacy of oral T-705 (favipiravir) against inhalational Ebola virus infection in a mouse model. *Antiviral Res.* **104**, 153-155 (2014). (b) Oestereich, L.; Lüdtke, A.; Wurr, S.; Rieger, T.; Muñoz-Fontela, C.; Günther, S. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res.* **105**, 17-21 (2014).
26. Florescu, D. F.; Keck, M. A. Development of CMX001 (Brincidofovir) for the treatment of serious diseases or conditions caused by dsDNA viruses. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **12**, 1171-1178 (2014).
27. Johansen, L. M.; Brannan, J. M.; Delos, S. E.; Shoemaker, C. J.; Stossel, A.; Lear, ; Hoffstrom, B. G.; Dewald, L. E.; Schornberg, K. L.; Scully, C.; Lehar, J.; Hensley, L. E.; White, J. M.; Olinger,



- G. G. FDA-approved selective estrogen receptor modulators inhibit Ebola virus infection. *Sci. Transl. Med.* **5**, 190ra79 (2013).
28. Panchal, R. G.; Reid, S. P.; Tran, J. P.; Bergeron, A. A.; Wells, J.; Kota, K. P.; Aman, J.; Bavari, S. Identification of an antioxidant small-molecule with broad-spectrum antiviral activity. *Antiviral Res.* **93**, 23-29 (2012).



## Protein tyrosine phosphatase deficiency protects against the induction of the early apoptosis by paracetamol in hepatocytes

Maysa Ahmed Mobasher\*, Ángela María Valverde

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), 28029 Madrid, Spain.

\*e-mail: maysaonline@yahoo.com

*An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 4 (2014), pag.666-682*

*Premio "Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos" en el Concurso Científico 2013 de la Real Academia Nacional de Farmacia.*

### ABSTRACT

*Acetaminophen* (paracetamol, APAP) is a widely used analgesic and antipyretic drug safe at therapeutic doses but its overdose causes liver injury. Our goal was to explore whether protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), a negative modulator of survival signaling pathways, plays a role in APAP-induced cell death in hepatocytes. Hepatotoxicity was evaluated in immortalized hepatocytes generated from wild-type (PTP1B<sup>+/+</sup>) and PTP1B-deficient (PTP1B<sup>-/-</sup>) mice. Apoptosis occurred as an early event only in APAP-treated PTP1B<sup>+/+</sup> hepatocytes. PTP1B deficiency conferred protection against cell cycle arrest and loss of cellular viability. These data suggest that PTP1B as a target against APAP-induced liver failure.

**Keywords:** Paracetamol; PTP1B; apoptosis.

### RESUMEN

*La inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B protege frente a la apoptosis temprana inducida por paracetamol en hepatocitos*

El paracetamol es un analgésico/antipirético hepatotóxico a dosis altas. Investigamos el papel de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), un modulador negativo de señalización de supervivencia celular, en la muerte celular temprana (apoptosis) inducida por paracetamol en hepatocitos. En hepatocitos controles se inducía apoptosis en respuesta al paracetamol. Este efecto se encontraba disminuido en hepatocitos deficientes en PTP1B. La falta de PTP1B protegía a los hepatocitos de la parada del ciclo celular y la pérdida de la viabilidad celular tras el tratamiento con paracetamol. Proponemos a la PTP1B como diana terapéutica frente al fallo hepático inducido por sobredosis de paracetamol.

**Palabras clave:** Paracetamol, PTP1B, apoptosis.

## **1. INTRODUCTION**

*Acetaminophen* (APAP) or Paracetamol is a widely used analgesic and antipyretic drug safe at therapeutic doses (1). However, an accidental or intentional overdose can induce severe hepatotoxicity in both experimental animals and humans (2). The first reports of APAP hepatotoxicity in humans appeared in the literature in the 1960s. In fact, APAP overdose is the most frequent cause of drug-induced liver failure in the United States and in Great Britain at present (3). Therefore, APAP-induced acute toxicity has become an essential model for studying drug-induced liver and kidney failure. In the liver, APAP overdose produces a centrilobular hepatic necrosis that can be fatal and is increasingly recognized as a significant public health problem (4-6). Moreover, APAP overdose is also the second leading cause of liver transplantation, which accounts for considerable levels of morbidity and mortality (7).

APAP is commonly used for the relief of minor pains like headaches and in combination with opioid analgesics is also used in the management of more severe pains in advanced cancer and in post-operative periods. While APAP has analgesic and antipyretic properties comparable to those of aspirin, its anti-inflammatory effects are weak. The mechanisms underlying APAP-induced liver injury have been studied for several decades and excellent recent reviews have revealed the main cellular and molecular pathways involved in its toxic response (8-12). However, despite of substantial progress in our understanding of APAP-induced hepatotoxicity, additional mechanisms responsible of the cellular damage induced by this drug remain still unknown.

The initial step in APAP-mediated toxicity is initiated by cytochrome P-450 (CYP) by a direct two electron oxidation of APAP, a previously unrecognized mechanism of CYP P450-mediated reactions, that convert APAP to the reactive metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) causing glutathione (GSH) depletion and covalent binding to hepatic parenchymal cell proteins and DNA (13). The CYP isoforms important in APAP metabolism are CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4 and CYP2D6 (14-15). Moreover, generation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species, lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, disruption of calcium homeostasis and induction of apoptosis and necrosis are also involved in APAP-induced hepatotoxicity (16).

At therapeutic doses, NAPQI is efficiently detoxified by GSH and eliminated in the urine or bile as APAP-cysteine, APAP-N-acetylcysteine (APAP-NAC), and APAP-glutathione (APAP-GSH). After an overdose of APAP, the glucuronidation and sulfation routes become saturated and more extensive bioactivation of the drug occurs leading to rapid depletion of the hepatic GSH pool. Subsequently, NAPQI binds to cysteine groups on cellular proteins forming APAP-protein adducts (17). Of note, NAPQI also binds to a number of mitochondrial proteins (9-10)

which, in turn, causes oxidative stress that may trigger signaling pathways through mitochondrial toxicity ultimately leading to lethal cell injury.

As stated above, the precise mechanisms by which APAP mediates hepatotoxicity in both humans and experimental animals still remain to be elucidated. Metabolic activation of APAP and NAPQI binding to target proteins and DNA seem to be necessary but are not sufficient for toxicity. Recent findings indicate that a combination of mitochondrial oxidative stress, increased calcium levels and other factors may trigger the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) pore opening resulting in the collapse of the transmembrane potential and then osmotic swelling. These events ultimately cause the rupture of the outer mitochondrial membrane and release of cytochrome c and other pro-apoptotic factors into the cytosol (18).

Regarding the signaling pathways mediated by various growth factors and hormones committed in the regulation of cellular metabolism, differentiation, growth and survival, protein tyrosine phosphorylation constitutes a key element. Given the importance of tyrosine kinase signaling in maintaining birth and death rates of cells, these pathways must be regulated carefully. Protein tyrosine phosphatases (PTPs) catalyze the dephosphorylation of tyrosine-phosphorylated proteins (19) and are known to be important negative regulators of growth factor signaling. Several PTPs have been described which may participate in modulating the balance between survival and cell death. Among them, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a widely expressed non-receptor PTP that is associated with the endoplasmic reticulum (ER) and other intracellular membranes via a hydrophobic interaction of its C-terminal targeting sequence (20). In particular, PTP1B dephosphorylates and inactivates receptors belonging to the tyrosine kinase superfamily such as the EGF receptor (EGFR) (21), the PDGFR (22), the insulin receptor (IR) (23) and the IGF-IR (24), all of them implicated in the survival of hepatocytes (25-26) and many other cellular models. Thus, PTPs represent novel molecular targets for the development of medicinal reagents that possess distinct modes of action.

During the last years, our laboratory has been interested in the study of key proteins that mediate survival pathways in hepatocytes. In this regard, the precise role of PTP1B in these processes has been investigated in a study published by Gonzalez-Rodriguez et al. (27) which was performed in immortalized neonatal hepatocyte cell lines from wild-type (PTP1B<sup>+/+</sup>) and PTP1B-deficient (PTP1B<sup>-/-</sup>) mice. These cell lines have been proven to be excellent tools for *in vitro* studies of cell death/survival because they express endogenous pro- and anti-apoptotic proteins at levels comparable to the liver and hepatocytes of neonatal mice. Using these cell lines it was demonstrated that the lack of PTP1B protects against apoptosis induced by trophic factors withdrawal, whereas increased expression of

this phosphatase sensitizes neonatal hepatocytes to death signals induced by this apoptotic stimulus (27). These differential effects resulted from the regulation of multiple events involving mitochondrial integrity, the Bcl-2 protein family, the caspases-8,-9 and -3 and the nuclear translocation of Foxo 1 which activates the death receptor pathway. Thus, these previous observations suggested that levels of PTP1B may exert a pivotal role in maintaining the balance between survival and death in hepatocytes.

On that basis, *the main goal* of the present study is to investigate if PTP1B deficiency is able to protect hepatocytes against the early events during APAP-induced hepatotoxicity.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***2.1. Materials.***

Fetal serum (FS) and culture reagents were obtained from Invitrogen. APAP was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich). Anti-phospho-JNK (#9251) (Thr183/Tyr185) and anti-active caspase 3 (#9661) antibodies were from Cell Signaling Technology. The antibodies against phospho-Akt (Ser 473) (sc-7985), phospho-IGF-IR (Tyr 1165/1166) (sc-101704) and total JNK (sc-571) were from Santa Cruz Biotechnology. The anti-IRS-1 (06-248), anti-IRS-2 (06-248) and anti-mouse PTP1B (07-088) antibodies were obtained from Upstate (Millipore). Anti-BclxL (610211) antibody was from BD Pharmingen. Anti- $\beta$ -actin (A-5441) antibody was from Sigma. Anti-Cyp2E1 antibody (aB19140) was from Abcam. Total Akt and total IGF-IR antibodies were gifts from M Birnbaum and MF White, respectively (Joslin Diabetes Center, USA). Anti GCLc and GCLm antibodies were a gift from T Kavanagh (University of Washington, USA).

### ***2.2. Human liver biopsies.***

Human liver samples were obtained from five patients intoxicated with APAP and three healthy subjects. These samples were kindly donated from Dr Kenneth J. Simpson in the division of Clinical and Surgical Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh EH164TJ, UK. Informed written consent was obtained from each patient.

### ***2.3. Animal models.***

Three months-old male PTP1B<sup>+/+</sup> (wild-type) and PTP1B<sup>-/-</sup> mice maintained on the C57Bl/6J x 129Sv/J genetic background (28) were used throughout the study. Animal experimentation was conducted accordingly to the accepted guidelines for animal care of the Comunidad de Madrid (Spain). Overnight fasted mice were intraperitoneally (i.p.) injected with 500 mg/kg APAP dissolved in physiological saline. Mice were sacrificed at 6 h and livers were collected.

#### ***2.4. Liver histology.***

Histological grading of hepatic necrosis was performed by two blinded observers using hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections as follows: 30% of the total area necrotic (1 point); 30–60% of the total area necrotic (2 points); 60% of the total area necrotic (3 points).

#### ***2.5. Generation of immortalized hepatocyte cell lines.***

The detailed protocol for the generation of immortalized neonatal hepatocytes from wild-type and PTP1B<sup>-/-</sup> mice is described in (27). For re-expression of PTP1B in deficient cells, PTP1B<sup>-/-</sup> neonatal hepatocytes were reconstituted with retroviral Myc-tagged PTP1B (kindly provided by M. L. Tremblay, McGill Cancer Center, Quebec, Canada) and four pools of infected cells were selected with hygromycin B (200 µg/ml) for 2 weeks. As a control, PTP1B<sup>-/-</sup> were infected with an empty vector (pBabe hygro). The expression of PTP1B in the different cell lines was assessed by Western blot.

#### ***2.6. Isolation and culture of primary mouse hepatocytes.***

Mouse hepatocytes were isolated from male mice (8-12 weeks-old) by perfusion with collagenase and cultured as described (27).

#### ***2.7. PTP1B immunohistochemistry.***

PTP1B expression was analyzed by immunohistochemistry in human liver samples as previously described (29).

#### ***2.8. Determination of Reactive Oxygen Species (ROS).***

Cellular ROS were quantified by flow cytometry using the dichlorofluorescein (DCFH) probe. APAP-stimulated cells were detached by trypsinization and collected by centrifugation at 2.500 x g for 4 min. Then, cells were washed and resuspended in 500 microliters of PBS. DCFH (10 µM) and propidium iodide (0,002% w/v) were added 10 min before measurement. Fluorescence was measured with 488-nm laser excitation and 510-nm for emission.

#### ***2.9. Analysis of caspase-3 activity.***

At the end of the treatments, cells were scraped off, collected by centrifugation at 2.500 x g for 5 min and lysed at 4°C in 5 mM Tris/HCl pH 8, 20 mM EDTA, 0,5% Triton X-100. Lysates were clarified by centrifugation at 13.000 x g for 10 min. Reaction mixtures contained 25 microliters of cell lysate, 325 microliters of assay buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 10% glycerol, 2 mM dithiothreitol) and 20 µM caspase-3 substrate (Ac-DEVD-AMC). After 2-hour incubation at 37°C in the dark, enzymatic activity was measured in a luminescence spectrophotometer (Perkin Elmer LS-50, Norwalk, CT) (λ excitation, 380 nm; λ emission, 440 nm). We define a unit of caspase-3 activity as the amount of active enzyme necessary to produce an increase in 1 arbitrary unit in the fluorimeter

after 2-hour incubation with the reaction mixture. Protein concentration of cell lysates was determined and the results are presented as caspase-3 activity/micrograms of total protein.

### ***2.10. Cell viability and cytotoxicity.***

Cell viability/damage was determined by two alternative methods: gross detection of cell viability by using the crystal violet assay (30) and cytotoxicity assay by measuring lactate dehydrogenase (LDH) leakage into the extracellular medium (31). For the crystal violet assay, cells were seeded at low density ( $10^4$  cells per well) in 24-well plates, grown for 12 hours with the different treatments and incubated with crystal violet (0.2% in ethanol) for 20 min. Plates were rinsed with distilled water and allowed to dry and 1% SDS was then added. The absorbance of each well was measured using a microplate reader at 570 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). Cytotoxicity was evaluated by the LDH method collecting both the culture medium and cells that were scraped in phosphate-buffered saline (PBS) after the different treatments. Then, cells were sonicated to ensure breaking down the cell membrane to release the total amount of LDH followed by centrifugation ( $1.000 \times g$  15 min) to clear up the cell sample. 11 microliters of extract were placed into a well of a 96-multiwell system for the assay. In the same manner, 11 microliters of each culture medium sample were also deposited in each 96-multiwell. The LDH leakage was estimated from the ratio between the LDH activity in the culture medium and that of the whole cell content. Fluorescence was measured at an emission wavelength of 460 nm and an excitation wavelength of 340 nm.

### ***2.11. Quantification of apoptotic cells by flow cytometry.***

After APAP stimulation, adherent and non-adherent cells were collected by centrifugation, washed with PBS and fixed with cold ethanol. The cells were then washed, resuspended in PBS, and incubated with RNase A ( $25 \mu\text{g}/10^6$  cells) for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . After addition of 0.05% propidium iodide, cells were analyzed by flow cytometry.

### ***2.12. Analysis of alanine amino transaminase (ALT) activity.***

Blood was collected in tubes containing heparin and diluted 1/30 with saline (0.9% NaCl). ALT activity was determined by direct measurement with the Reflotron test (Ref. 10745120, Roche Diagnostics).

### ***2.13. Protein determination.***

Protein determination was performed by the Bradford dye method, using the Bio-Rad reagent and BSA as the standard.



#### **2.14. Western blot analysis.**

To obtain total cell lysates, cells from supernatants were collected by centrifugation at 2.000 x g for 5 min at 4°C. Attached cells were scraped off in ice-cold PBS, pelleted by centrifugation at 4.000 x g for 10 min at 4°C and resuspended in lysis buffer (25 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 5 µg/ml leupeptin). Cellular lysates were clarified by centrifugation at 12.000 x g for 10 min. After SDS-PAGE, gels were transferred to Immobilon membranes (Millipore), blocked using 5% non-fat dried milk or 3% bovine serum albumin (BSA) in 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5 (TBS) and incubated overnight with antibodies as indicated in 0.05% Tween-20-TBS. Immunoreactive bands were visualized using the ECL Western blotting protocol (Millipore).

#### **2.15. Statistical Analysis.**

The data are expressed as means ± SD. The statistical significance was estimated with Student's test for unpaired observation ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ; and  $p^{***} < 0.001$ ).

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

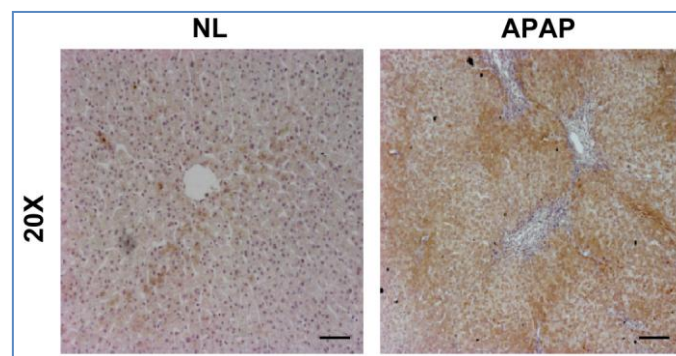
#### ***PTP1B expression is induced in human liver during APAP intoxication.***

Cell proliferation and cell death are governed by stimulatory and inhibitory signals. Whereas trophic factors simultaneously stimulate mitosis and inhibit cell death, negative growth signals regulate the opposite of these biological effects. In the liver, trophic factors include endogenous growth factors such as EGF, bFGF, TGF- $\alpha$  and IGFs that act through receptors belonging to the tyrosine kinase superfamily (32). Thus, tyrosine phosphorylation may play a regulatory role in the induction and execution of programmed cell death in the liver. On that basis, our first goal in this work was to investigate whether an overdose of APAP induced the expression of PTP1B, a negative modulator of survival-mediated signaling pathways, in human liver biopsies obtained from individuals suffering from APAP intoxication. In our previous work (33) we showed elevated PTP1B expression in patients with APAP toxicity that needed liver transplantation. In agreement with this, Figure 1 shows elevated PTP1B expression in another patient suffering from APAP intoxication. Notably, immunostaining was detected in surviving hepatocytes in the areas surrounding the central veins (right panel) as compared to a normal liver (left panel).

#### ***PTP1B deficiency protects mouse hepatocytes against elevation of ROS.***

The fact that PTP1B has been related to the induction of apoptosis in hepatocytes under conditions of serum withdrawal (27) or activation of the Fas death receptor (34) prompted us to investigate the involvement of PTP1B in the

susceptibility of hepatocytes to undergo apoptotic cell death induced by APAP. As indicated in the introduction section, APAP overdoses cause severe hepatotoxicity leading to liver failure in experimental animals and humans. APAP hepatotoxicity is, in part, the result of a series of events that increase cellular oxidative stress. In the liver, Cyp2e1 converts APAP to NAPQI that rapidly depletes GSH and the subsequent generation of ROS (7), and therefore the degree of GSH consumption is a biomarker for APAP bioactivation (35). Both the catalytic and the modifier subunits of  $\gamma$ -glutamyl cysteine ligase (GCL-C and GCL-M) are responsible for glutathione synthesis. Since the expression of Cyp2e1, GCL-C and GCL-M did not change in primary and immortalized hepatocytes from both genotypes of mice (Figure 2A), we used immortalized cells for further experiments.

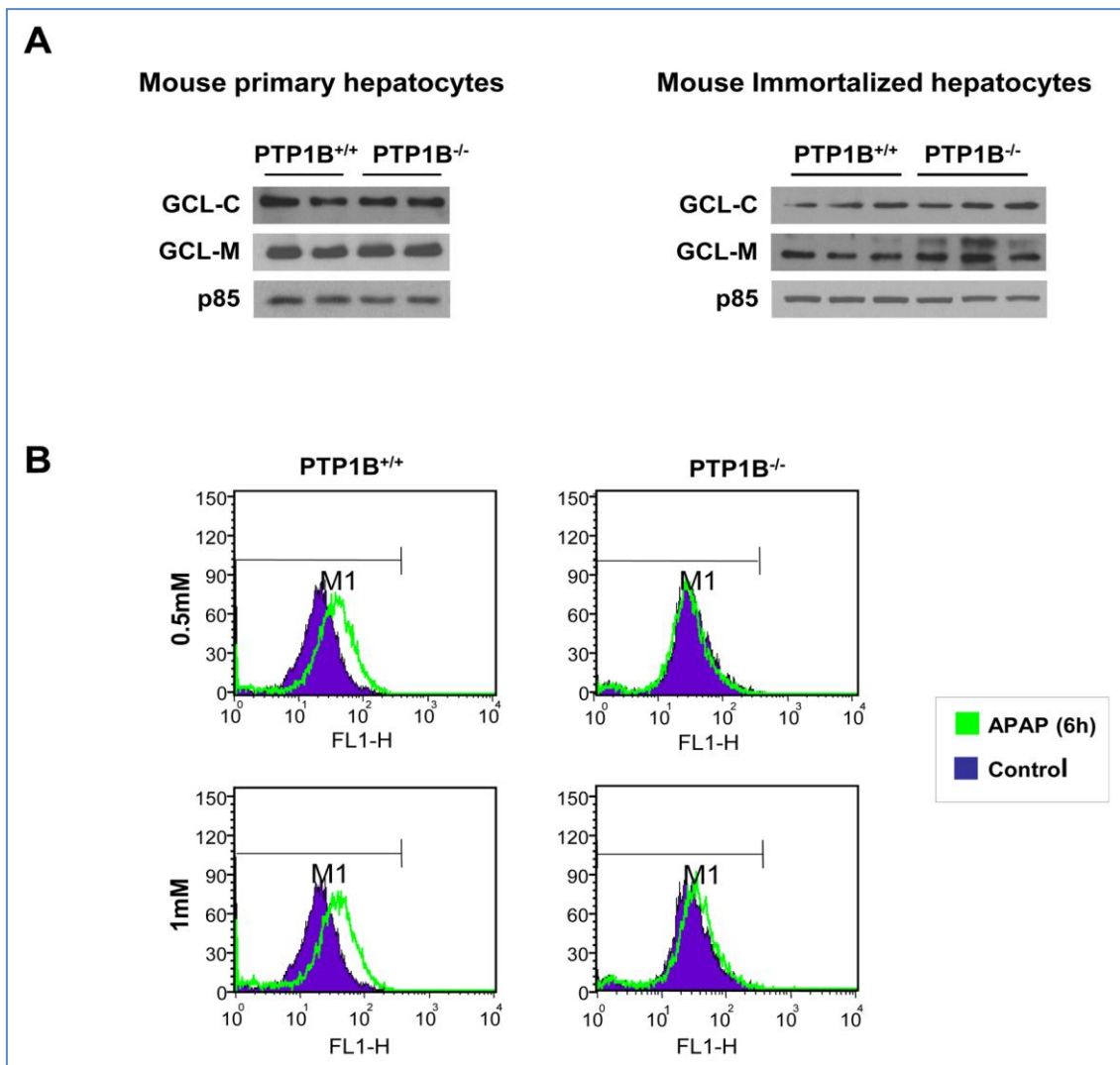


**Figure 1.-PTP1B expression is increased during APAP-induced liver injury.** Representative anti-PTP1B immunostaining of liver biopsy sections from an individuals with histologically normal liver (NL) or with APAP overdose intoxication (APAP). Bar scale 50  $\mu$ m.

It has been extensively reported that APAP hepatotoxicity concurs with elevated ROS (36). To evaluate the degree of cellular oxidative stress in APAP-treated hepatocytes, the intracellular ROS production was estimated. Figure 2B shows a representative plot with the shift of the mean fluorescence after APAP treatment for 6 h at 0.5 and 1 mM concentrations in immortalized hepatocytes. Importantly, ROS production was significantly ameliorated in hepatocytes lacking PTP1B compared to the wild-type controls.

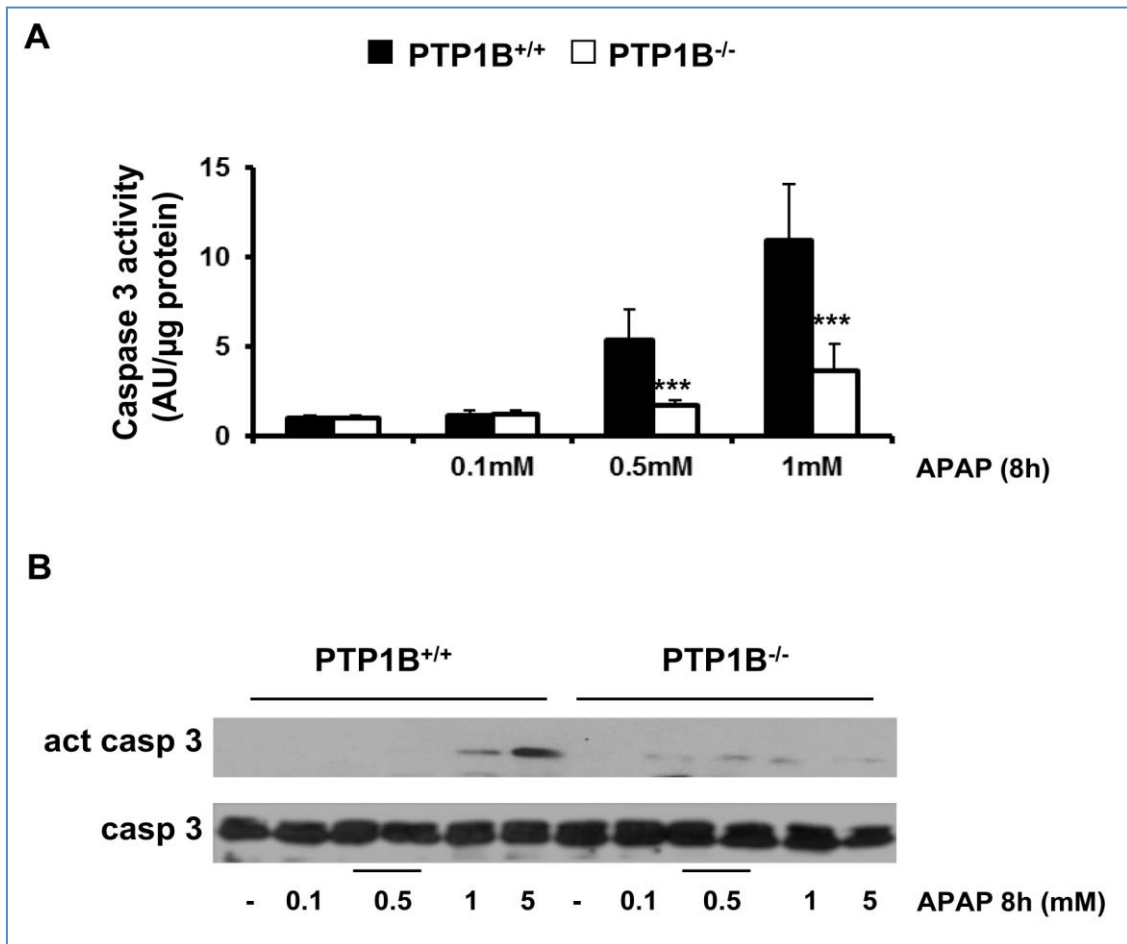
***Programmed cell death (apoptosis) induced by APAP treatment involves activation of caspase-3: protective effect of PTP1B deficiency.***

To further investigate whether caspase-3 is involved in APAP-induced apoptosis, we examined caspase-3 activity in wild-type and PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes. Cells were treated with APAP in a dose-dependent manner and caspase-3 enzymatic activity was analyzed as described in Materials and Methods. As shown in Figure 3A, caspase-3 activity increased with APAP treatment for 8 h in wild-type hepatocytes with a maximal effect at 1 mM concentration. However, in the absence of PTP1B, hepatocytes were protected against activation of caspase-3 upon APAP treatment.



**Figure 2.- Effects of PTP1B deficiency in APAP-mediated effects in oxidative stress in hepatocytes.** **A.** Whole cell lysates from PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> mouse primary (*left panel*) and immortalized (*right panel*) hepatocytes were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Representative autoradiograms are shown. **B.** Analysis of ROS levels in APAP-treated wild-type and PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes for 6 h. Representative plots with the shift of the mean fluorescence after APAP treatment are shown.

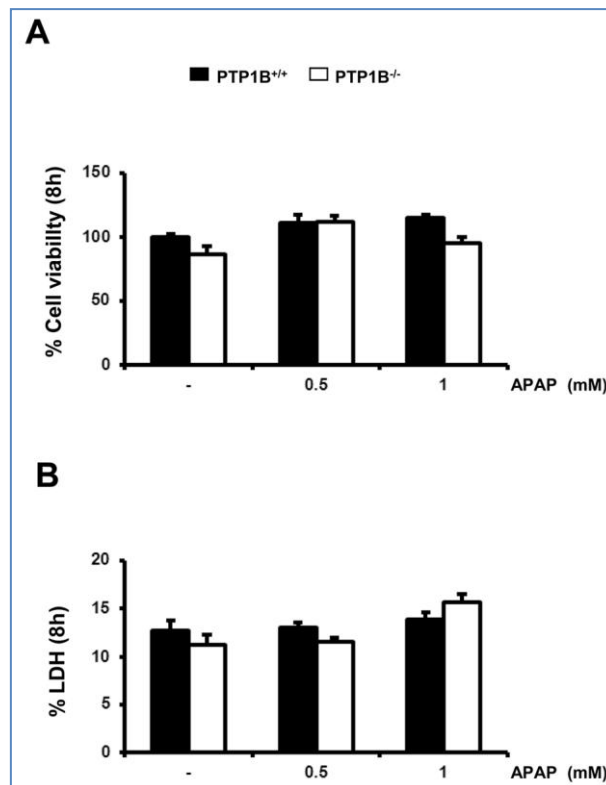
Caspases are synthesized as inactive zymogens, whose cleavage represents its activation (37). Accordingly, we examined the presence of the active fragment of caspase-3 (15-17 kDa) by Western blot analysis. As shown in Figure 3B, a marked increase in active caspase-3 fragment was observed in APAP-treated wild-type immortalized hepatocytes for 8 h in a dose-dependent manner. However, in PTP1B<sup>-/-</sup> cells this effect was ameliorated. Importantly, at this early time point we could not see any decrease in the cellular viability as assessed by crystal violet staining and the analysis of LDH enzymatic activity suggesting that apoptosis is a very early event triggered by APAP in hepatocytes (Figure 4A, 4B).



**Figure 3.- PTP1B-deficient hepatocytes are protected against APAP-induced caspase-3 activation.** PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes were treated with various doses of APAP for 8 h. **A.** Analysis of caspase-3 enzymatic activity. **B.** Analysis of the active caspase-3 fragment in total cell lysates by Western blot. \*P<0.05 and \*\*\*P<0.005 PTP1B<sup>-/-</sup> vs. PTP1B<sup>+/+</sup> cells (n=4 independent experiments).

### ***Effect of APAP treatment in the cell cycle of wild-type and PTP1B<sup>-/-</sup> hepatocytes.***

We next investigated the effects of APAP in the distribution of the hepatocytes along the phases of the cell cycle including the hypodiploid (sub G0/G1) population. In wild-type hepatocytes, APAP treatment induced cell cycle arrest in S phase with a maximal effect at 0.5 mM dose. Of note, under these experimental conditions a twofold increase in the percentage of S phase arrested cells was observed (Figure 5A). This effect was significantly ameliorated in hepatocytes lacking PTP1B. We also observed that APAP treatment increased the percentage of hypodiploid cells in wild-type hepatocytes, but again this effect was significantly reduced in PTP1B<sup>-/-</sup> hepatocytes (Figure 5B). This result indicates an apoptotic effect of APAP which was significantly reduced in hepatocytes lacking PTP1B.



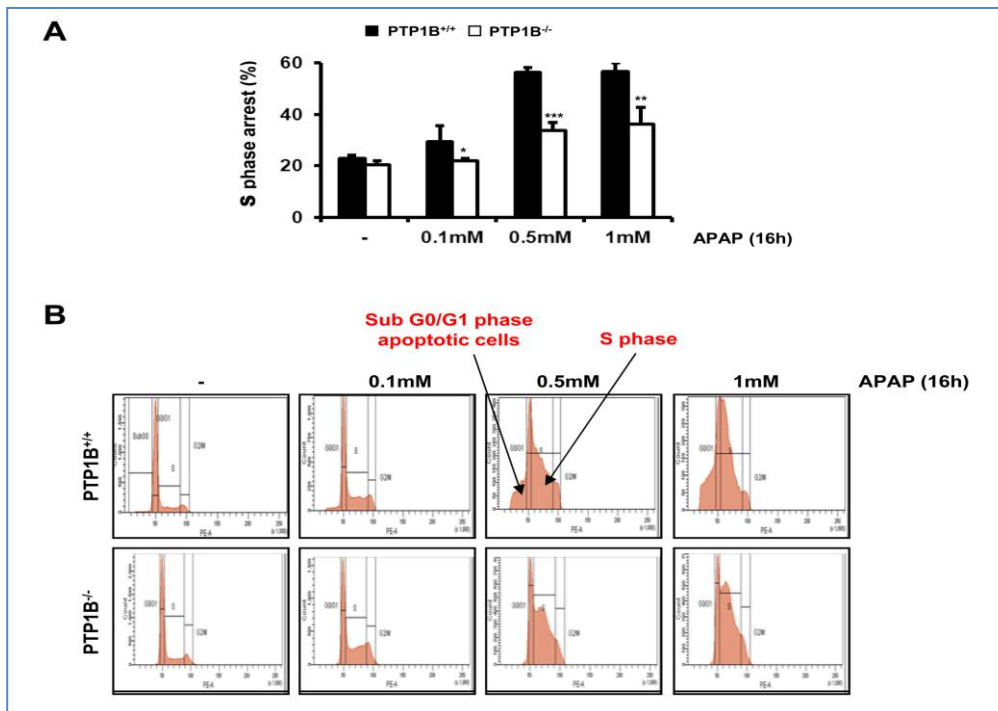
**Figure 4.- Immortalized PTP1B-deficient hepatocytes are protected against APAP-induced cell death.** PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes were treated with various doses of APAP for 8 h. Cellular viability (A) and released LDH activity (B) were analyzed. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.005 PTP1B<sup>-/-</sup> vs. PTP1B<sup>+/+</sup> hepatocytes (n=4 independent experiments).

Cell death (irreversible loss of vital cellular structure and function) is a fundamental phenomenon of biological organisms. Several lines of investigation have led to the concept that there are two fundamental types of cell death: apoptosis and necrosis. The findings of our study demonstrated that the administration of APAP at hepatotoxic doses led to the induction of cell death by both necrosis and apoptosis, with apoptotic cell death typically preceding necrosis. Therefore, we analyzed the population of apoptotic and necrotic cells in response to APAP by flow cytometry. The results shown in Figure 6 and Table 1 indicate a protection against both types of cell death in response to APAP in PTP1B<sup>-/-</sup> hepatocytes as compared to wild-type cells.

***Effect of APAP treatment in the signaling pathways that modulate cell death and survival in wild-type and PTP1B-deficient hepatocytes.***

At the molecular level, we analyzed both stress-mediated and survival signaling in wild-type and PTP1B<sup>-/-</sup> hepatocytes upon APAP treatment. The c-Jun N-terminal Kinases (JNKs), a subfamily of the mitogen-activated protein (MAP) kinases, have been shown to be activated by phosphorylation at early time-periods after APAP treatment in hepatocytes (38-39). To analyze JNK activation in immortalized hepatocytes, cells were treated with different doses of APAP for 8 h and JNK phosphorylation was examined by Western blot analysis. As shown in

Figure 7A, APAP markedly increased the levels of phosphorylated JNK in wild-type hepatocytes. Interestingly, the lack of PTP1B prevented JNK activation in response to APAP.



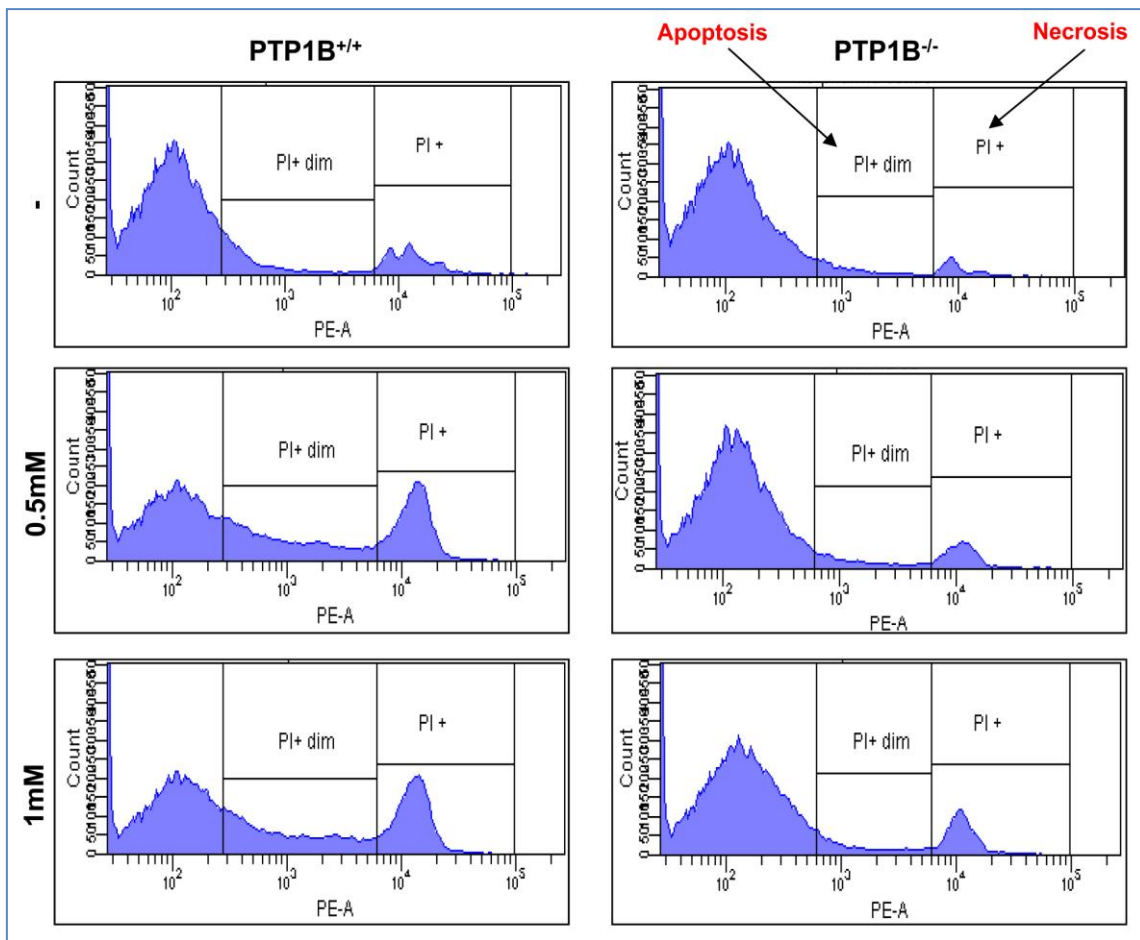
**Figure 5.- PTP1B-deficient hepatocytes are protected against APAP-induced arrest in the S phase of the cell cycle.** **A.** PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes were treated with various doses of APAP for 16 h. The percentage of S phase cell population was measured by flow cytometry. **B.** Images of flow cytometry showing the effect of APAP treatment on G0/G1 and S phases in both PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.005 PTP1B<sup>-/-</sup> vs. PTP1B<sup>+/+</sup> cells (n=4 independent experiments).

**Table 1.-** Effect of APAP treatment in the induction of both apoptosis and necrosis in PTP1B<sup>+/+</sup> PTP1B<sup>-/-</sup> hepatocytes.

| Population                 | PI   | PI+* | PI+dim** |
|----------------------------|------|------|----------|
| PTP1B <sup>+/+</sup> C     | 99.5 | 10   | 10.8     |
| PTP1B <sup>+/+</sup> 0.5mM | 98.5 | 22.7 | 24.1     |
| PTP1B <sup>+/+</sup> 1mM   | 98.7 | 23.1 | 24.6     |
| PTP1B <sup>-/-</sup> C     | 99.9 | 4.5  | 3.9      |
| PTP1B <sup>-/-</sup> 0.5mM | 99.5 | 7.2  | 5.7      |
| PTP1B <sup>-/-</sup> 1mM   | 99   | 10.2 | 6.7      |

PI\*=Necrosis. PI\*\*=Apoptosis

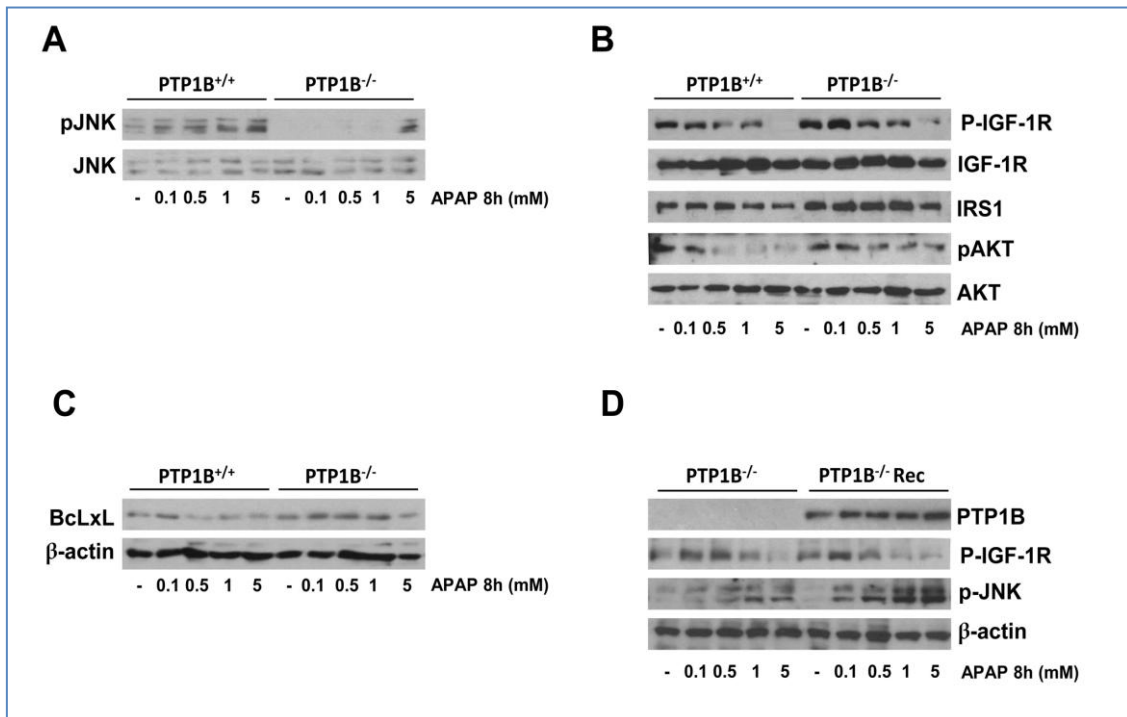




**Figure 6.- PTP1B-deficient hepatocytes are protected against APAP-induced apoptosis and necrosis.** PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes were treated with various doses of APAP for 16 h. Apoptosis and necrosis was measured by PI staining by flow cytometry (n=4 independent experiments).

To study the effect of APAP on the survival signaling pathways, phosphorylation of the IGF-IR, levels of IRS1 and activation of Akt were examined. As depicted in Figure 7B, phosphorylation of the IGF-IR and its downstream target Akt decreased in APAP-treated wild-type hepatocytes at 8 h, but it was maintained along APAP treatment in PTP1B-deficient hepatocytes. These results indicate that the protective effect of PTP1B deficiency also involve the increase in survival signaling. Interestingly, in PTP1B-deficient hepatocytes IRS1 degradation induced by APAP was attenuated. Altogether these results suggest that the increased tyrosine phosphorylation of IGF-IR as a result of PTP1B deficiency elicits hepatoprotection in conjunction with the attenuation of stress-mediated signaling.

Bcl-xL is a member of the Bcl-2 family with anti-apoptotic properties (40-41). On that basis, we analyzed the expression of Bcl-xL after 8 h of APAP treatment in wild-type and PTP1B<sup>-/-</sup> hepatocytes. As shown in Figure 7C, wild-type cells showed a decrease in the expression of BclxL after APAP treatment whereas BCLxL expression was maintained in hepatocytes lacking PTP1B.



**Figure 7.- Effect of PTP1B deficiency in stress and survival signaling in hepatocytes.** PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes were treated with various doses of APAP for 8 h. Total cell lysates were analyzed by Western blot with the antibodies against phospho-JNK1/2 and JNK1/2 (**A**), phosphor-IGFIR, IGFIR, IRS1, phospho-Akt and Akt (**B**) and BclxL and  $\beta$ -actin as a loading control (**C**). Representative autoradiograms corresponding to three independent experiments are shown. **D**. PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized hepatocytes were reconstituted with PTP1B by retroviral gene transfer. PTP1B<sup>-/-</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> Rec cells were treated with various doses of APAP for 16 h. Total cell lysates were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Representative autoradiograms corresponding to three independent experiments are shown.

Our next step was to study the effect of PTP1B reconstitution of PTP1B-deficient hepatocytes in the signaling pathways modulated by APAP. For this goal, we reconstituted PTP1B expression in deficient cells by retroviral gene transfer as described in Materials and Methods. As a control, hepatocytes were infected with an empty retroviral construct. Figure 7D shows the re-expression of PTP1B in PTP1B<sup>-/-</sup> immortalized neonatal hepatocytes (referred as PTP1B<sup>-/-</sup> Rec). Importantly, re-expression of recombinant PTP1B in PTP1B<sup>-/-</sup> neonatal hepatocytes induced a decline of IGF-IR phosphorylation after APAP treatment similar to the effects observed in wild-type cells. In addition, APAP treatment activated JNK phosphorylation in PTP1B<sup>-/-</sup> Rec neonatal hepatocytes as in wild-type cells.

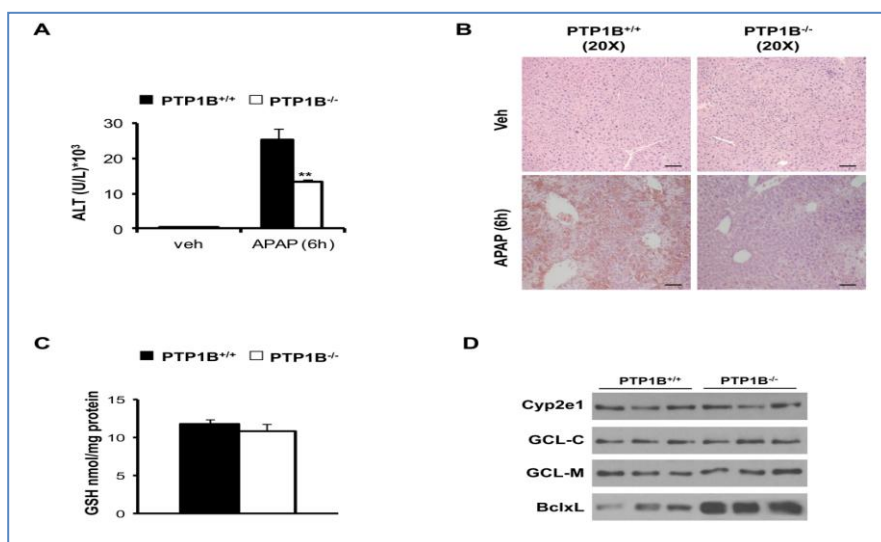
We have recently reported that APAP protected against liver injury induced by a toxic dose of APAP (300 mg/kg) in mice (33). To reinforce this finding, we injected both PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> mice with a higher dose of APAP (500 mg/kg) and analyzed liver toxicity. Serum ALT was higher in APAP-injected wild-type than in PTP1B<sup>-/-</sup> mice (Figure 8A). Moreover, less injury was observed in



liver sections from APAP-injected PTP1B<sup>-/-</sup> mice as compared to the wild-type controls that presented histological signs of severe hepatotoxicity (Figure 8B).

***PTP1B-deficient mice are protected against liver damage induced at a high dose of APAP.***

We next determined if reduced sensitivity of PTP1B<sup>-/-</sup> mice to APAP-induced liver injury was associated with alterations in basal GSH levels in the two mouse strains. Interestingly, the basal expression of Cyp2e1, GCL-C and GCL-M and basal GSH levels were comparable among both genotypes of mice (Figure 8C, 8D).



**Figure 8.- PTP1B-deficient mice are protected against liver damage induced by a high dose of APAP under similar GSH levels and expression of Cyp2e1, GCL-C, GCL-M and BclxL in the liver.** PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> mice were injected with 500 mg/kg APAP or saline for 6 h. **A.** ALT activity. \*\* P<0.01 PTP1B<sup>-/-</sup> vs. PTP1B<sup>+/+</sup> mice (n= 6-8 mice of each condition). **B.** Representative Hematoxylin & Eosin staining in liver sections. Bar scale 100 μm. **C.** Basal GSH levels in livers from PTP1B<sup>+/+</sup> and PTP1B<sup>-/-</sup> mice. **D.** Whole cell lysates from both mice +were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Representative autoradiograms are shown.

**4. CONCLUSION**

In summary, the present study provides the first molecular evidence that levels of PTB1B modulate susceptibility to apoptosis that occurred at early time-periods in hepatocytes treated with toxic doses of APAP. Thus, our results have revealed that PTP1B inhibition might be therapeutically of interest against the hepatotoxicity induced by overdoses of APAP.

**5. ACKNOWLEDGEMENTS**

We acknowledge the following grant support: SAF2012-33283 (MINECO, Spain), Comunidad de Madrid S2010/BMD-2423, EFSD and Amylin Paul Langerhans Grant and Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM, ISCIII, Spain).

## 6. REFERENCES

1. Rumack, B. H. Acetaminophen misconceptions. *Hepatology* 40,10-15 (2004).
2. Thomas, S. H. L. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Pharmacol. Ther.* 60, 91-120 (1993).
3. Litovitz, T. L.; Klein-Schwartz, W.; Rodgers, G. C.; Cobaugh, D. J.; Youniss, J.; Omslaer, J. C.; May, M. E.; Woolf, A. D.; Benson, B. E. 2001 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am. J. Emerg. Med.* 20, 391-452 (2002).
4. Lee, W. M. Acetaminophen toxicity: changing perceptions on a social /medical issue. *Hepatology* 46, 966-970 (2007).
5. Kaplowitz, N. Acetaminophen hepatotoxicity: what do we know, what don't we know, and what do we do next? *Hepatology* 40, 3-26 (2004).
6. Prescott, L. F. Hepatotoxicity of mild analgesics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2, 373-379 (1980).
7. Lee, W. M. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 40, 6-9 (2004).
8. Cohen, S. D.; Khairallah, E.A. Selective protein arylation and acetaminophen induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 29, 59-77 (1997).
9. James, L. P.; Mayeux, P. R.; Hinson, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* 31, 1499-1506 (2003).
10. Jaeschke, H.; Bajt, M. L. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen induced liver cell death. *Toxicol. Sci.* 89, 31-41 (2006).
11. Bessems, J. G.; Vermeulen, N. P. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 55-138 (2001).
12. Nelson, S. G.; Wan, Z.; Stan, M. A. S (N)2 ring opening of beta-lactones: an alternative to catalytic asymmetric conjugate additions. *J. Org. Chem.* 67, 4680-4683 (2002).
13. Vermeulen N. P. E.; Bessems J. G. M.; Vandestraat R. Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug Metab. Rev.* 24, 367-407 (1992).
14. Dong, H.; Haining, R. L.; Thummel, K. E.; Rettie, A. E.; Nelson, S. D. Involvement of human cytochrome P450 2D6 in the bioactivation of acetaminophen. *Drug Metab. Dispos.* 28, 1397-1400 (2000).
15. Snawder, J. E.; Roe, A. L.; Benson, R. W.; Roberts, D. W. Loss of CYP2E1 and CYP1A2 activity as a function of acetaminophen dose: relation to toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 532-539 (1994).
16. Ghosh, A.; Sil, P. C. Protection of acetaminophen induced mitochondrial dysfunctions and hepatic necrosis via Akt-NF-KB pathway: role of a novel plant protein. *Chem. Biol. Interact.* 177, 96-106 (2009).
17. Mitchell, J. R.; Jollow, D. J.; Potter, W. Z.; Gillette, J. R.; Brodie, B. B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 211-217 (1973).
18. Reid, A.; Kurten, R.; McCullough, S.; Brock, R.; Hinson, J. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 509-516 (2005).
19. Tonks, N. K.; Neel, B. G. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13,182-195 (2001).
20. Frangioni, J. V.; Beahm, P. H.; Shifrin, V.; Jost, C. A.; Neel, B. G. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell* 68, 545-560 (1992).
21. Flint, A. J.; Tiganis, T.; Barford, D.; Tonks, N. K. Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1680-1685 (1997).
22. Haj, F. G.; Markova, B.; Klamann, L. D.; Bohmer, F. D.; Neel, B. G. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J. Biol. Chem.* 278, 739-744 (2003).
23. Salmeen, A.; Andersen, J. N.; Myers, M. P.; Tonks, N. K.; Barford, D. Molecular basis for recognition and dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol. Cell* 6, 1401-1412 (2000).

24. Buckley, D. A.; Cheng, A.; Kiely, P. A.; Tremblay, M. L.; O'Connor, R. Regulation of insulin-like growth factor type I (IGF-I) receptor kinase activity by protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) and enhanced IGF-I-mediated suppression of apoptosis and motility in PTP-1B-deficient fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 22, 1998-2010 (2002).
25. Fabregat, I.; Herrera, B.; Fernández, M.; Alvarez, A. M.; Sánchez, A.; Roncero, C.; Ventura, J. J.; Valverde, A. M.; Benito, M. Epidermal growth factor impairs the cytochrome C/caspase-3 apoptotic pathway induced by transforming growth factor beta in rat fetal hepatocytes via a phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway. *Hepatology* 32, 528-35 (2000).
26. Valverde, A. M.; Fabregat, I.; Burks, D. J.; White, M. F.; Benito, M. IRS-2 mediates the anti-apoptotic effect of insulin in neonatal hepatocytes. *Hepatology* 40, 1285-1294 (2004).
27. Gonzalez-Rodriguez, A.; Clampit, J. E.; Escribano, O.; Benito, M.; Rondinone, C. M.; Valverde, A. M. Developmental switch from prolonged insulin action to increased insulin sensitivity in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient hepatocytes. *Endocrinology* 148, 594-608 (2007).
28. Gonzalez, R. A.; Gutierrez, J. A.; Sanz-Gonzalez, S.; Ros, M.; Burks, D. J.; Valverde, A. M. Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice. *Diabetes* 59, 588-599 (2010).
29. Gonzalez-Rodriguez, A.; Mas-Gutierrez, J. A.; Mirasierra, M.; Fernandez-Perez, A.; Lee, Y. J.; Ko, H. J.; Kim, J. K.; Romanos, E.; Carrascosa, J. M.; Ros, M.; Vallejo, M.; Rondinone, C. M.; Valverde, A. M. Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced inflammation and peripheral insulin resistance during aging. *Aging Cell* 11, 284-296 (2012).
30. Granado-Serrano, A. B.; Martín, M. A.; Goya, L.; Bravo, L.; Ramos, S. Time-course regulation of survival pathways by epicatechin on HepG2 cells. *J. Nutr. Biochem.* 20, 115-124 (2009).
31. Alfá, M.; Ramos, S.; Mateos, R.; Bravo, L.; Goya, L. Response of the antioxidant defense system to t-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 119-28 (2005).
32. Schulte-Hermann, R.; Bursch, W.; Grasl-Kraupp, B. Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease. *Progress Liver Disease* 13, 1-35 (1995).
33. Mobasher, M. A.; Gonzalez-Rodriguez, A.; Santamaria, B.; Ramos, S.; Martin, M. A.; Goya, L.; Rada, P.; Letzig, L.; James, L. P.; Cuadrado, A.; Martin-Perez, J.; Simpson, K. J.; Muntane, J.; Valverde, A. M. Protein tyrosine phosphatase 1B modulates GSK3beta/Nrf2 and IGFIR signaling pathways in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Cell Death Dis.* 4: e626 (2013).
34. Sangwan, V.; Paliouras, G. N.; Cheng, A.; Dube, N.; Tremblay, M. L.; Park, M. Protein-tyrosine phosphatase 1B deficiency protects against Fas-induced hepatic failure. *J. Biol. Chem.* 281, 221-228 (2006).
35. Kon, K.; Kim, J. S.; Jaeschke, H.; Lemasters, J. J. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 40, 1170-1179 (2004).
36. Ferret, P. J.; Hammoud, R.; Tulliez, M.; Tran, A.; Trébédén, H.; Jaffray, P.; Malassagne, B.; Calmus, Y.; Weill, B.; Batteux, F. Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 33, 1173-1180 (2001).
37. Boyce, M.; Degtrev, A.; Yuan, J. Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death Differ.* 11, 29-37 (2004).
38. Gunawan, B.; Liu, Z. X.; Han, D.; Hanawa, N.; Gaarde, W. A.; Kaplowitz, N. c-Jun N terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 131, 165-178 (2006).
39. Bae, M.; Pie, J.; Song, B. Acetaminophen induces apoptosis of C6 glioma cells by activating the c-Jun NH2-terminal protein kinase-related cell death pathway. *Mol. Pharmacol.* 60, 847-856 (2001).
40. Chao, D. T.; Korsmeyer, S. J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 395-419 (1998).
41. Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312 (1998).



## Riesgo y seguridad de la terapia avanzada

José María Pamo-Larrauri

Universidad de Salamanca. Facultad de Farmacia. Castilla y León. España. Campus M. Unamuno, Departamento de Tecnología Farmacéutica. 37007 Salamanca.  
e-mail: txito@usal.es

*An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 4 (2014), pag. 683-693*

### RESUMEN

Los riesgos inherentes a la terapia avanzada identificar los riesgos potenciales y mitigarlos mediante controles adecuados. Gracias en parte a la información obtenida en todas las etapas desarrollo. Las diferencias entre terapia celular, terapia génica e ingeniería de tejidos nos muestran los riesgos específicos para cada tipo de terapia. Pues la terapia génica podría generar efectos permanentes con una sola dosis. El seguimiento de la eficacia y las reacciones adversas son aspectos cruciales de la reglamentación de los medicamentos de terapia avanzada.

**Palabras clave:** Terapia avanzada; riesgos; farmacovigilancia.

### ABSTRACT

#### *Risks and safety of advanced therapy*

The risks inherent in the advanced therapy identify potential risks and mitigate them through appropriate controls. Thanks in part to the information obtained in all development stages. The differences between cell therapy, gene therapy and tissue engineering show us the risks specific to each type of therapy. Because gene therapy could generate lasting effects with a single dose. Follow-up of efficacy and adverse reactions are crucial aspects of advanced therapy medicines regulation.

**Keywords:** Advanced therapy; risk; pharmacovigilance.

### 1. INTRODUCCIÓN

La terapia avanzada va alcanzando cada vez mayor auge tras las nuevas posibilidades médicas, el aumento constante del número de ensayos clínicos, la salida al mercado de nuevos y complejos medicamentos, los biobancos y su

bioseguridad, las nuevas oportunidades para el tratamiento de enfermedades o disfunciones corporales humanas,...

En este avance de los medicamentos de terapia avanzada debe ser vital minimizar los riesgos específicos de cada tipo de terapia avanzada antes de su salida al mercado. La terapia avanzada se enfrenta a sus riesgos con una serie de estrategias capaces de fijar límites y controlar con éxito todo problema asociado a la terapéutica. Entender primeramente que el riesgo es contingencia o proximidad de un daño como define la RAE (Real Academia Española). Y se denominará como riesgo para la salud pública a todo riesgo referido a la calidad, la seguridad y la eficacia del medicamento, como señala la Directiva 2001/83/CE.

A principios del milenio surgió de la idea de expertos y representantes oficiales de los Estados miembros de desarrollar un marco regulatorio con altos estándares de seguridad y calidad para la contratación, pruebas, procesamiento, almacenamiento y distribución de células y tejidos humanos con el fin de garantizar un alto nivel de protección de la salud humana en la Unión Europea (UE) (1). Dadas la novedad, la complejidad y la especificidad técnicas de los medicamentos de terapia avanzada, se necesitaba una normativa especialmente adaptada y armonizada para combatir la diversidad normativa en la Comunidad Europea; por tanto, se decide en la Comisión Europea crear una nueva norma para medicamentos basados en terapia génica, terapia celular e ingeniería de tejidos denominados a su conjunto desde ese instante "*advanced therapy*" (terapia avanzada). La nueva norma, el Reglamento europeo 1394/2007, se perfila como una ley marco que regule todas las condiciones y actos de la terapia avanzada. En lo relativo al riesgo, el Reglamento 1394/2007 en su artículo 14, insta a la Agencia Europea de Medicamentos a elaborar directrices detalladas relativas al seguimiento post autorización de gestión de riesgos y reacciones adversas, y eficacia (2). Para cumplir con este requisito y proporcionar una base para el desarrollo de futuras directrices detalladas en este campo, la EMA (European Medicines Agency, Agencia Europea del Medicamento) junto con sus comités científicos y grupos de trabajo redactó la guía "*Guideline on safety and efficacy follow-up-risk management of advanced therapy medicinal products*" (3).

## **2. RIESGOS**

La mayor complejidad de los procesos de fabricación y de los productos, y la diversidad debido a la más amplia gama de productos de terapia génica, terapia celular somática, ingeniería de tejidos y productos medicinales; provoca que la regulación de estos medicamentos sea más amplia y desafiante. En este sentido, el reto para los científicos en este campo es identificar los riesgos potenciales y asegurar que se ponen suficientes controles para reducir éstos a un nivel aceptable, en consonancia con el beneficio potencial de la terapia (5). Señalar que

ante las diferencias entre terapia celular, terapia génica e ingeniería de tejidos; trataremos por separado cada tipo de terapia y sus riesgos.

Los principales riesgos relacionados con un producto de base celular son la contaminación microbiológica, la diferenciación (la capacidad de proliferación y diferenciación de la células), la pérdida de la función celular, la transformación maligna de la célula, la inmunogenicidad (la capacidad de las células de iniciar la respuesta inmune) y el injerto ectópico de las células en tejidos no diana (5,6). La inmunogenicidad no deseada conlleva consecuencias incluyendo anafilaxia, injerto contra huésped, rechazo del injerto, reacciones de hipersensibilidad, enfermedad, inmunodeficiencias... (3). Las formas de administración (por ejemplo, intracardiaca, intracraneal o intraespinal) propuestos para muchos productos de terapia celular plantean riesgos de seguridad adicionales derivados de la procedimientos quirúrgicos, las vulnerabilidades de los lugares de administración y posterior accesibilidad de dichos lugares en el caso de necesidad médica, incluyendo la necesidad de retirada del producto (8). Añadir como riesgos generales para los pacientes respecto al procedimiento de administración y preparación, por ejemplo: sustancias biológicamente activas o utilizadas en la preparación del producto antes de la administración (enzimas, anticuerpos, citoquinas, sueros, factores de crecimiento, antibióticos), riesgos relacionados con el acondicionamiento del paciente o riesgos de los procedimientos médicos o quirúrgicos relacionados como infusión, transfusión, implantación, trasplante, anestesia... (3). Por ejemplo, para el tratamiento de la isquemia crítica del miembro (*Critical Limb Ischemia* (CLI)) a través de inyecciones intramusculares de células madre en la extremidad amenazada se requieren de protocolos de terapia celular. Esto se debe a que la entrega de un volumen del producto celular a una zona del músculo que se ve comprometida por un flujo sanguíneo insuficiente; plantea una preocupación por el daño muscular, específicamente rabdomiolisis, y la lesión renal aguda subsecuente (7). Por último, señalar que la agrupación de células de múltiples donantes genera un riesgo potencial en términos de respuesta inmunológica, variabilidad en la actividad terapéutica y transmisión de enfermedades. En estos casos, la necesidad de consistencia en potencia/actividad debe equilibrarse con la inherente variabilidad (5). Y en común para todas las terapias avanzadas, los riesgos relacionados con estructuras, matrices y biomateriales (biodegradación, factores mecánicos...) (3).

En la terapia génica revisten especial interés los efectos permanentes que se pueden producir con una sola dosis (5). Posiblemente, el principal objeto de riesgo sean los vectores. Los riesgos relacionados con la infección con vectores utilizados en productos medicinales de terapia génica corresponden con el tipo del vector, células diana, persistencia, potencial de latencia y reactivación, potencial de integración de material genético en el genoma del paciente, expresión prolongada



del transgen, expresión alterada de los genes del paciente (3). Además, prestar especial cuidado ante los riesgos relacionados con la modificación genética de las células del paciente (apoptosis, cambio de función, alteración del crecimiento y diferenciación, neoplasia maligna). A diferencia de los medicamentos de terapia celular que duración de la exposición pueden corresponder a la vida útil de la célula, para los productos de terapia génica debe ceñirse sobre la vida útil en el paciente, y el modo de administración (5). Señalar también los riesgos específicos padres-hijos, por ejemplo: riesgo en la línea germinal por integración del transgén, u otra transformación genética de la línea germinal por transmisión al feto de vectores, sustancias biológicamente activas, células, agentes infecciosos... Sin olvidar la exposición transmamaria o sobre niños lactantes de vectores, sustancias biológicamente activas, células, agentes infecciosos... (3).

Una vez conocidos los riesgos potenciales, trataremos de caracterizarlos y evaluarlos según el tipo de terapia, sus condiciones y sus factores ante los que nos encontremos. Especialmente reviste interés la investigación preclínica, desarrollo clínico y post-comercialización. Además en todas estas etapas conseguimos mediante la práctica y el estudio mayor información de los medicamentos, la que nos permitirá gestionar los riesgos mediante controles o límites adecuados. En definitiva, se busca desde el principio la identificación de riesgos y su mitigación. La expresión de esa búsqueda es el protocolo, el cual debe identificar los riesgos asociados a la idiosincrasia del producto basándose en la experiencia previa con el mismo producto y/o la misma clase de productos, el modo de acción, la naturaleza del objetivo y la información de modelos preclínicos. Aspectos fundamentales del protocolo deben ser diseñados para mitigar los factores de riesgo identificados, incluyendo toda la serie de elementos (5).

Siguiendo el esquema de sistemas de gestión de riesgos donde primero se identifican y analizan los riesgos; después se evalúan; y finalmente se controlan. Pasamos a la evaluación de los riesgos potenciales, a la hora de la administración y determinación idoneidad de los controles, destacar: el origen del producto (autólogo o alogénico), el proceso de fabricación (grado al que han sido manipuladas las células) y la presencia de componentes no celulares (estructuras de anclaje inertes o moléculas bioactivas) (5, 6). Dadas todas las consideraciones anteriores, es importante que se proporcionen suficientes datos de seguridad preclínicos y sus conclusiones motivadas para apoyar la puesta en marcha de una dosis inicial y el aumento, en su caso, de la dosis propuesta en el estudio clínico. Finalmente, los riesgos de productos de terapia celular en investigación, incluyendo los procedimientos de administración y medicaciones concomitantes, generalmente son demasiado grandes para permitir el estudio en voluntarios sanos. Por lo tanto, a diferencia de muchos ensayos de medicamentos en su fase I, los participantes padecerán la enfermedad a la que se dirige los ensayos para un



producto de terapia celular, que a menudo es grave o peligrosa para la vida. Tales individuos pueden requerir tratamientos continuos y medicamentos, que tienen el potencial de interactuar con el productos celulares (8). La primera vez en humanos debe venir precedido de un juicio o análisis asegurándose también que cumple todas las directrices apropiadas y sigue incluyendo la guía de la UE en la mitigación de riesgo para la primera vez en ensayos clínicos para medicamentos (5). Resulta también fundamental que los riesgos e inconvenientes previsibles para los sujetos del ensayo se hayan ponderado con respecto a los beneficios previsibles para cada sujeto del ensayo y futuros pacientes. Además el estudio debe basarse en los conocimientos disponibles y la información a obtener suponga, presumiblemente, un avance en el conocimiento científico sobre el ser humano o para mejorar su estado de salud; y su diseño abogue por minimizar los riesgos para los sujetos participantes en él (9).

Los métodos de supervisión en los ensayos de la fase inicial deben elegirse después de tener en cuenta todas las capacidades existentes, tecnologías y herramientas analíticas aplicadas durante periodos de tiempo apropiados, con el fin de proporcionar la evaluación de la seguridad adecuada y medir los potenciales beneficios terapéuticos o acciones farmacodinámicas del producto celular. Los métodos también dependerán de la duración del seguimiento a largo plazo, la naturaleza del producto y la específica indicación terapéutica. Hay una gran necesidad de desarrollo de biomarcadores de seguridad y eficacia para caracterizar los efectos de tales productos participantes en el ensayo. Por otra parte, mejora en las técnicas de seguimiento de la célula especialmente los basados en modalidades de imágenes no invasivas que pueden ser utilizadas clínicamente, ayuda en la supervisión de seguridad y avanzar en la comprensión de los efectos clínicos de esta clase de producto (8).

### **3. SEGURIDAD Y FARMACOVIGILANCIA**

Un buen sistema de control y vigilancia de la seguridad de los medicamentos debe encaminarse a identificar los riesgos que éstos presentan e intentar encaminarse a su reducción y si es posible, su eliminación mediante los avances científicos y técnicos de la medicina. La utilización de los medicamentos requiere que el beneficio de su empleo sea superior a los riesgos que pueda generar. Es evidente que los medicamentos presentan riesgos para la salud y la integridad física de las personas, pero ello no les convierte en productos defectuosos de forma automática. Para identificar y prevenir tales riesgos es necesario un sistema de vigilancia postcomercialización, que en España es público y se denomina Sistema Español de Farmacovigilancia (10).

El seguimiento de la eficacia y las reacciones adversas son aspectos cruciales de la reglamentación de los medicamentos de terapia avanzada. Por

tanto, el solicitante debe indicar en la solicitud de autorización de comercialización qué medidas, en su caso, se prevén para garantizar dicho seguimiento; acreditando la capacidad de realizar una adecuada vigilancia post-comercialización de la seguridad del medicamento. Cuando esté justificado desde el punto de vista de la salud pública, también debe exigirse al titular de la autorización de comercialización que instaure los planes específicos de farmacovigilancia y de gestión de riesgos que, de acuerdo con las directrices nacionales y europeas, se consideren necesarios, así como el compromiso fehaciente de desarrollo y ejecución de los mismos (2, 11). Procedimientos empleados de control de seguridad durante los ensayos clínicos de terapia celular deben basarse en potencial producto/efectos adversos específicos que pueden surgir durante un período prolongado. Los productos de terapia celular pueden consistir en poblaciones células heterogéneas y pueden exhibir una variedad de propiedades que reflejan la mezcla de células específicas, incluyendo la capacidad de proliferación, diferenciación, migración y funcional integración fisiológica o patológica en los tejidos diana (8). En ciertas ocasiones, y más si al tratar sobre medicamentos de terapia avanzada por su novedad, el conocimiento sobre un medicamento resulta limitado y esa limitación se deslumbra con posterioridad con sistemas como el planteado. La razón de esa limitación se basa en que los estudios se recluta a un número pequeño de pacientes y durante un espacio corto-medio de tiempo. Los estudios postautorización una vez usados en la práctica clínica posibilitan detectar reacciones no comunes y a largo plazo. El principal destinatario de este deber de control post-comercialización es el fabricante del producto, cuya obligación de prevenir y evitar eventuales peligros creados por sus productos continúa una vez colocados en el tráfico. Ahora bien, el deber de seguimiento y observación del producto también alcanza a los restantes profesionales de la cadena de comercialización y, en el caso de los medicamentos, se extiende asimismo a la propia Administración sanitaria dentro de los límites de sus actividades respectivas (10).

El Sistema Español de Farmacovigilancia aspira a ser un sistema que permita la trazabilidad completa del paciente, del producto y de sus materias primas, para monitorizar la seguridad de los medicamentos de terapia avanzada. Conviene establecer y mantener dicho sistema de manera que se garantice la coherencia y la compatibilidad con los requisitos de trazabilidad establecidos en la Directiva 2004/23/CE para células y tejidos humanos, y en la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 2003, por la que se establecen normas de calidad y de seguridad para la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre humana y sus componentes (6). El sistema de trazabilidad debe respetar asimismo las disposiciones de la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de

1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos (2, 7).

#### **4. EJEMPLOS**

Dentro de todos los ensayos clínicos de terapia avanzada destacar por su amplio uso las células mesenquimales multipotentes (*Multipotent Mesenchymal Stromal Cells* (MSC), procedentes de médula ósea o *Bone Marrow* (BM); y hasta cierto punto, de otros tejidos tales como tejidos adiposos. Estas se han utilizado de forma generalizada en varios ensayos de fase II con fines regenerativos incluyendo pacientes con injerto contra huésped, neoplasias malignas hematológicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurológicas y autoinmunes y trasplante de órganos o inmunomoduladores. Los ensayos clínicos pilotos se han completado o están en marcha en varias áreas. Más de 2000 pacientes han sido tratados en todo el mundo con MSC contando con el trasplante alogénico o autólogo de cultivos celulares (13). Actualmente se dispone de datos experimentales y clínicos en referencia a trasplante de células madre hematopoyéticas, por ejemplo el tratamiento de MSC para trastornos autoinmunitarios que indican que son factibles y seguros. Como punto a favor, según un estudio reciente, destacar que no se han registrado en los pacientes tratados temprana toxicidad ni efectos secundarios posteriores, aunque un seguimiento mayor es necesario para establecer conclusiones definitivas respecto al potencial de eventos adversos a largo plazo. Aunque se han reportado mejoras en los pacientes, en la mayoría de los estudios, se carece de una clara demostración de la eficacia de la MSC en este contexto (14). Sin embargo, la seguridad ha planteado preocupaciones que debe tenerse en cuenta antes de embarcarse en grandes ensayos clínicos de MSC. En particular, se ha sugerido que las MSC podría sufrir una transformación maligna durante la expansión *ex vivo* del cultivo necesario para la obtención de un número suficiente de células, que pueden limitar fuertemente la aplicabilidad clínica de MSC. Además, las propiedades proangiogénico y antiapoptótica de MSC teóricamente pueden actuar junto con sus acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras para promover el crecimiento de tumores preexistentes (13). Por ello, necesitamos demostrar en grandes ensayos clínicos aleatorizados, que deben inscribirse a pacientes homogéneos que reciben productos celulares homogéneos, en cuanto a la fuente de tejido, componentes y vía de administración (14). Además de eventos relacionados con el procedimiento como el sangrado y el dolor, hay varios eventos adversos específicos identificado por los organismos reguladores como la FDA de interés potencial en pacientes tratados con terapia celular. Estos incluyen la muerte, eventos cardiovasculares adversos graves (ECAs), anemia y angiogénesis no regulada como retinopatía o malformaciones arterio-venosas y cáncer. Como ejemplo mostrar a los pacientes

que presentan isquemia crítica del miembro, los cuales tienen importantes comorbilidades tales como enfermedad coronaria, diabetes e insuficiencia renal, que contribuyen a una alta tasa de mortalidad en esta población. Dada la frágil naturaleza relativa de esta población de pacientes, la ocurrencia de la muerte durante un estudio no es de extrañar, aunque no deseable. En su revisión sistemática de la literatura identificaron 45 ensayos clínicos de terapia celular autóloga en la isquemia crítica del miembro (CLI), que incluyó siete ECA. La terapia celular en esta población tiene un perfil de seguridad favorable con un 4,2% tasa de eventos adversos en general. No hay aumento de la mortalidad en comparación con los pacientes de control, y no hay aumento en los casos de neoplasias malignas cuando se analizan contra las tasas de incidencia de población. Con respecto a la eficacia, la terapia celular reduce las tasas de amputación en comparación con los controles, así como mejora una variedad de resultados tanto funcionales como alternativos. Según los autores de la investigación sus resultados demuestran que la terapia celular en la CLI tiene una proporción de beneficio-riesgo positivo, que resulta de vital importancia en esta población de pacientes con difíciles y limitadas opciones terapéuticas (15). Otros estudios en pacientes tratados con MSCs para infarto de miocardio y otras enfermedades subrayan el peligro potencial de formación de tejido ectópico. Sin embargo, en los ensayos clínicos hasta la fecha, ningún tejido ectópico o formación de tumores *in vivo* se ha observado. Pocos estudios han intentado abordar específicamente esta preocupación, y factores que gobiernan el destino postinfusión de MSCs y la influencia del ambiente local sobre el comportamiento MSC son todavía en gran parte desconocidos y necesitan más investigación. Por lo tanto, se recomienda un seguimiento estricto y a largo plazo de pacientes tratados con MSCs para supervisar la formación potencial de los tejidos mesenquimales en sitios ectópicos. Desde la perspectiva clínica, la administración simultánea de otros tratamientos, por ejemplo inmunosupresores, puede potenciar o tal vez reducir el beneficio terapéutico de MSCs; este tema debe abordarse en el futuro en los estudios clínicos. También se requieren estudios adicionales para definir el papel de factores relacionados con el paciente, incluyendo el momento óptimo de administración de MSC, así como factores relacionados con el producto, incluyendo dosis de células y el programa de administración (14).

Respecto de la terapia génica, se han realizado grandes progresos en su desarrollo mediado por células madre hematopoyéticas en las últimas dos décadas. Comprender los factores que influyen en la genotoxicidad mediada por el vector permitirá en el futuro el desarrollo de vectores más seguros y protocolos, extendiendo las aplicaciones a las enfermedades que no son inmediatamente fatales. Las formas de reducir los riesgos de la terapia génica o minimizar vienen precedidas del estudio de genotoxicidad relacionadas con el vector de ensayos clínicos en humanos, en estudios *in vitro* y modelos animales. Las preocupaciones

de seguridad se mantienen tras el registro de leucemias asociadas al vector en varios pacientes inscriptos en el ensayo pionero de SCID - X 1 y de síndromes mielodisplástico (MSD) en 2 casos en el ensayo de X-CGD. El desarrollo de métodos para la evaluación del vector viral, su genotoxicidad y diseño de vectores de integración de menor riesgo; es fundamental para aumentar el uso de la terapia genética para tratar con células madre hematopoyéticas (Hematopoietic Stem Cell (HSC)) enfermedades hereditarias o adquiridas (16).

De los resultados de los ensayos clínicos con terapia génica para tratar trastornos de inmunodeficiencia primaria destacar entre los eventos adversos la mutagénesis insercional maligna asociados con estos ensayos. Así que se mantiene intensamente la investigación preclínica en determinar las tendencias de los diferentes vectores virales por su integración genómica. Junto con cuestiones relativas a la expresión del transgén, el paisaje terapéutico ha experimentado un cambio de paradigma en la determinación de seguridad, estabilidad y eficacia de los enfoques de terapia génica. Aunque el mecanismo exacto de neoplasia maligna observada en estos ensayos sigue sin resolverse, es posible que varios factores contribuyan a la oncogénesis (17).

## **5. CONCLUSIONES**

Tras una idea general transmitida por el texto y específica tras analizar diferentes ejemplos, como dato significativo y motivador, se muestra la existencia de los métodos y las herramientas para controlar los riesgos expuestos. Evidentemente se aprecia también que cada vez se conocen mejor los medicamentos de terapia avanzada minimizando los riesgos inherentes, al anticiparse al daño.

La identificación de los riesgos potenciales, la caracterización y evaluación y por último mediante la gestión conseguir la fijación de límites que nos permiten controlar con éxito todo problema asociado a la terapéutica referido a la calidad, la seguridad y la eficacia del medicamento. Además en todas estas etapas desarrollo de un medicamento conseguimos mediante la práctica y el estudio mayor información de los medicamentos, la cual nos permitirá gestionar en todo momento los riesgos mediante controles o límites adecuados. Después de ello, la gestión del riesgo asegura controles para reducir los riesgos a un nivel aceptable, en consonancia con el beneficio potencial de la terapia. En definitiva, se busca desde el principio la identificación de riesgos y su mitigación.

Como se puede apreciar en los ejemplos, los vectores están en el punto de mira de la seguridad. Obvio resulta también que las diferencias entre terapia celular, terapia génica e ingeniería de tejidos; generan a su vez diferentes riesgos.

Los estudios postautorización serán vitales para controlar la seguridad de los medicamentos al pasar de datos resultados de los ensayos clínicos de una población determinada y de un número pequeño de pacientes durante un espacio corto-medio de tiempo, a un uso generalizado por la diversa y diferente población durante medio-largo plazo.

Un buen sistema de control y vigilancia de la seguridad de los medicamentos debe encaminarse a identificar los riesgos que éstos presentan e intentar encaminarse a su reducción y si es posible, su eliminación mediante los avances científicos y técnicos de la medicina. En ese sistema de control, después de toda terapia o ensayo clínico, no puede faltar la trazabilidad completa del paciente, producto y de sus materias primas; es esencial mediante un sistema que permita la monitorización de la seguridad de los medicamentos de terapia avanzada.

El uso generalizado en la práctica clínica depende de esos datos de seguridad y no solo de la eficacia. Sin duda a la terapia avanzada el proverbio “a grandes males, grandes remedios” le viene como “anillo al dedo”.

## **6. REFERENCIAS**

1. Pirnay, JP.; Vanderkelen, A.; De Vos, D.; Draye JP.; Rose, T.; Ceulemans C.; et al. Business oriented EU human cell and tissue product legislation will adversely impact Member States' health care systems. *Cell Tissue Bank* (2013).
2. Reglamento 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos terapia avanzada y por el que se modifican Directiva 2001/83/CE y el Reglamento 726/2004.
3. Guideline on safety and efficacy follow-up-risk management of advanced therapy medicinal products. EMEA/149995/2008. European Medicines Agency [acceso 4 de diciembre de 2013]. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Regulatory\\_and\\_procedural\\_guideline/2009/10/WC500006329.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2009/10/WC500006329.pdf).
4. Directiva 2003/63/CE de la Comisión de 25 de junio de 2003 que modifica la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano.
5. Jones, DR.; McBlane, JW.; McNaughton, G.; Rajakumaraswamy, N.; Wydenbach, K. A regulatory perspective of clinical trial applications for biological products with particular emphasis on Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs). *Br J Clin Pharmacol* **76**(2), 203-209 (2013).
6. Giancola, R.; Bonfini, T.; Iacone, A. Cell therapy: cGMP facilities and manufacturing. *Muscles Ligaments Tendons J.* **2**(3), 243-247 (2012).
7. Benoit, E.; O'Donnell, TF.; Patel, AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant* **22**(3), 545-562 (2013).
8. Au, P.; Hursh, DA.; Lim, A.; Moos, MC Jr.; Oh, SS.; Schneider, BS.; et al. FDA oversight of cell therapy clinical trials. *Sci Transl Med.* **4**(149), 149fs31 (2012)
9. Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.
10. Ramos, S. *Responsabilidad civil del medicamento.*; Civitas Ediciones.; Madrid, 2004.
11. Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
12. Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad.
13. Casiraghi, F.; Remuzzi, G.; Abbate, M.; Perico, N. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies. *Stem Cell Rev.* **9**(1), 65-79 (2013).

14. Bernardo, ME.; Fibbe, WE. Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy in autoimmune disorders. *Ann N Y Acad Sci* **1266**, 107-117 (2012).
15. Benoit, E.; O'Donnell, TF.; Patel, AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant*, **22**(3), 545-562 (2013)
16. Wu, C.; Dunbar, CE. Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity. *Front Med* **5**(4), 356-371 (2011).
17. Mukherjee, S.; Thrasher AJ. Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. *Gene* **525**(2), 174-181 (2013).





## Efectos cardioprotectores de reducción de tamaño del infarto de miocardio y prevención del remodelado ventricular post-infarto del agonista del receptor de esfingosina-1-fosfato: estudio experimental en un modelo porcino de isquemia-reperfusión

Carlos García Santos-Gallego\*

\*e-mail: carlossantos@yahoo.es

*An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 3 (2014), pag. 694-719*

*Premio "Real Academia Nacional de Farmacia" en el Concurso Científico 2013 de la Real Academia Nacional de Farmacia.*

### RESUMEN

La isquemia miocárdica induce fenómenos de muerte celular por necrosis y apoptosis. La apoptosis es un proceso que requiere energía (dependiente de oxígeno y ATP), por lo que -aunque los genes proapoptóticos se activen durante la isquemia- el programa apoptótico no se lleva a cabo hasta la reperfusión (cuando el oxígeno está nuevamente disponible para sintetizar ATP). La esfingosina 1-fosfato es un fosfolípido presente en el cuerpo con propiedades antiapoptóticas ya demostradas. Fingolimod es el único agonista sintético del receptor de esfingosina 1-fosfato (S1P-R) que está aprobado para uso en pacientes (en concreto, para esclerosis múltiple). Nuestra hipótesis consiste en que la activación del receptor S1P-R mediante el tratamiento con Fingolimod durante el periodo isquémico del infarto agudo de miocardio disminuye la apoptosis, aumenta el miocardio preservado, reduce el tamaño de infarto y mitiga el remodelado del ventrículo izquierdo en un modelo porcino de isquemia-reperfusión (I-R). Se indujo isquemia-reperfusión en cerdos Yorkshire mediante la oclusión percutánea de la arteria coronaria descendente anterior en su segmento proximal durante 60 minutos. Los animales fueron aleatorizados a recibir Fingolimod o salino (grupo control). Los animales fueron evaluados con resonancia magnética cardiaca (RM), ecocardiografía 3D, técnicas de hemodinámica invasiva, histología y análisis por Western blot. En un estudio inicial, se observó los cerdos tratados con Fingolimod presentaban a las 24 horas post-IAM menos apoptosis en el miocardio isquémico y más activación de proteínas cardioprotectoras y anti-apoptóticas que los cerdos

del grupo control. En un estudio a largo plazo, la RM cardiaca una semana post-infarto (IAM) mostró que, a pesar de tener un tamaño similar de área en riesgo en el miocardio en ambos grupos, Fingolimod redujo significativamente el tamaño del infarto y mejoró la función sistólica del ventrículo izquierdo (VI). Estos efectos cardioprotectores seguían asimismo presentes un mes post-IAM, pues los cerdos tratados con Fingolimod presentaban menor tamaño de IAM, mejor función sistólica de VI y menor remodelado cardiaco a nivel anatómico (expresado como menos dilatación de VI, menor masa de VI y menor pérdida de la morfología normal del VI). Adicionalmente, Fingolimod mitigó el desarrollo del remodelado adverso del ventrículo izquierdo a nivel histológico (una disminución de la hipertrofia de los cardiomiocitos y de la fibrosis intersticial) y molecular (menor activación de Akt y de ERK1/2). Finalmente, el grupo Fingolimod presentaba asimismo menor activación neurohormonal (medida como menores niveles de catecolaminas). La activación precoz de S1P-R mediante el tratamiento con Fingolimod previo a la reperfusión provoca efectos cardioprotectores beneficiosos, incrementa el miocardio salvado, reduce el tamaño de infarto, mejora la función sistólica y la mecánica miocárdica del VI y mitiga el remodelado cardiaco adverso post-IAM.

**Palabras clave:** Infarto de miocardio; daño por isquemia-reperfusión; remodelado del VI; esfingosina 1-fosfato; miocardiopatía; apoptosis; farmacología.

### **ABSTRACT**

**Cardioprotective effects of reduction in size of the myocardial infarction and prevention of the ventricular remodeling post-infarction sphingosine-1-phosphate receptor agonist: an experimental study in a porcine model of ischemia-reperfusion**

Myocardial ischemia induces cell death due to necrosis or apoptosis. Apoptosis requires energy (obtained from oxygen and ATP). Although proapoptotic genes are activated during ischemia the apoptotic program does not take place until re-perfusion (when oxygen is again available to synthesize ATP). Sphingosine -1-phosphate is a phospholipid with known antiapoptotic properties. Fingolimod is the only synthetic agonist known of sphingosine-1-phosphate receptor (S1P-R) approved for use in patients (with multiple sclerosis). Our hypothesis is that activation of S-1-P R with Fingolimod during the period of ischemia of acute myocardial infarction decreases apoptosis, reduce the size and the process of remodeling of left ventricle in a porcine model of ischemia-reperfusion (I-R). Thus, I-R was induced in Yorkshire pigs by occlusion of coronary artery in its proximal segment during 60 min. and treated or not with Fingolimod. Animals were evaluated by cardiac magnetic resonance (RM), echocardiography 3D, hemodynamic techniques, histology and Western blot

analysis. Pigs treated with Fingolimod after 24 hr showed lower apoptosis of the myocardium and activation of antiapoptotic proteins Tan control group. In a long term study Fingolimod reduced the size of infarction and improved systolic function of left ventricle. In addition Fingolimod decreased cardiomyocytes hypertrophy and activation of molecular parameters as Akt and ERK 1/2. We conclude that early activation of S1P-R by Fingolimod reduces the size of infarction improves systolic function and mitigates adverse cardiac remodelling .

**Keywords:** Myocardial infarction; ischemia-reperfusion; Sphingosine -1-phosphate; cardiomyopathy; apoptosis; pharmacology.

## 1. INTRODUCCIÓN

La reperfusión precoz mediante cateterismo cardiaco/angioplastia coronaria o mediante trombolisis es el método más utilizado actualmente en el tratamiento de pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). La reperfusión temprana reduce con éxito el tamaño de infarto, preserva la función cardíaca y disminuye la morbilidad y la mortalidad (1). Desafortunadamente, la reperfusión no siempre es suficiente para conseguir la recuperación adecuada del miocardio. De hecho, la reperfusión por sí misma puede paradójicamente inducir el daño del cardiomiocito y muerte celular, fenómeno llamado daño por isquemia-reperfusion (I-R) (2,3). Por esta razón son necesarias intervenciones farmacológicas para reducir mejor el tamaño del infarto, preservar la función del ventrículo izquierdo, mitigar el remodelado y, por consiguiente, mejorar la supervivencia en pacientes con IAM.

La isquemia miocárdica induce fenómenos de muerte celular por necrosis y apoptosis, que son los causantes del infarto final. Durante el periodo isquémico se produce necrosis pero además se activa la apoptosis. La apoptosis es un proceso que requiere energía (es un proceso dependiente de oxígeno y ATP), por lo que - aunque los genes proapoptóticos se activen durante la isquemia- el programa apoptótico no se lleva a cabo hasta la reperfusión (cuando el oxígeno está nuevamente disponible para sintetizar ATP). Es decir, la apoptosis se activa durante la isquemia pero se efectúa durante la reperfusión. Por ello, la reperfusión, aunque beneficiosa para evitar la muerte por necrosis, paradójicamente puede tener efectos perjudiciales al poner en marcha la muerte celular por apoptosis. Este es el origen de la lesión por isquemia reperfusión (I-R), que es responsable hasta del 50% del tamaño final del IAM (2,3). Por ello, se postula que fármacos antiapoptóticos podrían disminuir la lesión por I-R.

La esfingosina-1-fosfato (S1P) ha recibido recientemente mucha atención por sus efectos antiapoptóticos y citoprotectores y su potencial para mejorar el daño por I-R (4). S1P es un lipofosfolípido bioactivo derivado del lípido de

membrana esfingomielina (5). De una manera importante, se ha demostrado recientemente que S1P reduce el daño por I-R en el hígado (6), riñón (7), páncreas (8), y en el cerebro (9). En experimentos *in vitro*, S1P aumenta la supervivencia del cardiomiocito en condiciones de hipoxia (10,11), y reduce el tamaño del infarto en experimentos *ex vivo* de preparaciones de corazones aislados (12,13). Además, experimentos *in vivo* iniciales también apoyan el papel cardioprotector de S1P en ratones durante el IAM (14,15).

Nuestra estrategia final consiste en aplicar un fármaco antiapoptótico al paciente que sufre un IAM ya durante el traslado en ambulancia del paciente al hospital, es decir antes de la reperfusión. Para facilitar la aplicación de nuestros hallazgos a la práctica clínica, elegimos un agonista de los receptores de S1P (S1P-R). Fingolimod, un derivado sintético de la miriocina (un metabolito del hongo *Isariasinclairii*), es el único agonista de S1P-R disponible para el uso clínico en humanos (16). Fingolimod reduce las recurrencias y las lesiones en cerebro (medidas por resonancia magnética) en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente (17,18), y fue aprobado por la Asociación Americana de Medicamentos y Alimentos (FDA) en Septiembre de 2010 como tratamiento de primera línea para estos pacientes. Además, la activación de S1P-R mediada por Fingolimod podría ser una terapia prometedora con el objetivo de mejorar la recuperación del miocardio durante el IAM. De hecho, estudios preliminares han demostrado que Fingolimod reduce la apoptosis del cardiomiocito en experimentos *in vitro* en condiciones de hipoxia (4,19-21). Sin embargo, aunque estos estudios preliminares son muy prometedores, el efecto cardioprotector de Fingolimod no se han estudiado todavía en modelos *in vivo*.

Nuestra hipótesis consiste en que la activación de S1P-R con Fingolimod durante la isquemia reduce la apoptosis de los cardiomiocitos dando lugar a un aumento de la recuperación miocárdica, disminución del tamaño de infarto y reducción del remodelado del VI en un modelo porcino de I-R.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***2.1. Diseño del estudio***

Utilizamos cerdos Yorkshire albinos (20±2kg) para este estudio, que fueron alojados en un animalario acreditado por la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio. Todos los experimentos se realizaron manteniendo a los animales anestesiados. Justo antes de la inducción del IM se realizaron ecocardiografías 2D y 3D. Seguidamente se llevó a cabo un modelo de I-R tal y como está descrito previamente por nuestro grupo (22).

En el primer grupo de animales, indujimos IAM en 10 cerdos (5 tratados con Fingolimod 1mg/kg IV 15 minutos antes de la reperfusión, 5 controles), que fueron

sacrificados a las 24 horas post-IAM para la valoración de la apoptosis y la activación de rutas moleculares en la zona del borde del miocardio isquémico.

Para el análisis a largo plazo, indujimos IAM en 14 animales. Los animales fueron aleatorizados a tratamiento con Fingolimod (1mg/kg IV, Cayman) 15 minutos antes de la reperfusión y una vez al día durante los siguientes 3 días, o con salino (grupo control) con un diseño 1:1. Una semana post-IAM se tomaron imágenes por resonancia magnética (RM, para la cuantificación de la función del VI, área en riesgo -AAR-<sup>23</sup> y tamaño de IAM) y ecocardiografía 2D y 3D para estudiar la mecánica del VI. Así mismo se repitieron estas técnicas 1 mes después del IM. Al finalizar las técnicas de imagen los animales fueron evaluados por técnicas invasivas de hemodinámica (análisis de presión-volumen) y seguidamente sacrificados para la toma de muestras de tejido.

## ***2.2. Inducción del Infarto Agudo de Miocardio***

Doce horas antes de la inducción del IM todos los animales recibieron una dosis oral de clopidogrel 150 mg. El día del IM la anestesia de los animales se indujo con telazol (6 mg/kg i.m.) y se mediante administración intravenosa constante de propofol (10 mg/kg/hr). Los cerdos fueron medicados con 3000 UI de heparina IV, 75 mg de amiodarona IV y atropina (0,04mg/kg). Se administró una perfusión continua a 2 ml/kg/hr que contenía amiodarona 75 mg, cloruro de potasio 10mEq y atropina 0,04 mg/kg.

Llevamos a cabo el acceso arterial a través de la arteria femoral por punción percutánea. Colocamos un introductor arterial de 7,5 French mediante técnica de Seldinger e insertamos un catéter guía coronario de 7 French desplazándolo hasta la arteria aorta ascendente hasta alcanzar el tronco coronario izquierdo. Realizamos una angiografía en el momento inicial. Bajo fluoroscopia, implantamos una guía coronaria en la arteria coronaria descendente anterior (DA). Sobre esa guía coronaria, implantamos un catéter balón de angioplastia (TREK OTW Coronary Dilation Catheter 4.0 x 15 mm, Abbot Vascular) en el segmento proximal de la DA inmediatamente proximal a la salida de la primera rama septal. De esta manera indujimos el IM por oclusión de la DA proximal durante 60 minutos inflando el globo en la arteria coronaria a 10 atm. A lo largo de todo el proceso, mantuvimos a los animales monitorizados con un EKG y un sistema invasivo para la medida de la presión sanguínea. Fue necesario prestar una atención especial para la detección temprana de arritmias ventriculares para llevar a cabo la desfibrilación. Tras 60 minutos, deshinchamos el balón y retiramos el catéter de la DA. La reperfusión fue documentada con un angiograma final. Retiramos entonces el introductor arterial y realizamos compresión manual sobre la zona de punción durante unos 15-20 minutos para hemostasia. El cuidado tras este procedimiento consistió en cefazolina (25 mg/kg) como profilaxis antibiótica, buprenorfina como

profilaxis analgésica (0,1 mg/kg), e infusión continua de amiodarona (150 mg en 500 ml de salino, a pasar en 12 horas) como profilaxis antiarrítmica.

### **2.3. Eutanasia**

Inmediatamente tras la realización de RM y ecocordio, los animales fueron sacrificados por inyección intravenosa de cloruro de potasio (20 mEq inyectados a través del acceso venoso central en la vena femoral), se extrajeron los corazones y se realizaron siete cortes del mismo grosor a lo largo del eje corto del VI. Se recogieron muestras de tejido de la zona de la cicatriz, borde y remota, parte se incluyó y congeló en medio OCT (TissueTek, California) para los estudios histológicos y parte se congeló para el análisis molecular. Visualizamos el tamaño final del infarto en los cortes restantes a través de la tinción con cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) y se tomaron imágenes de alta resolución pudiendo diferenciar el área del infarto (blanco) y el miocardio normal (rojo). Las imágenes se cuantificaron utilizando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). El volumen de infarto se expresó como porcentaje del volumen total del miocardio.

### **2.4. Imagen cardiaca por resonancia magnética**

Los estudios por resonancia magnética (RM) se realizaron en un equipo de RM de 3.0 Tesla (Achieva, Philips Medical System, Netherlands). Se realizó una secuencia de cine en el eje corto del VI (TR 3,6 ms, TE 1,6 ms, flipangle 45°, campo de visión 250 x 250 mm) desde la base hasta el ápex del VI para la cuantificación de los volúmenes, masa y fracción de eyección del VI (FEVI). A continuación realizamos una secuencia spin echo potenciada en T2(STIR, TR 2-3 latidos, TE 60 ms, TI 210 ms, campo de visión 250 x 250 mm, SENSE factor 3) para la medida del edema y determinación del área en riesgo (AAR). Realizamos realce tardío de gadolinio 15 minutos después de la administración del gadolinio (Magnevist, 0,2 mmol/kg) usando una secuencia de inversión-recuperación (TR 9 ms, TE 5,4 ms, TI optimizado para anular el miocardio sano, campo de visión 250 x 250 mm). Después del realce tardío, infundimos dobutamina a 5µg/kg/min y repetimos la secuencia SSFP para la determinación de la reserva contráctil.

Todas las imágenes de RM fueron analizadas de manera ciega usando un software comercial (Extended MR Workspace, Philips Medical Systems, Netherlands). Se trazaron los contornos del epicardio y del endocardio en cada una de las imágenes SSFP para la obtención de los volúmenes sistólicos y diastólicos finales (LVEDV y LVESV), FEVI y la masa del VI; por convención, los músculos papilares se incluyeron en la cavidad del VI. Para la determinación del AAR y de tamaño de IAM se delimitaron manualmente los bordes epicárdicos y endocárdicos de cada uno de los cortes del eje corto en las secuencias STIR e inversión-



recuperación, respectivamente; las áreas hiperintensas (intensidad de señal superior a tres veces la desviación estándar del miocardio remoto sano) definió el AAR y la escara. El VI se dividió en 16 segmentos y a cada segmento se le asignó una puntuación del cero al cuatro, teniendo en cuenta el porcentaje de miocardio cicatrizado (0- sin cicatriz, 1- menos del 25% de cicatriz, 2- del 25 al 50% de cicatriz, 3- del 50 al 75% de cicatriz, 4- más del 75% de cicatriz). La puntuación final (el índice de transmuralidad de la cicatriz) fue calculado como la suma de los 16 segmentos. El miocardio preservado se calculó como la diferencia entre el área en riesgo (edema medido en secuencias SE potenciadas en T2) y el tamaño de la cicatriz (medida a partir del realce tardío de gadolinio). El índice de miocardio preservado del miocardio se calculó como  $[\text{Área en Riesgo (g)} - \text{Tamaño de IAM (g)}] / \text{Área en Riesgo (g)}$  y expresado como porcentaje del VI.

### ***2.5. Ecocardiografía***

Realizamos ecocardiografía 2D con un sistema iE33 con transductor S5 (Philips Medical Systems, Andover, MA) de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía y de la Sociedad Europea de Ecocardiografía (24,25). Las imágenes fueron analizadas con el software comercial Q-Lab (Philips Medical Systems, Andover, MA). Las imágenes ecocardiográficas en 3D del volumen total se adquirieron con este mismo sistema iE33 utilizando un transductor X3 (Philips Medical Systems, Andover, MA). Se tuvo un especial cuidado a la hora de incluir la cavidad del VI dentro del volumen piramidal del transductor. Los ajustes para la adquisición de la imagen fueron optimizados para una visualización óptima del endocardio y al menos se adquirieron y guardaron tres datos para las posteriores medidas. La imagen en 3D de la superficie del endocardio se construyó de una forma semiautomática a lo largo del ciclo cardiaco. Seguidamente se ajustó manualmente la superficie si era necesario. Para determinar la deformación global del miocardio, realizamos un análisis de strain 3D utilizando el software 4D (Tom Tec Imaging Systems, Germany). Se seleccionaron vistas apicales a diferentes niveles de dos-cámaras, cuatro-cámaras y eje corto al final de la diástole. El VI se dividió en 16 segmentos de tres dimensiones usando una segmentación estándar. Se midieron los strains longitudinal (LS), circunferencial (RS) y radial (RS) globales en 3D y se hizo la media de los 16 segmentos. El índice de esfericidad del VI se calculó como el cociente eje mayor (longitudinal) del VI / eje menor (transversal) del VI en un eje apical de cuatro-cámaras (Figura 5C), como estaba descrito previamente (26). Calculamos el grosor relativo de la pared como  $2 \times \text{Grosor de la Pared Posterior} / \text{Diámetro del VI}$  al final de la diástole (26).

### ***2.6. Hemodinámica invasiva con microcatéter***

Las curvas de presión-volumen del VI se obtuvieron un mes después del infarto e inmediatamente antes del sacrificio para determinar las diferencias

hemodinámicas entre grupos. A través de la arteria femoral, introdujimos un microcatéter de tipo Millar de 7F (Millar Instruments Inc., Houston, TX) hasta el ápex del VI y tomamos durante las siguientes medidas: presión sistólica, presión al final de la diástole, tasa máxima de cambio de la presión en el VI (dP/dt) máx, y trabajo cardiaco; el índice de contractilidad fue calculado como (dP/dt) máx / (presión telesistólica de VI – presión telediastólica de VI). Cada parámetro se calculó a partir de la media de, al menos, tres ciclos cardiacos consecutivos.

### **2.7. Niveles plasmáticos de metanefrinas**

Se tomaron muestras de plasma quince minutos tras la inserción del introductor arterial y teniendo al animal anestesiado y en un estado de reposo. Los niveles de metanefrinas se determinaron utilizando un método de ELISA (Rocky Mountain Diagnostics Colorado Springs, Co).

### **2.8. Análisis histológico**

Los corazones incluidos en OCT se cortaron a 8  $\mu\text{m}$  y fueron usados para analizar fibrosis y tamaño de los cardiomiocitos en el tejido miocárdico remoto, no isquémico y para la determinación de la apoptosis en el tejido del borde del infarto. Para analizar el tamaño celular, se realizó una inmunohistoquímica para vinculina (#V9131, Sigma-Aldrich). Para ello utilizamos tres cortes de cada muestra que fueron permeabilizados y bloqueados con Triton 0,3% y con BSA 1% respectivamente. El anticuerpo primario anti-vinculina a una dilución 1:100 fue incubado durante toda la noche y a 4°C. Tras varios lavados con PBS, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario, Alexa Fluor 488 Goat Anti-mouse (#A11001, Invitrogen) a una dilución 1:500 durante 1h a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS, las preparaciones se montaron con medio de montaje con DAPI (#H-1500, Vector Lab) y se tomaron imágenes digitales (microscopio Zeiss Axioplan2 y el programa Zeiss Axio Vision, Micro-optik). El área y tamaño de los cardiomiocitos fueron cuantificados con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Para la determinación de la fibrosis intersticial, se tiñeron 3 cortes de cada muestra con Rojo Sirio (Spectrum Chemical) de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial. Las imágenes fueron realizadas con luz polarizada (microscopio Zeiss Axioplan2 y el programa Zeiss Axio Vision (Micro-optik)). Se cuantificó y analizó el área del miocardio positiva para esta tinción con el programa Image Pro Plus.

Para la determinación de la apoptosis celular vía fragmentación del DNA se utilizó un kit ensayo comercial de TUNEL (ApoTag® Florescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit, Millipore) siguiendo el protocolo del manual. Para las cuantificaciones se analizó un mínimo de 10 campos con un objetivo 20X por corte.

### **2.9. Expresión de proteínas**

Para la preparación del extracto proteico de las muestras de corazón se homogeneizaron unos 50 mg de miocardio congelado de cada uno de los animales (RIPA buffer (#R0278, Sigma-Aldrich) con inhibidores de proteasas y un sistema específico de homogeneizado (Fast Prephomogenizer). Después de 20 minutos de centrifugación a 30.000 g, la parte insoluble de la muestra fue descartada y el sobrenadante almacenado a -80°C para posteriores estudios bioquímicos. Para el estudio de la expresión de proteínas, se cargaron 50 µg de proteína junto con tampón de carga (40% β-mercaptoetanol, 8% SDS, 40% glicerol, 0,025% azul de bromofenol, and 0,25 mmol/L Tris, pH 6,4), y se llevó a cabo la separación de las proteínas por electroforesis en geles de acrilamida al 12%. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubó durante toda la noche y a 4°C con los anticuerpos específicos contra las proteínas que queríamos estudiar (Cell Signaling), anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), p44/42 MAPK (Erk1/2), phospo-Akt (Thr308), and Akt (Thr308). La dilución usada para todos ellos fue 1:1000. Tras varios lavados con TBST, se las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 1 hora a 4°C (#RPN4301, Amersham) a una dilución. Un anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (#G8795, Sigma-Aldrich) se usó como control de carga. Para la visualización de las bandas en las películas autorradiográficas utilizamos el sustrato quimioluminiscente ECL-Plus (#RPN2132, Amersham). Las películas fueron densitometradas y analizadas con el programa Image J.

### **2.10. Análisis estadístico**

Los resultados están expresados como la media ± error estándar. La comparación entre ambos grupos, cerdos tratados con Fingolimod y grupo control, se realizó con el test t-test para las medidas tomadas en un único tiempo. Para aquellas medidas tomadas a una semana y a un mes después de la inducción del IM, los datos se analizaron mediante una ANOVA de medidas repetidas seguidos de un análisis post-hoc Tukey para determinar si había diferencias entre los grupos. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Únicamente fueron consideradas significativas aquellas con una  $p < 0,05$ .

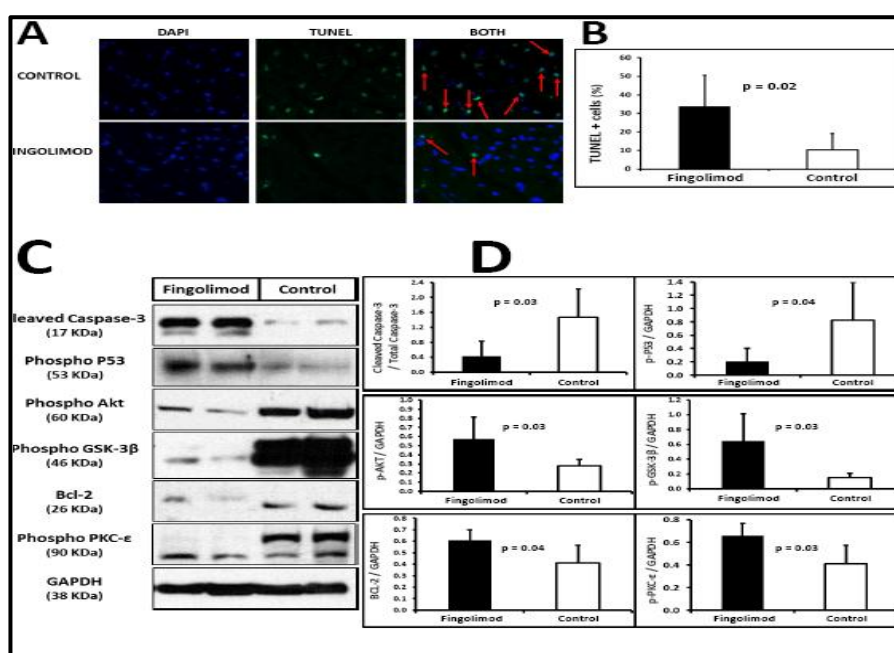
## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***La activación de S1P-R con Fingolimod en el periodo pre-reperfusión redujo la apoptosis de los cardiomiocitos en la zona isquémica 24 horas después del IAM***

La activación de S1P con Fingolimod dio lugar a una reducción significativa del número de núcleos positivos para la tinción de TUNEL indicando una disminución de la apoptosis de los cardiomiocitos (Figura 1A-B) en el grupo Fingolimod. La técnica de Western blot confirma estos resultados pues se observa

una disminución de la activación de proteínas proapoptóticas Caspasa-3 y p53 y un aumento en la activación de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

Además, evaluamos la ruta molecular RISK (Reperfusion Injury Salvaje Kinases), la principal ruta de protección de los cardiomiocitos contra el daño por I-R, que actúa a través de la fosforilación de Akt, PKC- $\epsilon$  y GSK-3 $\beta$ . Nuestros resultados muestran que la fosforilación de Akt, PKC- $\epsilon$  y GSK-3 $\beta$  estaba incrementada significativamente en los cerdos tratados con Fingolimod comparado con los controles (Figura 1C-D). Estos datos indican que la activación de S1P-R con Fingolimod en el periodo pre-reperusión activa la ruta RISK y promueve la citoprotección de los cardiomiocitos.

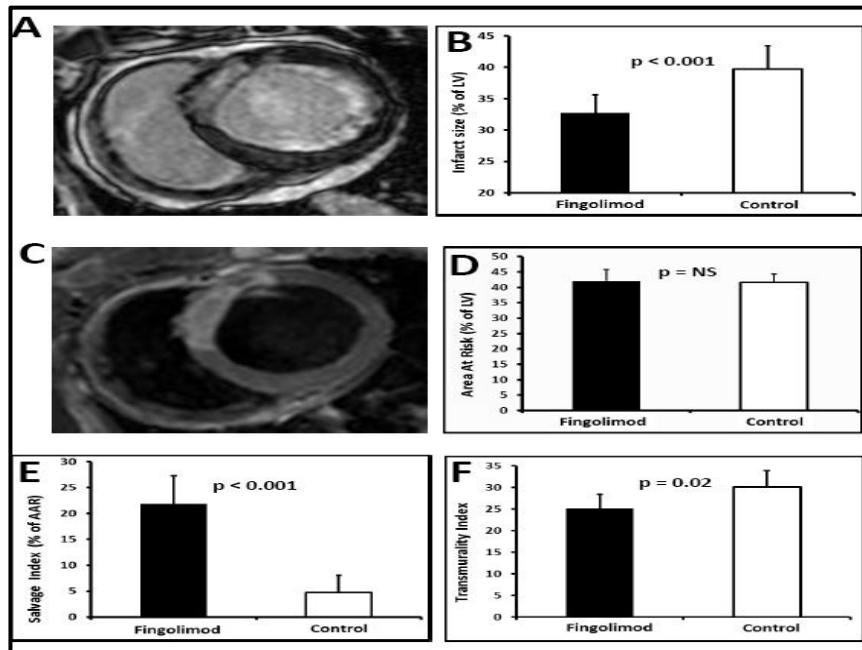


**Figura 1.-El tratamiento con Fingolimod redujo la apoptosis en el miocardio isquémico.** A: Imágenes representativas de DAPI (indicando los núcleos en azul) y de TUNEL (indicando los núcleos apoptóticos en verde) en inmunofluorescencia. Los núcleos positivos para TUNEL se calcularon a partir de las imágenes superpuestas TUNEL+DAPI. B: La cuantificación de las células TUNEL+ muestra menor porcentaje de células apoptóticas en los cerdos tratados Fingolimod. C y D: Western blot revela menor activación de proteínas pro-apoptóticas (caspasa-3 activa o *cleaved caspase-3*, p-P53) y mayor activación de proteínas anti-apoptóticas (p-Akt, p-GSK3- $\beta$ , Bcl-2, p-PKC- $\epsilon$ ) en el miocardio isquémico de los cerdos tratados con Fingolimod. Imágenes representativas de Western blot en C, cuantificación en D.

### **La activación de S1P-R con Fingolimod redujo el tamaño de infarto, aumentó el miocardio preservado y mejoró la función sistólica del VI (FSVI) 1 semana después del IAM**

La activación de S1P-R con Fingolimod dio lugar a un tamaño de infarto significativamente menor tanto en términos de masa infartada absoluta como en porcentaje de miocardio de VI infartado en comparación con los cerdos control (Figura 2A-B, Tabla 1). Dado que AAR medida mediante RM fue similar en ambos grupos (Figura 2C-D, Tabla 1), la activación de S1P-R en el periodo pre-reperusión aumentó el porcentaje de miocardio preservado (Figura 2E, Tabla 1). De hecho, el

porcentaje de miocardio preservado fue 5 veces mayor en los cerdos tratados con Fingolimod que en el grupo control. El índice de transmuralidad, una medida alternativa por RM del tamaño de infarto, también era significativamente menor al cabo de 1 mes en los cerdos tratados con Fingolimod (Figura 2F).



**Figura 2.- El tratamiento con Fingolimod redujo el tamaño de infarto y aumentó el miocardio preservado una semana post-IAM.** A: Imágenes representativas de RM cardíaca para realce tardío de gadolino. Las zonas hiperintensas (blanco) representan el miocardio infartado. B: Cuantificación de tamaño mediante RM; el tamaño de IAM era menor en los cerdos tratados con Fingolimod. C: Imágenes representativas de RM cardíaca para edema. Las zonas hiperintensas (blanco) representan el área en riesgo (AAR), el miocardio sometido a isquemia. D: Cuantificación de AAR mediante RM, que era similar en ambos grupos. E: El tratamiento con Fingolimod aumentó significativamente el miocardio preservado. F: El índice de transmuralidad, una medida alternativa de tamaño de IAM, asimismo mostró que el tamaño de IAM era significativamente menor en los cerdos tratados con Fingolimod. Infarct size: Tamaño de IAM. Area At Risk: Miocardio en riesgo. Myocardial Salvage: Miocardio preservado. Transmurality Index: Índice de transmuralidad.

Inicialmente, FEVI por ecocardiografía-3D y los strain tridimensionales eran similares en ambos grupos pre-IAM (Tabla 2), por lo que había diferencias en la función sistólica del VI antes de la inducción del infarto. Queremos resaltar que el aumento en miocardio preservado debido a la activación de S1P-R con Fingolimod mejoró la función contráctil al cabo de 1 semana. La FEVI era significativamente mayor en el grupo Fingolimod que en el grupo control tanto por RM (Figura 3A, Tabla 1) como por ecocardiografía-3D (Tabla 2). Además, 1 semana post-IAM, tanto el strain tridimensional longitudinal (3D-LS), el strain tridimensional radial (3D-RS) como el strain tridimensional circunferencial (3D-CS) estaban más preservados en los cerdos tratados con Fingolimod que en los controles (Figura 4, Tabla 2).

**La activación de S1P-R redujo el tamaño de IAM y mejoró la FSVI un mes post-IAM**

Al igual que 1 semana post-IAM, el tamaño de infarto medido por RM un mes post-IAM era significativamente menor en los cerdos tratados con Fingolimod en comparación con los controles (Tabla 1). Además, el índice de transmuralidad también era significativamente menor en los cerdos tratados con Fingolimod. La reducción en el tamaño final de infarto fue confirmada por histología utilizando la tinción con TTC (23,32±3,78 vs 29,73±4,92 % del volumen del VI para el grupo Fingolimod y control respectivamente, p=0,02). Hubo además una excelente correlación entre el tamaño de infarto al cabo de un mes cuantificado por LGE y por tinción con TTC (r=0,90, p=0,01).

**Tabla 1.- Resultados de RM cardiaca una semana y un mes post-IAM.**

|   | 1 semana post-IAM |             |         | 1 mes post-IAM |             |         |
|---|-------------------|-------------|---------|----------------|-------------|---------|
|   | Control           | Fingolimod  | p-Value | Control        | Fingolimod  | p-Value |
| Tamaño de IAM (% de VI)                                       | 39,69±3,71        | 32,76±2,88  | 0,002   | 32,22±4,44     | 25,47±4,60  | 0,01    |
| Área en Riesgo (% de VI)                                      | 41,63±2,74        | 42,01±3,74  | 0,83    |                |             |         |
| Miocardio preservado (% de Área en Riesgo)                    | 4,78±3,28         | 22,86±5,39  | <0,001  |                |             |         |
| Miocardio preservado (% de VI)                                | 1,93±1,22         | 9,26±2,84   | <0,001  |                |             |         |
| Índice de transmuralidad                                      | 26,43±3,64        | 20,83±3,87  |         | 26,43±3,64     | 20,83±3,87  | 0,04    |
| Masa de VI (g)  | 60,54±4,71        | 52,43±2,43  | 0,01    | 72,18±5,53     | 62,97±3,91  | 0,005   |
| VTdVI (ml)  | 83,70±15,35       | 73,57±15,87 | 0,25    | 118,33±22,14   | 96,96±15,98 | 0,08    |
| VTSVI (ml)  | 55,86±12,08       | 44,72±11,14 | 0,1     | 79,61±19,15    | 55,09±13,50 | 0,02    |
| FEVI (%)  | 33,61±2,84        | 39,61±4,16  | 0,008   | 33,30±4,26     | 43,68±5,85  | 0,001   |
| Volumen Latido de VI (ml)                                     | 27,86±3,56        | 29,01±5,35  | 0,64    | 38,73±3,77     | 41,85±5,14  | 0,23    |
| Peak ejection rate (ml/ms)                                    |                   |             |         | 0,16±0,04      | 0,29±0,04   | <0,001  |
| ΔLVEF, Incremento de FEVI desde 1 semana a 1 mes post-IAM (%) |                   |             |         | 0,24±2,20      | 3,93±1,83   | 0,004   |
| Reserva contráctil (FEVI máxima con dobutamina, %)            |                   |             |         | 35,94±8,21     | 55,66±10,34 | 0,007   |
| Reserva contráctil (ΔLVEF con dobutamine, %)                  |                   |             |         | 2,88±3,70      | 11,99±5,56  | 0,01    |

FEVI: Fracción de Eyección del VI. VTdVI: Volumen TeleDiastólico del VI. VTSVI: Volumen TeleSistólico del VI.

La activación de S1P-R también resultó en una mejora de la función sistólica un mes post-IAM. Los animales tratados con Fingolimod mostraron mayor FEVI que los cerdos control tanto por RM (Tabla 1) como por ecocardiografía-3D (Tabla 2). Además, en los cerdos Fingolimod la FEVI por RM mejoró en el periodo



comprendido entre una semana y un mes mientras que se mantuvo igual en los cerdos control (Figura 3B, cambio absoluto de FEVI  $3,9 \pm 1,8\%$  vs.  $-0,2 \pm 2,2\%$  en el grupo Fingolimod y control respectivamente,  $p=0,004$ ). Además, la reserva contráctil con dobutamina estaba aumentada en los animales tratados con Fingolimod (Figura 3C), incremento absoluto en la FEVI  $12 \pm 5,5\%$  vs.  $2,8 \pm 3,7\%$  en el grupo Fingolimod y control respectivamente,  $p=0,01$ ).

**Tabla 2.- Resultados de ecocardiografía 3D pre-IAM, una semana y un mes post-IAM.**

|   | Control            | Fingolimod         | P-value |
|---|--------------------|--------------------|---------|
| 3D-FEVI pre-IAM (%)                               | $71,59 \pm 3,03$   | $71,50 \pm 1,34$   | 0,95    |
| 3D-FEVI 1 semana post-IAM (%)                     | $32,98 \pm 4,88$   | $40,15 \pm 5,02$   | 0,04    |
| 3D-FEVI 1 mes post-IAM (%)                        | $34,24 \pm 5,26$   | $44,71 \pm 6,96$   | 0,001   |
| 3D-VTDVI pre-IAM (mL)                             | $43,81 \pm 4,38$   | $40,97 \pm 6,46$   | 0,37    |
| 3D-VTDVI 1 semana post-IAM (mL)                   | $66,94 \pm 6,40$   | $62,32 \pm 7,68$   | 0,31    |
| 3D-VTDVI 1 mes post-IAM (mL)                      | $93,99 \pm 17,70$  | $81,03 \pm 15,39$  | 0,18    |
| 3D-VTSVI pre-IAM (mL)                             | $12,4 \pm 1,15$    | $11,67 \pm 1,89$   | 0,41    |
| 3D-VTSVI 1 semana post-IAM (mL)                   | $45,06 \pm 7,25$   | $37,30 \pm 5,29$   | 0,07    |
| 3D-VTSVI 1 mes post-IAM (mL)                      | $65,27 \pm 17,35$  | $45,33 \pm 12,64$  | 0,03    |
| 3D-Strain Longitudinal - pre-IAM (%)              | $-21,4 \pm 1,45$   | $-22,13 \pm 3,0$   | 0,60    |
| 3D-Strain Longitudinal - 1 semana post-IAM (%)    | $-9,33 \pm 2,81$   | $-14,43 \pm 1,77$  | 0,005   |
| 3D-Strain Longitudinal - 1 mes post-IAM (%)       | $-11,35 \pm 1,70$  | $-16,34 \pm 1,95$  | <0,001  |
| 3D-Strain Circunferencial- pre-IAM (%)            | $-27,18 \pm 4,08$  | $-24,5 \pm 5,3$    | 0,37    |
| 3D-Strain Circunferencial - 1 semana post-IAM (%) | $-10,73 \pm 2,72$  | $-17,06 \pm 5,35$  | 0,04    |
| 3D-Strain Circunferencial - 1 mes post-IAM (%)    | $-11,86 \pm 3,81$  | $-16,6 \pm 3,94$   | 0,03    |
| 3D-Strain Radial- pre-IAM (%)                     | $129,42 \pm 46,31$ | $120,21 \pm 31,41$ | 0,69    |
| 3D-Strain Radial - 1 semana post-IAM (%)          | $26,94 \pm 9,82$   | $55,95 \pm 20,42$  | 0,03    |
| 3D-Strain Radial - 1 mes post-IAM (%)             | $32,77 \pm 10,59$  | $62,51 \pm 20,45$  | 0,005   |

FEVI: Fracción de Eyección del VI. VTDVI: Volumen TeleDiastólico del VI. VTSVI: Volumen TeleSistólico del VI.

Las técnicas de hemodinámica invasiva corroboraron la mejor función sistólica en el grupo Fingolimod, pues presentaba  $dP/dt_{m\acute{a}x}$ , trabajo latido (strokework) índice de contractilidad y presión telesistólica del VI significativamente mayores que los controles (Figura 3D-F, Tabla 3).

Para caracterizar mejor la FSVI, determinamos la función mecánica del VI mediante strain-3D. Los cerdos tratados con Fingolimod mostraron significativamente mejores 3D-LS, 3D-CS y 3D-RS un mes post-IAM que los controles (Tabla 2 y Figura 4).

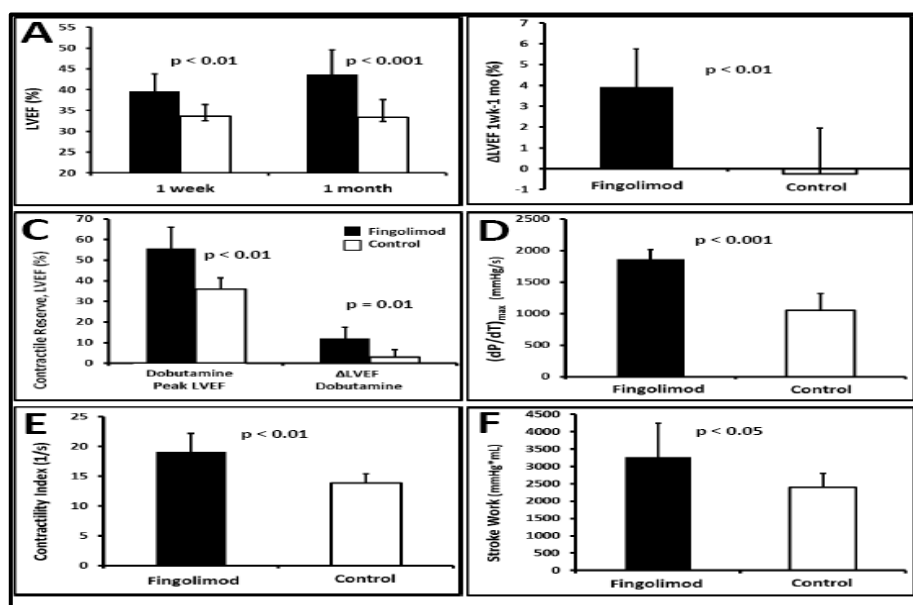
***La activación de S1P-R con Fingolimod en el periodo pre-reperfusión mitigó el remodelado anatómico del ventrículo izquierdo un mes después del IM.***



Las características anatómicas del remodelado post-IAM del VI son dilatación del VI con incremento en los volúmenes del VI, hipertrofia compensatoria del VI con aumento en la masa del VI y cambios en la morfología del VI (desde la geometría elíptica habitual hacia una conformación más esférica). La excesiva activación de la respuesta neurohormonal con activación del sistema simpático (expresado como altos niveles de catecolaminas en plasma) también es un componente importante.

**Tabla 3.- Medidas de función sistólica de VI mediante hemodinámica invasiva un mes post-IAM.**

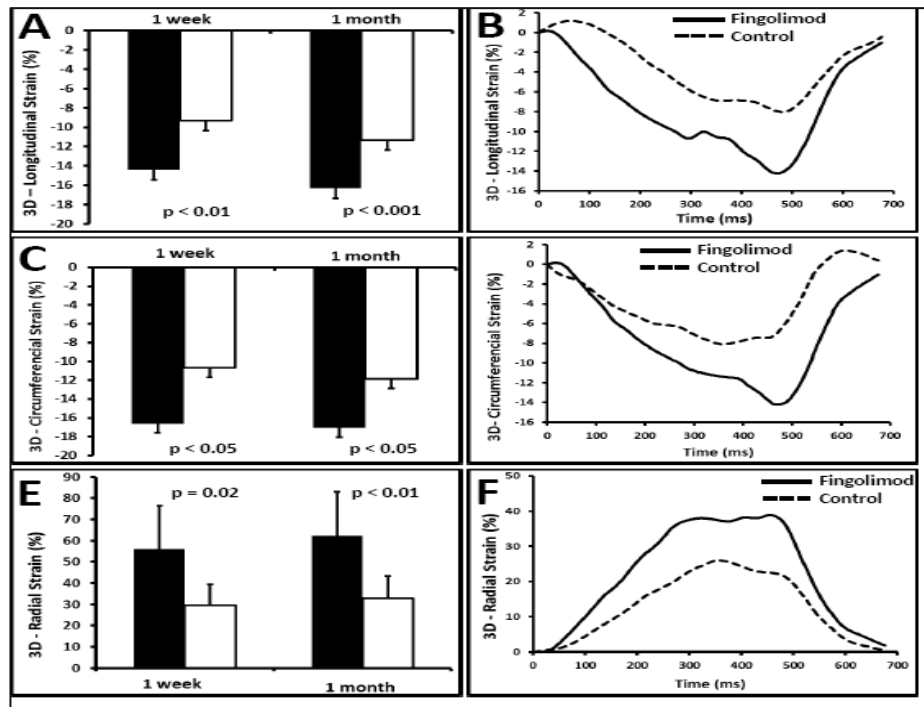
|                                    | Control          | Fingolimod       | P-value |
|------------------------------------|------------------|------------------|---------|
| Presión TeleSistólica de VI (mmHg) | 95,00 ± 10,88    | 116,60 ± 19,68   | 0,03    |
| dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)      | 1056,15 ± 261,03 | 1865,88 ± 147,46 | < 0,001 |
| Índice de Contractilidad (1/s)     | 13,84 ± 1,53     | 19,06 ± 3,11     | < 0,001 |
| Trabajo Latido                     | 2395,67 ± 401,80 | 3269,91 ± 968,46 | 0,047   |



**Figura 3.- El tratamiento con Fingolimod mejoró la función sistólica post-IAM del VI evaluada mediante RM cardíaca (A-C) y mediante hemodinámica invasiva (curvas de presión-volumen, D-F). Los cerdos tratados con Fingolimod (columnas negras) mostraron una mejor función sistólica del VI comparado con el grupo control (columnas blancas): A) FEVI 1 semana post-IAM y 1 mes post-IAM, B) mejoría de la FEVI desde 1 semana post-IAM a un mes post-IAM, C) reserva contráctil con dobutamina, D) (dP/dt)<sub>max</sub>, E) índice de contractilidad, and F) trabajo latido. LVEF: Fracción de Eyección del VI o FEVI. Contractile Reserve: Reserva Contráctil. ContractilityIndex: índice de contractilidad. StrokeWork: Trabajo Latido.**

La RM mostró que los animales tratados con Fingolimod presentaban una masa del VI significativamente menos que los controles (Tabla 1). Cabe destacar que existía una correlación inversa entre la masa del VI y la FEVI ( $r=-0,72$ ,  $p<0,001$ ), y una correlación directa entre la masa del VI y el tamaño del infarto ( $r=0,65$ ,  $p<0,001$ ). Esto indica que los animales con mayor tamaño de infarto y

menor FEVI muestran una mayor hipertrofia compensatoria. Los animales tratados con Fingolimod también presentaron menor índice de grosor de la pared ( $0,34\pm 0,03$  vs.  $0,40\pm 0,05$ ,  $p=0,03$ ), confirmando que el grupo Fingolimod presentaba una respuesta hipertrófica menor.

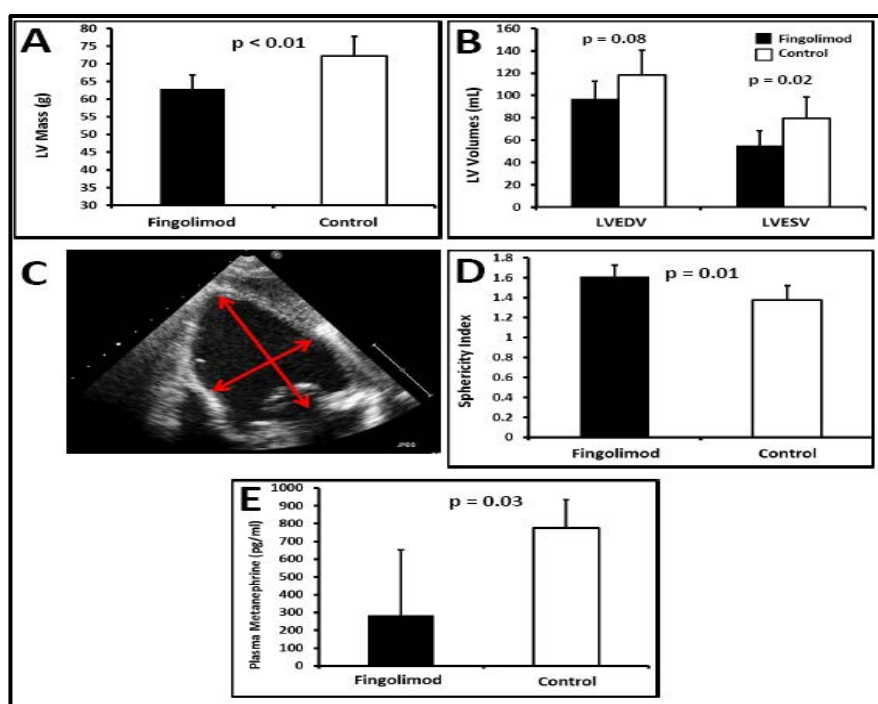


**Figura 4.- El tratamiento con Fingolimod mejoró la mecánica miocárdica evaluada mediante strain por ecocardiografía tridimensional.** Los cerdos tratados con Fingolimod (columnas negras) mostraron una mejor contractilidad miocárdica comparado con el grupo control (columnas blancas), tanto en strain 3D longitudinal (A), como en strain 3D circunferencial (C) como en strain 3D radial (E) una semana post-IAM y un mes post-IAM. Los paneles B, D y F muestra ejemplos representativos de la curvas de strain tridimensional de ambos grupos (control y Fingolimod).

Además, la RM demostró que la activación de S1P-R daba lugar a una reducción en la dilatación del VI al cabo de un mes del IM. Específicamente, los cerdos tratados con Fingolimod mostraron significativamente menor Volumen Tele Sistólico (LVESV) que los controles (Tabla 1). Además encontramos una fuerte tendencia (aunque no estadísticamente significativa) a un menor Volumen TeleDiastólico (LVEDV) en los cerdos tratados con Fingolimod ( $p=0,08$ , Figura 5B, Tabla 1).

Para evaluar los cambios geométricos del VI se midió también el índice de esfericidad del VI por ecocardiografía 2D. El índice de esfericidad del VI fue  $1,61\pm 0,11$  en los animales tratados con Fingolimod en comparación con  $1,37\pm 0,14$  en el grupo control (Figura 5C y 5D,  $p=0,01$ ), que indica una menor deformación del VI en el grupo Fingolimod.

Los niveles de metanefrinas en plasma estaban reducidos en los cerdos tratados con Fingolimod ( $285,11 \pm 366,85$  vs.  $774,21 \pm 158,42$  pg/mL,  $p=0,045$ ), lo que indica una menor activación neurohormonal simpática en el grupo Fingolimod.



**Figura 5.- El tratamiento con Fingolimod mitigó el remodelado anatómico post-IAM.** A: Los animales tratados con Fingolimod mostraban menor masa de VI, lo que indica menor hipertrofia compensadora en el grupo Fingolimod. B: Los cerdos tratados con Fingolimod mostraban unos volúmenes telesistólicos (LVESV) menores que los controles, y una tendencia hacia unos menores volúmenes telediastólicos (LVEDV) que el grupo control. C: El índice de esfericidad del VI se calculó como el cociente eje mayor (longitudinal) del VI / eje menor (transversal) del VI en un eje apical de cuatro-cámaras en ecocardiografía bidimensional. D: Los animales tratados con Fingolimod mostraban menor cambio en el índice de esfericidad, lo que indica que sufrían menos cambios en la morfología, en la arquitectura, en la forma del VI. E: Los animales tratados con Fingolimod presentaban menores niveles plasmáticos de metanefrinas, lo que indica menor activación neurohormonal del sistema nervioso simpático en el grupo Fingolimod. LV Mass: Masa de VI. LV Volumes: Volúmenes de VI. LVEDV: Volumen telediastólico de VI. LVESV: Volumen telesistólico de VI. Sphericity index: índice de esfericidad.

### ***El tratamiento con Fingolimod redujo la hipertrofia compensatoria del cardiomiocito y el acúmulo de fibrosis intersticial en el tejido miocárdico remoto, no infartado***

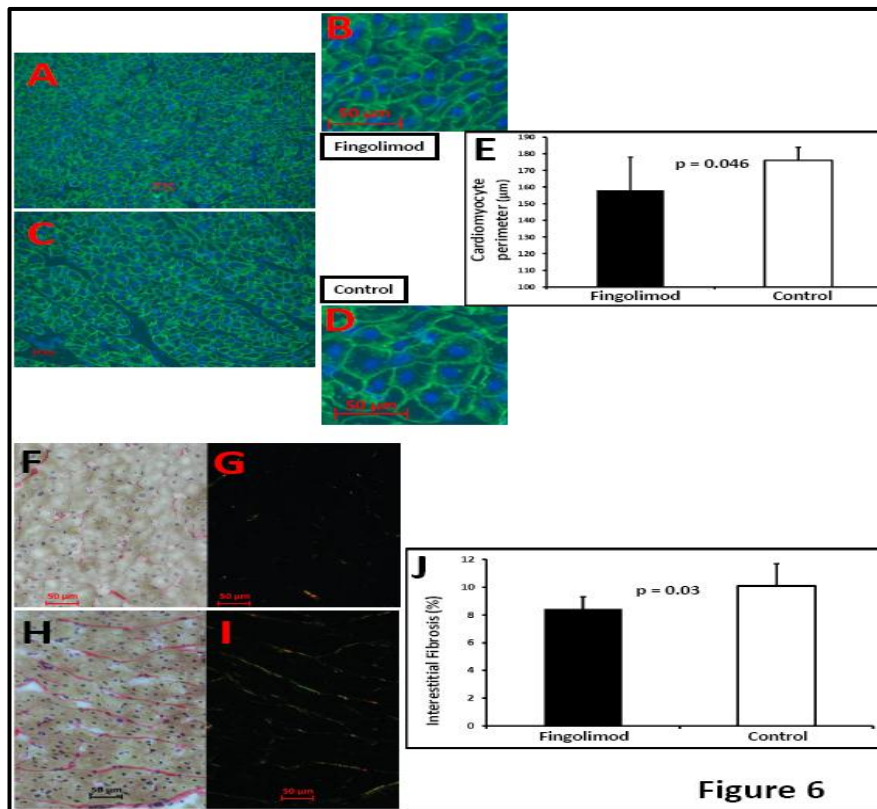
Los cambios histológicos del remodelado post-IAM son principalmente hipertrofia celular de los cardiomiocitos y aumento de la fibrosis miocárdica intersticial en el tejido remoto no infartado.

El tamaño del cardiomiocito un mes post-IAM era menor en el grupo Fingolimod evaluado mediante marcajate de vinculina por inmunohistoquímica. Los animales tratados con Fingolimod presentaron un perímetro celular menor ( $157,92 \pm 19,93$  vs.  $175,95 \pm 7,94$   $\mu\text{m}$ ,  $p=0,045$ ) y un área celular transversal menor ( $1751,56 \pm 436,39$  vs.  $2198,45 \pm 290,17$   $\mu\text{m}^2$ ,  $p=0,049$ ) que los controles (Figura 6A-

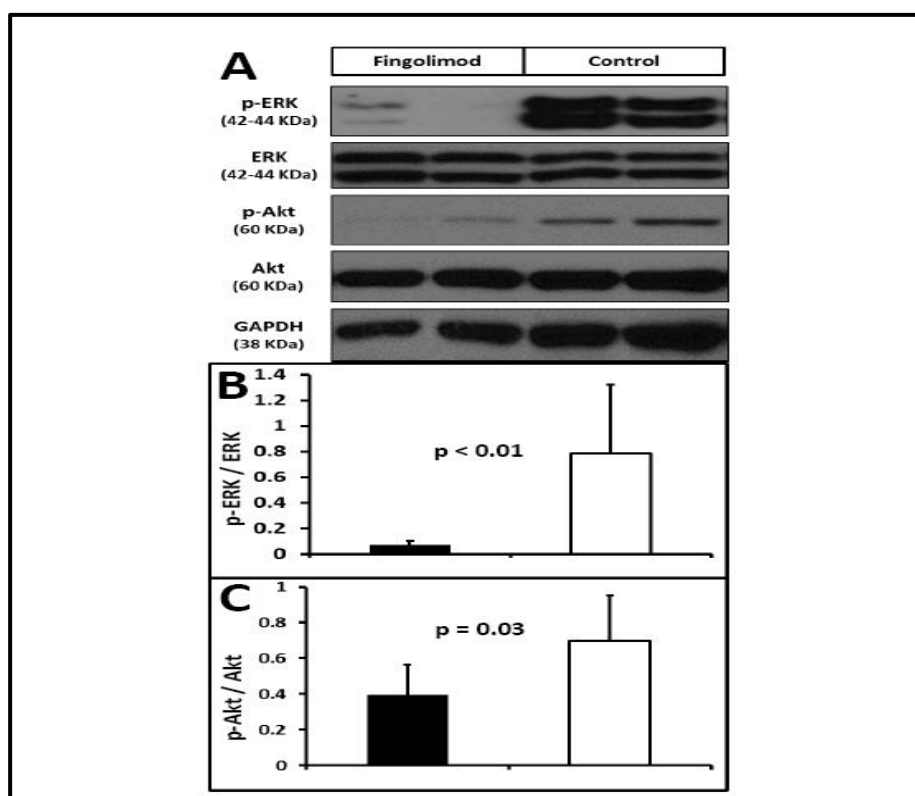
E), lo cual indica una menor respuesta hipertrófica compensatoria en el grupo Fingolimod.

La hipertrofia del cardiomiocito en el contexto del remodelado del VI está mediada por la activación (fosforilación) de Akt y de ERK 1/2. En concordancia con los resultados histológicos, la activación de S1P-R por Fingolimod da lugar a una reducción significativa en la fosforilación de Akt ( $0,33\pm0,32$  vs  $0,94\pm0,5$ ,  $p=0,02$ ) and ERK1/2 ( $0,16\pm0,03$  vs  $0,82\pm0,08$ ,  $p=0,04$ ) (Figura 7).

Finalmente, existía menos fibrosis intersticial un mes post-IAM en el miocardio remoto no infartado en los animales tratados con Fingolimod en comparación con los controles (rojo picrosirio:  $8,42\pm0,87\%$  vs.  $10,10\pm1,58\%$  del miocardio respectivamente,  $p=0,03$ , Figura 6F-J).



**Figura 6.- El tratamiento con Fingolimod redujo el remodelado histológico en el miocardio remoto no infartado un mes post-IAM.** A-E: Medida del tamaño de los cardiomiocitos. Imágenes representativas de inmunohistoquímica con vinculina y DAPI (la membrana de los cardiomiocitos está marcada en verde, los núcleos en azul) que muestra el tamaño de los cardiomiocitos en el grupo Fingolimod (A, detalle en B) y grupo control (C, detail in D). E: Los animales tratados con Fingolimod mostraban menor tamaño de cardiomiocitos que el grupo control, resultado de una menor hipertrofia de VI. F-J: Medida de fibrosis intersticial miocárdica. Imágenes representativas de tinción con rojo sirio en *brightfield* (F y H, colágeno en rojo, cardiomiocitos en amarillo) y luz polarizada (G e I, colágeno en amarillo y verde, el resto del tejido en negro) de un cerdo del grupo Fingolimod (F y G) y de un cerdo del grupo control (H e I). J: Los animales tratados con Fingolimod mostraban menor porcentaje de fibrosis intersticial en miocardio que los controles. Cardiomyocyte perimeter: Perímetro de los cardiomiocitos.



**Figura 7.- El tratamiento con Fingolimod redujo el remodelado molecular un mes post-IAM, pues había menor activación (fosforilación) de ERK1/2 y de Akten el miocardio remoto no infartado un mes post-IAM. A:** Western blot de p-ERK, ERK, p-Akt, Akt, y GAPDH (control de carga). **B:** Los animales tratados con Fingolimod presentaban menor activación de ERK1/2, demostrado por un menor cociente pERK/ERK. Este hallazgo apoya una menor hipertrofia en el grupo Fingolimod. **C:** El tratamiento con Fingolimod se asociaba con una menor activación (fosforilación) de Akt, consistente con menor estímulo hacia la hipertrofia de VI. p-ERK: ERK1/2fosforilado. P-Akt: Aktfosforilado.

#### 4. DISCUSIÓN

En este estudio examinamos los efectos cardioprotectores del agonista del receptor de S1P Fingolimod en un modelo porcino de I-R. El principal hallazgo de este estudio es que la activación de S1P-R con Fingolimod inmediatamente pre-reperusión da lugar a un mayor miocardio preservado, una disminución del tamaño de infarto y una mejora en la función sistólica del VI. Estos efectos están mediados por la activación de la ruta molecular cardioprotectora RISK que promueve una reducción en la apoptosis en los cardiomiocitos. Además, el tratamiento pre-reperusión con Fingolimod reduce el remodelado adverso del ventrículo izquierdo que tiene lugar tras el infarto, tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico, y produce una normalización del eje catecolaminérgico.

Nuestra estrategia final consiste en intentar reducir el tamaño de IAM mediante la administración de un fármaco antiapoptótico durante el traslado en ambulancia del paciente con IAM al hospital, es decir incluso antes de la reperusión. Para facilitar la aplicación de nuestros hallazgos a la práctica clínica, elegimos Fingolimod, el único agonista de S1P-R aprobado para uso humano.

### ***Papel de S1P en el daño por I-R***

Limitar el tamaño del infarto es de gran importancia puesto que se trata de un parámetro clave en la morbilidad y mortalidad. La restauración del flujo sanguíneo en el miocardio isquémico puede paradójicamente activar apoptosis (daño por I-R), siendo la lesión por I-R responsable hasta del 50% del tamaño de IAM (2,3). El lisofosfolípido SP1 ha sido reconocido recientemente como un mediador clave en la fisiología celular (5). La esfingosina es un derivado del lípido de membrana esfingomielina por la vía de las ceramidas. S1P es producto de la fosforilación de la esfingosina, reacción catalizada por una esfingosinquinasa. El concepto del reóstato de esfingosina fue introducido para expresar el balance entre ceramida, que es proapoptótica, y S1P, que activa rutas de supervivencia (27). Dado el papel fundamental de la apoptosis en el daño por I-R, la función de S1P como antiapoptótico representa una nueva diana farmacológica para disminuir este daño.

S1P promueve la supervivencia de los cardiomiocitos en experimentos *in vitro* llevados a cabo en condiciones de hipoxia, tanto en células neonatales (10) como en células adultas (11) de ventrículo de rata. S1P induce además resistencia al daño por I-R en experimentos *in vivo* en corazones aislados de ratones (12) y de rata (13) *wild-type*. Los ratones deficientes en esfingosinquinasa (la enzima responsable de la síntesis de S1P) mostraban un daño miocárdico por I-R más severo que los controles (28), mientras que la sobreexpresión de esfingosinquinasa (mediante transfección con adenovirus) protegía al miocardio del daño por I-R (14). Además, ratones deficientes en S1P-R mostraron un tamaño de infarto mayor que los ratones controles (15). Asimismo, S1P es un mediador clave en el preconditionamiento y en el postcondicionamiento, dos estrategias de cardioprotección establecidas. De hecho, el preconditionamiento y el postcondicionamiento reducen el tamaño de infarto en corazones *wild-type* pero ninguno de ellos fue cardioprotector en corazones deficientes en esfingosinquinasa o en S1P-R (13,28,29). Finalmente, se ha demostrado que HDL reduce el tamaño de infarto *in vivo* (30); este efecto está mediado por S1P ya que el efecto cardioprotector de HDL se pierde en ratones deficientes en S1P-R y durante el tratamiento con antagonistas de S1P-R. Todos estos resultados apuntan hacia un prometedor papel de S1P en la prevención del daño por I-R. Nosotros decidimos estudiar Fingolimod en nuestros experimentos puesto que es el único agonista de S1P-R aprobado por la FDA, lo que facilitaría la aplicación de esta estrategia terapéutica a la práctica clínica.

La apertura del poro de permeabilidad mitocondrial (MPTP) es el responsable final de la apoptosis mediada por el daño por I-R. En concreto, está demostrado que la prevención de la apertura del MPTP reduce el tamaño del infarto (31). La principal ruta molecular involucrada en la inhibición de la apertura



del MPTP es la ruta RISK (32), que conlleva la fosforilación (activación) de Akt y PKC- $\epsilon$  y la fosforilación (inactivación) de GSK3- $\beta$ . De hecho, nuestros resultados demuestran que Fingolimod da lugar a la activación de Akt y PKC- $\epsilon$  y a la inactivación de GSK3- $\beta$  a las 24 horas post-IAM. Estos datos son consistentes con estudios *in vitro* preliminares que muestran que Fingolimod previene la apoptosis de los cardiomiocitos expuestos a condiciones de hipoxia mediante la activación de la ruta RISK (19), demostrando nuestros resultados el mismo proceso *in vivo*. Como resultado, los cerdos tratados con Fingolimod presentaron una reducción de la apoptosis celular medida por ensayo TUNEL y un incremento de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 24 horas después del IAM. Estos mecanismos celulares serían la causa de la mejora en la recuperación del miocardio y a la disminución del tamaño del infarto en los cerdos tratados con Fingolimod.

### ***La activación de S1P-R con Fingolimod reduce el tamaño de infarto y mejora la función sistólica del VI***

Nuestros resultados demuestran que Fingolimod reduce el tamaño de infarto, determinado por técnicas no invasivas (RM) y por tinción post-mortem (TTC). Ambos métodos mostraron una reducción del 20% en el tamaño del infarto en el grupo tratado con Fingolimod. Este resultado tiene mucha importancia ya que el tamaño de infarto es un predictor independiente de pronóstico de enfermedad cardiovascular, incluso tras ajustar por FEVI (33-37).

Existe siempre una variación entre animales en el tamaño de infarto debido a las variaciones de la anatomía coronaria de cada animal. Para solucionar este problema, no sólo medimos el tamaño de infarto sino que también calculamos el área en riesgo (el miocardio sometido a isquemia que será necrosado si no se trata a tiempo) (22,23). El miocardio preservado (la proporción de miocardio en riesgo que es salvado con una intervención terapéutica, en nuestro caso el tratamiento con Fingolimod) es 5 veces mayor en los cerdos tratados con Fingolimod que en los cerdos control. Este hecho es de gran importancia ya que el miocardio preservado *per se* es un parámetro que predice de forma independiente eventos cardiovasculares adversos, incluso tras ajustar con el tamaño de infarto (38).

Además, la reducción del tamaño de IAM se correlaciona con una mejora en la FSVI. El grupo Fingolimod mostró una FEVI mayor a una semana y a un mes post-IAM (tanto por RM como por Eco-3D) y una mayor recuperación de la FEVI que el grupo control. Además el grupo tratado con Fingolimod presentó una mejor reserva contráctil que el grupo control. Estos resultados son importantes ya que tanto una FEVI más preservada (39) como la presencia de reserva contráctil (36,40) indican ambos mejor pronóstico cardiovascular.

Encontramos asimismo que la deformación miocárdica estaba más preservada en los cerdos tratados con Fingolimod. La FEVI es un parámetro clínicamente muy utilizado pero que presenta ciertos inconvenientes (dependiente



de precarga, asunciones geométricas que no son ciertas ante alteraciones de contractilidad segmentarias post-IAM). Por ello, recientemente se ha desarrollado el análisis de strain mediante ecocardiografía, una herramienta nueva que permite una evaluación más detallada de la mecánica del miocardio (41) y que predice eventos clínicos mejor que la FEVI en pacientes con IAM previo (42,43). Nuestros datos indican claramente que el tratamiento con Fingolimod mejora los tres strains tridimensionales (strain longitudinal, circunferencial y radial) en comparación con el grupo control. Estos hallazgos apoyan la reducción en el tamaño de infarto y la mejora de la FSVI en el grupo Fingolimod asimismo mostrada por FEVI y por las curvas de presión-volumen.

### ***La activación de S1P-R con Fingolimod reduce el remodelado del VI***

A pesar de que el tamaño de infarto es un predictor importante de la mortalidad tras un IM, la disfunción sistólica crónica y el remodelado adverso del VI tras el IM son importantes determinantes de la morbilidad del paciente y de los eventos a largo plazo (44). Nuestros datos son los primeros en demostrar que el tratamiento agudo con Fingolimod no sólo reduce el daño por I-R y disminuye el tamaño de infarto a corto plazo sino que sus efectos beneficiosos se extienden al periodo crónico pues además mitiga el desarrollo de miocardiopatía isquémica y remodelado cardiaco adverso.

El remodelado cardiaco se define como los cambios en la expresión genética, molecular, celular e intersticial que se manifiestan clínicamente como cambios en el tamaño, forma y funcionalidad del corazón ante el daño cardiaco (45). Los cambios macroscópicos que caracterizan el remodelado del VI conllevan dilatación de los volúmenes del VI e incremento en la masa del VI que dan lugar al desarrollo de una hipertrofia compensatoria y cambios en la arquitectura del VI haciendo que pierda su forma elíptica habitual (forma de bala) para tomar una forma más esférica. En nuestro estudio, los corazones de los cerdos tratados con Fingolimod presentaban menor dilatación post-IAM que el grupo control; en concreto, el volumen telesistólico (LVESV), el mejor predictor de eventos adversos en remodelado del VI (46,47), era significativamente menor en el grupo tratado con el agonista de S1P-R analizado tanto por RM como por ecocardiografía 3D.

Finalmente, la hipertrofia del cardiomiocito del tejido miocárdico remoto no infartado es un mecanismo compensatorio inicial importante, pero si se prolonga en el tiempo provoca incremento en la masa del VI y se convierte en un proceso negativo asociado a eventos adversos (48). Los efectos cardioprotectores de la activación de S1P-R en el momento del IM redujeron el nivel de remodelado compensatorio del VI, como muestra la menor masa del VI, la menor activación de Akt y ERK1/2 y el menor tamaño del cardiomiocito en los cerdos tratados con Fingolimod un mes post-IAM. Akt y ERK1/2 son importantes inductores del crecimiento y supervivencia de los miocitos; mientras que la activación

(fosforilación) aguda y puntual de Akt da lugar a una disminución de la apoptosis, la activación crónica de Akt y de ERK da lugar a hipertrofia, aspecto clave en el remodelado adverso del VI (49) y relacionado con efectos negativos sobre el miocardio (50). Por ello, la disminución de los ratios pAkt/Akt y pErk/Erk en el tejido miocárdico remoto no infartado en los cerdos tratados con Fingolimod, un mes después del IM, es un reflejo del menor remodelado del VI presente en este grupo, mientras que la elevación de pAkt en el miocardio isquémico a las 24 horas post-IAM en el grupo tratado con Fingolimod es el resultado de una mayor activación de las rutas de supervivencia mediadas por S1P-R (resultado consistente con una menor tasa de apoptosis en el grupo Fingolimod). La reducción en la hipertrofia de los cardiomiocitos (tanto tamaño como perímetro) a nivel histológico en el grupo Fingolimod apoya además esta disminución de la hipertrofia del VI. Finalmente, la fibrosis miocárdica intersticial en el miocardio remoto no isquémico, otro marcador de remodelado cardíaco (44,45,51), era menor en los cerdos tratados con Fingolimod, lo que corrobora la prevención de remodelado del VI producida por la activación de S1P-R.

La activación crónica de la respuesta neurohormonal, especialmente del sistema nervioso simpático (52), es un componente principal en el remodelado del VI. De hecho, los niveles plasmáticos de catecolaminas son un importante predictor de la mortalidad cardiovascular en pacientes tras un IAM (53,54). En este estudio, nos hemos enfocado en medir los productos de degradación de las catecolaminas plasmáticas (metanefrinas) ya que presentan una mayor estabilidad y representan la actividad neurohormonal a largo plazo (55). Curiosamente, los niveles plasmáticos de metanefrinas eran menores en el grupo Fingolimod que en el grupo control, lo que indica un menor remodelado post-IAM en los animales tratados con agonismo de S1P-R.

### **Limitaciones del estudio**

Nuestro estudio presenta varias limitaciones. En primer lugar no podemos estar seguros de si los beneficios de Fingolimod en la prevención del remodelado cardíaco post-IAM se deben exclusivamente a la reducción inicial del tamaño de IAM o si la activación de S1P-R *per se* posee efectos anti-remodelado. De hecho, el tratamiento crónico con Fingolimod previno el remodelado patológico del VI en otro estudio en modelo murino de sobrecarga de presión (56). No obstante, dado que nosotros administramos el fármaco a lo largo de un periodo de tiempo muy limitado (pre-reperfusión y durante 3 días post-IAM), creemos que la prevención del remodelado del VI en nuestro modelo se debe a una reducción del tamaño de IAM y no a un efecto crónico directo de Fingolimod en el miocardio no isquémico. Sin embargo, más estudios son necesarios para responder esta pregunta.

La enfermedad coronaria en humanos está asociada frecuentemente con comorbilidades que no están presentes en este modelo animal como por ejemplo

hipertensión, diabetes mellitus o hiperlipidemia. Por otro lado, no sabemos qué potencia podría tener la activación de S1P-R sobre el remodelado cardiaco con las terapias médicas estándar con beta-bloqueantes, inhibidores de la ECA y los antagonistas de la aldosterona. Por lo tanto, la eficacia clínica de la activación de S1P-R en el contexto del IAM tendría que ser investigada en pacientes humanos.

## **5. CONCLUSIONES**

Como conclusión, nuestros datos proporcionan un apoyo al concepto de la intervención farmacológica con el agonista de S1P-R Fingolimod en la reducción de los efectos deletéreos del IAM en un contexto experimental. Hemos demostrado por primera vez que la activación de S1P-R con Fingolimod antes de la reperfusión mejora el miocardio preservado y reduce el tamaño de infarto, dando lugar a una mejora de la función sistólica y de la mecánica del VI y a una reducción del remodelado del VI en un modelo con animales grandes. Estos efectos cardioprotectores de Fingolimod en un contexto agudo están mediados por la activación de la ruta RISK y la reducción de la apoptosis. Estos hallazgos muestran el potencial terapéutico de la señalización de S1P-R en el periodo peri-infarto y justifica futuros estudios en pacientes humanos.

## **6. REFERENCIAS**

1. De Luca G.; Suryapranata H.; Ottervanger JP.; Antman EM. Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction, every minute of delay counts. *Circulation* **109**(10), 1223-1225 (2004).
2. Yellon DM.; Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* **357**(11), 1121-1135 (2007).
3. Hausenloy DJ.; Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury, a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* **123**(1), 92-100 (2013).
4. Karliner JS. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in the heart, a decade of progress. *Biochim Biophys Acta* **1831**(1), 203-212 (2012).
5. Spiegel S.; Milstien S. Sphingosine-1-phosphate, an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(5), 397-407 (2003).
6. Man K.; Ng KT.; Lee TK.; Lo CM.; Sun CK.; Li XL.; Zhao Y.; Ho JW.; Fan ST. FTY720 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury in normal and cirrhotic livers. *Am J Transplant* **5**(1), 40-49 (2005).
7. Delbridge MS.; Shrestha BM.; Raftery AT.; El Nahas AM.; Haylor JL. Reduction of ischemia-reperfusion injury in the rat kidney by FTY720; a synthetic derivative of sphingosine. *Transplantation* **84**(2), 187-195, (2007).
8. Laychock SG.; Sessanna SM.; Lin MH.; Mastrandrea LD. Sphingosine 1-phosphate affects cytokine-induced apoptosis in rat pancreatic islet beta-cells. *Endocrinology* **147**(10), 4705-4712 (2006).
9. Hasegawa Y.; Suzuki H.; Sozen T.; Rolland W.; Zhang JH. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats. *Stroke* **41**(2), 368-374 (2010).
10. Karliner JS.; Honbo N.; Summers K.; Gray MO.; Goetzl EJ. The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **33**(9), 1713-1717 (2001).

11. Tao R.; Zhang J.; Vessey DA.; Honbo N.; Karliner JS. Deletion of the sphingosine kinase-1 gene influences cell fate during hypoxia and glucose deprivation in adult mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* **74**(1), 56-63 (2007).
12. Jin ZQ.; Zhou HZ.; Zhu P.; Honbo N.; Mochly-Rosen D.; Messing RO.; Goetzl EJ.; Karliner JS.; Gray MO. Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and ganglioside GM-1 in wild-type and PKC epsilon knockout mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(6), H1970-1977 (2002).
13. Lecour S.; Smith RM.; Woodward B.; Opie LH.; Rochette L.; Sack MN. Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **34**(5), 509-518 (2002).
14. Duan HF.; Wang H.; Yi J.; Liu HJ.; Zhang QW.; Li LB.; Zhang T.; Lu Y.; Wu CT.; Wang LS. Adenoviral gene transfer of sphingosine kinase 1 protects heart against ischemia/reperfusion-induced injury and attenuates its postischemic failure. *Hum Gene Ther* **18**(11), 1119-1128 (2007).
15. Means CK.; Xiao CY.; Li Z.; Zhang T.; Omens JH.; Ishii I.; Chun J.; Brown JH. Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(6), H2944-2951 (2007)
16. Brinkmann V.; Billich A.; Baumruker T.; Heining P.; Schmouder R.; Francis G.; Aradhye S.; Burtin P. Fingolimod (FTY720), discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* **9**(11), 883-897 (2010)
17. Kappos L.; Radue EW.; O'Connor P.; Polman C.; Hohlfeld R.; Calabresi P.; Selmaj K.; Agoropoulou C.; Leyk M.; Zhang-Auberson L.; Burtin P. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* **362**(5), 387-401 (2010).
18. Cohen JA.; Barkhof F.; Comi G.; Hartung HP.; Khatri BO.; Montalban X.; Pelletier J.; Capra R.; Gallo P.; Izquierdo G.; Tiel-Wilck K.; de Vera A.; Jin J.; Stites T.; Wu S.; Aradhye S.; Kappos L. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* **362**(5), 402-415 (2010)
19. Zhang J.; Honbo N.; Goetzl EJ.; Chatterjee K.; Karliner JS.; Gray MO. Signals from type 1 sphingosine 1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(5), H3150-3158 (2007).
20. Hofmann U.; Burkard N.; Vogt C.; Thoma A.; Frantz S.; Ertl G.; Ritter O.; Bonz A. Protective effects of sphingosine-1-phosphate receptor agonist treatment after myocardial ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* **83**(2), 285-293 (2009).
21. Egom EE.; Mohamed TM.; Mamas MA.; Shi Y.; Liu W.; Chirico D.; Stringer SE.; Ke Y.; Shaheen M.; Wang T.; Chacko S.; Wang X.; Solaro RJ.; Fath-Ordoubadi F.; Cartwright EJ.; Lei M. Activation of Pak1/Akt/eNOS signaling following sphingosine-1-phosphate release as part of a mechanism protecting cardiomyocytes against ischemic cell injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**(4), H1487-1495 (2011).
22. Ibanez B.; Prat-Gonzalez S.; Speidl WS.; Vilahur G.; Pinero A.; Cimmino G.; Garcia MJ.; Fuster V.; Sanz J.; Badimon JJ. Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage, analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* **115**(23), 2909-2916 (2007).
23. Aletras AH.; Tilak GS.; Natanzon A.; Hsu LY.; Gonzalez FM.; Hoyt RF.; Jr.; Arai AE. Retrospective determination of the area at risk for reperfused acute myocardial infarction with T2-weighted cardiac magnetic resonance imaging, histopathological and displacement encoding with stimulated echoes (DENSE) functional validations. *Circulation* **113**(15), 1865-1870 (2006).
24. Lang RM.; Bierig M.; Devereux RB.; Flachskampf FA.; Foster E.; Pellikka PA.; Picard MH.; Roman MJ.; Seward J.; Shanewise JS.; Solomon SD.; Spencer KT.; Sutton MS.; Stewart WJ. Recommendations for chamber quantification, a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group; developed in conjunction with the European Association of Echocardiography.; a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* **18**(12), 1440-1463 (2005)
25. Mor-Avi V.; Lang RM.; Badano LP.; Belohlavek M.; Cardim NM.; Derumeaux G.; Galderisi M.; Marwick T.; Nagueh SF.; Sengupta PP.; Sicari R.; Smiseth OA.; Smulevitz B.; Takeuchi M.; Thomas JD.; Vannan M.; Voigt JU.; Zamorano JL. Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics, ASE/EAE consensus

- statement on methodology and indications endorsed by the Japanese Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* **24**(3), 277-313 (2011).
26. Savu O.; Jurcut R.; Giusca S.; van Mieghem T.; Gussi I.; Popescu BA.; Gingham C.; Rademakers F.; Deprest J.; Voigt JU. Morphological and functional adaptation of the maternal heart during pregnancy. *Circ Cardiovasc Imaging* **5**(3), 289-297 (2012).
  27. Cuvillier O.; Pirianov G.; Kleuser B.; Vanek PG.; Coso OA.; Gutkind S.; Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* **381**(6585), 800-803 (1996).
  28. Jin ZQ.; Zhang J.; Huang Y.; Hoover HE.; Vessey DA.; Karliner JS. A sphingosine kinase 1 mutation sensitizes the myocardium to ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **76**(1), 41-50 (2007).
  29. Jin ZQ.; Goetzl EJ.; Karliner JS. Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation* **110**(14), 1980-1989 (2004).
  30. Theilmeyer G.; Schmidt C.; Herrmann J.; Keul P.; Schafers M.; Herrgott I.; Mersmann J.; Larmann J.; Hermann S.; Stypmann J.; Schober O.; Hildebrand R.; Schulz R.; Heusch G.; Haude M.; von Wnuck Lipinski K.; Herzog C.; Schmitz M.; Erbel R.; Chun J.; Levkau B. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* **114**(13), 1403-1409 (2006).
  31. Piot C.; Croisille P.; Staat P.; Thibault H.; Rioufol G.; Mewton N.; Elbelghiti R.; Cung TT.; Bonnefoy E.; Angoulvant D.; Macia C.; Raczka F.; Sportouch C.; Gahide G.; Finet G.; Andre-Fouet X.; Revel D.; Kirkorian G.; Monassier JP.; Derumeaux G.; Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **359**(5), 473-481 (2008).
  32. Ovize M.; Baxter GF.; Di Lisa F.; Ferdinandy P.; Garcia-Dorado D.; Hausenloy DJ.; Heusch G.; Vinten-Johansen J.; Yellon DM.; Schulz R. Postconditioning and protection from reperfusion injury, where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* **87**(3), 406-423 (2010).
  33. Kwong RY.; Chan AK.; Brown KA.; Chan CW.; Reynolds HG.; Tsang S.; Davis RB. Impact of unrecognized myocardial scar detected by cardiac magnetic resonance imaging on event-free survival in patients presenting with signs or symptoms of coronary artery disease. *Circulation* **113**(23), 2733-2743 (2006).
  34. Cheong BY.; Muthupillai R.; Wilson JM.; Sung A.; Huber S.; Amin S.; Elayda MA.; Lee VV.; Flamm SD. Prognostic significance of delayed-enhancement magnetic resonance imaging, survival of 857 patients with and without left ventricular dysfunction. *Circulation* **120**(21), 2069-2076 (2009).
  35. Yan AT.; Shayne AJ.; Brown KA.; Gupta SN.; Chan CW.; Luu TM.; Di Carli MF.; Reynolds HG.; Stevenson WG.; Kwong RY. Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality. *Circulation* **114**(1), 32-39 (2006).
  36. Kelle S.; Roes SD.; Klein C.; Kokocinski T.; de Roos A.; Fleck E.; Bax JJ.; Nagel E. Prognostic value of myocardial infarct size and contractile reserve using magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* **54**(19), 1770-1777 (2009).
  37. Wu E.; Ortiz JT.; Tejedor P.; Lee DC.; Bucciarelli-Ducci C.; Kansal P.; Carr JC.; Holly TA.; Lloyd-Jones D.; Klocke FJ.; Bonow RO. Infarct size by contrast enhanced cardiac magnetic resonance is a stronger predictor of outcomes than left ventricular ejection fraction or end-systolic volume index, prospective cohort study. *Heart* **94**(6), 730-736 (2008).
  38. Masci PG.; Ganame J.; Strata E.; Desmet W.; Aquaro GD.; Dymarkowski S.; Valenti V.; Janssens S.; Lombardi M.; Van de Werf F.; L'Abbate A.; Bogaert J. Myocardial salvage by CMR correlates with LV remodeling and early ST-segment resolution in acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging* **3**(1), 45-51 (2010).
  39. Solomon SD.; Anavekar N.; Skali H.; McMurray JJ.; Swedberg K.; Yusuf S.; Granger CB.; Michelson EL.; Wang D.; Pocock S.; Pfeffer MA. Influence of ejection fraction on cardiovascular outcomes in a broad spectrum of heart failure patients. *Circulation* **112**(24), 3738-3744 (2005).
  40. Williams MJ.; Odabashian J.; Lauer MS.; Thomas JD.; Marwick TH. Prognostic value of dobutamine echocardiography in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **27**(1), 132-139 (1996).



41. Geyer H.; Caracciolo G.; Abe H.; Wilansky S.; Carerj S.; Gentile F.; Nesser HJ.; Khandheria B.; Narula J.; Sengupta PP. Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography, fundamentals and clinical applications. *Journal of the American Society of Echocardiography*, official publication of the American Society of Echocardiography **23**(4), 351-369, quiz 453-355 (2010).
42. Stanton T.; Leano R.; Marwick TH. Prediction of all-cause mortality from global longitudinal speckle strain, comparison with ejection fraction and wall motion scoring. *Circulation. Cardiovascular imaging* **2**(5), 356-364 (2009).
43. Hung CL.; Verma A.; Uno H.; Shin SH.; Bourgoun M.; Hassanein AH.; McMurray JJ.; Velazquez EJ.; Kober L.; Pfeffer MA.; Solomon SD.; investigators V. Longitudinal and circumferential strain rate.; left ventricular remodeling.; and prognosis after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **56**(22), 1812-1822 (2010).
44. Konstam MA.; Kramer DG.; Patel AR.; Maron MS.; Udelson JE. Left ventricular remodeling in heart failure, current concepts in clinical significance and assessment. *JACC Cardiovasc Imaging* **4**(1), 98-108 (2011).
45. Cohn JN.; Ferrari R.; Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications, a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* **35**(3), 569-582 (2000).
46. White HD.; Norris RM.; Brown MA.; Brandt PW.; Whitlock RM.; Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* **76**(1), 44-51 (1987).
47. Migrino RQ.; Young JB.; Ellis SG.; White HD.; Lundergan CF.; Miller DP.; Granger CB.; Ross AM.; Califf RM.; Topol EJ. End-systolic volume index is a strong predictor of early and late mortality. The GUSTO-I Angiographic Investigators. *Circulation* **96**(1), 116-121 (1997).
48. Verma A.; Meris A.; Skali H.; Ghali JK.; Arnold JM.; Bourgoun M.; Velazquez EJ.; McMurray JJ.; Kober L.; Pfeffer MA.; Califf RM.; Solomon SD. Prognostic implications of left ventricular mass and geometry following myocardial infarction, the VALIANT (VALsartan In Acute myocardial infarcTion) Echocardiographic Study. *JACC Cardiovasc Imaging* **1**(5), 582-591 (2008).
49. van Berlo JH.; Maillet M.; Molkenin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest* **123**(1), 37-45 (2013).
50. Haq S.; Choukroun G.; Lim H.; Tymitz KM.; del Monte F.; Gwathmey J.; Grazette L.; Michael A.; Hajjar R.; Force T.; Molkenin JD. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* **103**(5), 670-677 (2001).
51. Gonzalez A.; Ravassa S.; Beaumont J.; Lopez B.; Diez J. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol* **58**(18), 1833-1843 (2011).
52. Lympelopoulos A.; Rengo G.; Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure, pathophysiology and therapy. *Circ Res* **113**(6), 739-753 (2013).
53. Francis GS.; Cohn JN.; Johnson G.; Rector TS.; Goldman S.; Simon A. Plasma norepinephrine.; plasma renin activity.; and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation*. **87**(6 Suppl), VI40-48 (1993).
54. Benedict CR.; Shelton B.; Johnstone DE.; Francis G.; Greenberg B.; Konstam M.; Probstfield JL.; Yusuf S. Prognostic significance of plasma norepinephrine in patients with asymptomatic left ventricular dysfunction. SOLVD Investigators. *Circulation*. **94**(4), 690-697 (1996).
55. Raake PW.; Schlegel P.; Ksienzyk J.; Reinkober J.; Barthelmes J.; Schinkel S.; Pleger S.; Mier W.; Haberkorn U.; Koch WJ.; Katus HA.; Most P.; Muller OJ. AAV6.betaARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *Eur Heart J* **34**(19), 1437-1447 (2013).
56. Liu W.; Zi M.; Naumann R.; Ulm S.; Jin J.; Taglieri DM.; Prehar S.; Gui J.; Tsui H.; Xiao RP.; Neyses L.; Solaro RJ.; Ke Y.; Cartwright EJ.; Lei M.; Wang X. Pak1 as a novel therapeutic target for antihypertrophic treatment in the heart. *Circulation* **124**(24), 2702-2715 (2011).

## Curcumin induces apoptosis of 3T3-L1 adipocytes and affects molecular signals of adiponectin, AMPK and PKA

Ebtesam A. Al- Suhaimi

Biology Department, College of Sciences, University of Dammam, Dammam, Saudi Arabia.

\*e-mail: ealsuhaimi@ud.edu.sa

*An. Real Acad. Farm. Vol. 80, Nº 4 (2014), pag. 720-734*

### ABSTRACT

Apoptosis is an important cellular physiological function to continually balance the cell proliferation with cell death to maintain the healthy internal milieu. This study assessed the ability of Curcumin to inhibit 3T3-L1 adipocytes viability and its effects on apoptosis to identify a potential molecular approach for preventing adipocytes growth. To optimize the growth inhibitory concentration, 3T3-L1 adipocytes treated with different concentrations of Curcumin (5, 10, 20, 40, 60, and 80  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours, and were analyzed by MTT and found 40  $\mu\text{M}$  as an optimal dose. Cell cycle was analysed by FACS using the optimal dose for different periods (4-24h). Western blot was carried out using antibodies to detect protein expression and Phosphorylation of Adiponectin, AMPK, CREB, PKA catalytic subunit, and Akt. PKA relative activity and ROS generation was also assessed by DCFHDA fluorescence. The findings of the study revealed that Curcumin has successfully arrested 3T3L1 adipocytes cycle and exerted apoptotic action on the cells in a concentration- time dependent manner; increased Adiponectin expression; activated phosphorylated AMPK (p-AMPK) and inhibited PKA activation. Curcumin prevented the production of ROS generation. Results indicate that Curcumin exerts a very potent apoptotic action on 3T3L1 adipocytes and modulates adiponectin expression and AMPK and PKA signalling. These findings lead us to further investigate and support the potential use of Curcumin therapy in obesity resistance.

**Keywords:** Apoptosis; 3T3L1; Curcumin; Adiponectin; AMPK; PKA.



## RESUMEN

### *La curcumina inhibe la viabilidad celular e induce la apoptosis mediante la modulación de la adiponectina, la AMPK y PKA en adipocitos 3T3-L1*

La apoptosis es una función fisiológica celular importante para equilibrar de manera continua la proliferación y la muerte celulares con el objeto de mantener el entorno interno sano. Este estudio se determina la capacidad de la curcumina de inhibir la viabilidad de los adipocitos 3T3-L1 y sus efectos sobre la apoptosis para identificar un posible acercamiento molecular para prevenir el crecimiento de los adipocitos. Para optimizar la concentración inhibitoria del crecimiento, los adipocitos 3T3-L1 han sido tratados con diversas concentraciones de curcumina (5, el  $\mu\text{M}$  10, 20, 40, 60, y 80) durante 24 horas y analizados por MTT, encontrando el  $\mu\text{M}$  40 como dosis óptima. El ciclo de la célula ha sido analizado por FACS usando la dosis óptima en diversos períodos (4-24h). El *Western blot* se realizó usando los anticuerpos para detectar la proteína y la fosforilación de la adiponectina, de la subunidad catalítica de AMPK, de CREB, de PKA, y de Akt. La actividad relativa de PKA y la generación del ROS también fueron determinadas por fluorescencia de DCFHDA. Los resultados del estudio revelaron que la curcumina ha detenido con éxito el ciclo de los adipocitos 3T3L1 y que la acción apoptótica ejercida en las células en una concentración mide el tiempo de manera dependiente; expresión creciente de adiponectina; AMPK fosforilado activado (p-AMPK) y activación inhibida de PKA. La curcumina previno la producción de la generación del ROS. Los resultados indican que la curcumina ejerce una acción apoptótica muy potente en los adipocitos 3T3L1 y modula la expresión de la adiponectina indicando AMPK y PKA. Estos resultados nos conducen a ir más lejos en la investigación y el uso potencial de la terapia de la curcumina para combatir la obesidad.

**Palabras clave:** Apoptosis; 3T3L1; curcumina; adiponectina; AMPK; PKA.

## 1. INTRODUCTION

The possibility of managing cell survival and death has great therapeutic potential given the importance of cell cycle transition and apoptosis in the physiological functions of cells (1). The inhibition of differentiation, adipogenesis, angiogenesis and stimulation of physiological apoptosis in adipocytes in vitro or in vivo may be a potential strategy to inhibit adipose cell expansion and growth, thus preventing obesity and associated disorders. It has recently been discovered that adipose tissue is a hormone-secreting organ that releases adipokines, such as leptin, adiponectin, and visfatin. As such, adipose tissue is a principal of both the endocrine and immune systems (2). 3T3L1 cells are considered to be an excellent model to study adiposity because Adiponectin is primarily distributed in microvesicle particles of adipocytes (3). Many factors include curcumin could

modulate leptin release from 3T3L1 cells (4, 5). Different mechanisms for physiological and pathological apoptosis processes have been investigated, including suppressing signal transduction pathways to stimulate apoptosis (6). Cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase (PKA) functions as both a suppressor and activator of apoptosis. In arterial smooth muscle cells adenosine-mediated apoptotic pathways are activated (7); however, Zhang et al, (8) reported that the cAMP signalling pathway has been found to either support or inhibit apoptosis, depending on cellular situation. The adipokine leptin inhibits growth via apoptosis caused by adenylate cyclase/cAMP/PKA-elevating agents in some cancer cells (9). Increase in weight is resulted due to the growth and enlargement of adipose tissue, and AMPK is a major controller of energy metabolism that increases fatty acid oxidation and suppresses lipid accumulation (10,11). Mihaylova and Shaw (12) reported that in addition to physiological AMP/ADP elevation stresses, AMPK can be stimulated by many pharmacological agents and factors, including leptin, and AMPK in turn can suppress cell growth by acting as a metabolic check point. AMPK also directly phosphorylates some regulatory associated proteins and reduces expression of cAMP response element-binding protein (CREB) targets, which is important since CREB activation stimulates the expression of multiple transcription factors required for adipogenesis (13). Reactive oxygen species (ROS) and mitochondria play a prominent role in apoptosis as described by Simon et al. (14). Recently, it was found that apoptosis is regulated by ROS through a variety mechanisms depending on cell and conditioned media types (15). Adipose tissue growth is sensitive to angiogenesis and adipogenesis inhibitors (16), as well as adipokines (2) and these may serve as effective tools for controlling adipocytes growth.

Curcumin was reported as a potent inducer for apoptosis characteristics, including cell fading, chromatin retraction, DNA fragmentation, and cell membrane blebbing (6). The anti-angiogenic effect of curcumin in vivo was supported by its action at the level of gene expression in modified media of cells treated with different doses of curcumin (1  $\mu$ M–1 mM) for various time durations (0–24 h) (17). Curcumin has been studied for its potential effect in antiangiogenic activity in tumor (18) and in preventing obesity in C57BL mice and inhibiting adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes (16) as well as cancers (19- 21). In contrast, Kim et al (22) found that low concentration of curcumin activated proliferation, improved stemness and migration of 3T3-L1 preadipocytes. Cellular survival required Protein Kinase B (PKB or Akt1) through its inhibiting effect on apoptosis so it is involved as principal factor in multiple cancers (23). But curcumin was able to induce cell cycle arrest in different phases, including human osteosarcoma cells in successive G(1)/S and G(2)/M phases (19) and on colorectal carcinoma cells in the S phase (24). Recent studies described an inhibiting growth action of curcumin by stimulation of adenosine 5'-monophosphate (AMP, also called activated protein

kinase (AMPK)) in adipocytes and cancer cells (19) and cause apoptosis in several cell lines (20, 21). The safety of curcumin was proved previously (17, 25- 27)

The current study was performed to investigate the underlying molecular mechanism of curcumin inhibition of 3T3-L1 adipocytes. The study will aid further molecular signals involved in 3T3L1 adipocytes apoptosis and supports the potential use of Curcumin therapy in obesity resistance.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### ***2.1. Cell culturing and treatment.***

The 3T3-L1 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC-CL-173) and maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-moistened environment. 3T3-L1 cells were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) at a density of  $5 \times 10^5$  and supplemented with L- glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and penicillin-streptomycin (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). After cells reached 70% confluence, Then cells were collected and sub cultured using a standard trypsin /EDTA method (28 - 30). Different concentrations of curcumin were dissolved in DMSO for cells treatment as well as with 40  $\mu$ M for different periods (h).

### ***2.2. Cell viability assay.***

MTT ( 3-(4, 5- dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphenyl tetrasodium bromide) reagent was used for detecting the cell death induce by curcumin treatment according to the previously reported method (31). Cells were treated with different doses of curcumin for 24 h, followed by the addition of MTT reagents and finally DMSO . After discarding unbound stain, the crystallised formazan was dissolved and spectrophotometrically measured at 570 nm. Growth inhibition % was presented, with control growth as 100%, viability% was calculated (sample/control  $\times$  100) (32). Cell culturing was repeated to evaluate the dose-dependent effect of curcumin using concentrations of (5, 10, 20, 40, 60, and 80  $\mu$ M) for 24 h. Ultimately, 40  $\mu$ M curcumin was used to evaluate the time-dependent effect of treatment.

### ***2.3. Flow cytometric analysis of cell cycle status.***

After treatment with (40  $\mu$ M) curcumin for different time periods (4, 8 ,12, and 24 h), cell cycle progress was examined by fluorescence-activated cell sorting (FACS). In brief, cells were collected by centrifugation. For fixation cells were vortexed slowly with 70% ethanol and kept at 4°C overnight, stained with propidium iodide (PI) reagents, the stained DNA content was then measured using a flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) as previously described(29).

#### ***2.4. Western blotting.***

After treatment with 40  $\mu\text{M}$  curcumin, the cells were washed with ice-cold 1 $\times$  phosphate-buffered saline (PBS), collected, centrifuged, and total protein was extracted using radioimmunoprecipitation buffer. In brief, lysis buffer were add to re-suspend the pellets, which were subjected to ultrasonication, and then centrifuged to separate cell debris. Supernatants were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use (9, 33). Immunoblotting was carried out using antibodies against  $\beta$ -actin, PKA (ab5816, abcam, Cambridge, UK), p-CREB (9191s Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), CREB (9197, Cell Signaling Technology), p-AMPK (2535s, Cell Signaling Technology), and AMPK (2532, Cell Signaling Technology) according to the manufacturers' protocols.

#### ***2.5. Protein Kinase A (PKA) phosphorylation assay.***

PKA activity was measured based on transferring  $^{32}\text{P}$ -ATP to a targeted peptide substrate. Relative PKA activity was measured with a liquid scintillation counter as previously described (34).

#### ***2.6. Measurement of reactive oxygen species (ROS) generation.***

Intracellular ROS concentrations were assessed using the oxidant-sensitive fluorescent probe-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFHDA). 3T3L1 cells were incubated with DCFHDA and then washed with 1 $\times$  PBS. Fluorescence was measured spectrofluorometry at wavelengths (excitation 507 nm and emission: 530 nm) as previously described (35).

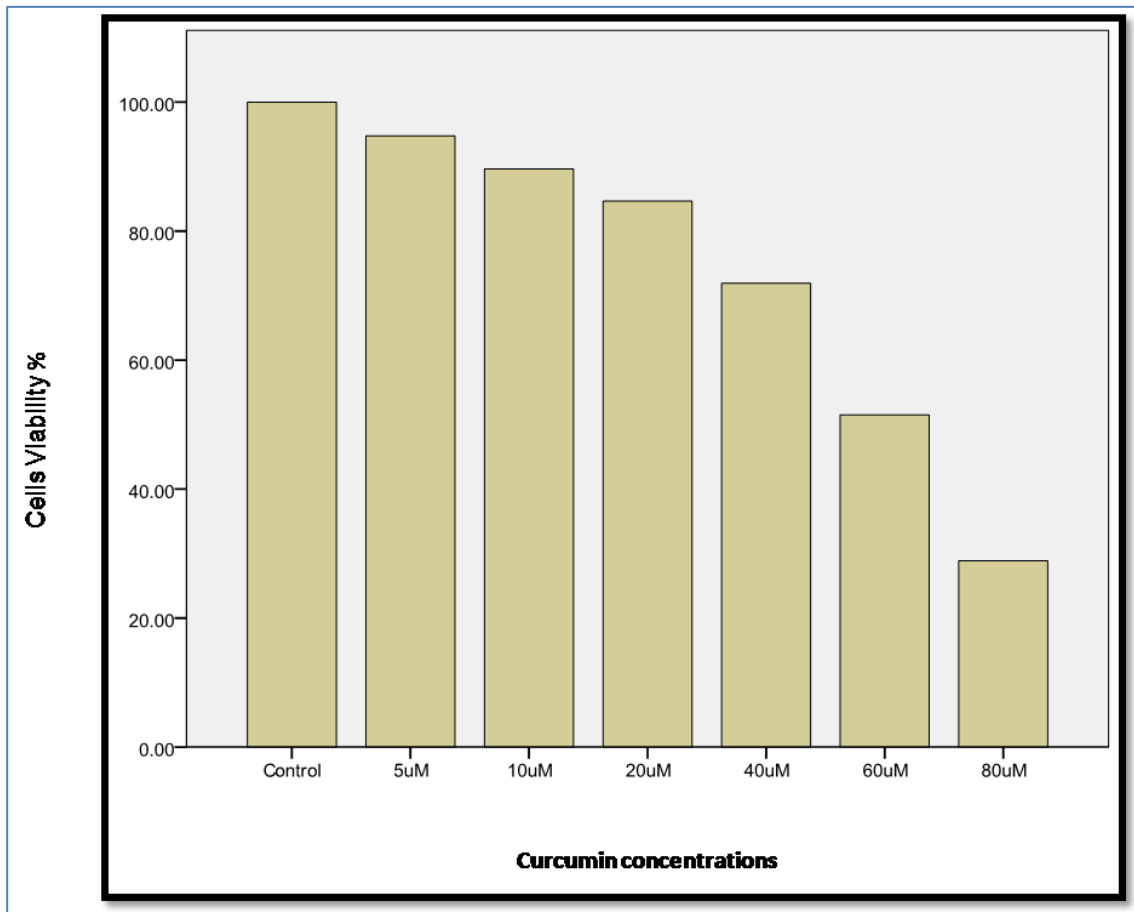
#### ***2.7. Statistical analysis.***

Three independent experiments were carried out for the statistical evaluation. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. All results were generated with SPSS (Chicago, IL, USA) using analysis of variance (ANOVA) and Least Significant Difference (LSD) post-hoc tests. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

### **3. RESULTS**

#### ***3.1. Curcumin inhibits 3T3L1 adipocyte viability in a dose- and time-dependent manner.***

The cell life survival of curcumin (viability or % inhibition) was measured with the MTT cell viability assay post-induction and confirmation of adipocyte differentiation. The results revealed that treatment of 3T3L1 adipocytes for 24 h with different concentrations of curcumin (5, 10, 20, 40, 60, and 80  $\mu\text{M}$ ) in the culture media resulted in significant ( $p < 0.01$ ) and gradual inhibition in mean cell viability ( $94.76\% \pm 1.01\%$ ,  $89.65\% \pm 0.65\%$ ,  $84.64\% \pm 0.93\%$ ,  $71.90\% \pm 1.09\%$ ,  $51.51\% \pm 1.42\%$ ,  $28.91\% \pm 6.65\%$ , respectively; vs compared to control cell (viability of 100%; (Figure 1)).

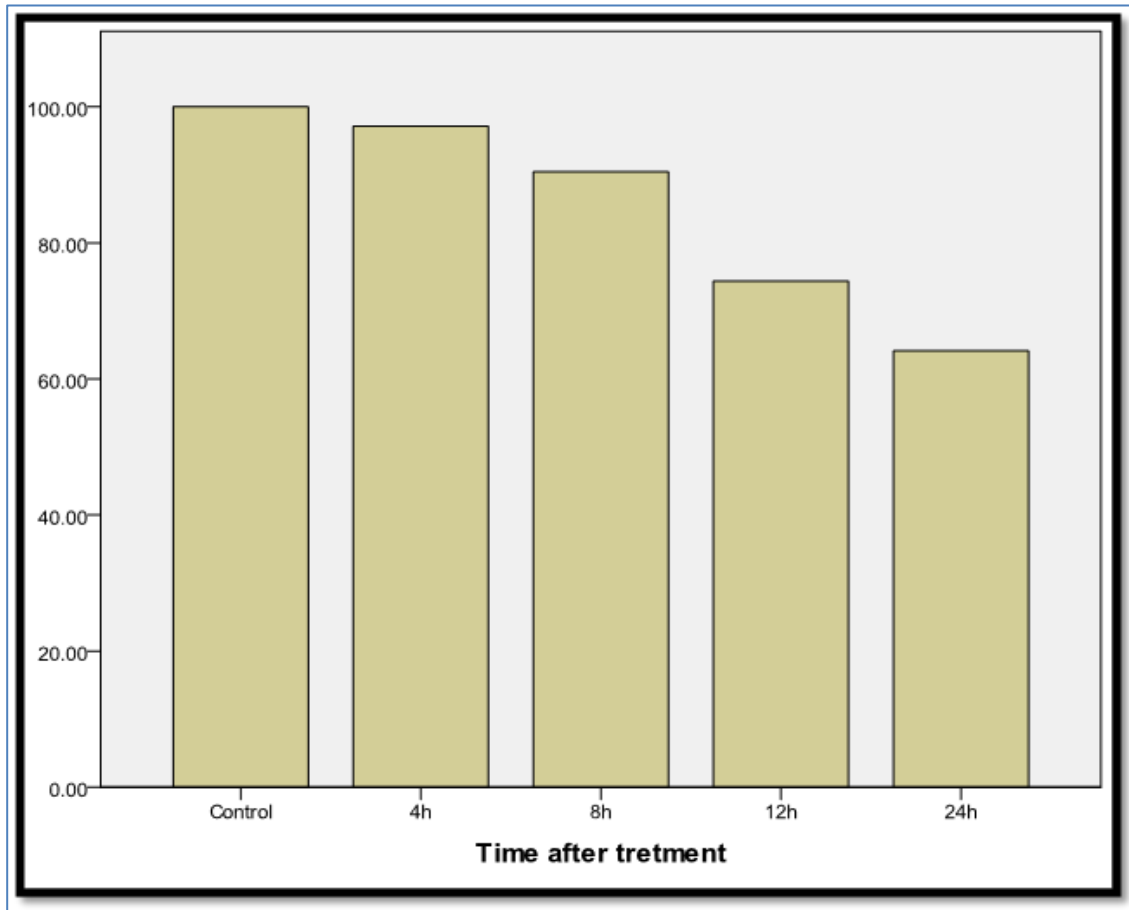


**Figure 1.- Viability % inhibition effect of different concentrations of curcumin ( 5- 80  $\mu$ M ) on 3T3L1 adipocytes. Cells were incubated with curcumin for 24h. Viability of the cells calculated by formula sample/control) x100.**

Post-hoc testing (LSD) showed that the most significant inhibition ( $P \leq 0.01$ ) started from the dose of 40  $\mu$ M, which is physiologically relevant. Moreover, induction of maximum inhibition by curcumin - as previously recommended- at ( $P \leq 0.01$ ) with this concentration (Figure 1). The selected dose (36- 37) showed a clear gradual inhibition in 3T3L1 cell viability% in a time-dependent manner (Figure 2), indicating that cell viability was significantly decreased ( $P \leq 0.01$ ) with longer incubations (97.13%  $\pm$  0.85%, 90.42%  $\pm$  1.44%, 74.38%  $\pm$  1.87%, and 64.12%  $\pm$  3.54% at 4, 8, 12, and 24 h, respectively).

### **3.2. Curcumin induces apoptosis.**

FACS analysis provided information about the extent of cell death (%). The results clearly showed that curcumin (40  $\mu$ M) induced apoptosis in a time-dependent manner, indicated an increase in cell death % compared with control (Figure 3).



**Figure 2.- Viability % inhibition effect of 40  $\mu$ M curcumin for different periods ranged from (4-24h) on 3T3-L1 adipocytes. Cells Viability % was calculated by formula sample/control) x100.**

### ***3.3. Curcumin induces AMPK and adiponectin activation and suppresses PKA and CREB phosphorylation.***

We next studied downstream the effect of Curcumin on these signals. Western blot analysis demonstrated that cells treated with 40  $\mu$ M curcumin induced AMPK phosphorylation (p-AMPK) and reduced levels of phosphorylated CREB (p-CREB) and phosphorylated Akt (p-Akt, to a lesser extent). Curcumin increased the expression of adiponectin, however, total AMPK expression was unaffected.  $\beta$ -actin was used as a loading control (Figure 4).

### ***3.4. Curcumin inhibits PKA activation.***

We further demonstrated a gradual decrease with time in the expression of the PKA catalytic subunit, an important transcription factor. The results of the PKA relative phosphorylation assay support this result; PKA relative activity was inhibiting 4–24-h post-curcumin treatment (Figure 5B)

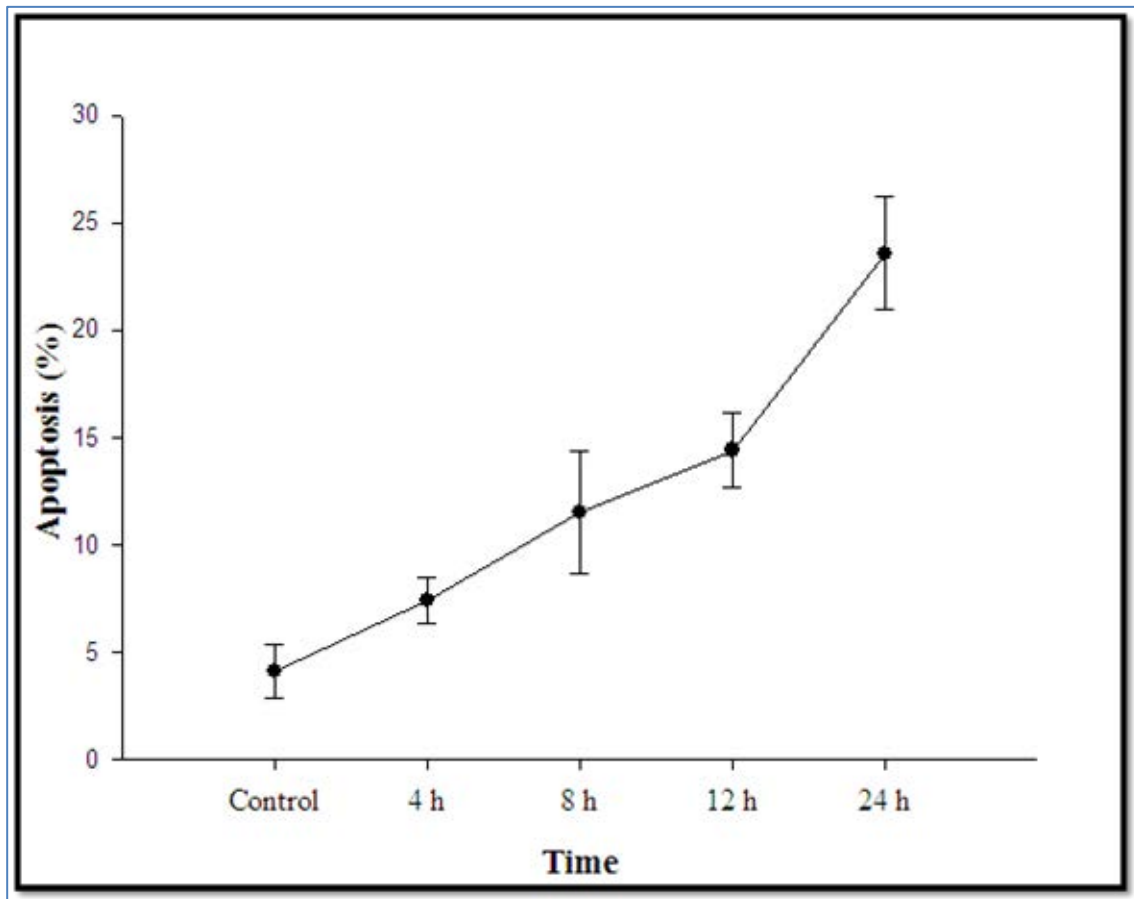


Figure 3.- Curcumin (40  $\mu\text{M}$ ) induces apoptosis (the number of cell death (%)) with time increasing.

### 3.5. Curcumin-inhibits oxidative stress-induced apoptosis.

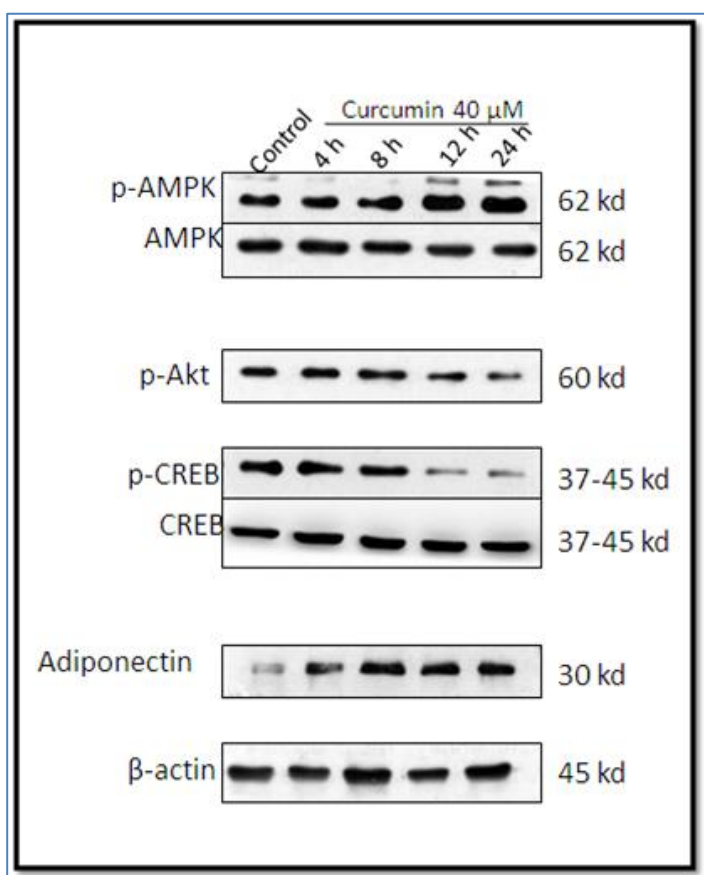
ROS relative fluorescence was measured after curcumin treatment (40  $\mu\text{M}$ ) showed an inhibitory effect on ROS generation level with/without  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment of 3T3L1 adipocytes (Figure 6).

## 4. DISCUSSION

This present study was performed to address contrasting data demonstrating that Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes versus data demonstrating that Curcumin activates proliferation of 3T3-L1 adipocytes. In addition, the present studies aim to elucidate the underlying molecular mechanism utilized by Curcumin. The results showed that increasing doses of curcumin significantly inhibited 3T3L1 adipocyte viability%. A lot of compelling evidences have also shown that curcumin exerts an angio-inhibitory action by decreasing vascular endothelial growth factor levels of NIH3T3 cells (17). These results were in agreement with previous finding that curcumin inhibited differentiation and increased apoptosis in 3T3-L1 (16) and in T-cell lymphoma cell lines (20). Curcumin can significantly decrease leptin release in LPS-treated adipocytes in



concentration and time-dependent way (5). The action of Curcumin observed in our current study is in agreement to results published by Guo and coworkers (24) who treated human colorectal carcinoma cells with 0–30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  curcumin and observed significant concentration-dependent inhibition of cell viability and growth, as well as induction of apoptosis. It is worth mentioning that low doses of curcumin (0.02  $\mu\text{M}$  for 24 h) exert different actions than high doses, which can have cytotoxic effects on 3T3-L1 cells (22).



**Figure 4.-** Western blot analysis showed that curcumin (40  $\mu\text{M}$ ) treated 3T3L1 cells at the indicated time induced AMPK phosphorylation (p-AMPK) and inhibited phosphorylated CREB (p-CREB) and also phosphorylated AKt (p-Akt) to a lesser extent . Adiponectin expression increased with time increasing in comparison with control. The expression of AMPK and CREB were still detected and didn't differ post curcumin (40 $\mu\text{M}$ ) treatment in indicated time,  $\beta$  - actin used as control for protein loading

Furthermore, flow cytometry analysis of cells treated with curcumin revealed an accumulation of apoptotic cells and suggested a clear and gradual increase in cell death compared with control (Figure 3). The results were in agreement with those published by Kim et al (38); We hypothesize that this delay in cell growth may be attributable to re-regulation of the expression of some essential proteins required in cell cycle (39) and to the modulation in apoptotic factors (24). Curcumin has shown apoptotic effects in many cell lines in a concentration- and time-dependent manner (6).

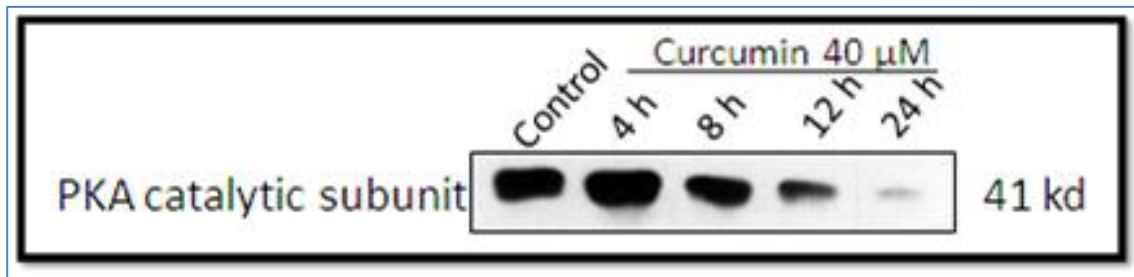


Figure 5a.- Curcumin (40 μM) treatment showed clear decrease in the expression of PKA catalytic subunit with time increasing in 3T3L1 cells compared with control.

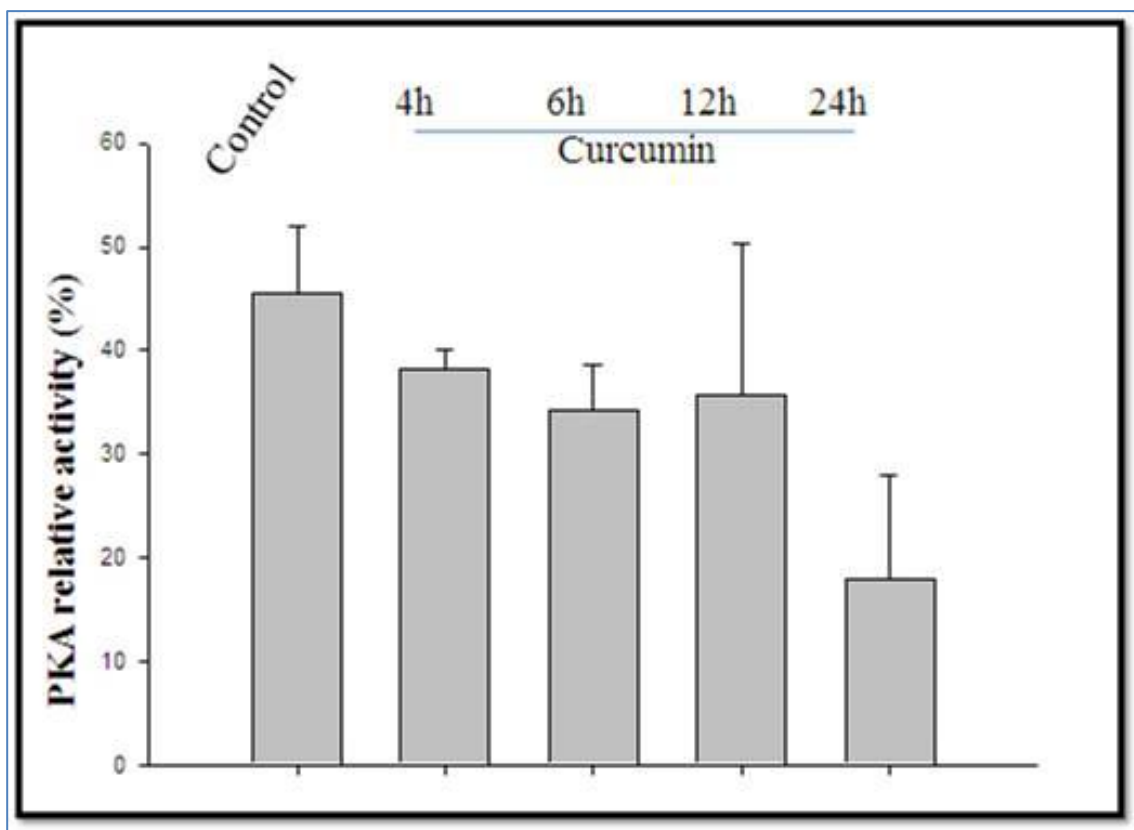


Figure 5b.- Curcumin (40 μM) treatment showed an inhibiting effect on PKA activity (%) during 4-24h on 3T3L1 cells.

In this study, FACS analysis showed that curcumin arrested the cell cycle. Curcumin was shown to induce sequential G1/S and G2/M phase arrest in a human osteosarcoma cell line (37) and S phase arrest in human colorectal carcinoma cells (24). Our data demonstrated found that Curcumin induced apoptosis and inhibited ROS generation level induced by the oxidant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 3T3L1 adipocytes. This result could be explained by the findings of Balasubramanyam et al (40) who showed that the antioxidant effects of curcumin occurred via inhibition of Ca<sup>2+</sup> influx and protein kinase C. In contrast, Thayyullathil et al (41) reported that curcumin induced ROS generation, which in turn resulted in apoptosis via activating apoptotic-inducing factor in mouse

fibroblast L929 cells. In addition, Yang et al, (42) showed that ajoene exerts apoptotic activity in 3T3L1 cells by increasing intracellular ROS levels. The results of the current study demonstrate that curcumin exerts apoptotic effect on 3T3L1 cells in an ROS generation-independent fashion.

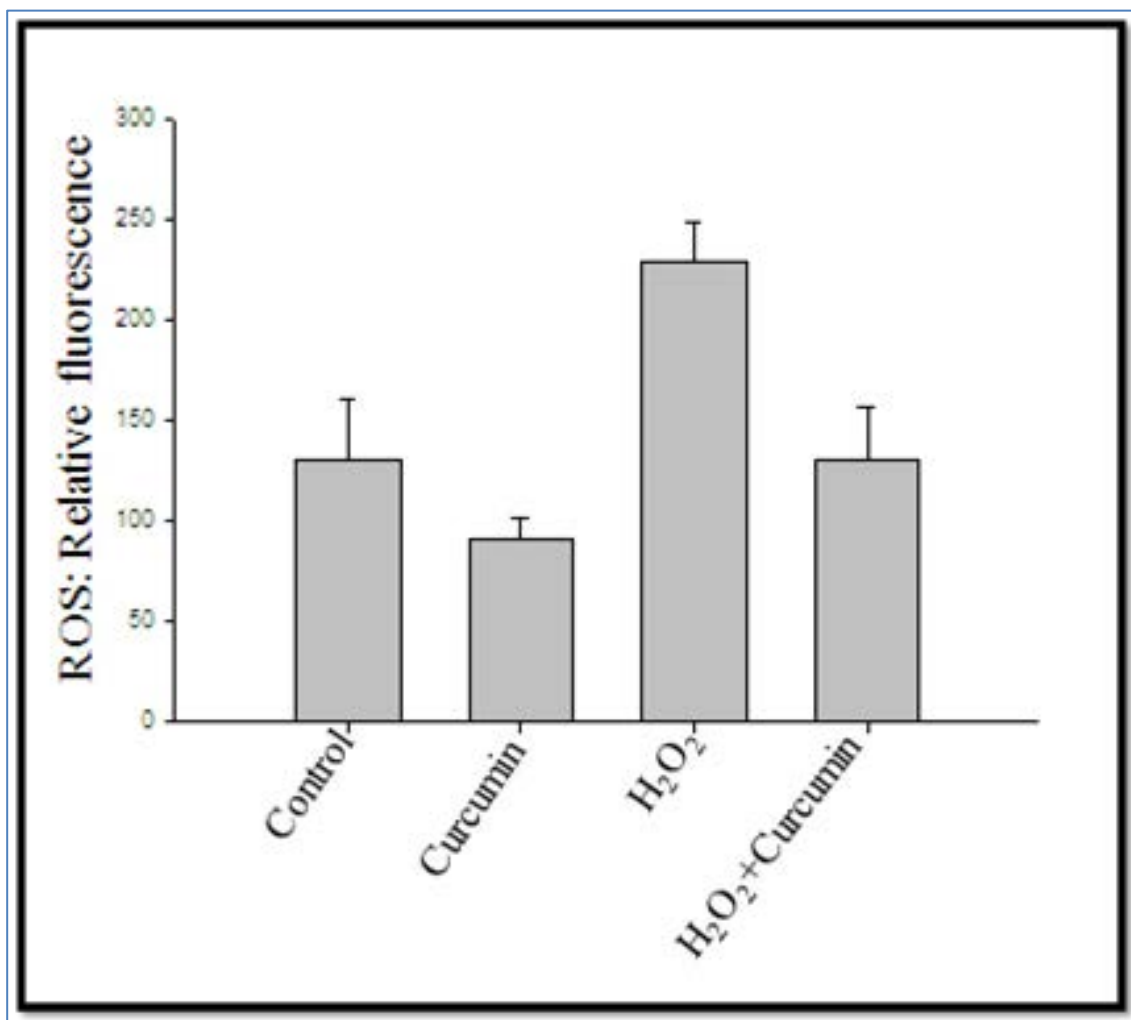


Figure 6.- Showed curcumin (40 $\mu$ M) inhibiting effect on ROS generation level induced with/without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 3T3L1 adipocytes.

Western blot analysis revealed that curcumin inhibited 3T3L1 viability and affected cellular signalling, including PKA pathway inhibitions, cyclic adenosine mono phosphate (cAMP) is an essential intracellular second messenger for controlling a variety of cellular processes, and PKA is its primary target (43). In this study, 40  $\mu$ M curcumin increased p-AMPK levels (Figure 4) but inhibited expression of the PKA catalytic subunit and its relative activity (Figure 5). PKA has four subunits, and the dissociated active catalytic subunits elicit cellular responses by increasing the phosphorylation of several proteins. cAMP-mediated transcriptional responses requires the ability of PKA to phosphorylate CREB (30) . Induction of CREB is followed by the expression of many transcription factors that support adipogenesis (13,44,45). To identify the physiological importance of PKA

signalling on the apoptotic action of curcumin, we examined the expression of PKA catalytic subunits in Curcumin treated 3T3L1 adipocyte cells. We demonstrated that Curcumin treatment blocked PKA catalytic subunit expression and inhibited PKA relative activity (Figure 5A), especially at 24h post treatment (Figure 5B), which explained the gradual reduction in p-CREB levels (Figure 4). As Akt's phosphorylation is required for its efficient activation (30), the p-Akt expression was also examined and found that it has decreased but to a lesser extent than p-CREB (Figure 4). This means that the apoptotic action of curcumin on 3T3L1 cells is accompanied by decreasing p-CREB and p-Akt expression. This is consistent with the function of CREB in mediating Akt's action described by Wang et al. (46) and Akt's ability to phosphorylate CREB (47).

In contrast, these results disagree with the finding of Yeo et al (30) studying prostaglandin-mediated anti-apoptotic action on monocytic HL-60 cells.

Adiponectin hormone concentrations are inversely correlated with body fat % in adults (48). In transgenic mice, there was a reduction in adipocytes differentiation following overexpression of adiponectin targeted to adipose tissue (49) which is in agreement with other findings. Curcumin's apoptotic effect was accompanied by increased expression of both adiponectin and p-AMPK (Figure 4). Adiponectin appears to be a growth antagonistic hormone in 3T3L1 adipocytes and may promote apoptosis via the AMPK signal pathway. AMPK has a key role in regulating cell metabolism, energy (50), cell growth, autophagy, and cell reprogramming, (12). In the current study, AMPK was detected in 3T3L1 before and 24-h post-curcumin treatment, a result that is supported by a previous study of adipocytes and cancer cells, which found that curcumin plays a critical role on cell differentiation and growth inhibition via AMPK activation (19, 12). Upregulation of fatty acid oxidation is a physiological function of leptin and adiponectin in skeletal muscle, and adipokines are able to carry out this function through their effect on AMPK signalling (51, 52). Our findings demonstrated that both adipokines and cAMP play a role in apoptosis and are supported by the study on breast cancer cells by Naviglio et al, (9) who concluded that although leptin inhibits adenylate cyclase/cAMP/PKA, elevating cAMP levels may be a novel therapy for breast cancer. Furthermore, Hardie et al (53) demonstrated that stimulators of AMPK may be of useful tools for preventing metabolic diseases.

In conclusion, curcumin modulates the phosphorylation of cellular signalling molecules. Curcumin's ability to inhibit the phosphorylation of transcription factor in 3T3L1 could be attributed to the ability of AMPK to adapt to acute changes in the metabolic enzymes via direct phosphorylation and through decreased transcriptional response (54). In addition, AMPK reduced the expression of CREB targets (12), and Curcumin decreased the expression of the PKA catalytic subunit and inhibited levels of the phosphorylated protein factors p-

CREB and p-Akt, Finally, the apoptotic effect of curcumin was synchronised with decreased expression of p-Akt, which is an important factor in cell survival and proliferation (47).

## **5. ACKNOWLEDGEMENT**

The author thanks Dr Adeeb Shehzad for his technical assistance and help with figures preparation, and gratefully acknowledges the efforts by Prof. Alexzander Asea and Dr. Badaruddin Abbasi for carefully proofreading the manuscript.

## **6. REFERENCES**

1. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* **35**, 495–516 (2007).
2. Tilg, H.; Moschen, AR. Adipocytokines, mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*. **6**, 772-783 (2006).
3. Aoki, N.; Jin-no, S.; Nakagawa, Y.; Asai, N.; Arakawa, E.; Tamura, N.; Tamura, T.; Matsuda, T. Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes, redox- and hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles. *JEndocrinology* **148**(8), 3850-3862 (2007).
4. Zeigerer, A.; Rodeheffer, M S.; McGraw, T E.; Friedman, J M. Insulin regulates leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes by a PI 3 kinase independent mechanism. *JExp Cell Res.* **1**, **314**(11-12), 2249-2256 (2008).
5. Ciardi, C.; Jenny, M.; Tschoner, A.; Ueberall, F.; Patsch, J.; Pedrini, M.; Ebenbichler, C.; Fuchs, D. Food additives such as sodium sulphite, sodium benzoate and curcumin inhibit leptin release in lipopolysaccharide-treated murine adipocytes in vitro. *Br J Nutr* **107**(6), 826-833 (2012).
6. Jiang, M C.; Yang-Yen, H F.; Yen, J J.; Lin, J K. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer* **26**(1), 111-120 (1996).
7. Peyot, M.; Gadeau, A.; Dandré, F.; Belloc, I.; Dupuch, F.; Desgranges, C. Extracellular Adenosine Induces Apoptosis of Human Arterial Smooth Muscle Cells via A2b-Purinoceptor. *Circulation Research* **86**, 76-85 (2000).
8. Zhang, J.; Wang, Q.; Zhu, N.; Yu, M.; Shen, B.; Xiang, J.; Lin A. Cyclic AMP inhibits JNK activation by CREB-mediated induction of c-FLIP(L) and MKP-1, thereby antagonizing UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **15**(10), 1654-1662 (2008).
9. Naviglio, S.; Di Gesto, D.; Romano, M.; Sorrentino, A.; Illiano, F.; Sorvillo, L.; Abbruzzese, A.; Marra, M.; Caraglia, M.; Chiosi, E.; Spina, A.; Illiano, G. Leptin enhances growth inhibition by cAMP elevating agents through apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* **8**(12), 1183-1190 (2009).
10. Ruderman, N B.; Park, H.; Kaushik, V K.; Dean, D S.; Constant, S.; Prentki, M.; Saha, A K. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand* **178**, 435–442 (2003).
11. Ruderman, N. B.; Saha, A. K.; Vavvas, D.; Witters, L. A. Malonyl-CoA, fuel sensing and insulin resistance. *Am J Physiol* **276**, E1–18 (1999).
12. Mihaylova, M. M.; Shaw, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology* **13**, 1016-1023 (2011).
13. Reusch, J. B.; Colton, L. A.; Klemm, D. J. CREB Activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol* **20.3**, 1008–1020 (2000).
14. Simon, H. U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Schaffer, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **5.5**, 415-418 (2000).
15. Antognelli, C.; Gambelungho, A.; Talesa, V. N.; Muzi, G. Reactive oxygen species induce apoptosis in bronchial epithelial BEAS-2B cells by inhibiting the antiglycation glyoxalase I

- defence, involvement of superoxide anion.; hydrogen peroxide and NF- $\kappa$ B. Apoptosis (2013 September 4) (Epub ahead of print).
16. Ejaz, A.; Dayong, W.; Paul, K.; Mohsen, M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL Mice1–3. *The Journal of Nutrition* **139** 919–925 (2009).
  17. Gururaj, A. E.; Belakavadi, M.; Venkatesh, D. A.; Marmé, D.; Salimath, B. P. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* **4**, 297(4), 934-942 (2002).
  18. Kawamori, T.; Lubet, R.; Steele, V. E.; Kelloff, G. J.; Kaskey, R. B.; Rao, C. V.; Reddy, B. S. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res* **59**, 597–601 (1999).
  19. Lee, Y.K.; Lee, W.S.; Hwang, J.T.; Kwon, D.Y.; Surh, Y.J.; Park, O.J. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPK $\alpha$ -PPAR- $\gamma$  in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPK $\alpha$ -COX-2 in cancer cells. *J Agric Food Chem* **14**, 57(1), 305-310 (2009a).
  20. Zhang, C.; Li, B.; Zhang, X.; Hazarika, P.; Aggarwal, B.B.; Duvic, M. Curcumin selectively induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines and patients' PBMCs, potential role for STAT-3 and NF- $\kappa$ B signaling. *J Invest Dermatol* **130**(8), 2110-2119 (2010)..
  21. Masuelli, L.; Benvenuto, M.; Fantini, M.; Marzocchella, L.; Sacchetti, P.; et al. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cell lines and delays the growth of mammary tumors in neu transgenic mice. *J Biol Regul Homeost Agents* **27**(1), 105-119 (2013).
  22. Kim, J H.; Park, S. H.; Nam, S. W.; Kwon, H. J.; Kim, B. W.; Kim, W. J.; Choi, Y. H. Curcumin stimulates proliferation, stemness acting signals and migration of 3T3-L1 preadipocytes. *International Journal of Molecular Medicine* **28**(3), 429-435 (2011a).
  23. Staal, S P.; Hartley, J. W.; Rowe, W. P. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci* **74**(7), 3065–3067 (1977).
  24. Guo, L D.; Chen, X. J.; Hu, Y. H.; Yu, Z. J.; Wang, D.; Liu, J. Z. Curcumin inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal cancer cells by activating the mitochondria apoptotic pathway. *Phytother Res* **27**(3), 422-430 (2013).
  25. Ammon, H. P.; Wahl, M. A. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med* **57**, 1–7 (1991).
  26. Chainani-Wu, N. Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin, A Component of Tumeric (Curcuma longa). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* **9**.1, 161-168 (2003).
  27. Nawaz, A.; Khan, G.; Hussain, A.; Ahmad, A.; Khan, A.; Safdar, M. Gomal. *University Journal of Research* **27**(1), 7-14 (2011).
  28. Lu, F.; Chen, H.; Zhou, C.; Liu, S.; Guo, M.; Chen, P.; Zhuang, H.; Xie, D.; Wu, S. T-type Ca<sup>2+</sup> channel expression in human esophageal carcinomas, A functional role in proliferation. *Cell Calcium* **43**(1), 49–58 (2008).
  29. Lee, S.; Shehzad, A.; Jung, J.; Sonn, J.; Lee, J.; Park, J.; Lee, S. Protein kinase C $\alpha$  protects against multidrug resistance in human colon cancer cells. *Molecules and Cells* **34**(1), 61-69 (2012).
  30. Yeo, H.; Shehzad, A.; Lee, Y. Prostaglandin E2 Blocks Menadione-Induced Apoptosis through the Ras/Raf/Erk Signaling Pathway in Promonocytic Leukemia Cell Lines. *Molecules and Cells* **33**, 371-378 (2012).
  31. Hsu; Yen. Posted without published information on the link <http://www.nchu.edu.tw/~add/budget/student%20abroad/inter-meeting-94/T94-3-27.pdf>
  32. Hsu, C.; Yen, G. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Molecular Nutrition & Food Research* **50**(11), 1072–1079 (2006).
  33. Reyes-Leon, A.; Atherton, J C.; Argent, R H. Puente, J. L.; Torres V. Heterogeneity in the Activity of Mexican Helicobacter pylori Strains in Gastric Epithelial Cells and Its Association with Diversity in the cagA Gene. *Infect. Immun* **75**(7), 3445-3454 (2007).
  34. Blum, S.; Moore, A N.; Adams, F.; Dash, P K. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J. Neurosci* **19**, 3535-3544 (1999).
  35. Roy, A.; Ganguly, A.; Dasgupta, S. B.; Das, B. B.; Pal, C.; Jaisankar, P.; Majumder H. K. Mitochondria-Dependent Reactive Oxygen Species-Mediated Programmed Cell Death



- Induced by 3,3'-Diindolylmethane through Inhibition of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP Synthase in Unicellular Protozoan Parasite *Leishmania donovani*. *Molecular Pharmacology* **74**(5), 1292-1307 (2008).
36. Wang, D.; Jiang, H. U.; Lin, L. V.; Xiuwen, X.I.A.; Jianzhong, L.I.U.; Xiaoyuan, L.I. Enhanced inhibitory effect of curcumin via reactive oxygen species generation in human nasopharyngeal carcinoma cells following purple-light irradiation. *Oncology Letters* **6**(1), 81-85 (2013).
  37. Lee, D. S.; Lee, M. K.; Kim, J. H. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells. *Anticancer research* **29**, 5039-5044 (2009b).
  38. Kim, C.Y.; Le, T. T.; Cheng, J.; Kim, K. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **22**(10), 910-920 (2011b).
  39. Bertoli, C.; Skotheim, J. M.; De Bruin, R.A.M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **14**, 518- 528 (2013).
  40. Balasubramanyam, M.; Koteswari, A. A.; Kumar, R. S.; Monickaraj, S. F.; Maheswari, J U.; Mohan, V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation, Novel therapeutic implications. *J. Biosci* **28**, 715-721 (2003).
  41. Thayyullathil, F.; Shahanas, C.; Abdulkader, H.; Mahendra, P.; Sehamuddin, G. Rapid reactive oxygen species (ROS) generation induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells. *Free Radical Biology and Medicine* **45**(10), 1403-1412 (2008).
  42. Yang, J.; Della-Fera, M. A.; Nelson-Dooley, C.; Baile, C. A. Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Ajoene in 3T3-L1 Adipocytes. *Obesity* **14**(3), 388-397 (2006).
  43. Funamoto, S.; Anjard, C.; Nellen, W.; Ochiai, H. cAMP-dependent protein kinase regulates Polysphondylium pallidum development. *Differentiation* **71**(1), 51-61 (2003).
  44. Voet, V.; Pratt, R. *Fundamentals of Biochemistry*. Wiley; 2006.
  45. Peverelli, E.; Ermetici, F.; Corbetta, S.; Gozzini, E.; Avagliano, L.; Zappa, M.; Bulfamante G.; Beck-Peccoz, P.; Spada, A.; Mantovani G. PKA regulatory subunit R2B is required for murine and human adipocyte differentiation. *Endocr Connec* EC-13-0049, (2006).
  46. Wang, J. M.; Chao, J. R.; Chen, W.; Kuo, M L.; Yen, J J.; Yang-Yen, H F. The antiapoptotic gene *mcl-1* is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol. Cell Bio* **19**, 6195-7206 (1999).
  47. Song, G.; Ouyang, G.; Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **9**(1), 59-71 (2005).
  48. Ukkola, O.; Santaniemi, M. Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *J. Mol. Med* **80**(11), 696-702 (2002)..
  49. Bauche, I B.; El Mkaem, S A.; Pottier, A. M.; Senou, M.; Many, M. C.; Rezsosazy, R.; Penicaud, L.; Maeda, N.; Funahashi, T.; Brichard, S M. Overexpression of adiponectin targeted to adipose tissue in transgenic mice: impaired adipocyte differentiation. *Endocrinology* **148**, 1539-1549 (2007).
  50. Zhang, B. B.; Zhou, G.; Li, C. AMPK, an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* **5**, 407-416 (2009).
  51. Minokoshi, Y.; Kim, Y. B.; Peroni, O. D.; Fryer, L. G.; Müller, C.; Carling, D.; Kahn, B.B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415** (6869), 339-343 (2002).
  52. Taylor, E B.; Hurst, D.; Greenwood, L J.; Lamb, J D.; Cline, T D.; Sudweeks, S N.; Winder, W W. Endurance training increases LKB1 and MO25 protein but not AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* **287**(6), E1082-E1089 (2004).
  53. Hardie, D. G.; Ross, F A.; Hawley, S A. AMP-activated protein kinase, a target for drugs both ancient and modern. *Chem Biol* **26**, **19**(10), 1222-1236 (2012).
  54. Cantó, C.; Auwerx, J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci* **67**(20), 3407-3423 (2010).





## Sesión científica conmemorativa del Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina y en Química



**Juan Ramón Lacadena Calero**

Coordinador de la sesión.

Sesión celebrada el 27 de noviembre de 2013

e-mail: [jrlgbucm@bio.ucm.es](mailto:jrlgbucm@bio.ucm.es)

---

---

### ORDEN DEL DÍA

#### *Presentación:*

---

**“El Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina: el GPS cerebral”**

**“El Premio Nobel 2014 en Química: la nanoscopía”**

Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

#### *Ponentes:*

---

**“El premio Nobel de Fisiología o Medicina 2014”**

Excmo. Sr. Francisco J. Rubia

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina

**“Premio Nobel de Química 2014: observando el nanomundo”**

Excmo. Sr. Jesús Pintor

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

## El Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina: el GPS cerebral

Juan-Ramón Lacadena Calero

---

An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 4 (2014), pag. 736-737

El 6 de octubre de 2014, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo otorgó el Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina “por sus descubrimientos de las células que constituyen un sistema de posicionamiento en el cerebro” conjuntamente y a partes iguales, por un lado, a John O’Keefe, Profesor de Neurociencia Cognitiva y Director del Sainsbury Wellcome Center in Neural Circuits and Behaviour en el University College de Londres y, por otro lado, al matrimonio formado por los Dres. May-Britt y Edvard I. Moser que son, respectivamente, Profesora de Neurociencia y Directora del Centre for Neural Computation en la Universidad Noruega de Ciencia y Tecnología en Trondheim y Profesor y Director del Kavli Institute for Systems Neuroscience en la misma Universidad. Ambos fueron científicos visitantes en el laboratorio del Dr. O’Keefe.

Como señalaba la nota de prensa del Instituto Karolinska, John O’Keefe descubrió en 1971 el primer componente cerebral del sistema de posicionamiento: se trataba de un tipo de células del hipocampo del cerebro de ratas que se activaban cuando el animal estaba en un determinado lugar del espacio de investigación, mientras que otras células nerviosas se activaban cuando el animal estaba en otro lugar (1, 2). La conclusión de O’Keefe fue que estas células de lugar o posicionamiento (*place cells*) formaban en el cerebro un mapa del espacio.

Treinta años más tarde, en la primera década de este siglo, May-Britt y Edvard I. Moser (3, 4, 5) descubrieron otro nuevo componente del sistema de posicionamiento del cerebro, identificando un tipo de células situadas en otro lugar del cerebro (el cortex entorrinal), llamadas células en parrilla o red (*grid cells*), que generan un sistema de coordenadas cerebral que permite a la rata situarse y explorar el terreno con precisión.

En definitiva, usando términos coloquiales, los galardonados han puesto en evidencia la existencia de un sistema interno de GPS cerebral.

Termino este breve comentario poniendo de manifiesto mi particular satisfacción por un doble motivo: en primer lugar, porque haya merecido el premio un matrimonio (es la cuarta vez que esto sucede) que ha sido capaz de colaborar no sólo en su proyecto de vida en común como pareja, sino también en el quehacer científico y, en segundo lugar, porque May-Britt Moser ha aumentado la nómina de mujeres galardonadas con el Premio Nobel en un área científica (Fisiología o Medicina, Química, Física) que, según los datos que proporciona la Institución

Nobel es más bien escasa: solamente 16 mujeres han obtenido el Premio Nobel en Ciencias, aunque alguna por partida doble, como es el caso de Marie Curie.

Para comentar este Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina contamos hoy con la presencia del Profesor Francisco José Rubia, experto en Fisiología del Sistema Nervioso. Me gustaría poner de manifiesto que en el ciclo de conferencias que ha impartido en el mes de octubre de este año el profesor Rubia en el Colegio Libre de Eméritos sobre “Funciones cerebrales” incluía una conferencia sobre “Cerebro y espacio”, programada proféticamente mucho antes de la concesión del Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina.

Tiene la palabra el Profesor Rubia.

### **REFERENCIAS**

1. O'Keefe, J.; Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* **34**, 171-175. (1971).
2. O'Keefe, J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental Neurology*, **51**, 78-109 (1976).
3. Fyhn, M.; Molden, S.; Witter, M.P.; Moser, M.B.; Moser, E.I. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science*, **305**, 1258-1264 (2004).
4. Hafting, T.; Fyhn, M.; Molden, S.; Moser, M.B.; Moser, E.I. Microstructure of spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, **436**, 801-806 (2005).
5. Sargolini, F.; Fyhn, M.; Hafting, T.; McNaughton, B.L.; Witter, M.P.; Moser, M.B.; Moser, E.I. Conjunctive representation of position, direction, and velocity in the entorhinal cortex. *Science*, **312**, 758-762 (2006).

## El premio Nobel de Medicina o Fisiología 2014

### Francisco J. Rubia

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina.

---

*An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 2 (2014), pag. 738-748*



**Figura 1.**

El premio Nobel de Medicina o Fisiología de este año ha sido concedido a tres neurocientíficos: el estadounidense John O'Keefe y la pareja de noruegos May-Britt y Edvard Moser (Figura 2).

Oficialmente el premio se concede por sus investigaciones sobre las células de posicionamiento del cerebro, una especie de "GPS interno" que permite a las personas orientarse en el espacio.

John O'Keefe nació en 1939 en Nueva York y es Profesor en el Instituto de Neurociencia Cognitiva y en el Departamento de Anatomía del University College de Londres. En este mismo año recibió el Premio Kavli de Neurociencia "por el descubrimiento de las redes cerebrales específicas de la memoria y la cognición", junto con Brenda Milner y Marcus Raichle (Figura 3).



**Figura 2.-De izquierda a derecha, John O'Keefe, May Britt y Edvard Moser.**



**Figura 3.-John O'Keefe junto a Brenda Milner y Marcus Raichle.**

Brenda Milner es una neuropsicóloga canadiense, profesora en el Departamento de Neurología y Neurocirugía de la Universidad McGill y Profesora de Psicología del Instituto Neurológico de Montreal. Es muy conocida por haber estudiado durante años al paciente H.M. del que hablaremos más tarde. Marcus Raichle es un neurólogo estadounidense de la Escuela de Medicina de la Universidad Washington en San Luis, Missouri, y es conocido por sus trabajos con técnicas de neuroimagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la resonancia magnética funcional aplicadas al estudio del cerebro sano y patológico.

La pareja de neurocientíficos noruegos, May-Britt y Edvard Moser nacieron en 1963 y 1962 respetivamente. Edvard Moser es el director del Instituto Kavli para Neurociencia de Sistemas y Centro de Computación Neural de la Universidad noruega de Ciencia y Tecnología en Trondheim. Ambos trabajan en un gran laboratorio con unos 20 a 30 doctorandos y estudiantes de Ph.D.



Pero antes de entrar en detalle sobre estos descubrimientos permítanme remontarme un poco en el tiempo.

Desde el punto de vista del sistema nervioso podría decirse que “en el principio era la acción”. Esto quiere decir que sólo organismos que se mueven poseen un sistema nervioso.

Como ejemplo que corrobora esta afirmación tenemos a las ascidias, un género de tunicados que pertenecen al subfilo Urochordata (Figura 4). Estos animales, en su estado larvario, poseen una notocorda (Figura 5), que induce a la ectodermis a formar el sistema nervioso central. Pero cuando se hacen sésiles, cuando se fijan a las rocas, y por tanto dejan de moverse, las ascidias reabsorben estos rudimentos de sistema nervioso central. Precisamente por ello han sido comparadas con algunos profesores cuando consiguen un puesto fijo.



**Figura 4.-Ascidias, subfilo Urochordata.**

Por tanto, animales que se mueven tienen un sistema nervioso y este sistema nervioso tiene que hacer posible, para que puedan moverse en un entorno, la orientación en ese espacio. Un espacio en el que vivimos, en el que nos movemos, que exploramos y que defendemos.

En los animales de experimentación que solemos utilizar, generalmente mamíferos, dos estructuras permiten la orientación en el espacio: la corteza posterior del lóbulo parietal y el hipocampo.



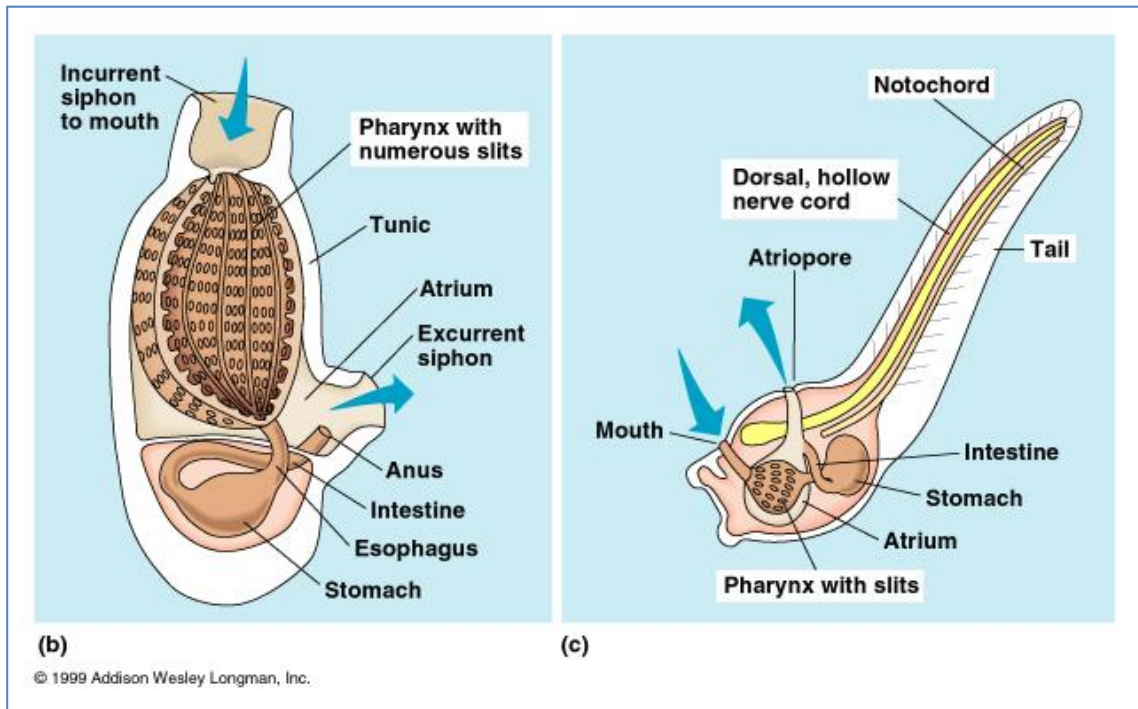


Figura 5.

Que la corteza parietal posterior tiene que ver con el espacio es un conocimiento ya antiguo demostrado sobre todo por los efectos de lesiones o tumores en esa región del cerebro. El síndrome de negligencia, por ejemplo, producido sobre todo por lesiones en la corteza parietal posterior derecha hace que el paciente desatienda el hemiespacio contralateral, es decir, el izquierdo, que comience a leer una página de un libro desde el centro a la derecha, que se afeite sólo la mitad derecha de la cara, o que dibuje solamente la parte derecha de una figura (Figura 6).

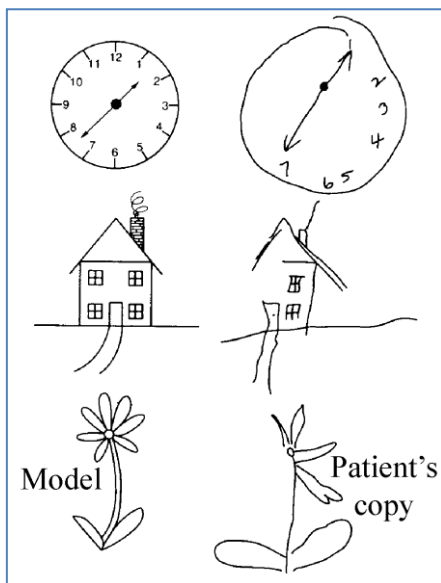


Figura 6.

La orientación en el espacio guiada por la visión, lo que se conoce como visuoespacialidad, es una de las funciones que realiza esta parte de la corteza cerebral, función importante sobre todo para poder movernos en el espacio exterior. De ahí las profundas conexiones de esta región parietal con las funciones ejecutivas, motoras, de la corteza frontal.

Mucho más moderno es el conocimiento de la implicación del hipocampo en tareas espaciales. Bien es verdad que aquí también se adelantó la neurología, ya que a mitad del siglo pasado se conoció el célebre caso del paciente H.M., llamado así para proteger su privacidad,

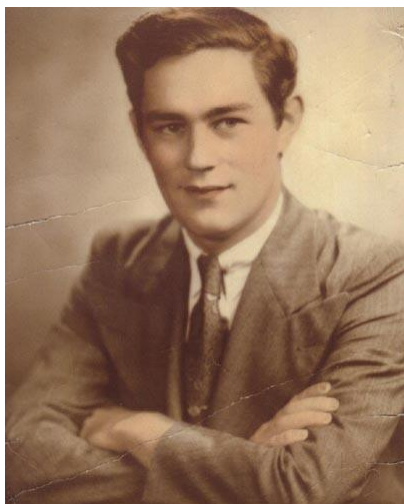


Figura 7.

pero que hoy sabemos que se llamaba Henry Molaison tras su muerte en el año 2008 (Figura 7).

Este paciente sufría de ataques epilépticos en ambos lóbulos temporales, por lo que un neurocirujano le extirpó grandes regiones de ambos lóbulos incluido el hipocampo de los dos lados. Los ataques desaparecieron, pero el paciente sufrió desde entonces una amnesia anterógrada, es decir que olvidaba al cabo de una hora todo lo que experimentaba, conservando en cambio la memoria de lo vivido antes de la operación. La amnesia anterógrada se manifestaba, por ejemplo, en el hecho de que cada día que entraba el médico a visitarle le saludaba como si no lo conociese, como si el día anterior no lo hubiese visto. O en que el paciente lloraba cada vez que se le decía que un tío muy querido por él había fallecido.

Hoy sabemos que la llamada memoria explícita, episódica o autobiográfica depende del hipocampo, pero también la memoria espacial, demostrada recientemente con técnicas modernas de neuroimagen en taxistas londinenses que tenían un hipocampo de mayor tamaño que el ciudadano normal de Londres, ya que los taxistas tienen que orientarse continuamente en la ciudad y pasar previamente un durísimo examen con el aprendizaje de numerosas rutas para poder llegar a conseguir su licencia. El aumento del hipocampo se explica hoy por otro descubrimiento relativamente reciente, a saber que en el hipocampo existe neurogénesis, o sea creación de nuevas células, algo desconocido cuando yo estudiaba medicina.

Evidentemente, el paciente H. M. sufría asimismo de un grave deterioro en la memoria espacial y se manifestaba en la incapacidad para aprender y encontrar el camino en barrios que no conocía.

Pero la importancia del hipocampo para la orientación espacial del animal fue definitivamente confirmada por los descubrimientos de John O'Keefe en 1971. En este año, O'Keefe y su estudiante Jonathan Dostrovsky publicaron en la revista *Brain Research* un trabajo titulado "El hipocampo como un mapa espacial" en el que constataron que las neuronas del hipocampo dorsal disparaban cuando los animales, concretamente ratas, estaban localizadas en una parte determinada de su entorno, pero no en otros lugares. A estas neuronas, los autores las llamaron "place cells" o neuronas de lugar (Figura 8).

Y a las neuronas que no tenían nada que ver con la posición del animal en el espacio las llamaron "displace cells".

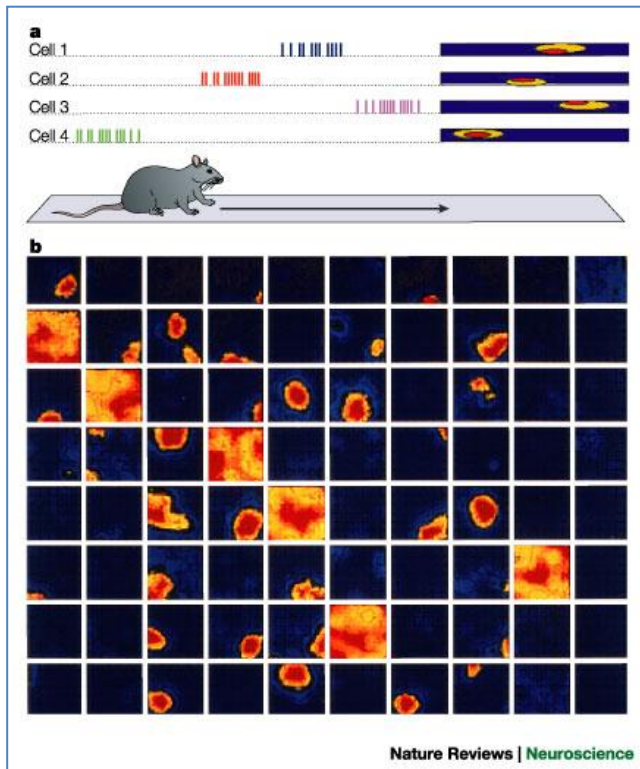


Figura 8.

En esa época estaba yo de catedrático de Fisiología Humana en la Universidad de Munich y recuerdo la controversia que los resultados de O'Keefe despertaron en la comunidad científica. Hasta que, en 1978, John O'Keefe y Lynn Nadel publicaron un libro con el título "The Hippocampus as A Cognitive Map" (El hipocampo como un mapa cognitivo) (Figura 9), que reunía todos los trabajos realizados por estos autores y sus colaboradores hasta ese momento.

La teoría del mapa cognitivo de la función del

hipocampo es sobre todo una teoría sobre la memoria de los diseños espaciales y manera en la que los animales utilizan ese sistema de memoria para su conducta adaptativa al mundo exterior. Los hechos que llevaron a O'Keefe y colaboradores a esta teoría son los siguientes: O'Keefe estaba muy interesado en conocer cómo el cerebro controlaba la conducta, y a finales de los años 60 comenzó sus experimentos con métodos neurofisiológicos. Utilizando ratas de laboratorio, los investigadores registraron la actividad de neuronas piramidales del hipocampo en las regiones CA3 y CA1. Las llamadas células de lugar disparaban cuando el animal entraba en una precisa localización que denominaron "campos de lugar". Cuando el animal entraba en un nuevo entorno en cuestión de minutos se formaban nuevos campos de lugar que permanecían estables durante meses. De manera que si se registraba un cierto número de células de lugar se podía predecir dónde se encontraba el animal en su entorno. De esta manera, el hipocampo constituye un mapa cognitivo del entorno del animal.

Esta idea de "mapa cognitivo" ya fue propuesta anteriormente por el psicólogo estadounidense Edward Tolman en 1948. Tolman planteó que en algún lugar del cerebro tenía que haber una representación del entorno que permitiera al animal orientarse en él.

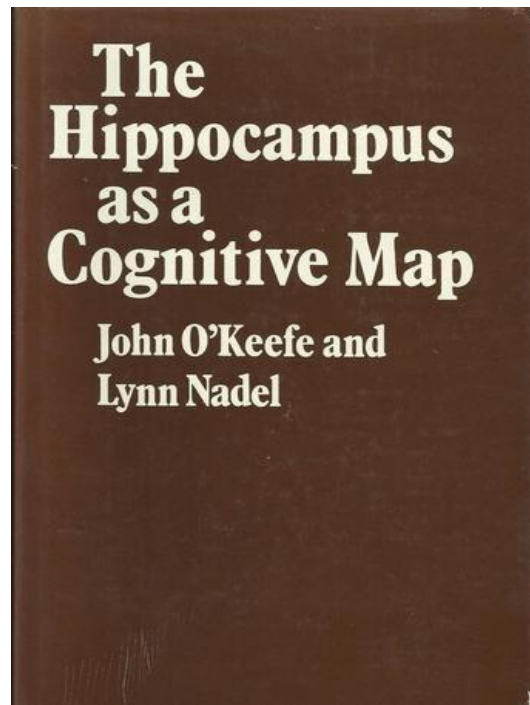


Figura 9.

La cuestión es cómo se forma ese mapa del entorno y qué tipo de información es aportada a las neuronas piramidales del hipocampo que son células de lugar. Esto es precisamente lo que investigaron los científicos noruegos May-Britt y Edvard Moser. Descubrieron que en la corteza entorrinal, localizada en el lóbulo temporal medio y que funciona como una interfaz entre el hipocampo y el neocórtex, sus células proyectan sus axones por la llamada vía perforante al hipocampo (Figura 10).

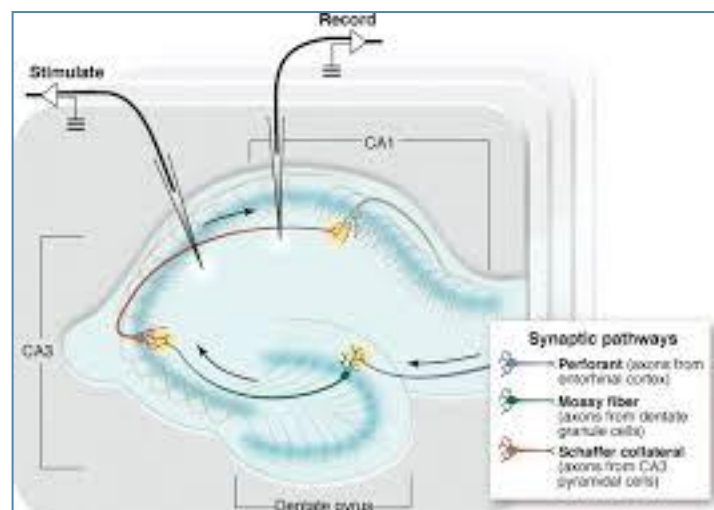


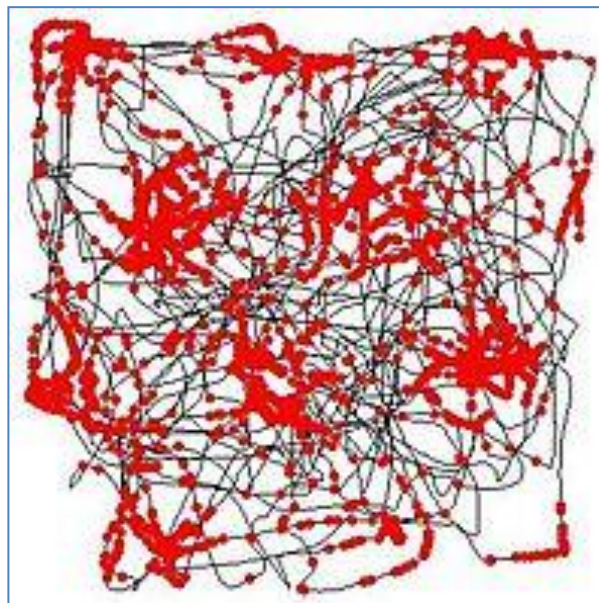
Figura 10.

Estas células forman un mapa de manera diferente a las células de lugar. En vez de disparar cuando el animal se encuentra en un lugar determinado, como las



células de lugar, las neuronas entorrinales, llamadas células de cuadrícula o de red (grid cells), lo hacían siempre que el animal se encontraba en una posición que forma un triángulo (Figura 11). Esta cuadrícula le permite al animal situar su cuerpo en un sistema cartesiano de coordenadas que es independiente del contexto, de puntos de referencia, o de señales específicas y que le permite la navegación espacial. Esta información espacial cartográfica es transformada en el hipocampo en localizaciones espaciales determinadas representadas por las descargas de las células de lugar. En resumen: el hipocampo genera un sistema GPS o sistema de posicionamiento.

La pregunta que se plantea es la siguiente: ¿cómo se mantiene el patrón de descarga de una población de neuronas del hipocampo una vez formado para un determinado entorno? La respuesta es: mediante la potenciación a largo plazo, un fenómeno descubierto en 1966 por Terje Lomo y que consiste en la intensificación duradera en la transmisión de señales entre dos neuronas que resulta de la estimulación sincrónica de ambas (Figura 12).



**Figura 11.**

Este fenómeno subyace a la plasticidad sináptica, esto es la capacidad de las sinapsis de modificar su fuerza o intensidad transmisora. La potenciación a largo plazo se considera que es el mecanismo fundamental para el aprendizaje y la memoria.

De la misma manera que el aprendizaje se fomenta por la atención que se presta al propio proceso, la atención es también imprescindible para la estabilidad a largo plazo de los campos de lugar de las neuronas. Si un animal no presta atención al espacio en el que se mueve, los campos de lugar se forman, pero son

inestables tras 3 o 6 horas. Y estos animales con espacios de lugar inestables no son capaces de aprender una tarea de memoria espacial. Si por el contrario el animal presta atención, entonces los campos de lugar son estables durante varios días.

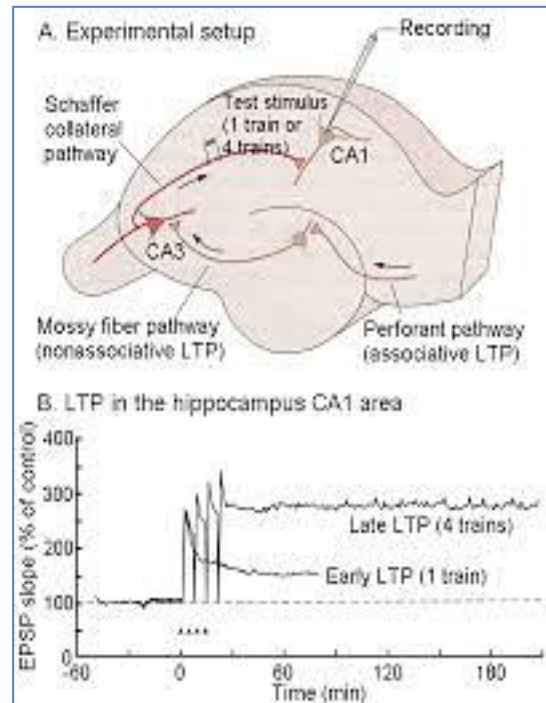


Figura 12.

Los mecanismos de atención dependen de la corteza prefrontal y del sistema modulador dopaminérgico. La memoria a largo plazo de los campos de lugar requiere la atención del animal a su entorno, de la misma manera que también se requiere en humanos para la memoria explícita.

Después de estos hallazgos se entiende por qué las lesiones del hipocampo producen deficiencias de las memorias con contenido espacial, sobre todo la llamada memoria “navegacional”. Esta navegación espacial u orientación en el espacio exterior es importante para toda una serie de funciones, como la búsqueda de alimentos, la huida a un lugar seguro, la conducta parental y reproductiva o el regreso al nido o madriguera.

Existen dos tipos de navegación en nuestras experiencias diarias. Una es la ruta que seguimos cuando nos levantamos para ir a beber algo durante la publicidad en la televisión, esto es, siguiendo una ruta muy conocida. La otra es el tipo de navegación que hacemos cuando conducimos un automóvil desde el trabajo a casa y tenemos que sortear, por ejemplo, una nueva construcción o una desviación del tráfico. El primer tipo depende, como habilidad motora bien establecida, de los ganglios basales y del cerebelo, mientras que el segundo implica al hipocampo.

Más recientemente, investigaciones utilizando las modernas técnicas de neuroimagen, así como estudios en pacientes que tenían que someterse a operaciones neuroquirúrgicas, han podido comprobar que las células de lugar y de red o cartográficas también existen en humanos. En pacientes con enfermedad de Alzheimer, tanto el hipocampo como la corteza entorrinal se ven afectados en los primeros estadios de la enfermedad, por lo que estos pacientes pierden con frecuencia la capacidad de orientación espacial, incluso en su propia casa, pero también muestran un deterioro de la memoria episódica, autobiográfica o explícita que depende asimismo del hipocampo.

Las consecuencias de estos resultados son de gran relevancia. En realidad son cuestiones que fueron de gran importancia para el filósofo alemán Immanuel Kant en el siglo XVIII cuando se preguntaba que cuáles serían las facultades mentales con las que nacemos. Kant concluía que el espacio y el tiempo eran formas de la sensibilidad, es decir que no son rasgos que las cosas tengan independientemente de nuestro conocimiento. El espacio es una forma a priori de la sensibilidad externa, o percepción de las cosas físicas, mientras que el tiempo sería una forma a priori de la sensibilidad interna, o percepción de la propia vida psíquica. Así, el sujeto cognoscente estructura las sensaciones proyectando todo lo conocido en una dimensión espacio-temporal. Con otras palabras: que el concepto de espacio era un principio innato de nuestra mente, principio a través del cual se percibía el mundo.

Y ya en el siglo XX, Edward Tolman, mencionado anteriormente, estudiando el comportamiento de ratas de laboratorio en laberintos, pudo comprobar que los animales aprendían a navegar, proponiendo la existencia de un mapa cognitivo cerebral que les permitía encontrar fácilmente su camino en los laberintos. Faltaba solamente saber cómo esos mapas estaban representados en el cerebro.

Por tanto, y volviendo a los descubrimientos de la pareja Moser, sabemos que comenzaron analizando en ratas recién nacidas, justo después de que abrieran sus ojos, si tenían células de lugar o células de cuadrícula o cartográficas. Estas células no estaban maduras en animales tan jóvenes, pero supusieron que a lo largo del desarrollo estas células, como resultado de la experiencia, terminan formándose. Con otras palabras, como ocurre con todas las facultades mentales, aunque tengamos una predisposición genética para ellas, se necesita la influencia del medio ambiente para que esa predisposición se desarrolle normalmente, como ocurre, entre otras cosas, con el lenguaje, que si no encuentra un entorno parlante no se desarrolla normalmente. Y lo mismo puede decirse de la música o la inteligencia y otras facultades mentales.

Habría que añadir que en humanos la lateralización de funciones en ambos hemisferios ha mostrado que el hipocampo del hemisferio no dominante,



generalmente el derecho, está especializado en codificar memorias relacionadas con el entorno y la situación del organismo en él, mientras que el hipocampo del lado izquierdo está más implicado en cuestiones lingüísticas.

En relación con otras estructuras, como la corteza parietal posterior, el hipocampo está implicado en el procesamiento del espacio llamado aloentríco, es decir, un sistema de representación que implica relaciones entre objetos, mientras que la corteza parietal posterior está implicada en un procesamiento del espacio en relación con el sujeto, espacio llamado egocéntrico. De esta manera, ambos sistemas ayudan a la orientación en el espacio, siendo la corteza parietal posterior especialmente importante en representar el espacio para poder guiar visualmente los movimientos en él.

Finalmente unas palabras sobre la relación entre la memoria episódica y la memoria espacial, ambas localizadas y procesadas en la misma estructura, es decir el hipocampo. La memoria episódica trata de sucesos vividos por el sujeto y suele incluir información correspondiente al contenido del propio suceso, así como al contexto externo de ese suceso, como dónde y cuándo ocurrió. Este tipo de memoria es un recuerdo de sucesos espacio-temporales, a diferencia de la memoria semántica que es una memoria de hechos y que se supone está localizada en un lugar distinto del lóbulo temporal.

En resumen: el Comité Nobel ha premiado a tres científicos que han hecho avanzar nuestros conocimientos sobre un tema crucial para nuestra mente: la capacidad de orientarnos en el espacio exterior generando una representación interna de ese espacio para poder guiar y anticipar sin problemas nuestra conducta. De nuevo otro ejemplo de la creciente internalización del mundo exterior en el cerebro a lo largo de la evolución.

Muchas gracias por su atención.

## Presentación. El Premio Nobel 2014 en Química: la nanoscopía

### Juan-Ramón Lacadena Calero

El 8 de octubre de 2014, la Real Academia de Ciencias de Suecia en Estocolmo acordó conceder el Premio Nobel 2014 en Química conjuntamente a Eric Berzig (Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA), Stefan W. Hell (University of Heidelberg, Director at the Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Division Head at the German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) y a William E. Moerner (Mosher Professor in Chemistry y Professor of Applied Physics at Stanford University, CA, USA) “por el desarrollo de la microscopía de fluorescencia de super-resolución”.

Siempre y nunca son dos palabras que no pueden utilizarse en Ciencia porque, como decía Laín Entralgo, la Ciencia es lo penúltimo, lo último no es Ciencia. Digo esto porque el famoso microscopista Ernst Abbe afirmó en 1873, mediante la denominada “ecuación de Abbe”, que había un límite físico (límite de difracción de Abbe) para la resolución máxima de la microscopía óptica que nunca –repito, nunca– podría llegar a los 0,2 micrómetros (la mitad de la longitud de onda de la luz visible). Como señalaba la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, ayudados por las moléculas fluorescentes, los tres galardonados lograron salvar con ingenio esa limitación, llevando la microscopía óptica a la nanodimensión; es decir, al nacimiento de la nanoscopía.

El avance científico se basa en dos principios. El primero – la *microscopía STED* (*stimulated emission depletion*) – fue desarrollado por Stefan Hell, (1, 2, 3), utilizando dos rayos laser: uno que estimula a las moléculas fluorescentes para que brillen y el otro que anula la fluorescencia excepto en volúmenes nanométricos. El segundo principio –la *microscopía de moléculas individuales*– que consiste en la posibilidad de encender y apagar (on/off) la fluorescencia de moléculas individuales fue desarrollado por William Moerner (4,5) y Eric Berzig (6,7), aunque trabajando por separado.

En la actualidad los científicos pueden visualizar los movimientos de moléculas individuales dentro de las células vivas. Así, pueden ver cómo las moléculas crean las sinapsis entre células nerviosas en el cerebro o seguir la pista a las proteínas responsables de las enfermedades de Parkinson, de Alzheimer o la corea de Huntington cuando se agregan o seguir la pista a proteínas individuales en el proceso de división del cigoto en la primera división embrionaria, tomando literalmente los ejemplos utilizados en la nota de prensa institucional.

## **REFERENCIAS**

1. Hells, S.W.; Wichman, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulation–emission–depletion–microscopy. *Opt. Lett.* **19**, 780-782 (1994).
2. Hell, S.W.; Krough, M. Ground-state depletion fluorescence microscopy, a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl. Phys. B.* **60**, 495-497 (1995).
3. Klar, T.A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egnér, A.; Hell, S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **97**, 8206-8210 (2000).
4. Moerner, W.E.; Kador, L. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535-2538 (1989).
5. Dickson, R.M.; Cubitt, A.B.; Tsien, R.Y.; Moerner, W.E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355-358 (1997).
6. Betzig, E. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.* **20**, 237-239 (1995).
7. Betzig, E.; Patterson, G.H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O.W.; Olenych, S.; Bonifacino, J.R.; Davidson, M.W.; Lippincott-Schwarz, J.; Hess, H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-1645 (2006).

Para glosar estas investigaciones contamos con el Profesor Jesús Pintor. Sus méritos académicos nos fueron recordados hace pocos días con motivo de su ingreso como Académico de Número en esta Real Academia Nacional de Farmacia. Aquí y ahora, únicamente quiero recoger algunas palabras que dijo la Profesora M<sup>a</sup> Teresa Miras en su laudatio: “Puedo asegurarles que en los congresos internacionales nadie se olvida de asistir a las conferencias de Suso, así le llaman todos, pues van a disfrutar de la buena ciencia, bien envuelta y con comprensión asegurada, ya que es un excelente comunicador. Lo mismo ocurre en sus clases del día a día docente, o en las ilustraciones para sus artículos científicos. La estética es un valor añadido y si acompaña a la buena ciencia la hace más atractiva y se difunde mejor”. Seguro que en su intervención de hoy en esta Real Academia hará gala de tales méritos.

Tiene la palabra el Profesor Pintor.

## Premio Nobel 2014 en Química. Observando el nanomundo

### Jesús Pintor

Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Departamento de Bioquímica, Facultad de Óptica y Optometría, Universidad Complutense de Madrid, c/Arcos de Jalón 118, 28037 Madrid, España  
e-mail: jpintor@ucm.es

---

*An. Real Acad. Farm. Vol 80, Nº 4 (2014), pag. 751-762*

### RESUMEN

Con lo que se conoce como “nanoscopía”, los científicos pueden visualizar moléculas individuales dentro de las células vivas. Parecía imposible que los científicos pudiesen, a través de métodos ópticos, ver cierto tipo de detalles en sus preparaciones, sobre todo en observar detalles de las moléculas en el interior de las células. En 1873, el microscopista Ernst Abbe estipuló un límite físico a la máxima resolución de la microscopía óptica tradicional: nunca podría llegar a ser mejor que 0,2 micrómetros. Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner han sido galardonados con el Premio Nobel de Química 2014 por haber pasado por alto este límite. Debido a sus logros el microscopio óptico puede ahora mirar en el nanomundo. Son básicamente dos principios los que han propiciado la concesión del mencionado galardón. En primer lugar la técnica STED (stimulated emission depletion), desarrollada por Stefan Hell en el año 2000. En esta estrategia dos rayos láser son utilizados; uno estimula las moléculas fluorescentes haciéndolas brillar, otro anula toda fluorescencia a excepción de un volumen de tamaño nanométrico. El barrido de la preparación en observación produce una imagen con una resolución mejor que cualquiera que se hubiera obtenido hasta la actualidad. Eric Betzig y William Moerner, trabajando por separado, sentaron las bases para el segundo método, la microscopía de una sola molécula, definida con el acrónimo PALM (Photoactivated localization microscopy). El método se basa en la posibilidad de excitar la fluorescencia de moléculas individuales encendiéndolas y apagándolas. Los científicos iluminan la misma zona varias veces, dejando que sólo unas pocas moléculas intercaladas brillen cada vez. La superposición de estas imágenes produce una imagen súper densa con una resolución en el nivel nanométrico. Hoy en día, nanoscopía se utiliza en todo el mundo y se con ella se profundiza en el conocimiento de cómo las moléculas participan en las sinapsis entre las células nerviosas en el cerebro, se pueden rastrear proteínas implicadas en la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer y la de Huntington, o investigar proteínas individuales en los huevos fertilizados que dan lugar embriones. Sin duda la nanoscopía favorecerá el conocimiento científico en aspectos que redundarán en una mejora de la calidad de vida de los seres humanos.

## **ABSTRAC**

With what is known as "nanoscopy", scientists can display individual molecules within living cells. It seemed impossible that scientists could see, via optical methods, details in certain preparations, especially to observe details of molecules inside cells. In 1873, the microscopist Ernst Abbe stipulated a physical limit to the maximum resolution of traditional light microscopy: resolution could never be better than 0.2 micrometers. Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner have been awarded with the Nobel Prize in Chemistry 2014 for having surpass this limit. Because of their achievements light microscopy can now look into the nanoworld. There are basically two principles that have been discovered by the awarded scientists. First the STED technique (stimulated emission depletion) developed by Stefan Hell in 2000. In this strategy two laser beams are used, one stimulates fluorescent molecules, the second limits the fluorescent area to a nano-sized volume. This combination produces an image with better resolution than any image taken before. Eric Betzig and William Moerner, working separately, laid the groundwork for the second method, the single-molecule microscopy, with the acronym PALM (photoactivated localization microscopy). The method is based on the possibility of turning on and off the fluorescence of individual molecules. Scientists can illuminate the same area several times, leaving only a few molecules interspersed increasingly shine. The superposition of these images produces a super dense image with a resolution in the nanometer level. Today, nanoscopy is used worldwide and has improved the knowledge of how molecules are involved in the synapses between nerve cells in the brain, and how proteins involved in Parkinson's disease, Alzheimer's and Huntington disease can interact during the pathology. Moreover, it has been possible to investigate how individual proteins in fertilized embryos participate in the animal development. Certainly the nanoscopy helps the scientific knowledge in ways that will result in improved quality of life of human beings.

## **INTRODUCCIÓN**

Como cada año, la Real Academia de las Ciencias de Suecia es la encargada de nombrar al ganador del Premio Nobel de Física, del Premio Nobel de Química y del Premio en Ciencias Económicas en memoria de Alfred Nobel. Este año en el apartado de química, han sido galardonados los científicos Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner "*por el desarrollo de la microscopía de fluorescencia de alta resolución*" (Figura 1). La institución del Premio Nobel ha referido los siguientes párrafos como justificación de la concesión:



**Figura 1.-** Fotografías de los laureados, de izquierda a derecha Eric Betzig, Stefan Hell y William H. Moerner.

*“Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner han sido galardonados con el Premio Nobel de Química 2014 por haber superado una limitación científica que indicaba que un microscopio óptico no podía tener una resolución más allá de 0.2 micrómetros”*

*“Con el uso de moléculas fluorescentes, los científicos pueden ahora controlar la interacción entre las moléculas individuales dentro de las células, pueden observar las interacciones de las proteínas a nivel individual en los procesos patológicos y es posible realizar un seguimiento de la división celular a la escala nanométrica”*

Las aportaciones de los insignes científicos son el desarrollo de la técnica denominada STED (inventada por Stefan Hell), y PALM (desarrollada por Moerner y Betzig). Ambas técnicas son capaces de romper la norma definida por Ernst Abbe en 1873 que indicaba que la máxima resolución de la microscopía óptica tradicional nunca sería mejor que 0,2 micrómetros. Para comprender la relevancia de estas técnicas es conveniente revisar algunos conceptos de la microscopía óptica, empezando por el papel de los pioneros en la microscopía.

### ***Notas históricas sobre los inventores del microscopio***

Como suele ocurrir en muchas áreas de la ciencia, los expertos en la historia de la microscopía no se ponen de acuerdo sobre quién fue el primero en desarrollar un instrumento óptico para poder magnificar los objetos pequeños. Sí parece que Holanda fue el país donde se ideó el microscopio, pero no se sabe con certeza quien lo inventó, aunque todos los indicios señalan a Zacharias Janssen como su creador en 1590. Zacharias Janssen trabajaba en la fábrica de lentes de su padre, junto con Hans Lippershey, otro posible candidato a inventor del microscopio. Existen indicios que apuntan a que Hans Lippershey vio jugar a

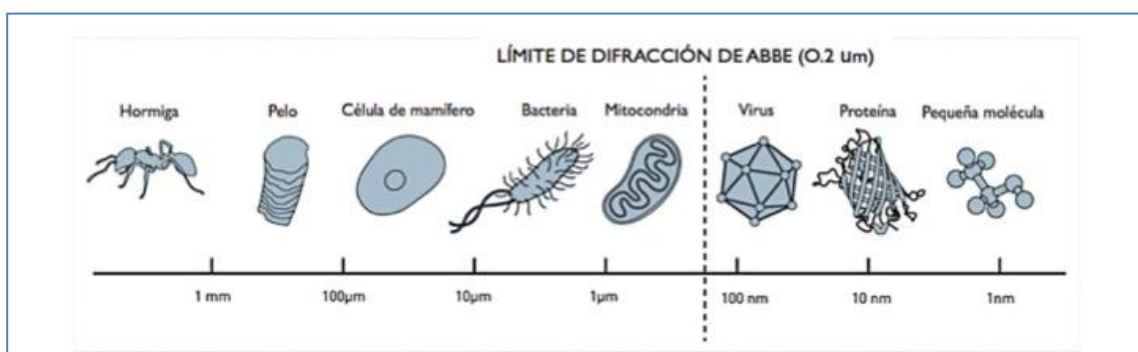
Zacharias cuando era niño con los restos de lentes desechadas, y como combinando esas lentes podía ampliar las imágenes de algunas plantas y animales. Se dice que Hans tomó buena nota de este hecho y haciendo suya la idea desarrolló el primer microscopio que denominó con el nombre de *tubo óptico*. Lamentablemente no se sabe cual de los dos fue el inventor, pero aunque aparentemente Hans Lippershey habría actuado de una manera no muy honrosa, Zacharias Janssen no era tampoco una persona demasiado escrupulosa. Zacharias no tenía muy buena reputación, ya que hizo fortuna a base de falsificar monedas de españolas, primero de cobre y más adelante de oro y plata. Independientemente de quien fuera el inventor, el primer microscopio tenía forma cilíndrica y presentaba una magnificación entre 3 y 9 aumentos.

En el año 1665 Robert Hooke observó con un microscopio, cuya capacidad de magnificación era de 30 a 50 aumentos, una fina sección de corcho en la que pudo visualizar estructuras en forma de celdas a las que llamó células. Este es un hito en la historia de la ciencia.

Posteriormente, un tratante de telas llamado Anton van Leeuwenhoek desarrolló un microscopio simple, es decir con una sola lente, pero de tal calidad, que permitía una magnificación superior a los 200 aumentos. Desarrolló el instrumento para valorar la calidad de los tejidos con los que comerciaba. Leeuwenhoek fue un auténtico pionero describiendo las estructuras de “cosas” invisibles hasta la fecha, y así describió por primera vez protozoos, bacterias, espermatozoides y los glóbulos rojos (1).

Otra persona muy influyente en el desarrollo de la microscopía fue Ernst Abbe. Las mejoras más importantes de la óptica en los microscopios surgieron en 1877, cuando por encargo de Carl Zeiss, mejoró la microscopía de inmersión sustituyendo el agua por aceite de cedro, lo que permitió obtener aumentos de 2000.

Es Ernst Abbe, una persona clave en el Premio Nobel de Química 1905 puesto que en 1873 elaboró la Teoría de los Límites de la Resolución (Figura 2).



**Figura 2.-** Descripción de los tamaños de las estructuras microscópicas y el punto límite descrito por Ernst Abbe del límite de la resolución para la microscopía óptica.



Esta teoría dice que debido a la difracción de la luz al atravesar la óptica de un microscopio, la luz procedente de un objeto puntual crea una imagen anular con un patrón de difracción característico denominado disco de Airy. Este fenómeno se utiliza para conocer la habilidad del ojo humano para distinguir dos fuentes puntuales de luz cuyos discos de Airy se superponen.

Esto quiere decir que la resolución de un microscopio es capaz de distinguir entre dos puntos que estén separados aproximadamente la mitad de la longitud de onda de la luz, con la que queremos observar esos dos puntos. En líneas generales, se puede asumir que la distancia que han de tener esos dos puntos entre sí para ser discernibles tiene que ser superior a 0,2 micrometros.

Gracias a la contribución de los galardonados este limite de 0,2 micrómetros ha podido ser sobrepasado, de manera que ya es posible diferenciar entre moléculas que estén a menor distancia de lo anteriormente indicado.

### ***¿Pero qué se puede hacer para mejorar la resolución de un microscopio óptico?***

Pese a las limitaciones de resolución definidas por Abbe, existen estrategias que se han ido desarrollando a lo largo de los años para poder mejorar la calidad de las imágenes microscopio óptico. Básicamente además de mejorar la calidad de las lentes se ha trabajado intensamente en iluminar las muestras de diversas formas o bien procesar las imágenes usando métodos físicos para ver más allá de lo que permite la observación con la luz transmitida. Son habituales las técnicas de campo oscuro, contraste de fases o contraste interferencial de Normarski, entre otras (2).

En la microscopía óptica normal (luz transmitida) la muestra se tiñe con algún colorante que permita ver los detalles que de otra manera no se pueden ver. En algunos casos los colores naturales de la muestra permiten observar algunos detalles sin la necesidad de la tinción.

El microscopio en campo oscuro utiliza una luz muy intensa en forma de un cono hueco concentrado sobre la muestra. El campo de visión del objetivo se encuentra en la zona hueca del cono de luz y sólo recoge la luz que se refleja en el objeto. Por ello las porciones claras de la muestra aparecen como un fondo oscuro y los objetos minúsculos que se están analizando aparecen como una luz brillante sobre el fondo. Esta forma de iluminación se utiliza para analizar elementos biológicos transparentes y sin manchas, invisibles con iluminación normal.

En la microscopía de contraste de fases se ilumina el espécimen con un cono hueco de luz, como en el microscopio en campo oscuro. Sin embargo dicha luz entra en el campo de visión del objetivo, que contiene un dispositivo en forma de anillo que reduce la intensidad de la luz y provoca un cambio de fase de un cuarto de la longitud de onda. Este tipo de iluminación provoca variaciones minúsculas en el índice de refracción de un espécimen transparente, haciéndolo visible. Esta

técnica se usa principalmente para aumentar el contraste entre las partes claras y oscuras de las células sin la necesidad de teñirlas. Es ideal a la hora de examinar tejidos vivos, por lo que se utiliza con frecuencia en biología y medicina

La microscopía DIC o Nomarski, emplea dos rayos de luz polarizada de manera que las imágenes combinadas aparecen como si la célula estuviera proyectando sombras hacia un lado. Fue diseñado para observar relieves de muestras que son más bien gruesas y en las que se pueden ver relieves. Con esta técnica tampoco es necesario teñir la preparación.

Una innovación muy interesante ha sido la aplicación de la fluorescencia para la observación de preparaciones de interés biológico. En este caso lo que se hace es aprovechar las propiedades naturales fluorescentes de las células o bien se aplica un colorante con esta propiedad (la de ser fluorescente). La preparación se ilumina (excita) con un haz de luz para que emita luz a una longitud de onda mayor de la que se ha empleado para excitar al pigmento fluorescente. El microscopio de fluorescencia necesita de una lámpara para poder excitar el pigmento fluorescente y unos filtros especiales para poder permitir el paso de la luz que emite el pigmento excitado (3).

Mejorando todavía más la técnica fluorescente una de las implementaciones que más han contribuido a relanzar la microscopía óptica como herramienta crucial en la investigación biomédica y científica en general ha sido la aparición de la microscopía confocal.

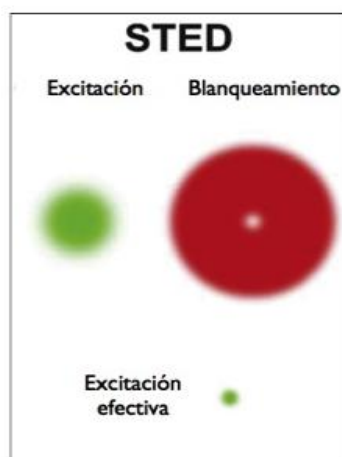
El microscopio confocal es un microscopio de fluorescencia en donde la muestra se ilumina con un láser y en la que se emplean dos diafragmas confocales (uno antes de la muestra y otro después) capaces de enfocar la iluminación en un único punto de la preparación. Como el láser tiene propiedades de coherencia la muestra se puede barrer en toda su superficie, plano a plano. Con todas esas imágenes que son bidimensionales el ordenador las puede integrar generando una imagen tridimensional de la muestra.

Todas estas estrategias han valido para mejorar sustancialmente la resolución de las imágenes, sin embargo, en ningún caso ha sido posible superar el límite de difracción de Abbe, por lo que por mucho que hayan mejorado las cosas, hasta hace poco no se podían diferenciar dos moléculas cuando se encuentran a una distancia inferior a 0.2 micrometros.

### ***Stefan Hell y la técnica agotamiento de la emisión estimulada: STED (Stimulated Emission Depletion)***

Stefan W. Hell (1962) nació en Rumania pero se doctoró en la Universidad de Heidelberg y actualmente está a cargo de la dirección del el Instituto Max Planck de Química Biofísica (Alemania), y del Centro Alemán de Investigación contra el Cáncer de Heidelberg.

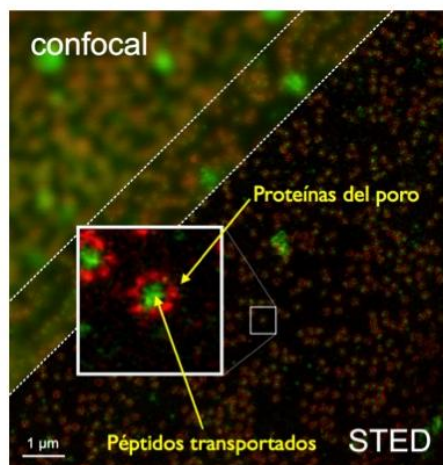
Cuando Stefan Hell leyó sobre el concepto de la emisión estimulada, se dio cuenta de que debería ser posible concebir una especie de nano-flash de laser que podría barrer las muestras de nanómetro en nanómetro. Mediante el uso de la emisión estimulada los científicos puede apagar moléculas fluorescentes. Cuando se dirige un rayo láser a dichas moléculas, pierden inmediatamente su energía y se oscurecen. En 1994, Stefan Hell publicó un artículo que resumía sus ideas (4). En el método propuesto, denominado agotamiento de la emisión estimulada (STED), un pulso de luz excita todas las moléculas fluorescentes, mientras otro pulso de luz apaga la fluorescencia de todas las moléculas excepto en un volumen de tamaño nanométrico en el medio. Sólo este volumen es registrado por lo que el área observada es muy pequeña y precisa (Figura 3).



**Figura 3.-** Descripción de la técnica inventada por Stefan Hell, donde la fluorescencia de un punto producido por un rayo láser (en verde), es mejorada por medio de otro láser (en rojo) que apaga parte de dicha fluorescencia. Se ha eliminado gran parte de la difracción del láser verde haciendo que el punto luminoso sea más pequeño y definido.

Haciendo el correspondiente barrido de toda la muestra es posible obtener una imagen completa y más precisa. Cuanto menor sea el volumen al que se le permite emitir fluorescencia en un instante, mayor será la resolución de la imagen final. Por lo tanto, no hay, en principio, límite a la resolución de los microscopios ópticos (Figura 4).

El artículo teórico de Stefan Hell no creó ninguna conmoción inmediata, pero era lo suficientemente interesante como para que le ofrecieran un puesto en el Instituto Max Planck de Química Biofísica en Göttingen. En los años siguientes llevó sus ideas a buen término, desarrolló un microscopio STED. En 2000 él fue capaz de demostrar que sus ideas funcionan realmente en la práctica, mediante, entre otras cosas, imágenes de una bacteria *E. coli* con una resolución nunca antes alcanzado en un microscopio óptico (5).



**Figura 4.-** Imagen comparativa entre la microscopía confocal (parte superior izquierda) y la nueva técnica STED descrita por S. Hell. Nótese la extraordinaria calidad y resolución de la nueva técnica.

El microscopio STED recoge la luz de una multitud de pequeños volúmenes para crear una imagen más completa. En contraste, el segundo principio galardonado, la microscopía de una sola molécula, implica la superposición de varias imágenes. Eric Betzig y WE Moerner, desarrollaron, independientemente entre sí, los diferentes elementos fundamentales para su desarrollo. El origen de esta segunda técnica ocurrió cuando Moerner logró detectar una sola molécula fluorescente.

### ***Moerner, el primero en detectar una molécula fluorescente***

En la mayoría de los métodos químicos, por ejemplo al medir la absorción de luz por una molécula o en medidas de fluorescencia, los científicos estudian millones de moléculas simultáneamente. Los resultados de tales experimentos representan una especie de media de todas ellas. Los científicos han tenido que aceptarlo, sin embargo hay que reconocer que la ciencia soñaba con la medición de moléculas individuales, ya que así sería más fácil y mejor comprender, por ejemplo, como se desarrollan las enfermedades. Así, en 1989, cuando Moerner como el primer científico en el mundo fue capaz de medir la absorción de la luz de una sola molécula, consiguió un logro fundamental (6).

El experimento abrió la puerta a un nuevo futuro e inspiró muchos químicos a dirigir su atención a las moléculas individuales. Uno de ellos era Eric Betzig, cuyos logros se describen más adelante.

Ocho años más tarde Moerner dio el siguiente paso hacia la microscopía de una sola molécula, basándose en el descubrimiento anterior de la proteína verde fluorescente (GFP) del Premio Nobel Roger Tsien otorgado en el año 2008.

En 1997 Moerner se incorporó a la Universidad de California en San Diego, donde Roger Tsien, Premio Nobel, estaba tratando de conseguir que la proteína verde fluorescente, GFP, tuviese todos los colores del arco iris. La proteína verde se

aisló de una medusa fluorescente y su interés se encuentra en su capacidad para hacer que las proteínas dentro de las células vivas puedan ser visibles. Usando el gen de la GFP los científicos pueden hacer fluorescentes a otras proteínas. La luz verde posteriormente revela exactamente en que parte de la célula se ubica la proteína marcada.

Moerner descubrió que la fluorescencia de una variante de la proteína GFP se podría encender y apagar a voluntad. Cuando se excita con luz de longitud de onda de 488 nanómetros la proteína comienza a emitir fluorescencia, pero después de un tiempo la fluorescencia se desvanece. Independientemente de la cantidad de luz que dirige a la proteína, la fluorescencia desaparece. Sin embargo, la luz de longitud de onda de 405 nanómetros hace que la proteína vuelva a ser fluorescente al ser de nuevo iluminada con luz de 488 nanómetros.

Moerner dispersa estas proteínas excitables en un gel, de manera que la distancia entre cada proteína individual fuera mayor que el límite de difracción de Abbe de 0,2 micrómetros. Con un microscopio óptico se podría discernir el resplandor de las moléculas individuales - eran como pequeñas lámparas con interruptores, que podía encender y apagar. Los resultados fueron publicados en la revista científica *Nature* en 1997 (7).

Por este descubrimiento Moerner demostró que es posible controlar ópticamente la fluorescencia de moléculas individuales. Esto resuelve un problema que Eric Betzig había formulado dos años antes.

### ***Entra en escena Eric Betzig***

Al igual que Stefan Hell, Eric Betzig estaba obsesionado por la idea de sobrepasar el límite de difracción de Abbe. A principios de la década de 1990 estaba trabajando en un nuevo tipo de microscopía óptica llamada microscopía de campo cercano en los Laboratorios Bell, en Nueva Jersey. En la microscopía de campo cercano el rayo de luz se emite desde una punta muy delgada que se coloca a sólo unos nanómetros de la muestra. Este tipo de microscopía también puede eludir límite de difracción de Abbe, aunque el método tiene importantes debilidades. Por ejemplo, la luz emitida tiene un corto alcance tal que es difícil de visualizar las estructuras por debajo de la superficie de la célula.

En 1995 Eric Betzig concluyó que la microscopía de campo cercano no podría mejorarse mucho más allá. Además, él no se sentía a gusto en el mundo académico y decidió poner fin a su carrera de investigación; sin saber a dónde iría después, dejando los Laboratorios Bell. Pero límite de difracción de Abbe se mantuvo en su mente. Durante un paseo un día frío de invierno una nueva idea se le ocurrió; ¿Podría ser posible eludir el límite de difracción utilizando moléculas con diferentes propiedades, moléculas que fluorescen con diferentes colores?

Inspirado por W.E. Moerner, entre otros, Eric Betzig ya había detectado fluorescencia en moléculas individuales utilizando microscopía de campo cercano. Empezó a preguntarse si un microscopio regular podría producir la misma alta resolución si diferentes moléculas brillaban con diferentes colores, como el rojo, amarillo y verde. La idea era tener el microscopio y registrar una imagen por color. Si se dispersaban moléculas fluorescentes de un color y se encuentran a una distancia mayor a los 0,2 micrómetros estipulados por límite de difracción de Abbe, su posición se podría determinar con gran precisión. Si después hacemos lo mismo con las de otro color, es muy posible que cuando se superpusiesen estas imágenes, la fotografía completa obtendría una resolución entre moléculas mucho mejor que el límite de difracción de Abbe, y así las moléculas de color rojo, amarillo y verde serían distinguibles incluso si su distancia estaba a unos pocos nanómetros. De este modo límite de difracción de Abbe podría eludirse. Sin embargo, hubo algunos problemas prácticos, por ejemplo, una falta de moléculas con una calidad suficiente de propiedades ópticas adecuadas para ser distinguibles.

En 1995 Eric Betzig publicó sus ideas teóricas en la revista *Optics Letters*, y posteriormente abandonó la academia y se unió a la compañía de su padre (8).

### ***La atracción por la proteína verde fluorescente (GFP)***

Durante muchos años, Eric Betzig estuvo totalmente desconectado de la comunidad investigadora. Pero un día, un anhelo de la ciencia cobró vida de nuevo y volvió a revisar la literatura científica encontrándose con la proteína fluorescente verde por primera vez. Al darse cuenta de que había una proteína que podría hacer que otras proteínas dentro de las células visibles, revivieron los pensamientos de Betzig sobre cómo eludir límite de difracción de Abbe.

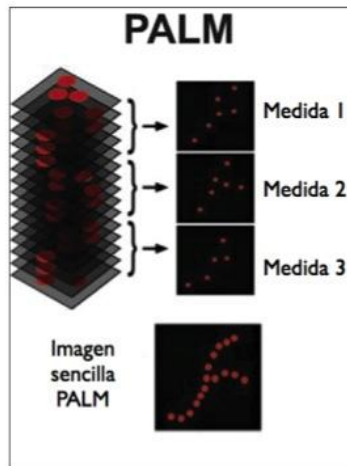
Sin embargo, el verdadero avance se produjo en 2005, cuando se topó con las proteínas fluorescentes que podrían activarse a voluntad, aquellas en las que había trabajado Moerner en 1997. Betzig se dio cuenta de que una proteína como esa era la necesaria para poner en práctica la idea de que había tenido diez años antes. Las moléculas fluorescentes no necesitaban ser de diferentes colores sino que valdría con poder encenderlas y apagarlas en diferentes momentos.

### ***Sobrepasando el límite de difracción de Abbe: la técnica PALM (photoactivated localization microscopy)***

Apenas un año más tarde, Eric Betzig demostró, en colaboración con científicos que trabajan en proteínas fluorescentes excitables, que su idea funcionaba en la práctica. Entre otras cosas, los científicos acoplaron la proteína brillante a la membrana que envuelve el lisosoma de la célula. Con el uso de un pulso de luz las proteínas se activaban emitiendo fluorescencia, pero ya que el pulso era tan débil sólo una fracción de estas proteínas comenzaban a brillar.



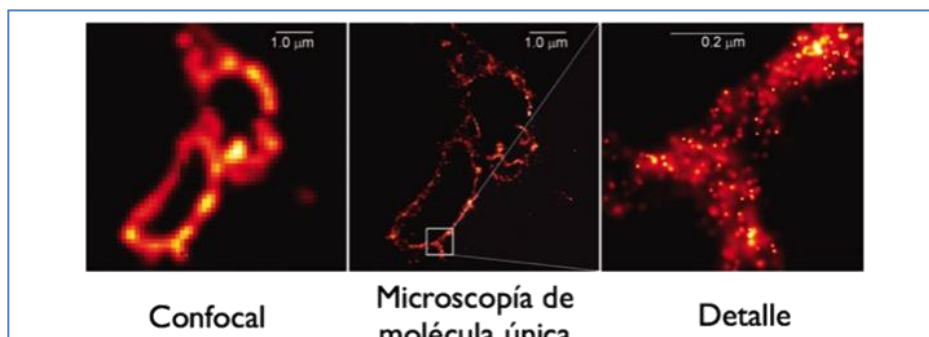
Debido a su pequeño número, casi todos ellos estaban situados a una distancia mayor que el límite de difracción de Abbe de 0,2 micrómetros. Por lo tanto la posición de cada proteína brillante podría ser registrado de forma muy precisa en el microscopio. Después de un tiempo, cuando su fluorescencia se apagaba, los científicos activaban un nuevo subgrupo de proteínas. Una vez más, el pulso era tan débil de modo que sólo una fracción de las proteínas brillaba, después de lo cual otra imagen se tomaba. Este procedimiento se repetía una y otra vez (Figura 5).



**Figura 5.-** Descripción de la técnica inventada por Betzig basada en los descubrimientos de W. E. Moerner. Con esta técnica se hacen fotografías consecutivas de la misma preparación iluminándola varias veces, de modo que en cada foto se iluminan moléculas distintas. Cuando se superponen las fotos las distancias entre dichas moléculas es inferior al límite de Abbe.

Cuando Betzig superpuso las imágenes obtuvo una imagen de alta resolución de la membrana de los lisosomas. A esta técnica se la denominó PALM (photoactivated localization microscopy) que podría traducirse como microscopía de localización fotoactivada o microscopía de una sola molécula.

Su resolución era mucho mejor que el límite de difracción de Abbe (Figura 6).



**Figura 6.-** Comparativa entre una imagen confocal y una imagen por la técnica PALM (microscopía de molécula única) de las proteínas de la membrana lisosomal. Obsérvese la extraordinaria resolución de la imagen de la derecha, donde claramente se aprecia que el límite de Abbe ha sido superado.

Un artículo publicado en la revista Science en 2006, presentó esta nueva aproximación a la comunidad científica (9).

## **CONCLUSIONES**

Los métodos desarrollados por Eric Betzig, Stefan Hell y W.E. Moerner han dado lugar a varias técnicas de la denominada “nanoscopía” que se utilizan en la actualidad en todo el mundo. Los tres laureados son todavía investigadores en activo, formando parte de una comunidad grande y creciente de científicos que lideran la innovación en el campo de la microscopía. Cuando ellos dirigen sus poderosos “nanoscopios” hacia los componentes más pequeños de la vida, realizan descubrimientos que están a la vanguardia de la ciencia. Stefan Hell se ha observado el interior de células nerviosas con el fin de entender mejor las sinapsis de las neuronas cerebrales. W.E. Moerner ha estudiado las proteínas en relación con la enfermedad de Huntington. Eric Betzig ha rastreado la división celular dentro de los embriones. Estos son sólo algunos de los muchos ejemplos pero más tendrán que venir no solo provenientes de los laureados sino también de muchos otros investigadores.

## **REFERENCIAS**

1. Maxfield, F.R. Introduction: optical microscopy in physiological investigations. *FASEB J.* **8**(9), 571-582 (1994).
2. Keller, P.J.; Dodt, H.U. Light sheet microscopy of living or cleared specimens. *Curr Opin Neurobiol.* **22**(1), 138-143 (2012).
3. Renz, M. Fluorescence microscopy-a historical and technical perspective. *Cytometry A.* **83**(9), 767-779 (2013).
4. Hell, S.W.; Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* **19**(11), 780-782 (1994)
5. Klar, T.A.; Jakobs, S.; Dyba, M.; Egner, A.; Hell, S.W. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8206–8210 (2000).
6. Moerner, W.E.; Kador, L. Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535–2538 (1989)
7. Dickson, R.M.; Cubitt, A.B.; Tsien, R.Y.; Moerner, W.E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355–358 (1997).
8. Betzig, E. Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.* **20**, 237–239 (1995).
9. Betzig, E.; Patterson, G.H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O.W.; Olenych, S.; Bonifacino, J.S.; Davidson, M.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).

## INFORMACIÓN ACADÉMICA



### Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia  
e-mail: secretaria@ranf.com

---

Durante el cuarto trimestre del año 2014 hemos realizado un total de doce sesiones científicas de las cuales cuatro fueron dedicadas a tomas de posesión de nuevos Académicos, uno de Número, uno de Honor, otro Extranjero y, por último, uno Nacional; una Necrológica, dos conferencias, dos mesas redondas, una Tertulia Científica, una Sesión Conmemorativa de los Premios Nobel 2013 y un acto homenaje al Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva realizado conjuntamente por esta Academia (RANF), la Nacional de Medicina (RANM) y la de Ciencias Exactas Físicas y Naturales (RACEFYN).

**El 2 de octubre** tuvo lugar la Conferencia celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, sobre "Visión actual del Universo", pronunciada por el Académico Correspondiente, Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada, quien fue presentado por el Académico de Número, el Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega.

**El 9 de octubre** la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil celebraron la Mesa Redonda sobre "Radicales libres en Farmacología y Terapéutica", coordinada por el Académico de Número el Excmo. Sr. D. Ángel María Villar del Fresno, que actuó también como Presentador. Los ponentes fueron las Académicas Correspondientes de la RANF, Dra. Mercedes Salaices Sánchez, que trató sobre "Estrés oxidativo y patología cardiovascular", y la Dra. María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado, que disertó sobre "Compuestos de origen natural neuroprotectores en estrés oxidativo"

**El 15 de octubre** la Real Academia Nacional de Farmacia y Novartis Oncology celebraron la Sesión Pública de Toma de Posesión como Académico de Honor del Excmo. Sr. D. José Baselga, Director Médico del Hospital Memorial Sloan-Kettering de Nueva York de EEUU quien pronunció su conferencia de ingreso titulada "Medicina de precisión en cáncer: de la genómica a las inmunoterapias". Fue presentado por la Académica de Número de la RANF la Excmo. Sra. Dña. M<sup>a</sup> José Alonso Fernández.

En la última década, la secuenciación completa de los genomas de los tumores malignos ha resultado en una visión inédita del paisaje mutacional de los

cánceres más frecuentes. Los hallazgos confirman que el cáncer es una enfermedad del genoma, y la presencia de mutaciones responsables del fenotipo maligno abre la oportunidad de desarrollar fármacos específicos contra estos genes mutados. Estudios recientes en pacientes han confirmado la actividad terapéutica de fármacos dirigidos a mutaciones de BRAF, PI3K, erBB2, AKT, ESR1, ALK, EGFR, ROS, IDH2 entre otros genes. En algunos casos, las respuestas son dramáticas y duraderas y justifican la implementación progresiva del estudio de mutaciones en la práctica clínica. Retos futuros incluyen la heterogeneidad tumoral y la evolución mutacional bajo presión terapéutica que apunta hacia la necesidad de diseñar cocteles terapéuticos para evitar o retrasar la aparición de resistencia al tratamiento de modo similar a estrategias implementadas con éxito en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

**El 23 de octubre** tuvo lugar la Conferencia celebrada en colaboración con la Fundación José Casares Gil, de Amigos de la RANF, sobre: "Cooperación hispano-francesa en actividades culturales y científicas a lo largo de la Historia", pronunciada por el Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, Académico de Número, con la asistencia del Consejero de Ciencia y Tecnología de la Embajada de Francia, Sr. D. Bertrand Bouchet y del Presidente de la Comisión de Relaciones Institucionales de la Academia Nacional de Farmacia de Francia.

**El 30 de octubre** se celebró la Tertulia Científica sobre el tema de actualidad: "EBOLA: breve recapitulación sobre etiología, epidemiología, patogenia, tratamiento y control". Moderada por el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Académico de Número de la RANF, cuyo ponente fue el Prof. Dr. Rafael Rotger Anglada, Catedrático de Microbiología y Director del Centro de Análisis Sanitarios de la UCM.

Esa misma tarde, la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la Sesión Necrológica en Memoria del Excmo. Sr. D. Miguel Rubio Huertos, Académico de Número, Medalla 31, con las intervenciones de los Excmos. Sres. Académicos de Número, D. Julio Rodríguez Villanueva, que habló sobre "Miguel Rubio Huertos: Su calidad humana y científica", D. Bartolomé Ribas Ozonas cuya intervención trató sobre "Miguel Rubio Huertos: Su vida académica", y D. César Nombela Cano, que disertó sobre "Miguel Rubio Huertos: Su vida investigadora y docente".

**El 6 de noviembre** ingresó como Académico de Número, de Ciencias afines el Excmo. Sr. D. Jesús Pintor Just, que fue contestado por la Excma. Sra. Dña. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal, Académica de Número de la RANF.

El Dr. Pintor Just se licenció en Biología en 1989 por la Universidad Complutense de Madrid y en 1993 obtuvo el título de Doctor por la misma Universidad. Ha realizado diversas estancias en centros extranjeros como la

Universidad Johann Wolfgang Goethe de Frankfurt, en Alemania (1990), el Instituto Bogomoletz de Kiev, en Ucrania (1992) y el University College London en Londres, en el Reino Unido (1994). Actualmente es Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Universidad Complutense de Madrid en la Facultad de Óptica.

Entre 1990 y 1993 su actividad investigadora se centró en el estudio de la presencia de diadenosin polifosfatos en células neurosecretoras y terminales nerviosas así como en la descripción de sus receptores. A partir del año 1993 comenzó el estudio de los receptores para nucleótidos y dinucleótidos en terminales sinápticas del SNC y su relación con otros neurotransmisores.

Actualmente su actividad investigadora está enfocada en las siguientes líneas:

- Presión intraocular-glaucoma (desde 1998).
- Nuevas sustancias para el tratamiento del ojo seco (desde 2000).
- Efecto de los nucleótidos y la melatonina sobre la reepitelización corneal (desde 2002).
- Tratamiento de la acondroplasia- enanismo (desde 2003).

Ha dirigido dos tesis doctorales y en la actualidad se encuentra dirigiendo otras dos. El Dr. Pintor posee 102 artículos publicados en revistas científicas indexadas en el "Science Citation Index (SCI)", ha participado en 38 proyectos y contratos de investigación subvencionados y es inventor de 12 patentes.

Su discurso preceptivo de recepción como Académico de Número en la Real Academia Nacional de Farmacia, se fundamenta en la exposición de nuevas aproximaciones farmacológicas para el tratamiento de las patologías oculares más prevalentes.

Su discurso se tituló "Sobre la búsqueda de nuevas aproximaciones farmacológicas para el tratamiento de las patologías oculares". Su exposición es el resultado del trabajo realizado por su grupo de investigación durante los últimos años y refleja su interés por buscar nuevas moléculas, nuevas estrategias y nuevos mecanismos para tratar enfermedades oculares que por su trascendencia suponen un serio problema para los pacientes y por extensión para la sociedad española y la Humanidad.

Atrajo la atención de los presentes y televidentes sobre las afecciones de la superficie ocular, como el ojo seco, o las heridas corneales, así como de patologías que conducen a la ceguera como el "glaucoma" o las "cataratas" y concluyó con los avances más recientes que han sido realizados sobre la administración de fármacos con la aplicación de lentes de contacto.

**El 13 de noviembre** tuvo lugar el Acto de Toma de Posesión como Académico Extranjero del Dr. Paul Nguewa, de Camerún, actualmente Profesor del Departamento de Microbiología y Parasitología y Director del Instituto de Salud Tropical de la Universidad de Navarra, quien pronunció su discurso titulado: "Enfermedades tropicales, salud y pobreza: Retos para el Siglo XXI". Fue presentado por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega.

**El 20 de noviembre** la Real Academia Nacional de Farmacia, la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF celebraron la Mesa Redonda sobre: "Continuidad Asistencial del Paciente con Quimioterapia Oral".

El acto comenzó con la presentación de la Mesa Redonda por parte del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y el Dr. D. José Luis Poveda Andrés, Presidente de la Soc. Esp. de Farmacia Hospitalaria.

Se encargó de moderar el acto el Excmo. Sr. D. Víctor Jiménez Torres, Académico de Número de la RANF y los ponentes fueron: el Dr. Daniel Almenar Cubells, Jefe de Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Dr. Peset. (Valencia): "Retos de la prescripción oncológica en transición asistencial"; el Dr. Ramón Orueta Sánchez, Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria del Centro de Salud "Sillería" (Toledo): "La transición asistencial. Momento crítico para la adherencia terapéutica"; la Dra. Beatriz Bernárdez Ferrán, Unidad de Farmacia Oncológica, Complejo Hospitalario Universitario (Santiago de Compostela): "Impacto de la historia electrónica en la transición asistencial"; y la Dra. Mónica Climente Martí, Jefe de Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Dr. Peset. (Valencia): "Percepción del paciente onco-hematológico en transición asistencial".

**El 27 de noviembre** tuvo lugar la Sesión Científica Conmemorativa de los Premios Nobel 2014 en Fisiología o Medicina y en Química. La presentación estuvo a cargo del Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero, Académico de Número de la RANF.

En su intervención el Dr. Lacadena comentó, que el 6 de octubre de 2014, la Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo otorgó el Premio Nobel 2014 en Fisiología o Medicina "por los descubrimientos de las células que constituyen un sistema de posicionamiento en el cerebro" conjuntamente y a partes iguales, por un lado, a John O'Keefe, Profesor de Neurociencia Cognitiva y Director del Sainsbury Wellcome Center in Neural Circuits and Behaviour en el University College de Londres y, por otro lado, al matrimonio formado por los Dres. May-Britt y Edvard I. Moser que son, respectivamente, Profesora de Neurociencia y Directora del Centre for Neural Computation en la Universidad Noruega de Ciencia y Tecnología, en Trondheim, y Profesor y Director del Kavli



Institute for Systems Neuroscience en la misma Universidad. Ambos fueron científicos visitantes en el laboratorio del Dr. O'Keefe.

Como señalaba la nota de prensa del Instituto Karolinska, John O'Keefe descubrió en 1971 el primer componente cerebral del sistema de posicionamiento: se trataba de un tipo de células del hipocampo del cerebro de ratas que se activaban cuando el animal estaba en un determinado lugar del espacio de investigación, mientras que otras células nerviosas se activaban cuando el animal estaba en otro lugar. La conclusión de O'Keefe fue que estas células de lugar o posicionamiento (*place cells*) formaban en el cerebro un mapa del espacio.

Treinta años más tarde, en la primera década de este siglo, May-Britt y Edvard I. Moser descubrieron otro nuevo componente del sistema de posicionamiento del cerebro, identificando un tipo de células situadas en otro lugar del cerebro (el cortex entorrinal), llamadas células en parrilla o red (*grid cells*), que generan un sistema de coordenadas cerebral que permite a la rata situarse y explorar el terreno con precisión.

En definitiva, usando términos coloquiales, los galardonados han puesto en evidencia la existencia de un sistema interno de GPS cerebral.

Finalmente, terminó este breve comentario poniendo de manifiesto su particular satisfacción por un doble motivo: en primer lugar, porque haya merecido el premio un matrimonio (es la cuarta vez que esto sucede) que ha sido capaz de colaborar no sólo en su proyecto de vida en común como pareja, sino también en el quehacer científico y, en segundo lugar, porque May-Britt Moser ha aumentado la nómina de mujeres galardonadas con el Premio Nobel en un área científica (Fisiología o Medicina, Química, Física), que, según los datos que proporciona la Institución Nobel es más bien escasa: solamente 16 mujeres han obtenido el Premio Nobel en Ciencias, aunque alguna por partida doble, como es el caso de Marie Curie.

Sobre el Premio en Química, comentó el Excmo. Sr. Lacadena Calero, que el 8 de octubre de 2014, la Real Academia de Ciencias de Suecia en Estocolmo acordó conceder el Premio Nobel 2014 en Química conjuntamente a Eric Berzig (Janelia Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, VA, USA), Stefan W. Hell (University of Heidelberg, Director en el Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Division Head del German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) y a William E. Moerner (Mosher Professor in Chemistry y Professor of Applied Physics en la Standford University, CA, USA) "por el desarrollo de la microscopía de fluorescencia de super-resolución".

Siempre y nunca son dos palabras que no pueden utilizarse en Ciencia porque, como decía Laín Entralgo, la Ciencia es lo penúltimo, lo último no es Ciencia. Digo esto porque el famoso microscopista Ernst Abbe afirmó en 1873,

mediante la denominada “ecuación de Abbe”, que había un límite físico (límite de difracción de Abbe) para la resolución máxima de la microscopía óptica que nunca –repito, nunca– podría llegar a los 0,2 micrómetros (la mitad de la longitud de onda de la luz visible). Como señalaba la nota de prensa de la Real Academia Sueca de Ciencias, ayudados por las moléculas fluorescentes, los tres galardonados lograron salvar con ingenio esa limitación, llevando la microscopía óptica a la nanodimensión; es decir, al nacimiento de la nanoscopía.

El avance científico se basa en dos principios. El primero – la *microscopía STED* (*stimulated emission depletion*) – fue desarrollado por Stefan Hell, utilizando dos rayos laser: uno que estimula a las moléculas fluorescentes para que brillen y el otro que anula la fluorescencia excepto en volúmenes nanométricos. El segundo principio –la *microscopía de moléculas individuales*- que consiste en la posibilidad de encender y apagar (on/off) la fluorescencia de moléculas individuales fue desarrollado por William Moerner y Eric Betzig aunque trabajando por separado.

En la actualidad los científicos pueden visualizar los movimientos de moléculas individuales dentro de las células vivas. Así, pueden ver cómo las moléculas crean las sinapsis entre células nerviosas en el cerebro o seguir la pista a las proteínas responsables de las enfermedades de Parkinson, de Alzheimer o en la de Corea de Huntington cuando se agregan, o seguir la pista a proteínas individuales en el proceso de división del cigoto, en la primera división embrionaria, tomando literalmente los ejemplos utilizados en la nota de prensa institucional.

EL PREMIO NOBEL 2014 EN FISIOLÓGÍA O MEDICINA contó con la intervención del Excmo. Sr. D. Francisco José Rubia Vila, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina, con el título: "El Premio Nobel 2014 de Medicina o Fisiología". Y por otra parte EL PREMIO NOBEL 2014 EN QUÍMICA, contó con la intervención del Excmo. Sr. D. Jesús Pintor Just, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, con el título: "Premio Nobel de Química 2014: Observando el nanomundo".

Con lo que se conoce como "nanoscopía", los científicos pueden visualizar moléculas individuales dentro de las células vivas. Parecía imposible que los científicos pudiesen, a través de métodos ópticos, ver cierto tipo de detalles en sus preparaciones, sobre todo en observarlos de las moléculas en el interior de las células. En 1873, el microscopista Ernst Abbe estipuló un límite físico a la máxima resolución de la microscopía óptica tradicional: nunca podría llegar a ser mejor que 0,2 micrómetros. Eric Betzig, Stefan W. Hell y William E. Moerner han sido galardonados con el Premio Nobel de Química 2014 por haber pasado por alto este límite. Debido a sus logros el microscopio óptico puede ahora mirar en el nanomundo. Son básicamente dos principios los que han propiciado la concesión del mencionado galardón. En primer lugar la técnica STED (*stimulated emission*

depletion), desarrollada por Stefan Hell en el año 2000. En esta estrategia dos rayos láser son utilizados; uno estimula las moléculas fluorescentes haciéndolas brillar, otro anula toda fluorescencia a excepción de un volumen de tamaño nanométrico. El barrido de la preparación en observación produce una imagen con una resolución mejor que cualquiera que se hubiera obtenido hasta la actualidad. Eric Betzig y William Moerner, trabajando por separado, sentaron las bases para el segundo método, la microscopía de una sola molécula, definida con el acrónimo PALM (Photoactivated localization microscopy). El método se basa en la posibilidad de excitar la fluorescencia de moléculas individuales encendiéndolas y apagándolas. Los científicos iluminan la misma zona varias veces, dejando que sólo unas pocas moléculas intercaladas brillen cada vez. La superposición de estas imágenes produce una imagen súper densa con una resolución en el nivel nanométrico.

Hoy en día, nanoscopía se utiliza en todo el mundo y se con ella se profundiza en el conocimiento de cómo las moléculas participan en las sinapsis entre las células nerviosas en el cerebro, se pueden rastrear proteínas implicadas en la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer y la de Corea de Huntington, o investigar proteínas individuales en los huevos fertilizados que dan lugar embriones. Sin duda la nanoscopía favorecerá el conocimiento científico en aspectos que redundarán en una mejora de la calidad de vida de los seres humanos.

**El 4 de diciembre** tuvo lugar el Acto de Toma de Posesión como Académico Correspondiente del Ilmo. Sr. D. Gregorio Rodríguez Boto, Catedrático acreditado de Neurocirugía, Profesor Titular de Neurocirugía vinculado asistencialmente al Hospital Clínico San Carlos de Madrid, quien pronunció su discurso titulado: "La cirugía del Sistema Nervioso: desde la trepanación a la Neurocirugía moderna". Fue presentado por el Académico de Número de la RANF, Excmo. Sr. D. Antonio L. Doadrio Villarejo.

Expuso de forma magistral que la cirugía del sistema nervioso y/o de los nervios es etimológicamente conocida como "Neurocirugía". Aunque posiblemente sea la trepanación craneal la operación más antigua, de la cual existen huellas comprobadas, ya desde el período paleolítico (12.000 años a. C.), la Neurocirugía como disciplina de la Medicina y especialidad de la Cirugía se inició como tal a finales del siglo XIX. Y mostró durante su exposición, toda una serie de atractivas imágenes que hicieron amena e inteligible su magnífica disertación. Desde ese momento hasta nuestros días puede sentenciarse que no hay ninguna otra especialidad médica o quirúrgica que haya experimentado un desarrollo tan extenso y acusado en el lapso de poco más de un siglo. En este trabajo se expone este devenir histórico de la que puede considerarse como Neurocirugía "moderna"

En un segundo plano, realizó una exposición de las principales patologías que competen a la Neurocirugía por antonomasia: traumatismos craneoencefálicos, tumores craneoencefálicos, patología vascular cerebral, patología del líquido cefalorraquídeo y patología malformativa, neurocirugía funcional, patología degenerativa espinal, traumatismos raquimedulares, tumores raquimedulares y por último, patología del sistema nervioso periférico y autónomo. Asimismo, se hizo hincapié respecto a lo que puede ser la Neurocirugía en un futuro no muy lejano, por no decir ya presente. Finalmente, añadió algunos comentarios referentes a la investigación en Neurocirugía, principalmente a las creaciones tecnológicas llevadas a cabo por los neurocirujanos en épocas recientes como los clips aneurismáticos, los sistemas de derivación del líquido cefalorraquídeo, el microscopio quirúrgico, las guías de estereotaxia y la radioterapia estereotáxica.

**El 11 de diciembre** en la sede de la Real Academia Nacional de Farmacia, las RR. AA. Nacionales de Farmacia, de Medicina y de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales tuvieron el honor de celebrar la Sesión Científica Extraordinaria conjunta, en un acto homenaje al Excmo. Sr. D. Julio Rodríguez Villanueva, sobre: "Microbiología y aplicaciones biotecnológicas". El acto comenzó con la "laudatio" a cargo del Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza. Los ponentes fueron:

El Excmo. Sr. D. César Nombela Cano Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia: "La escuela del Profesor Villanueva: impacto en la Microbiología y la Biotecnología en España".

La trayectoria del profesor Villanueva es la de una persona que aúna talento, coraje y corazón, de los que tan necesitados estamos en nuestro mundo académico. Tras beber en las fuentes de maestros –él reconoce especialmente la inspiración del profesor Albareda, de Madrid, y el profesor Gale, Cambridge (UK)- creó un grupo de notable impacto en el CSIC, en los años sesenta, para ocupar después una cátedra en la Universidad de Salamanca en 1966. Inspirador entusiasta de vocaciones para la dedicación investigadora y universitaria, sus esfuerzos de más de cuatro décadas arrojan un impresionante balance para la Ciencia española. La Escuela de Villanueva, conocida también como Escuela Microbiología de Salamanca, está integrada por más de dos docenas de catedráticos, establecidos en numerosas universidades españolas, así como otros muchos profesores e investigadores, de notable impacto en el desarrollo de Microbiología y la Biotecnología.

Su trabajo está basado en un aprecio especial por todo lo que compone el mundo de lo vivo, con su inmensa diversidad dentro de la unidad de los procesos esenciales que se da en todos los vivientes. Su aproximación al conocimiento de la vida microbiana se basó siempre en la búsqueda de sistemas modelo, en los que experimentar para el progreso del conocimiento y sus aplicaciones. A lo largo de

muchos años, el trabajo del Prof. Villanueva y su escuela se ha centrado en aproximaciones morfológicas, bioquímicas, genéticas, moleculares, genómicas y proteómicas verdaderamente pioneras. En la conferencia se pusieron de manifiesto algunas de las aportaciones más fundamentales, que proporcionaron un conocimiento más profundo de funciones y actividades esenciales de los microorganismos, tanto patógenos como de los que resultan útiles para aplicaciones biotecnológicas.

La Excm. Sra. Dña. María del Carmen Maroto Vela, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Medicina disertó sobre: "Biotecnología en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades transmisibles". En su exposición valoró el significado de las Next Generation Sequencing, en especial la secuenciación masiva, para la aplicabilidad en el diagnóstico, tratamiento y epidemiología de diversos procesos patológicos. Para ello definió cinco apartados, en los cuales, debido a la amplitud del tema, mostró algunos ejemplos. En el primero, relacionado con las bacterias, presentó algunas plataformas necesarias para la respuesta que exigen principalmente las UVIs. En el segundo, dedicado a los virus, además de los aspectos generales relacionados con genotipos, subtipos, mutaciones, polimorfismos, cuasiespecies o CRFs, se refirió a las hepatitis B y C, así como el VIH y una breve referencia al virus Ébola. En el tercero, en relación con el microbioma, señaló que partimos de muestras respiratorias (fibrosis quística), orales (periodontitis) y heces (síndrome del intestino irritable, con posibilidad de trasplante fecal) e incluso obesidad y diabetes. En el cuarto, se refirió a la posible relación de microorganismos con patologías crónicas no transmisibles, tales como la esquizofrenia, la esclerosis múltiple, la arteriosclerosis, e incluso la progresión de la osteoporosis. En el apartado final, comentó el significado que el estudio de la filogenia y la filogeografía permite analizar linajes, reconstruir la historia evolutiva de algunos procesos, así como la transmisión de las infecciones. Para el correcto manejo de todos estos apartados son totalmente necesarias las modernas técnicas de biotecnología.

Por su parte el Excmo. Sr. D. Carlos López-Otín, Académico de Número Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales disertó sobre: "La Biomedicina y la Farmacología en la era genómica".

Comentó que las nuevas aproximaciones tecnológicas al estudio de los procesos biológicos están comenzando a tener una gran repercusión en el campo de la Biomedicina, esa conjunción ahora ya imprescindible entre la Biología y la Medicina, que está llamada a impulsar a la Farmacología en el desarrollo de nuevas formas de tratar las enfermedades. Así, el fascinante progreso alcanzado por la Biología Molecular en esta era genómica en la que ya estamos viviendo, va a facilitar la transición de la Medicina hacia una disciplina con mayor contenido molecular, que va a necesitar nuevos adjetivos que la definan. La Medicina está

dando ya sus primeros pasos hacia su convergencia con una Ciencia predictiva, individualizada y regenerativa, que pretenderá anticiparse al futuro desarrollo de enfermedades en cada individuo, a través del estudio de marcadores moleculares inscritos en el genoma, el epigenoma, el varioma, el proteoma, el metaboloma, el degradoma o en cualquiera de los múltiples lenguajes "ómicos" en los que hoy se escriben las Ciencias de la Vida.

En esta conferencia en honor del Profesor Rodríguez Villanueva, se presentaron de forma atractiva y amena estas nuevas aproximaciones hacia la Medicina Molecular y se discutieron las numerosas barreras que todavía deben superarse para poder afrontar, explicar y desentrañar las enfermedades humanas bajo una nueva perspectiva genómica.

En cuanto a los premios y distinciones que han recibido nuestros Académicos durante este último trimestre, hay que destacar:

El 13 de noviembre, los Excmos. Sres. D. Benito del Castillo García y D. Fidel Ortega Ortiz Apodaca fueron designados y nombrados a propuesta del Consejo Rector, miembros del Comité de la Farmacopea y el Formulario Nacional del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Y tomaron posesión el día 4 de diciembre.

El 21 de noviembre tomo posesión como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Castilla y León, el Dr. D. Antonio González Bueno, Académico Correspondiente de la RANF y Catedrático de la Facultad de Farmacia de la UCM. Su discurso de Ingreso versó sobre "Aventuras, venturas y desventuras de un burgalés universal: Hipólito Ruiz López (1754-1816)".

El 25 de noviembre la Residencia de Estudiantes rindió homenaje a nuestro Académico de Honor, Excmo. Sr. D. José Elguero Bertolini con la celebración de la Mesa Redonda "Entre el humanista y el Científico".

El 10 de diciembre nuestro Académico de Número, Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García, ingresó como Académico Correspondiente en la Academia de Farmacia "Reino de Aragón". Su discurso trató sobre "Farmacopeas de ayer y de hoy" y fue presentado por el Ilmo. Sr. Dr. D. Santiago Andrés Magallón, Académico de Número y Vicepresidente fundador de la misma.

El 18 de diciembre se otorgó el Premio del Instituto Danone a la Trayectoria Científica 2014 a nuestra Académica Correspondiente electa, la Ilma. Sra. Dña. Ascensión Marcos Sánchez, que tomará posesión como Académica Correspondiente de la RANF, el próximo 29 de enero. El acto tuvo lugar en la Real Academia Nacional de Medicina y fue inaugurado por la Excma. Sra. Dña. Pilar Farjas Abadía, Secretaria General de Sanidad y Consumo; y Presidenta de la Agencia Española de Consumo y Seguridad Alimentaria y Nutrición.



Se ha concedido la *Medalla de Honor al Fomento de la Invención*, por la Fundación García Cabrerizo, en el Salón de Actos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y presidido por su Presidente, Excmo. Sr. D. Emilio Lora-Tamayo, a dos eminentes Académicos Correspondientes de la RANF, los Excmos. Sres. D. Pedro Guillén García y a D. José María Ventura Ferrero (Grupo Ordesa).

El 16 de diciembre se celebró en la Sede del Instituto de España, con numerosa asistencia, Presidentes de las ocho Reales Academias y numerosos Académicos de la RANF y invitados, la Sesión de Homenaje a la Antigüedad Académica en honor del Excmo. Sr. D. Federico Mayor Zaragoza, y la "laudatio" corrió a cargo de la Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto. Y cuyas intervenciones publicadas se distribuyeron a los asistentes al finalizar el Acto.