

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA



Volumen. 84, Número 4 - Cdtkn- Lwpkq (2018)



Nobel Prizes of Chemistry and Physiology or Medicine. Biology invades Chemistry and Chemistry invades Medicine

Title in Spanish: *Premios Nobel de Química y de Fisiología o Medicina 2105. La biología “invade” a la química y ésta a la medicina*

M.^a del Carmen Avendaño López¹

¹Catedrática de Química Orgánica, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid

ABSTRACT: We argue that the outcome of the 2015 Nobel Prizes shows that the barriers between physical and life sciences are increasingly subtle. Biology continues its Chemistry invasion and the Nobel Prize of Physiology or Medicine is given to a classical Medicinal Chemistry methodology: the search for new drugs through natural products optimization.

RESUMEN: Se pretende demostrar que ambos premios reflejan la dificultad de establecer líneas divisorias entre las ciencias relacionadas con la vida. La biología sigue “invadiendo” a la Química y el Nobel de Fisiología o Medicina se otorga a descubrimientos enmarcados en un campo propio de la Química Médica: el descubrimiento de fármacos por manipulación estructural de productos naturales.

*Corresponding Author: avendano@farm.ucm.es

Received: October 22, 2015 Accepted: October 27, 2015

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 121-128

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Desde el año 1901 han sido galardonadas 870 personas y 23 organizaciones con Premios Nobel. A ellas se han sumado en el año 2015 Takaaki Kajita y Arthur B. McDonald, que han sido nominados para el Nobel de Física "por el descubrimiento de las oscilaciones de los neutrinos, que demuestran que los neutrinos tienen masa"; Tomas Lindahl, Paul Modrich y Aziz Sancar, galardonados con el Nobel de Química "por los estudios mecanísticos de la reparación del ADN"; William C. Campbell y Satoshi Ōmura "por sus descubrimientos relacionados con una nueva terapia contra infecciones causadas por nematodos", comparten el premio de Fisiología o Medicina con Youyou Tu "por sus descubrimientos relacionados con una nueva terapia contra la malaria"; Svetlana Alexievich ha sido premiada con el Nobel de Literatura "por sus escritos polifónicos, un monumento al sufrimiento y al coraje en nuestro tiempo"; a la organización "National Dialogue Quartet" se otorga el Nobel de la Paz "por su decisiva contribución a la construcción de una democracia plural en Túnez en el despertar de la Revolución de los Jazmines en 2011"; y a Angus Deaton el Premio en Ciencias Económicas (*Sveriges Riksbank Prize in Economic Sciences in Memory of Alfred Nobel*) "por su análisis sobre el consumo, la pobreza y el bienestar". A lo largo de los años, varias concesiones de estos premios han provocado reacciones contradictorias a nivel internacional, basadas con frecuencia en razones políticas. Este año parece haber

destacado en este sentido la concesión del Premio Nobel de Literatura a la periodista bielorrusa Svetlana Alexievich, autora de una obra en la que la ficción ha sido reemplazada por testimonios y documentos.

Aunque los Nobel de Química y de Fisiología o Medicina de 2015 se analizarán detenidamente en la sesión organizada anualmente al efecto por la RANF, aquí pretendemos demostrar que ambos premios reflejan la dificultad de establecer líneas divisorias entre las ciencias relacionadas con la vida. La biología sigue “invadiendo” a la química y el Nobel de Fisiología o Medicina se otorga a descubrimientos enmarcados en un campo propio de la Química Médica: el descubrimiento de fármacos por manipulación estructural de productos naturales (1).

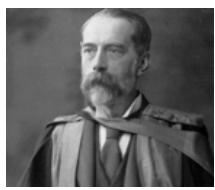
2. LA QUÍMICA MÉDICA, UNA NUEVA ORIENTACIÓN DE LA QUÍMICA

Se puede decir que las bases científicas del desarrollo de los medicamentos surgieron alrededor de 1850 con la síntesis de Perkin del primer colorante artificial y con el inicio de los estudios farmacológicos en animales. En 1868, el químico orgánico A. C. Brown y el farmacólogo T. R. Fraser pusieron de manifiesto que lo que determina los efectos de los compuestos en los sistemas biológicos es su estructura química (2). Aunque algunos científicos pensaron que se podrían diseñar fármacos para tratar cualquier enfermedad, los nuevos fármacos surgían todavía por la vía empírica del ensayo y el error, de tal forma que el famoso farmacólogo A. J. Clark (3) opinaba en los años 1930s que los que se dedicaban el estudio de

las relaciones entre la estructura química y los efectos biológicos de los compuestos habían conseguido entender cual era su nivel de ignorancia.



A. C. Brown



T. R. Fraser



A. J. Clark

Figura 1. Pioneros y críticos de las relaciones estructura química-actividad biológica.

La Química Médica apareció en la bibliografía después de la Segunda Guerra Mundial, cuando el avance de las técnicas farmacológicas permitió cuantificar la actividad biológica, que pasó a ser una nueva propiedad de las moléculas. Esta nueva orientación de la química surgió en grupos de investigación de la industria farmacéutica de los EEUU, y tomó carta de naturaleza cuando la *American Chemical Society* aceptó que la *Division of Pharmaceutical Chemistry* (fundada in 1909 y transformada en 1920 en *Division of Chemistry and Medicinal Products*) se denominara en 1948 *Division of Medicinal Chemistry*. Posteriormente comenzó a desarrollarse en Europa a nivel industrial y académico.

En 1959, la *Division of Medicinal Chemistry* comenzó a publicar la revista *Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, que pasó a llamarse en 1963 *Journal of Medicinal Chemistry* y se convirtió en la de mayor impacto de esta disciplina. En 1966 esta División empezó también a publicar los *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, una serie que recogía los principales avances de cada año. El término *Medicinal Chemistry* se tradujo al español de varias formas, adoptándose el de Química Médica cuando se creó el correspondiente Instituto del CSIC en 1973, mientras que la Sociedad de Química Terapéutica creada para promover el desarrollo de la investigación y el desarrollo en el sector farmacéutico español adoptó ese nombre cuando se fundó en 1977. Los nombres de Química Medicinal o Química Farmacéutica se aplicaron a la nueva disciplina que se incluyó por primera vez en los planes de estudios de la Licenciatura de Farmacia de 1973, no sin ciertas reticencias por sus contenidos, que según las directrices de la Comunidad Europea eran el diseño, la síntesis y el análisis de los fármacos, entendidos en el sentido amplio de moléculas activas biológicamente y no sólo como los aceptados oficialmente para su comercialización y uso humano.

Este nuevo campo interdisciplinar de la química se apoyó primero en la química orgánica y en particular en la síntesis orgánica, pero el estudio de las relaciones estructura química-actividad biológica y la interpretación de los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos tuvieron cada vez más relevancia. La cuantificación de la actividad biológica de las moléculas y la introducción de los métodos computacionales posibilitó establecer

relaciones cuantitativas e hizo pensar en que el diseño racional de fármacos era un objetivo alcanzable. Además, el marcapas de las moléculas con radioisótopos permitió desarrollar ensayos de enlace e identificar y validar dianas para los distintos fármacos, que pasaron a ser una herramienta para el conocimiento de la biología celular y molecular y de los mecanismos de acción de los fármacos. La IUPAC definió en 1998 a la Química Médica como “*a chemistry-based discipline, also involving aspects of biological, medical and pharmaceutical sciences. It is concerned with the invention, discovery, design, identification and preparation of biologically active compounds, the study of their metabolism, the interpretation of their mode of action at the molecular level and the construction of structure-activity relationships*” . Sus posibilidades se incrementaron gracias al progreso de los métodos de cribado molecular, las técnicas analíticas y las tecnologías computacionales aplicadas al modelado molecular y al cribado virtual. Actualmente, además de permitir optimizar la actividad biológica o el índice terapéutico, la Química Médica proporciona herramientas útiles para el diagnóstico y el entendimiento de las enfermedades, y facilita la evaluación clínica de nuevos fármacos. Por otra parte, la diversidad estructural de las moléculas sometidas a estudio es cada vez mayor e incluye ligandos sintéticos, productos naturales o de semisíntesis, peptidomiméticos y proteínas modificadas, conjugados de fármacos con anticuerpos, compuestos multifuncionales y vacunas sintéticas (4).

3. PREMIO NOBEL DE QUÍMICA 2015

Si asignamos los campos de investigación correspondientes a los Nobel de Química que se han otorgado en el siglo XXI (Tabla 1), corresponderían 9 a la Química Biológica (entre ellos el del año 2015), 2 a la Química Física, 1 a la Química Aplicada a la Ingeniería de Materiales, 1 a la Química Computacional, y 3 a la Síntesis Orgánica.

El Nobel de Química de 2015 premia los estudios sobre la reparación del ADN llevados a cabo por T. Lindahl, P. Modrich y A. Sancar. El primero ha trabajado en el Instituto Francis Crick de Investigación biomédica y en el Laboratorio de Investigación sobre el cáncer Clare Hall en Gran Bretaña; Modrich es investigador del Instituto Médico Howard Hughes y catedrático de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad Duke de EEUU; y Sancar es catedrático de biofísica y bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad de Carolina del Norte (Figura 2). Sus trabajos han sido relevantes para conocer que la actividad celular, así como diversos factores ambientales, pueden producir daño en el ADN. La inestabilidad de esta molécula fue demostrada en los primeros años 1970s por el Dr. Lindahl, quien descubrió una maquinaria molecular que lo repara constantemente. El Dr. Sancar trazó el camino para establecer cómo las células reparan el daño que origina en el ADN la luz ultravioleta y el Dr. Modrich mostró cómo la maquinaria celular corrige los errores producidos durante la replicación del ADN.

Tabla 1. Premios Nobel de Química 2001-2015.

| Año | Científicos premiados | Tema |
|------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2001 | K.B. Sharpless, W.S. Knowles y R. Noyori | Catalizadores quirales en reacciones de oxidación y reducción. |
| 2002 | J.B. Fenn, K. Tanaka y K. Wüthrich | La desorción iónica y la RMN en el análisis espectrométrico de moléculas biológicas. |
| 2003 | P. Agre y R. MacKinnon | Canales de agua y mecanismos de intercambio iónico en las membranas celulares. |
| 2004 | A. Ciechanover, A. Hershko e I. Rose | Descubrimiento de la reacción proteínica causada por la ubiquitina |
| 2005 | Y. Chauvin, R. H. Grubbs y R.R. Schrock | Desarrollo del método de metátesis olefínica en la química orgánica. |
| 2006 | R.D. Kornberg | Bases moleculares de la transcripción genética. |
| 2007 | G. Ertl | Procesos químicos sobre superficies sólidas. |
| 2008 | O. Shimomura, M. Chalfie y R.Y. Tsien | Descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente (GFP). |
| 2009 | V. Ramakrishnan, T.A. Steitz y A. Yonath | Estructura y función de los ribosomas. |
| 2010 | R. Heck, E-i. Negishi y A. Suzuki | Reacciones químicas catalizadas por paladio. |
| 2011 | D. Shechtman | Descubrimiento de los cuasicristales (sólidos cuasiperiódicos). |
| 2012 | B.K. Kobilka y R.J. Lefkowitz | Descubrimiento de los receptores acoplados a proteínas G. |
| 2013 | M. Karplus, M. Levitt y A. Warshel | Desarrollo de modelos informáticos que permiten entender y predecir sistemas químicos complejos. |
| 2014 | E. Betzig, S.W. Hell y W.E. Moerner | Desarrollo del microscopio de fluorescencia de alta resolución. |
| 2015 | T. Lindahl, P. Modrich y A. Sancar | Estudios mecanísticos de la reparación del ADN. |



Figura 2. Científicos galardonados con el Premio Nobel de Química 2015.

Se calcula que el genoma de una célula de un ser humano puede experimentar diariamente miles de cambios espontáneos y que en la división y multiplicación de las células que tiene lugar diariamente en las personas millones de veces, pueden introducirse defectos. Muchas lesiones originan un daño estructural en el ADN que altera o inhibe la transcripción genética o induce mutaciones que afectan a la supervivencia celular. Las lesiones más comunes son las roturas de una hebra (*single-strand breaks*, SSBs). Cuando se detecta el daño se activan los procesos de respuesta (*DNA damage response*, DDR), que implican su reparación o la muerte celular programada de

la célula dañada (apoptosis). Si estos procesos fallan, se producen lesiones irreversibles que conducen a distintas enfermedades, fundamentalmente al cáncer (que se origina cuando se acumulan varias de estas lesiones y las células entran en una división descontrolada), y a otras enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Por ello, varios fármacos que inhiben la DDR potencian el efecto de los tratamientos anticancerosos al alterar o inhibir los procesos de reparación del ADN a fin de que las células cancerosas, sensibles a dichos tratamientos, entren en apoptosis (5). Aunque el aumento de la eficacia terapéutica de los antitumoriales administrados conjuntamente con estos quimiosensibilizantes puede inducir efectos indeseables derivados de la inhibición de la reparación del ADN en tejidos normales o aumentar el riesgo de malignidades secundarias, serían muy útiles como coadyuvantes en la radioterapia porque la inhibición de la respuesta al daño del ADN sensibilizará selectivamente a las células radiadas. Hoy se conocen cuatro modos de reparar el ADN: la reparación directa (*direct repair*, DR), la reparación por excisión de una base (*base excision repair*, BER), la recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR), y la unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ) (Figura 3).

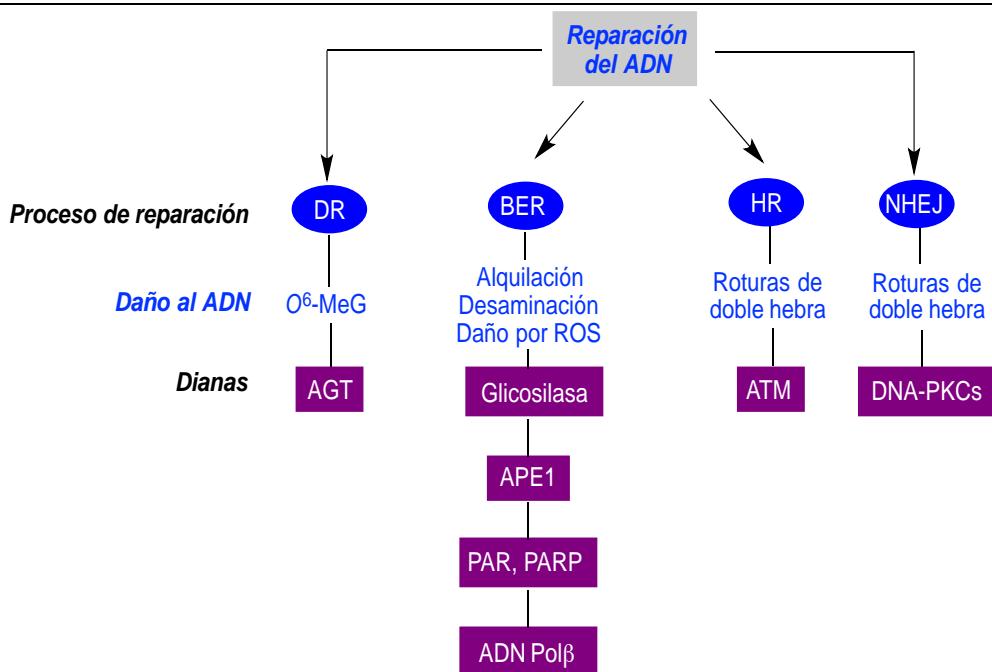


Figura 3. Modos de reparación del ADN, daño que se repara y dianas implicadas.

5. PREMIO NOBEL DE FISIOLOGÍA O MEDICINA 2015

Si analizamos los Premios Nobel de Fisiología o Medicina concedidos en el mismo periodo (Tabla 2) podemos observar que se premian frecuentemente descubrimientos relacionados con la biología molecular (especialmente con la genética) que explican el funcionamiento del organismo humano. Otros descubrimientos han permitido el desarrollo de animales manipulados genéticamente para el estudio de

enfermedades y fármacos o el de métodos para modificar artificialmente ciertos procesos vitales (como la fertilización *in vitro*). También se ha premiado el descubrimiento de patógenos externos (bacterias o virus) causantes de enfermedades. Se salen de estos campos científicos el premio del año 2003, otorgado a la aplicación de la resonancia magnética de imagen para observar alteraciones en tejidos y detectar tumores u otras patologías utilizando métodos físicos (campos magnéticos), y el premio del año 2015.

Tabla 2. Premios Nobel de Fisiología o Medicina 2001-2015.

| Año | Científicos premiados | Tema |
|------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2001 | L.H. Hartwell, T. Hunt y Sir P. Nurse | Descubrimiento de los reguladores clave del ciclo celular. |
| 2002 | S. Brenner, H.R. Horvitz y J. E. Sulston | Descubrimientos relacionados con la regulación genética del desarrollo de los órganos y de la muerte celular programada. |
| 2003 | P.C. Lauterbur y Sir P. Mansfield | Descubrimientos relacionados con la resonancia magnética de imagen. |
| 2004 | R. Axel y L.B. Buck | Descubrimiento de los receptores de los olores y de la organización del sistema olfativo. |
| 2005 | B.J. Marshall y J.R. Warren | Descubrimiento de la bacteria <i>Helicobacter pylori</i> y de su papel en la gastritis y la úlcera péptica. |
| 2006 | A.Z. Fire y C.C. Mello | Descubrimiento del ARN de interferencia – silenciamiento genético por ARN de doble hebra. |
| 2007 | M.R.M. Capecchi, Sir M.J. Evans y O. Smithies | Descubrimientos para introducir modificaciones genéticas específicas en ratones utilizando células madre embrionarias. |
| 2008 | H. zur Hausen F. Barré-Sinoussi, L. Montagnier | Descubrimiento de los virus del papiloma humano causantes del cáncer cervical. Descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana. |
| 2009 | E.H. Blackburn, C.W. Greider y J.W. Szostak | Descubrimiento de cómo están protegidos los cromosomas por los telómeros y la enzima telomerasa. |
| 2010 | R. Edwards | Desarrollo de la fertilización in vitro. |
| 2011 | R.M. Steinmann B.A. Beutler y J.A. Hoffmann | Descubrimiento de las células dendríticas y de su papel en la inmunidad adaptativa. Descubrimientos acerca de la activación del sistema inmune innato. |
| 2012 | Sir J.B. Gurdon y S. Yamanaka | Descubrimiento de que las células maduras pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes. |
| 2013 | J.E. Rothman, R.W. Scheckman y T.C. Südhof | Descubrimiento de la maquinaria que regula el tráfico de vesículas, un importante sistema de transporte en nuestras células. |
| 2014 | J. O'Keefe, M.-B. Moser y E.I. Moser | Descubrimiento de las células que constituyen un sistema de posicionamiento en el cerebro. |
| 2015 | W.C. Campbell y S. Ōmura Y. Tu | Descubrimiento de una nueva terapia contra infecciones causadas por nematodos. Descubrimientos de una nueva terapia contra la malaria. |

Los tres investigadores premiados este año (Figura 4), han identificado tratamientos contra importantes enfermedades parasitarias, y ejemplifican cómo la ciencia puede cambiar el mundo en los países más pobres.



S. Omura

W. Campbell

Y. Tu

Figura 4. Investigadores premiados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2015.

Satoshi Ōmura, de la Kitasato University de Tokio, y William Campbell, de la Drew University de Madison (EEUU), comparten la mitad del premio por sus trabajos sobre las avermectinas y sus derivados. La avermectinas son lactonas macrocíclicas (Figura 5a) producidas en la fermentación de *Streptomyces avermitilis*, un actinomiceto del suelo. Estos compuestos han resultado eficaces en el tratamiento de la oncocercosis o ceguera del río, la filariasis linfática y otras enfermedades infecciosas producidas por gusanos nematodos. La ivermectina es una mezcla de estos macrólidos y uno de los antihelmínticos más eficaces que existen, generando ventas de alrededor de mil millones de dólares anuales. Ōmura es un experto en el aislamiento de productos naturales que desarrolló técnicas para cultivar bacterias a gran escala, siendo

coautor de al menos 1179 publicaciones. Entre otras bacterias se interesó por el género *Streptomyces*, del que ya se había aislado la estreptomicina. Dado que era pionero en buscar en estos cultivos actividades distintas a la antibiótica, envió varios compuestos aislados del cultivo de *Streptomyces avermitilis* a los laboratorios de la compañía Merck en EEUU, donde Campbell observó que uno de ellos denominado avermectina era muy eficaz contra parásitos de animales de granja, llegando así a la ivermectina que es capaz de controlar parásitos de animales y seres humanos. Es tan eficaz en el tratamiento de la oncocercosis y de otras infecciones que éstas están a punto de ser erradicadas, gracias en parte a que para lograr este propósito la compañía Merck donó este tratamiento en el año 1983.

La otra mitad del Premio Nobel de Fisiología o Medicina, se ha otorgado a Youyou Tu por su descubrimiento de la artemisinina. Tu es directora de la Academia de Medicina China, y a sus casi 85 años es el primer científico chino que ha alcanzado un Premio Nobel por trabajos desarrollados en China, representando a la primera generación de científicos que fundó Mao Zedong. La artemisinina es un compuesto natural aislado de la planta *Artemisia annua* (ajeno dulce), cuyo extracto se utilizaba como antimalárico y como antihelmíntico con anterioridad al año 168 antes de Cristo. En 1972, se aisló de sus hojas un compuesto cristalino al que se denominó "qinghaosu" (6), que es el responsable de la actividad biológica y actualmente es la base de los tratamientos más eficaces frente a la malaria (7) (Figura 5b).

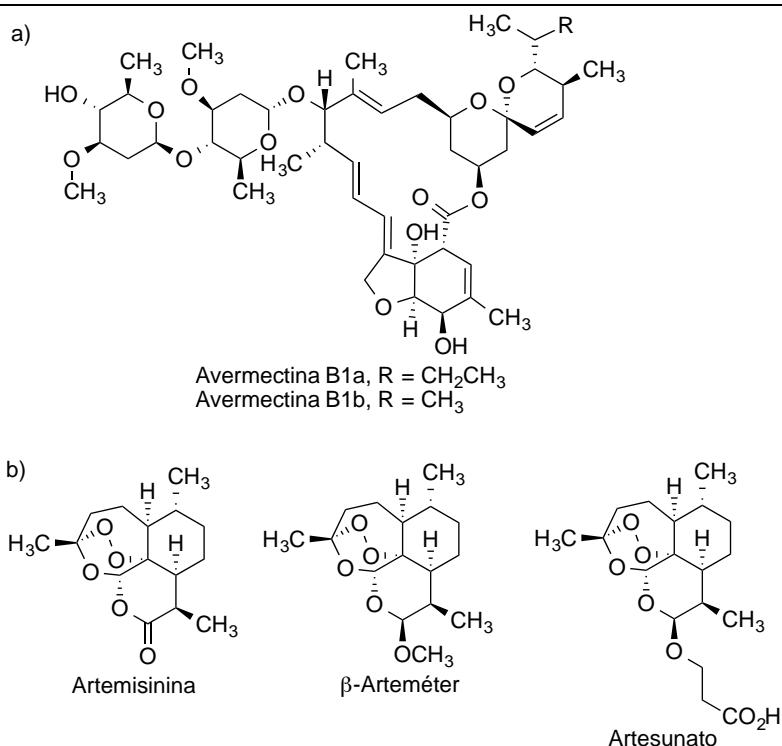


Figura 5. Estructura de algunas avermectinas. Artemisinina y algunos de sus análogos.

El descubrimiento de la artemisinina se produjo en la Revolución Cultural, resultando de una iniciativa del gobierno chino para ayudar a Vietnam del Norte en la guerra con EEUU. El desastre que producían en las tropas las cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a la cloroquina llevó al descubrimiento en los laboratorios estadounidenses de la mefloquina (8), mientras que China organizó un proyecto secreto en 1967, denominado proyecto 523, en el que estaban implicados 600 científicos y alrededor de 60 laboratorios e institutos. Dentro de este proyecto la Prof. Tu dirigía un equipo que estudió la literatura y las recetas de la medicina tradicional china, y tras seleccionar 640 recetas que parecían tener alguna actividad antimalárica ensayó 380 extractos de hierbas en un roedor utilizado como modelo para esta actividad, encontrando que los extractos de *Artemisia annua* (Qinghao) inhibían el crecimiento del parásito en porcentajes bajos. En 1971 logró el extracto 191, que debía contener el principio activo puro ya que mostró un 100% de inhibición, pero no llegó a obtenerlo en forma cristalina. Tras presentar estos resultados en la reunión del proyecto 523 celebrada en marzo de 1972, su información permitió que dos equipos de químicos lograran aislar la artemisinina en forma cristalina. Dado que se trataba de un secreto militar, los resultados no se publicaron hasta 1979, y lo hicieron en una revista médica china sin los nombres de sus descubridores. Así estaban las cosas hasta que en 2007 los especialistas en malaria de los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos Louis Miller y Xinzhuhan Su lograron identificar a Youyou Tu como descubridora de la artemisinina. Tras otorgarle en el año 2011 el prestigioso premio Albrt Lasker de investigación médica, ahora se le ha asignado la mitad del Premio Nobel de Fisiología o Medicina. Se estima que las terapias en las que la artemisinina se combina con otro fármaco antimalárico han reducido alrededor de un 20% la mortalidad, salvando unas 100.000 vidas al año.

6. NUESTRA RELACIÓN CON EL PROF. ÓMURA

El Prof. Ómura ha sido un antiguo conocido en nuestro grupo de investigación desde que publicó en el año 1983 la estructura del nuevo antibiótico diazaquinomycina A, cuyo efecto antitumoral atribuyó en 1985 a su actividad antifolato por inhibir la enzima timidilato sintasa (9). La escasez de datos sobre la síntesis y actividad biológica de aza y diazaantraquinonas y las dudas que nos planteó el mecanismo de acción propuesto nos motivaron a desarrollar su síntesis y a estudiar su actividad antitumoral, una tarea que desarrollamos en colaboración con la empresa Pharmamar y dio lugar a varias publicaciones (10) y patentes (11). Varios de los análogos de diazaquinomicina sintetizados mostraron una potente actividad antitumoral *in vitro*, pero no mostraron actividad significativa como inhibidores de timidilato sintasa, sino como inhibidores de la biosíntesis de proteínas, ADN y ARN.

7. REFLEXIÓN FINAL

Las invasiones no son perniciosas en el campo de batalla de la ciencia, donde la interdisciplinariedad facilita una mayor productividad.

8. REFERENCIAS

1. Sobre este tema, ver por ej.: a) Avendaño C. Síntesis de nuevos antitumorales por manipulación de modelos naturales de origen marino. *Anal Real Acad Nac Farm* 2007;73:1079-92. b) Avendaño C. Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión de conjunto. *Anal Real Acad Nac Farm* 2011;77:15-35.
2. Brown AC, Fraser TR. On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action; with special reference to the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia, *J Anat Physiol* 1868;2:224-42 (Abstract de una lectura realizada el 6 de enero de 1868 en la Royal Society de Edimburgo).
3. Parascandola JA. J. Clark: quantitative pharmacology and the receptor theory. *Trends Pharm Sci* 1982;3:421-23.
4. Timmerman J. Medicinal Chemistry in Europe; annotations on the History of the European Federation for Medicinal Chemistry. *MedChemWatch* 2008; 5 (publicación periódica de la European Federation for Medicinal Chemistry, EFMC, creada en 1972).
5. Ljungman M. Targeting the DNA Damage Response in Cancer *Chem Rev* 2009;109:2929-50.
6. Miller LH, Su X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell* 2011;146:855-8.
7. Ver una revisión reciente en: Avendaño C. A brief updated report on the battle against malaria, *Anal Real Acad Nac Farm* 2015;81:145-57.
8. Trenholme CM, Williams RL, Desjardins RE, et al. *Science* 1975;190:792-4.
9. a) Ómura S, Nakagawa A, Aoyama, H, Hinotozawa K, Sano H. The structure of diazaquinomycins A and B, new antibiotic metabolites. *Tetrahedron Lett* 1983;24:3643-6. b) Murata M, Miyasaka T, Tanaka H, Ómura S. Diazaquinomycin A, a new antifolate antibiotic, inhibits thymidylate synthase. *J Antibiotics* 1985;38:1025-33. c) Tsuzuki K, Yokozuka T, Murata M, Tanaka H, Ómura S. Synthesis and biological activity of analogues of diazaquinomycin A, a new thymidylate synthase inhibitor. *J. Antibiot* 1989;42:727-37.
10. Ver algunos resultados en: a) Gesto C, de la Cuesta E, Avendaño C. Synthesis of diazaanthraquinones by hetero Diels-Alder cycloaddition reactions. *Tetrahedron* 1989;45:4477-84. b) Gesto C, de la Cuesta E, Avendaño C. An efficient synthesis of 8-methoxy- and 8-hydroxy-1-methylcarbostyryl. *Synthetic Commun* 1990;20:35-9. c) Gesto C, de la Cuesta E, Avendaño C, Emling F. Synthesis and

- Biological Activity of New 1,8-Diaza-2,9,10-anthracenetrione Derivatives. *J Pharm Sci* 1992;81:815-6. d) González R, Ramos MT, de la Cuesta E, Avendaño C. Base-Catalyzed Electrophilic Substitution in 2(1*H*)-quinolinone. *Heterocycles* 1993;36:315-22. e) Alonso MA, Blanco MM, Avendaño C, Menéndez JC. Synthesis of 2,5,8-(1*H*)-quinolinetrione derivatives through Vilsmeier-Haack formylation of 2,5-dimethoxyanilides. *Heterocycles* 1993;36:2315-25. f) Alonso MA, Úbeda JI, Avendaño JI, Menéndez JC, Villacampa M. New findings on the Vilsmeier Haack-Approach to Quinoline Derivatives. *Tetrahedron* 1993;47:10997-11008. g) Pérez JM, Vidal L, Grande MT, Menéndez JC, Avendaño C. Regioselectivity of the Diels-Alder Reactions of 2,5,8(1*H*)-Quinolinetriones. *Tetrahedron* 1994;50:7923-32. Ocaña B, Espada M, Avendaño C. *N*-Oxides of Azaanthraquinones. *Tetrahedron* 1994;50:9505-10. h) Marcos A, Pedregal C, Avendaño C. Synthesis of 2- and 4-oxo-1*H*-1-azaanthracene-9,10-dione from 2-Amino-1,4-naphthoquinone. *Tetrahedron* 1994; 50, 12941-52. i) Ocaña B, Espada M, Avendaño C. Reactions of Aza- and Diazaanthraquinone *N*-oxides. *Tetrahedron* 1995; 51: 1253-58. j) Villacampa M, de la Cuesta E, Avendaño C. Regioselective Synthesis of 1,8-Diazaanthracene-9,10-dione by Tandem Directed *ortho*-Metallation/Metal-Halogen Exchange. *Tetrahedron* 1995;51:1259-64. k) Marcos A, Pedregal C, Avendaño C. Synthesis of 1,5- and 1,8-Diazaanthraquinones by Reaction of Aminoquinolinequinones with β -dielectrophiles. *Tetrahedron* 1995;51:1763-74. l) Pérez JM, Avendaño C, Menéndez JC. 1-Acylamino-1-azadienes as an alternative to 1-dimethylamino-1- azadienes in the preparation of 1,8-diazaanthracene-2,9,10-triones. *Tetrahedron* 1995;51:6573-86. m) Martín O, de la Cuesta E, Avendaño C. Electrophilic Substitution in 3-and 4-Methyl-2(1*H*)quinolinone through Metallated Species. *Tetrahedron* 1995;51:7547-54. n) Ferrer P, Avendaño C, Söllhuber MM. Synthesis of 5,8-Dimethoxy-2(1*H*)quinolinones by Intramolecular Wittig Reaction. *Liebigs Ann* 1995;1895-9. ñ) Fernández M, de la Cuesta E, Avendaño C. Metallation of 2(1*H*)-Quinolinone: Synthesis of 3-Substituted Compounds. *Synthesis* 1995;11:1362-4. o) Ramos MT, Díaz-Guerra LM, García-Copín S, García-Grávalos D, García de Quesada T, Avendaño C. Synthesis and Antitumor Activity of Fluorinated 1-Aza and 1,8-Diazaanthraquinones. *Il Farmaco* 1996;51:375-9. p) Blanco MM, Alonso MA, Avendaño C, Menéndez JC. New Findings in Hetero Diels-Alder Reactions of Quinolinetriones. *Tetrahedron* 1996;52:5933-44. q) Moreno T, Fernández M, de la Cuesta E, Avendaño C. Metallation of Methoxy-2(1*H*)-Quinolinones. *Heterocycles* 1996;43:817-28. r) López-Alvarado P, Avendaño C, Menéndez JC. 1,2-Dihydroquinolin-2-one (carbostyryl) anions as bidentate nucleophiles in their reactions with aryllead triacetates: synthesis of 1-aryl and 3-aryl-tetrahydroquinoline-2,5,8-triones. *J Chem Soc (Perkin 1)* 1996;229-33. s) Pérez JM, Avendaño C, Menéndez JC. A Very Efficient Synthesis of 1,8-Diazaanthraquinones. *Tetrahedron Lett* 1997;38:4717-20. t) Pérez JM, López-Alvarado P, Avendaño C, Menéndez JC. Total Synthesis of Diazaquinomycin A. *Tetrahedron Lett* 1998;39:673-6. u) Avendaño C, Menéndez JC. Recent progress in the Synthesis of Antitumour Azaanthraquinones. *Recent Res Develop in Org Chem* 1998;2:69-86. v) López-Alvarado P, Avendaño C, Menéndez JC. A General Synthesis of Quinoline-2,5,8(1*H*)-triones via Acylation of 2,5-Dimethoxyaniline with *S*-tert-Butyl Thioacetates by Application of the Knorr Cyclization. *Synthesis* 1998;186-94. x) Avendaño C, Pérez JM, Blanco MM, de la Fuente JA, Manzanaro S, Vicent MJ, Martín MJ, Salvador-Tormo N, Menéndez JC. Synthesis and structure-activity relationships of 1,5-diazaanthraquinones as antitumour compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:3929-32.
11. a) Avendaño C, Alonso MA, Espada M, García-Grávalos D, Menéndez JC, Ocaña B, Pérez JM. "New Synthetic Antitumoral Compounds", patentes No. 921222000.5 (Gran Bretaña. 5/06/92), No. 0 574 195 (EEUU, 15/12/93), y otras solicitudes en Canadá, Japón, Australia y Suráfrica. b) Avendaño C, García-Grávalos D. "Nuevos Derivados Antraquinónicos con Actividad Antitumoral y sus Aplicaciones". Patente Internacional No. WO 95/2314 (31/08/1995). c) Avendaño C, Pérez JM, Blanco M.M, Menéndez JC, García-Grávalos D, de la Fuente J.A, Martín J.A. "Antitumour 1,5-diazaanthraquinones", International Publication Number: WO 99/59996 (25/11/99).



Role of insulin receptor A isoform and IGF-1R in the development of atherosclerotic plaque

Title in Spanish: Papel de la isoforma A del receptor de la insulina y del IGF-1R en el crecimiento de la placa aterosclerótica

Almudena Gómez-Hernández^{1,2,3,*}, Nuria Beneit Redondo^{1,2,3}, Liliana Perdomo Loaiza^{1,2,3}, Óscar Escribano Illanes^{1,2,3}, Sabela Díaz-Castroverde^{1,2,3}, Manuel Benito de las Heras^{1,2,3}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España. ²Instituto de Salud del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, España. ³CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, España.

ABSTRACT: In this work, we have obtained new lines of vascular smooth muscle cells (VSMCs) to demonstrate that IRA and IRA/IGF-1R might confer a proliferative and migratory advantage in response to insulin, IGF-2 or TNF- α . These results might be relevant due to in the early stages of atherosclerotic process; we have demonstrated that there is a significant increase of IRA and IGF-1R expression as well as higher formation of hybrid receptors in the aorta from two models of early atherosclerosis. Finally, anti-TNF- α treatment prevented vascular alterations.

RESUMEN: En este trabajo se han obtenido nuevas líneas de células de músculo liso vascular (VSMCs) que nos han permitido demostrar que la IRA e IRA/IGF-1R podrían conferirles una ventaja proliferativa y migratoria en respuesta a insulina, IGF-2 o TNF- α . Estos resultados podrían ser relevantes ya que en las fases iniciales del proceso aterogénico nosotros hemos demostrado que hay un aumento significativo de la expresión de la IRA e IGF-1R así como una mayor presencia de receptores híbridos en la aorta de dos modelos experimentales de aterosclerosis temprana. Y finalmente, como el tratamiento con un anticuerpo anti-TNF- α previno las alteraciones vasculares.

*Corresponding Author: algomezh@ucm.es

Received: October 7, 2015 Accepted: June 20, 2016

Premio Juan Abelló del Concurso Científico 2014 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 129-142

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La insulina ejerce un gran número de acciones dependiendo de la fase del desarrollo, el grado de diferenciación o el tipo de célula estudiada. La selectividad en la señalización de la insulina es el resultado de la activación de forma específica de distintas vías de señalización (1) que comienzan con la activación del receptor de insulina (IR), su autofosforilación en la cadena β y la fosforilación de los sustratos del IR (IRSs) y posterior activación de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/Akt, siendo crucial en las acciones de supervivencia y metabólicas de la insulina (2). Así, la insulina ejerce sus acciones a través de su receptor. Por splicing alternativo de 36 nucleótidos del exón 11 de las subunidades α del IR, se generan dos isoformas: IRA (que pierde dicho exón) y la IRB (que tiene incluido el exón 11) (3). La relativa abundancia de una u otra isoforma del IR es específica de tejido y de especies (4,5). Además, la expresión de las isoformas del IR está también regulada por el estado de desarrollo y la diferenciación celular. IRA es predominante en células fetales y tumorales, mientras que la IRB es principalmente expresada en células diferenciadas y dianas de la insulina (6, 7). Las dos

isoformas del IR tienen algunas propiedades diferenciales. Así, aunque ambas isoformas del IR muestran alta afinidad por la insulina, IRA exhibe mucho mayor ratio de internalización que IRB (8), afinidad intermedia por el factor de crecimiento 2 similar a la insulina (IGF-2) y baja afinidad por IGF-1 (6). Sin embargo, en determinadas situaciones patológicas, el perfil de expresión de ambas isoformas puede modificarse. En este sentido, se ha descrito que en células β pancreáticas de ratón, la IRA confiere una ventaja proliferativa en respuesta a insulina e IGF-1, aportando una posible explicación para la hiperplasia pancreática inducida por la resistencia primaria hepática a la insulina en el modelo iLIRKO (9). En una línea de células hematopoyéticas (32D) la IRA induce señales mitogénicas y antiapoptóticas en respuesta a IGF-2, mientras que la IRB es más efectiva induciendo la diferenciación (10). Además, la IRA además de estar aumentada su expresión en las células β durante la hiperplasia pancreática, se ha visto un aumento de la expresión de IRA (11, 12) y sus niveles correlacionados con el grado de desdiferenciación en células cancerosas de tiroides (13).

Los IGFs, IGF-1 e IGF-2, polipéptidos con homología

estructural a la proinsulina e insulina, son constituyentes habituales del plasma sanguíneo, donde circulan unidos a IGFBPs. Regulan procesos de proliferación y diferenciación en múltiples tipos celulares y son capaces de ejercer los efectos metabólicos característicos de la insulina, pero, a diferencia de ésta, son sintetizados por la mayoría de tejidos del organismo (14). Los efectos biológicos de los IGFs están mediados por receptores de membrana específicos. El receptor de IGF-1 (IGF-1R), homólogo al IR, es responsable de la señalización intracelular de IGF-1 e IGF-2 (15). IGF-2 se une también al IGF-2R, idéntico al receptor de manosa-6-fosfato que no presenta actividad señalizadora para el crecimiento celular, mientras que induce un efecto mitogénico a través de una interacción de alta afinidad con IRA (16). En células que co-expresan IR e IGF-1R, como es el caso de las VSMCs, es posible la formación de receptores híbridos IR/IGF-1R (17).

Por otro lado, el papel potencial de ambas isoformas del IR en la aterosclerosis temprana es completamente desconocido. Para poder estudiar el papel de las dos isoformas del IR (IRA e IRB) en la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular implicadas en las fases iniciales del proceso aterogénico, se han generado nuevas líneas celulares. Las primeras presentan el IR (WT VSMCs e IRLoxP^{+/+} VSMCs), otra línea celular que carece del IR (IR^{-/-} VSMCs), y otras dos líneas celulares expresan la IRA (IRA VSMCs) o la IRB específicamente (IRB VSMCs). En estas líneas celulares, se han estudiado los ratios de proliferación y migración inducidos por la insulina, IGFs o citoquinas proinflamatorias (TNF- α) así como la asociación entre las isoformas del IR y receptores aterogénicos o con el receptor de IGF-1 (IGF-1R). Además, se ha estudiado la expresión de ambas isoformas del IR, IGF-1R y TNFR-1 (receptor de alta afinidad de TNF- α) en dos modelos de daño vascular, como un modelo clásico de aterosclerosis (ApoE^{-/-} sometido a dieta rica en grasa durante 18 semanas) y un segundo modelo de resistencia a la insulina vascular y disfunción vascular (BATIRKO de un año de edad) (18). Nuestros resultados parecen sugerir que la IRA, y no la IRB, confiere una ventaja proliferativa y migratoria a las VSMCs en respuesta a diversos estímulos proaterogénicos. Además, la IRA podría asociarse con IGF-1R favoreciendo las acciones aterogénicas de IGF-2 bajo condiciones inflamatorias.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Modelos experimentales

Los ratones macho fueron mantenidos en el animalario según los estándares de temperatura y los ciclos de luz recomendados. A los ratones ApoE^{-/-} y sus controles wild-type se les administró una dieta rica en grasas (Western A04 + 21% kcal aportadas por los lípidos) durante 18 semanas desde la semana sexta. Los ratones se genotiparon por PCR a partir de 10-200ng del DNA extraído de la cola. Se sometió a una amplificación de 35 ciclos (30 segundos, 94°C; 40 segundos, 68°C; y 1 minuto, 72°C) en el

termociclador. Los tres primers utilizados fueron los siguientes: el oligonucleótido sentido, oIMR0180 (5'-GCCTAGCCGAGGGAGAGCCG-3') y los dos oligonucleótidos antisentidos, oIMR0181 (5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3') y oIMR0182 (5'-GCCGCCCGACTGCATCT-3'). Una banda de 155 pb se obtenía para el ratón WT y otra banda de 245 pb para el ratón ApoE^{-/-}. El ratón BATIRKO y sus controles de 52 semanas recibían dieta estándar (A04, 3% de las calorías está aportada por la grasa). Además un grupo de animales BATIRKO se trataron con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α (MP6-XT22, Biolegend) (50 µg/intraperitonealmente por animal) cada 3 días, durante 6 semanas. El genotipaje de los controles y de los animales BATIRKO se realizó como se ha descrito previamente (18).

Los ratones anestesiados con Avertin (250 mg/kg, ip) se perfundieron con suero salino desde el ventrículo izquierdo. Los arcos aórticos se incluyeron en OCT para inmunohistoquímica y la aorta torácica se congeló para valorar la expresión del mRNA de genes implicados en el proceso aterosclerótico por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El estudio se ha realizado según los acuerdos con la normativa de la Unión Europea y ha sido previamente aprobado por el comité ético de nuestra institución.

2.2. Cultivos celulares

En primer lugar, se aislaron las arterias aórticas torácicas de 2 ratones macho IR^{LoxP/LoxP} de 8 semanas de edad. Los ratones anestesiados (Avertin, 250 mg/kg, ip) fueron perfundidos con solución salina y las arterias aortas torácicas se sometieron a digestión con colagenasa, seguidos de lavados y centrifugaciones para la obtención del cultivo primario de VSMCs. A partir de este cultivo primario se obtuvieron nuevas VSMCs de aorta de ratón con IR (IRLoxP^{+/+} VSMCs), sin IR (IR^{-/-} VSMCs), y líneas celulares que expresan específicamente la isoforma A (IRA VSMCs) o la isoforma B (IRB VSMCs). Para ello, el cultivo primario de IRLoxP^{+/+} VSMCs fue transfectado por infección retroviral (partículas virales que contienen el vector retroviral pBabe codificando el antígeno largo T de SV40) y seleccionado con puromicina 1 µg/mL durante 3 semanas. Las IRLoxP^{+/+} VSMCs inmortalizadas fueron infectadas con adenovirus que codifican la recombinasa Cre para obtener IR^{-/-} VSMCs. Finalmente, las IR^{-/-} VSMCs fueron transfectadas por infección retroviral (partículas virales que contienen el vector retroviral pBabe codificando las isoformas individuales del IR humano, IRA o IRB) y seleccionadas con higromicina 200 µg/mL durante 2 semanas para obtener IRA VSMCs o IRB VSMCs, respectivamente.

Las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) a una temperatura de 37°C y una atmósfera al 5% de CO₂. Las células fueron privadas de suero durante 4-5 horas para los experimentos de señalización o 18 horas para los ensayos de migración o de expresión de mRNA y

Role of insulin receptor A isoform and IGF-1R in the development of atherosclerotic plaque

después incubadas con los correspondientes estímulos. En los experimentos de señalización de insulina, captación de glucosa y del mRNA, las células estaban en subconfluencia (70-80%).

2.3. Western Blot

Los estudios de Western blot se realizaron con los extractos totales de las VSMCs o de las arterias aortas como previamente se ha descrito (9). Los anticuerpos utilizados fueron anti-IR β (Ab-4) de Oncogene, phospho-AKT (Ser473), AKT, p-p70K (Ser389), p70, pERK-1/-2 (S202/T204) y ERK de Cell Signalling, Glut-4, TNF-R1 y TNF-R2, de Santa Cruz Biotechnology, p53 de Millipore, α - y β -actina y α -tubulina anticuerpos de Sigma-Aldrich Corp. El anticuerpo frente a la isoforma B del IR (+exón 11) fue cedido generosamente por el Dr. Sesti y la Dr. Hribal.

2.4. Inmunoprecipitación

Para obtener el total de las células lisadas, se rasparon con PBS frío y se centrifugaron a 4000 x g, durante 10 min a 4°C, y a continuación el pellet se resuspendió en el buffer de lisis. Posteriormente, se centrifugaron a 12,000 x g for 10 min y se recogieron los sobrenadante. Para la inmunoprecipitación, 150-200 μ g de proteína se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C toda la noche. Los inmunocomplejos se incubaron con la proteína A o G agarosa durante 4h, y finalmente, se sometieron a una electroforesis en geles PAGE-SDS.

Para la inmunoprecipitación con extractos de proteínas de arterias aortas, en el modelo ApoE $^{-/-}$ fue necesario reunir muestras aórticas de 5 ratones ApoE $^{-/-}$ y juntamos también otras 5 muestras de sus respectivos controles. Sin embargo, se pudieron utilizar muestras individuales de tres ratones por grupo en BATIRKO y controles de 52 semanas. 150 μ g de proteínas se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-IRB. Los sobrenadantes se reinmunoprecipitaron nuevamente con el anticuerpo anti-IRB. Los sobrenadantes de esta segunda inmunoprecipitación se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-IR β (que reconoce a las dos isoformas del IR). Así, los inmunocomplejos (sólo habría de IRA) se recogieron con la proteína A-agarosa y se sometieron a una electroforesis en geles PAGE-SDS. Finalmente, las membranas se incubaron con IGF-1R o con TNFR-1 para estudiar la posible asociación entre la IRA e IGF-1R o TNF-R1, respectivamente.

2.5. Aislamiento de membranas plasmáticas

Las VSMCs se resuspendieron en el buffer de homogeneizado (20 mM Tris:HCl pH 7.4, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1mM PMSF, 10mM β -Mercaptoetanol, 10 μ g/mL Aprotinina, 10 μ g/mL Leupeptina) y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Las suspensiones se homogeneizaron con un homogeneizador Dounce. A continuación, se centrifugaron a 1300 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se salvó como fracción nuclear. Así, el pellet se homogeneizó en el buffer + 1% triton-X-100 y se incubó durante 1 h a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron

a 14000 rpm durante 1 h y el sobrenadante se recogió como fracción citosólica. Se detectaron los niveles de Glut-4 por Western blot utilizando un anticuerpo anti-Glut-4 (Millipore) en las fracciones citosólicas y de membranas plasmática. Y se utilizaron como controles de carga del Western blot, la incubación Anti-Na $^{+}$ /K $^{+}$ ATPase (Santa Cruz Biotechnology) y anti-GSK3 β (Cell Signalling) en las fracciones de membrana y citosólica, respectivamente.

2.6. Captación de glucosa

Las células con una confluencia del 80% fueron mantenidas en ausencia de suero durante 4-6h. Despues, se estimularon con 10 o 100 nmol/L de insulina durante 30 minutos. La captación de glucosa se medía por incubación de las células con 2-desoxy-d-[1-3H]-glucosa durante los últimos 10 minutos por triplicado en seis experimentos independientes como previamente se ha descrito (9).

2.7. PCR y qRT-PCR

El RNA fue extraído de las arteria aortas y de las VSMCs por el método del TRizol (Invitrogen, Barcelona, España) y cuantificado su concentración por la medida de absorbancia a 260 nm. 20 ng de RNA fueron necesarios para la reacción de la transcriptasa inversa, durante 15 min a 25°C y 2 h a 37°C, con el kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se evaluaron la expresión de distintos genes implicados en el proceso aterosclerótico en la arteria aorta así como la expresión de IRA, IRB, IGF-1R y TNFR-1 en la aorta y las VSMCs. Como control interno se utilizó la GADPH. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador 7500 Real-Time PCR, y la cuantificación relativa con el software Prism 7000 system SDS software (Applied Biosystems). La expresión de los genes analizados por qRT-PCR se realizó según se ha descrito previamente (9). Así, RQ correspondería con $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [$\Delta Ct = Ct$ (gen diana) - Ct (gen endógeno); $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ para una muestra - ΔCt para el control].

En la caracterización de las líneas celulares generadas para confirmar la reconstitución de las líneas IRA e IRB VSMCs, se realizó un RT-PCR a partir de 5 μ g del RNA total utilizando unos oligonucleótidos que reconocen el exón 11 del IR murino para IRLoxP $^{+/+}$ e IR $^{-/-}$ (primer 1: 5'-ATCAGAGTGAGTATGACGACTCGG-3' y primer 2, 5'-TCCTGACTTGTGGCA CAATGGTA-3) o del exón 11 del IR humano para IRA e IRB VSMCs (primer 1, 5'-ACCAGAGTGAGTATGAGGATTGG-3' y primer 2, 5'-TCCGGACTCGTGGCA CGCTGGTC-3'. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2%.

2.8. Estudios de proliferación por incorporación de BrdU

10 4 células en 1mL de medio completo fueron sembradas en cada pocillo en las placas de 96 pocillos. Al día siguiente, las células se mantuvieron en ausencia de suero durante 5 horas y se estimularon con insulina, IGF-1, IGF-2, TNF- α u otros estímulos aterogénicos durante 24 horas. Despues, el ratio de proliferación celular se evaluó

utilizando un kit de ELISA BrdU. La incubación con la solución de BrdU marcado fue de 18 h.

2.9. Ensayo de herida

La migración de las VSMCs fue evaluada mediante un ensayo de reparación o cierre de herida. Para este ensayo, las células se dejaron crecer hasta confluencia en DMEM suplementado con 10% de FBS. Tras 18 horas sin suero, se realizó una “herida” en la parte central de la placa de cultivo usando una punta de pipeta estéril y se lavaron las células varias veces con PBS 1X para asegurar la eliminación de todas las células levantadas y/o muertas. Las células, a excepción de las células control, se estimularon con insulina (10 nM), IGF-1 (10 nM), IGF-2 (10 nM), o TNF- α (10 ng/ml) y se incubaron durante 24 horas. La migración celular fue monitorizada en tres puntos de referencia seleccionados por visualización microscópica directa utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300); mediante una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon Digital Sight DSU2), se tomaron fotografías con un objetivo 10X a tiempo 0 (momento en que realizó la herida) y a las 6, 12 y 24 horas de incubación. Se empleó el programa TScratch para llevar a cabo la cuantificación de las tasas de cierre de herida, expresando los resultados como porcentaje de cierre a las 6, 12 o 24 horas respecto al tiempo 0.

2.10. Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron como media \pm SEM. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA seguido de un test de Bonferroni (Graph Pad Prism 5.0, La Jolla, CA, USA). Se consideró estadísticamente significativo cuando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Implicación de la IRA, IGF-1R y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la aterosclerosis temprana

Uno de los principales objetivos de este trabajo es valorar si el perfil de expresión de las isoformas del IR podría modificarse en el proceso aterosclerótico al igual que ocurre en otras situaciones patológicas como en la hiperplasia pancreática o en procesos tumorales. Para ello, empleamos dos modelos animales que presentan distinto grado de daño vascular. El primero de ellos fue el ratón ApoE^{-/-} como modelo de hipercolesterolemia que desarrolla aterosclerosis de forma espontánea o sometido a dieta grasa. El ratón ApoE^{-/-} presentó un aumento significativo de los niveles de colesterol y de los triglicéridos sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa. El área de lesión en los arcos aórticos era del 48,9%, la acumulación lipídica en los arcos aórticos del

23,7% y una estenosis del 32,8% (datos no mostrados). Además, presentan un aumento significativo del infiltrado de macrófagos, del número de VSMCs y de la tinción frente a PCNA en los arcos aórticos. También se observó una aumento significativo de la expresión del mRNA de ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α y PAI-1 así como de IRA (Figure 1A), sin cambios en la IRB, en la arteria aorta de ratones ApoE^{-/-}.

El segundo de los modelos que se ha empleado ha sido el ratón BATIRKO de 52 semanas que muestra resistencia vascular a la insulina y disfunción vascular (18). Estos ratones tienen una severa lipoatrofia marrón, obesidad, hipoinsulinemia, moderada hiperglucemia en el ayuno, intolerancia a la glucosa sin resistencia global a la insulina debido a un defecto en la secreción de la insulina (18). Previamente se había demostrado que en la aorta del ratón BATIRKO de 52 semanas había un aumento significativo de la expresión de ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α o PAI-1 así como un aumento significativo de la expresión de la IRA (Figura 1B). Además, se observó también una correlación significativa y positiva entre la expresión de la IRA y ET-1, o ICAM-1, o MCP-1, o TNF- α o PAI-1 tanto en la arteria aorta de ratones ApoE^{-/-} como de ratones BATIRKO (datos no mostrados).

Además de observar un aumento significativo de la expresión de la isoforma A del IR en la aorta de los ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO de 52 semanas, se obtuvo un aumento significativo de la expresión de IGF-1R y una mayor formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R. Todo ello contribuyendo a la proliferación y migración de las VSMCs implicadas en las fases iniciales del crecimiento de la placa. Otros autores han descrito previamente que hay un aumento significativo del IGF-1R en las placas ateroscleróticas de un modelo experimental en conejos (19). Sin embargo, los niveles de IGF-1 e IGF-1R están disminuidos en placas ateroscleróticas avanzadas y podrían contribuir a la apoptosis de las VSMCs y favorecer la ruptura de la placa aterosclerótica (20, 21).

Un aumento significativo en la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R en la arteria aorta de ApoE^{-/-} y BATIRKO podría contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina vascular. La regulación de la expresión del IGF-1R podría impactar sobre la sensibilidad a la insulina. En este sentido, la disminución de la expresión de IGF-1R podría incrementar la fracción de receptores de insulina organizados en holoreceptores que podría conducir a aumentar la señalización de insulina y las propiedades anti-inflamatorias de la misma (22).

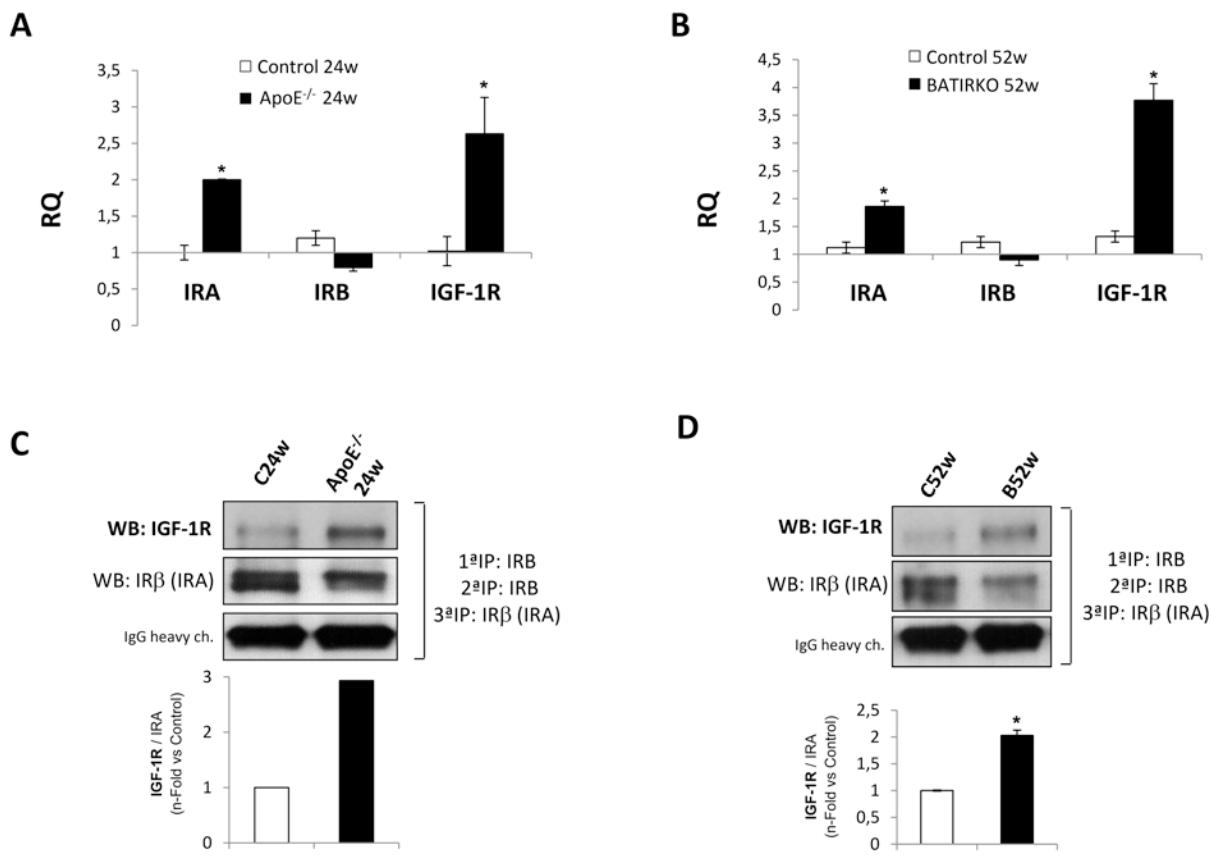
**Figura 1**

Figura 1. Expresión de las isoformas del IR e IGF-1R y sus asociaciones en dos modelos experimentales de daño vascular. Análisis por qRT-PCR de la expresión de IRA, IRB and IGF-1R en la aorta del ratón ApoE^{-/-} (**A**), BATIRKO (**B**) y sus respectivos controles. Geles representativos y sus cuantificaciones de la asociación de IRA con IGF-1R en la aorta del ratón ApoE^{-/-} (**C**), BATIRKO (**D**) y sus respectivos controles. Grupo control de 24 semanas (C24w; n=5); grupo ApoE^{-/-} de 24 semanas (ApoE^{-/-} 24w; n =5); grupo control de 52 semanas (C52w; n=6); grupo BATIRKO de 52 semanas (B52w; n=5). *p<0.05 vs. cada Control; †p<0.05 vs. grupo BATIRKO de 52 semanas.

3.2. Implicación de la IRA, IGF-1R y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la proliferación de las VSMCs

Para estudiar el papel de las isoformas del IR en la proliferación de las VSMCs, se generaron cuatro nuevas líneas celulares aórticas de VSMCs: contienen el IR (WT and IRLoxP^{+/+} VSMCs), que han perdido el IR (IR^{-/-} VSMCs), y que expresan sólo la IRA (IRA VSMCs) o la IRB (IRB VSMCs). En primer lugar, se realizó el cultivo primario de WT o IRLoxP^{+/+} VSMCs de arterias aortas torácicas. Para comprobar que la inmortalización había funcionado realizamos un Western blot frente al AgT y p53 (Figura 2A). También se utilizó una marcador específico de VSMCs como la α-actina de músculo liso (α-SMA) para caracterizar las cuatro líneas (Figure 2B). A continuación, por Western blot frente al IRβ, comprobamos que la línea celular, IR^{-/-} VSMCs carece de IR y niveles muy similares del IR en IRA VSMCs, IRB VSMCs e IRLoxP^{+/+} VSMCs (Figure 2B). Además comprobamos por RT-PCR que las IRA VSMCs e IRB

VSMCs expresan específicamente la isoforma del IRA o la IRB, respectivamente (Figure 2B).

A continuación comprobamos que las líneas celulares reconstituidas presentan un IR funcional y analizamos la fosforilación en Tyr del IR y de su sustrato más importante en estas células (IRS-1). La insulina indujo la fosforilación en Tyr en todas las líneas celulares exceptuando IR^{-/-} VSMCs. Además, analizamos la fosforilación de AKT, p70 y ERK inducida por insulina, IGF-1 e IGF-2. Como cabía esperar, las IR^{-/-} VSMCs respondían a IGF-1 e IGF-2, pero no a insulina, mientras que en las IRLoxP^{+/+} VSMCs se produjo un aumento significativo de p-AKT, p-p70 y p-ERK inducido por los tres estímulos. Se observó una mayor afinidad y máxima fosforilación de AKT, p70 y ERKs en respuesta a insulina o IGFs en IRA VSMCs versus IRB VSMCs (Figura 2C y D). En este sentido, se ha descrito que la insulina induce una señalización más sostenida en el tiempo en células pancreáticas que sólo expresan la isoforma A con respecto a las que solo

expresan la IRB (19). Por otro lado, se ha descrito que la insulina induce la vía de señalización PI3K/Akt y la translocación de Glut-4 del citosol a la membrana plasmática (23). Por ello, nos planteamos en este trabajo analizar el papel diferencial de las dos isoformas del IR en la captación de glucosa y se observó que la insulina inducía captación de glucosa dosis dependiente en las

IRLoxP^{+/+} VSMCs e IRA VSMCs (Figura 2E). Y comprobamos que aunque los niveles totales de Glut-4 eran muy similares en todas las líneas celulares estudiadas, la insulina inducía translocación de Glut-4 desde el citosol a la membrana plasmática en IRA VSMCs, pero no en IRB VSMCs (Figura 2F).

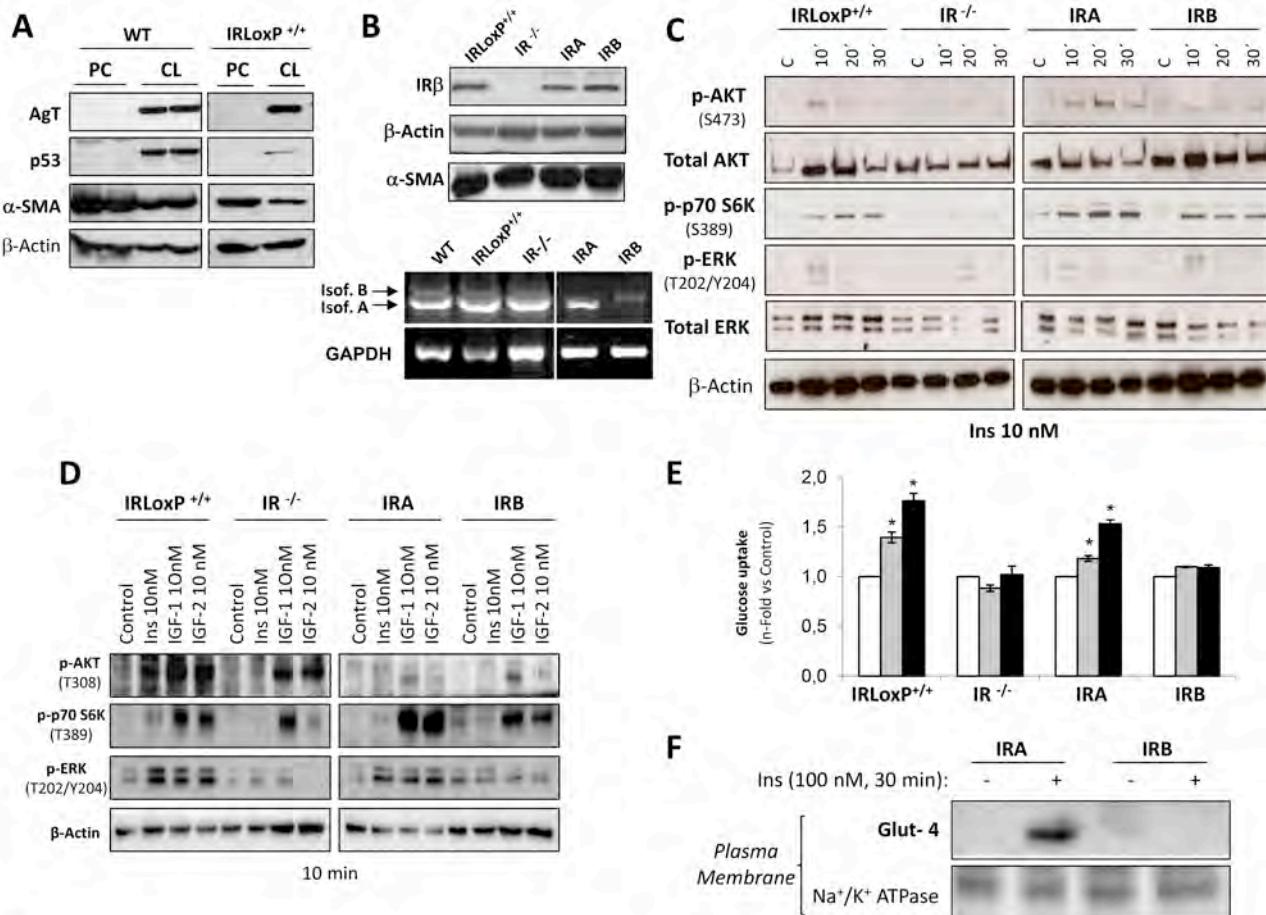


Figura 2

Figura 2. Caracterización, señalización de insulina y captación de glucosa de las VSMCs. (A) Análisis por Western blot de AgT, p53, α -SMA y β -actina en el cultivo primario y las líneas celulares: WT and IRLoxP^{+/+}. (B) (Panel superior) Análisis por Western blot de IR β en IRLoxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA e IRB VSMCs. (Panel inferior) RT-PCR de las isoformas del IR isoforms en todas las líneas celulares estudiadas. (C) Análisis por Western blot de la fosforilación de AKT, p70S6K y ERK en VSMCs en respuesta a insulina 10nM. (D) Análisis comparativo por Western blot de la fosforilación de AKT, p70S6K y ERK en VSMCs en respuesta a insulina, IGF-1 o IGF-2 10nM. (E) Captación de glucosa dependiente de insulina en VSMCs. (F) Análisis por Western blot de Glut-4 en la membrana plasmática y en el citosol de VSMCs estimuladas con 100 nM de insulina durante 30 min. Los experimentos fueron realizados al menos 5 veces. Cultivo primario (PC); línea celular (CL); VSMC con IR (WT and IRLoxP^{+/+}); VSMC sin IR (IR^{-/-}); VSMC sólo con IRA (IRA); VSMC sólo con IRB (IRB); Inmunoprecipitación (IP) y Western blot (WB). *p<0.05 vs. Control.

A continuación, como en los modelos *in vivo* habíamos visto que el patrón de expresión de las isoformas del IR o IGF-1R en la arteria aorta de animales control con respecto a los grupos que poseen alteraciones vasculares puede modificarse, pensamos que ciertos estímulos implicados en dichas alteraciones podrían también *in vitro* modificar la expresión de estos receptores. En este sentido, observamos tanto por qRT-PCR como por Western blot, que la insulina, IGF-2, TNF- α y otros estímulos aterogénicos, como Ang II, ET-1 o el análogo del TXA2 (U46619)

inducen un aumento significativo de la expresión a nivel del mRNA y de los niveles de proteína de la IRA sin modificar la expresión de la IRB en las VSMCs (Figura 3A, B, D y E). Además, tanto el IGF-2 como el TNF- α serían capaces también de aumentar significativamente la expresión y los niveles de proteína del IGF-1R en las VSMCs (Figura 3C y F).

A continuación, evaluamos uno de los principales objetivos del presente trabajo que es el papel de estos receptores en la proliferación de las VSMCs. Para ello,

Role of insulin receptor A isoform and IGF-1R in the development of atherosclerotic plaque

analizamos el ratio de proliferación por incorporación de BrdU a las 42h y observamos que la insulina indujo una discreta proliferación en WT, IRLoxP^{+/+} e IRB VSMCs. No hubo efecto en la proliferación inducida por insulina en las IR^{-/-} VSMCs. Sin embargo, la insulina indujo un aumento significativo en las IRA VSMCs dosis dependiente (Figure 4A). Además, observamos que 25 nmol/L IGF-1 indujo un aumento significativo de la proliferación en todas las líneas estudiadas (Figure 4B). Sin embargo, 25 nmol/L IGF-2 indujo un aumento significativo de la proliferación en IR^{-/-} e IRA VSMCs, sin modificar el ratio de proliferación en IRLoxP^{+/+} and IRB VSMCs (Figure 4C). Asimismo, cuando empleamos otros estímulos aterogénicos que habíamos visto que aumentaban la expresión de la IRA y que previamente se han descrito como inductores de la migración y proliferación en VSMCs (24), inducían el mayor incremento en la ratio de proliferación en las VSMCs que

sólo expresaban la IRA (Figure 4D). En este sentido, se ha descrito que la IRA podría tener una función principal en procesos proliferativos, como en el cáncer y en la hiperplasia pancreática (9, 11-13)

Además de ver in vitro que distintos estímulos podrían modificar el patrón de expresión de las isoformas del IR e IGF-1R y que en todo caso parece que ese aumento de la expresión de la IRA podría conferir una ventaja proliferativa a las VSMCs; queríamos analizar si in vitro se estaba favoreciendo la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R igual que previamente habíamos demostrado in vivo. Así, en ambas líneas celulares hay una asociación basal de IRA o IRB con IGF-1R. Sin embargo, IGF-2 y TNF-α inducía de forma significativa la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R en IRA VSMCs con respecto a IRB VSMCs (Figura 4E).

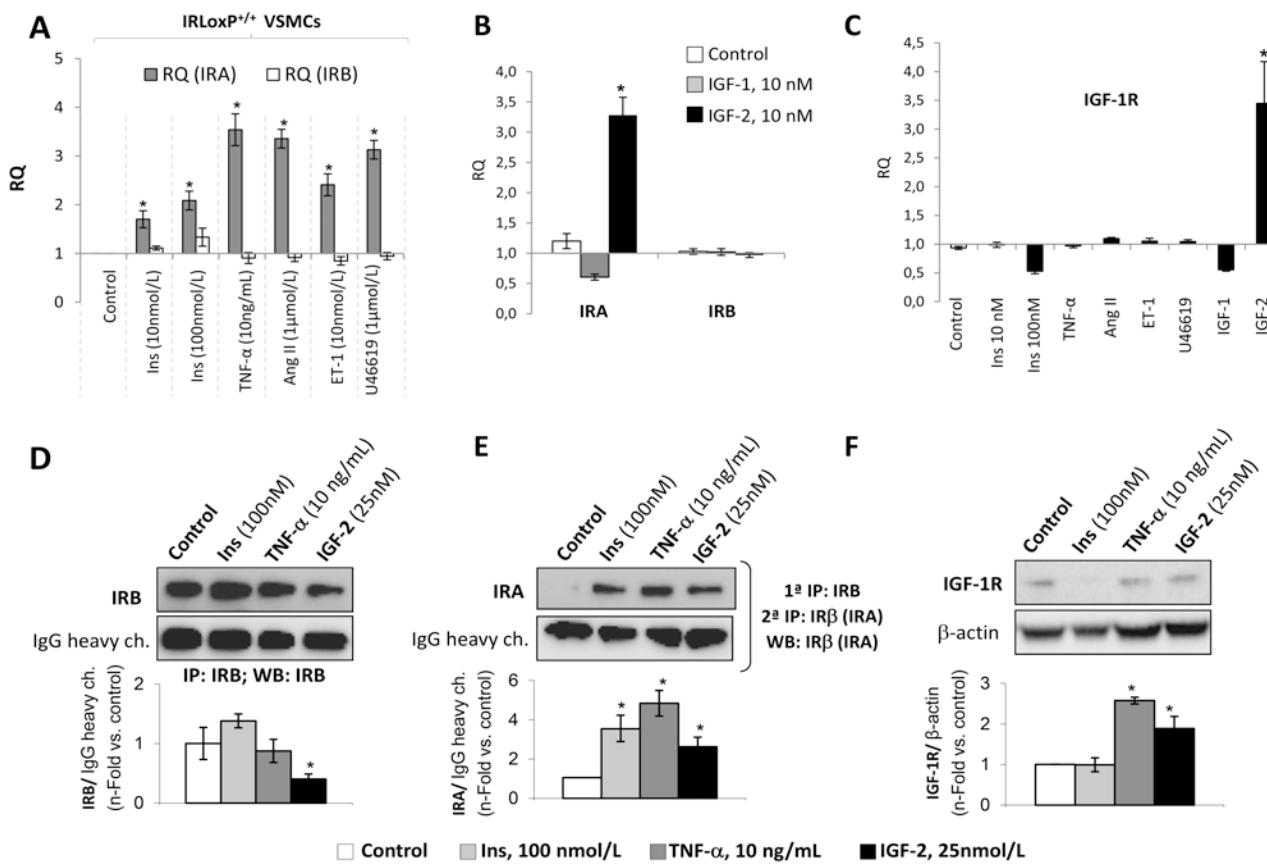


Figura 3

Figura 3. Efecto de la insulina, IGFs u otros estímulos aterogénicos en el perfil de expresión de ambas isoformas del IR e IGF-1R. Análisis de los niveles de mRNA por qRT-PCR (A, B y C) o de los niveles de proteína por Western Blot (D, E, F) de la IRA, IRB e IGF-1R en VSMCs estimuladas por insulina, IGF-1, IGF-2, TNF-α, Ang II, ET-1 o U46619. *p<0,05 vs. cada control.

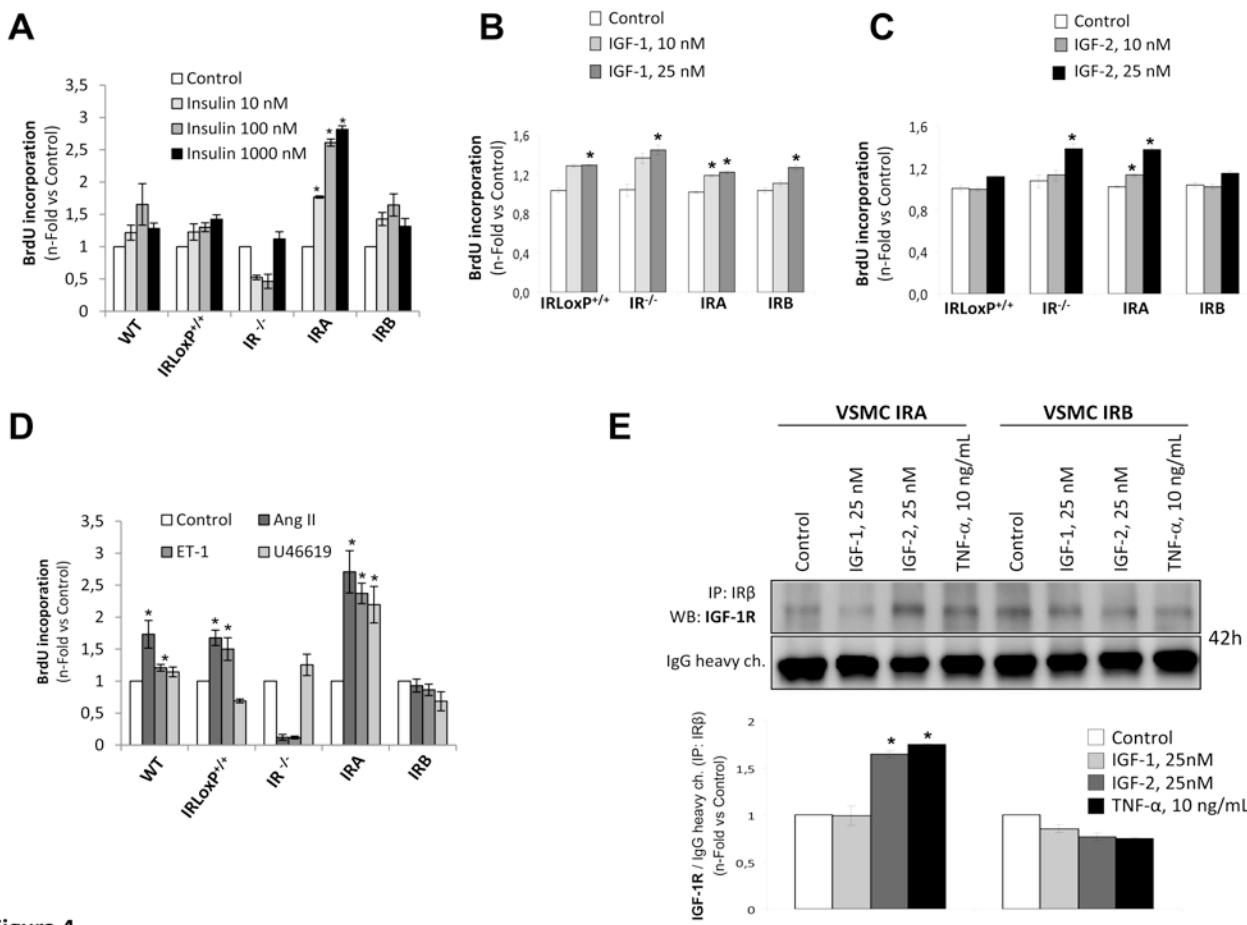


Figura 4

Figura 4. Estudios de proliferación en VSMCs. Se determinaron los ratios de proliferación por incorporación de BrdU en VSMCs en respuesta a insulina (10-1000 nM) (A), IGF-1 (10-25 nM) (B), IGF-2 (10-25 nM) (C) o a estímulos aterogénicos (Ang II, ET-1 y U46619) (D). Geles representativos y cuantificación de la asociación de IGF-1R con IR en respuesta a IGF-1 (25 nmol/L), IGF-2 (25 nmol/L) y TNF- α (10 ng/mL) durante 42h en IRA e IRB VSMCs. *p<0.05 vs. cada Control.

3.3. implicación de la IRA, IGF-1R y los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la migración de las VSMCs

La migración de las VSMCs contribuye al desarrollo del proceso aterosclerótico. En este contexto, nos planteamos la necesidad de estudiar el papel de las isoformas del IR en la migración de las VSMCs. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de reparación de herida en VSMCs control y VSMCs estimuladas con insulina, IGFs o TNF- α .

La insulina producía un aumento significativo de la migración de las IRLoxP^{+/+} VSMCs en comparación con las IR^{-/-} VSMCs a las 6 y 12 horas de realizar la herida. Además, inducía un mayor incremento en las tasas de cierre de herida en las células IRA VSMCs respecto a las IRB VSMCs a todas las horas estudiadas (Figura 5). Esto sugiere que la insulina estimula la migración de las VSMCs, principalmente a través de la isoforma IRA y en mucha menor medida a través del IGF-1R. El efecto de la insulina en la migración de las VSMCs ha sido estudiado por distintos autores, con resultados bastante controvertidos dependiendo de la concentración de

insulina. Así, una concentración de insulina (1 mM) no afectaba a la migración de cultivos primarios de VSMCs (25). Por el contrario, un estudio reciente demuestra que el tratamiento con insulina (100 nM) durante 6 días inducía la migración y proliferación de VSMCs humanas (26).

La estimulación con IGF-1 potenciaba en gran medida la migración de las VSMCs, apreciando incrementos significativos en las tasas de cierre de herida en las cuatro líneas celulares estudiadas (Figura 6). Por tanto, este efecto parece estar mediado principalmente por el IGF-1R, ya que se ve completamente anulado en VSMCs que carecen del IGF-1R (dato no mostrado). Así, IGF-1 es un reconocido inductor de la migración de las VSMCs (27, 28). De forma coherente, nuestros resultados sugieren que IGF-1 potencia en gran medida la migración de las IRLoxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA e IRB VSMCs. Aunque sus efectos están generalmente mediados por el IGF-1R, IGF-1 puede unirse también al IR con menor afinidad. Sin embargo, el incremento de la migración observado en las IR^{-/-} VSMCs parece evidenciar que este efecto del IGF-1 está mediado principalmente por el IGF-1R.

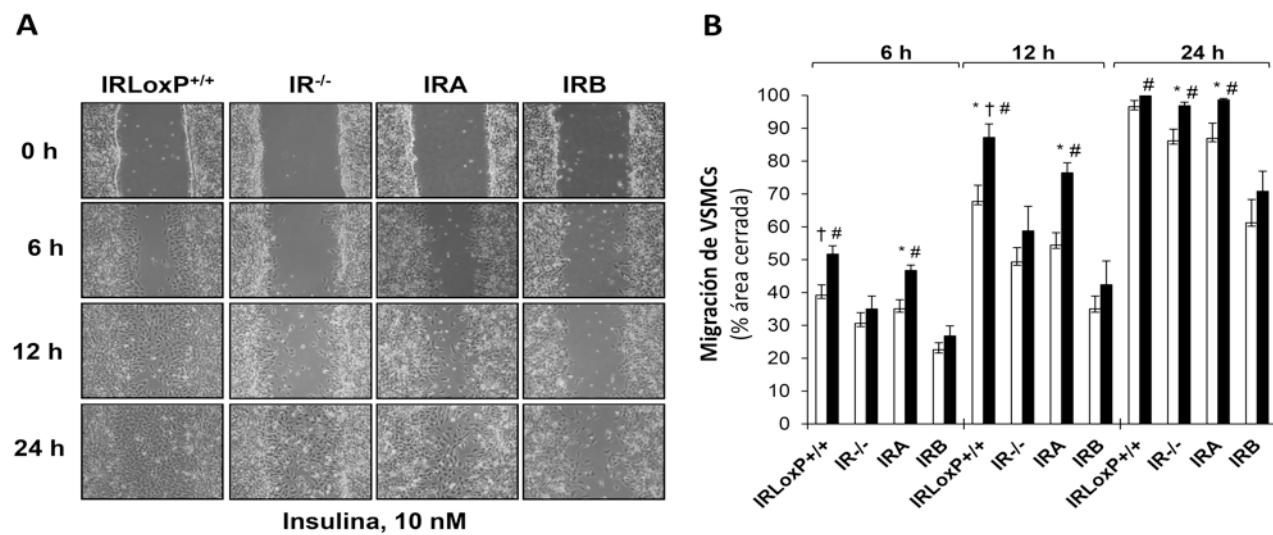


Figura 5

Figura 5. Efecto de la insulina en la migración de las VSMCs. (A) Microfotografías representativas de los ensayos de reparación de herida en IRLoxP^{+/+} VSMCs, IR^{-/-} VSMCs, IRA VSMCs e IRB VSMCs estimuladas con insulina (10 nM) a las 0, 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Efecto de la insulina (10 nM) en las tasas de cierre de herida a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida en todas las líneas celulares. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. *p<0,05 vs. cada control; †p<0,05 vs. IR^{-/-} VSMCs; #p<0,05 vs. IRB VSMCs.

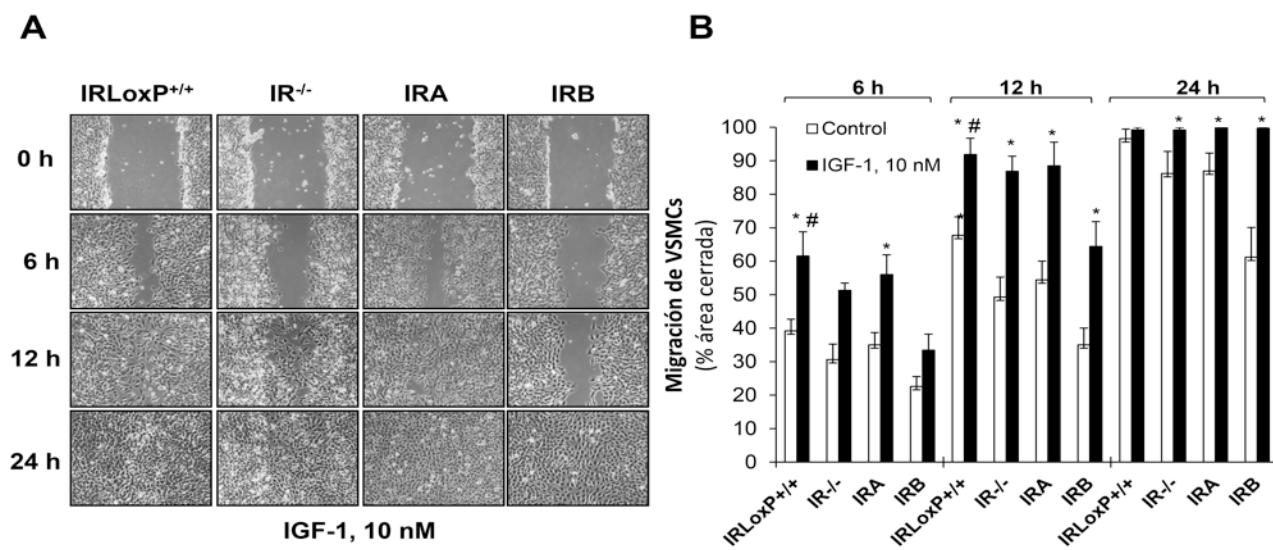


Figura 6

Figura 6. Efecto del IGF-1 en la migración de las VSMCs. (A) Microfotografías representativas de los ensayos de reparación de herida en IRLoxP^{+/+} VSMCs, IR^{-/-} VSMCs, IRA VSMCs e IRB VSMCs estimuladas con IGF-1 (10 nM) a las 0, 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Efecto del IGF-1 (10 nM) en las tasas de cierre de herida a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida en todas las líneas celulares. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. *p<0,05 vs. cada control; #p<0,05 vs. IRB VSMCs.

Por el contrario, IGF-2 induce la migración a través de la IRA o la formación de receptores híbridos IRA: IGF-1R (Figura 7). Así, el máximo efecto del IGF-2 en la migración fue el observado en IRA VSMCs a las 12h (16%). Siendo el efecto de IGF-2 en la migración de las VSMCs mucho más discreto, apreciando un incremento significativo de la misma principalmente en las células IRA VSMCs.

Se ha descrito que en fases iniciales de la aterosclerosis, donde cobra especial importancia la migración y proliferación de la VSMCs, hay un aumento significativo de la expresión de IRA y del IGF-1R (29). Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten entender que ese aumento de la expresión de IRA e IGF-1R favorece la proliferación y la migración inducida por insulina, IGF-1 e IGF-2. Asimismo, parece que la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R, presentes también en la aorta de modelos con aterosclerosis, podría

favorecer la migración de las VSMCs inducida por IGF-2.

El aumento tanto de la migración como de la proliferación de las VSMCs contribuye de forma considerable al desarrollo de una placa aterosclerótica organizada (24). Así, la formación temprana de la neoíntima puede contribuir al aumento del proceso inflamatorio y trombótico, conduciendo a la aterosclerosis (30, 31). De este modo, un mejor conocimiento y compresión de los mecanismos moleculares y los cambios celulares asociados al daño vascular, con el fin de determinar si la inhibición del crecimiento y la migración de las VSMCs podría servir como nueva estrategia terapéutica para prevenir el crecimiento de la placa aterosclerótica o las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes (32). Así, se ha descrito que los pacientes diabéticos presentan una aterosclerosis acelerada en parte debido a que sus células de músculo liso vascular tienen mayor tasa de proliferación, adhesión y migración (33).

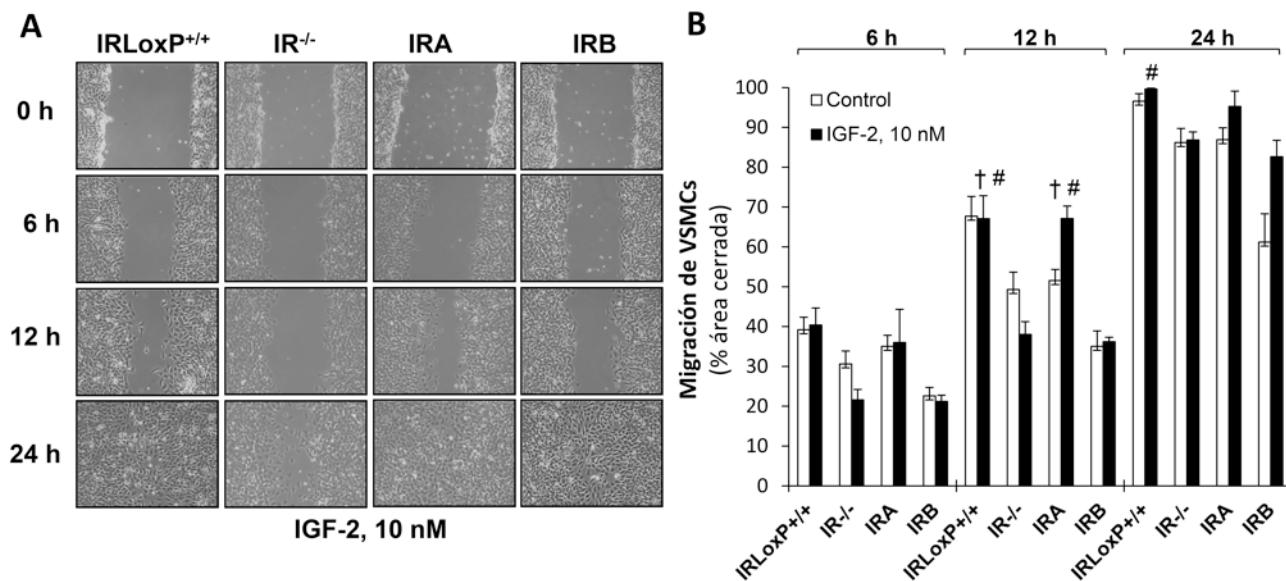


Figura 7

Figura 7. Efecto del IGF-2 en la migración de las VSMCs. (A) Microfotografías representativas de los ensayos de reparación de herida en IRLoxP^{+/+} VSMCs, IR^{-/-} VSMCs, IRA VSMCs e IRB VSMCs estimuladas con IGF-2 (10 nM) a las 0, 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Efecto del IGF-2 (10 nM) en las tasas de cierre de herida a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida en todas las líneas celulares. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. *p<0,05 vs. cada control; †p<0,05 vs. IR^{-/-} VSMCs; #p<0,05 vs. IRB VSMCs.

3.4. Papel del TNF- α en la aterosclerosis temprana

El TNF- α es uno de los estímulos inflamatorios y aterogénicos que se han utilizado en este trabajo y que hemos demostrado que modifica el perfil de expresión de las isoformas del IR, aumentando la expresión y los niveles de proteína de la IRA (Figura 3A). Dicha citoquina proinflamatoria inducía también un aumento significativo

de la expresión de IGF-1R y favorecía la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R. Por incorporación de BrdU, también observamos que el TNF- α inducía un aumento significativo del ratio de proliferación, principalmente en WT e IRA VSMCs (Figura 8A). Además se estudió el papel del TNF- α en la migración de las VSMCs. Se observó un incremento significativo en las

Role of insulin receptor A isoform and IGF-1R in the development of atherosclerotic plaque

tasas de cierre de herida en las IR^{-/-} VSMCs, IRA VSMCs e IRB VSMCs a las 24 horas (Figura 8B), sugiriendo un efecto más tardío del TNF- α en la migración de las VSMCs en relación con los otros estímulos empleados.

Con el fin de analizar porque el TNF- α inducía más proliferación y migración en las células IRA VSMCs vs IRB VSMCs, se valoró los niveles de proteínas de sus receptores, TNF-R1 y TNF-R2, así como su asociación con las isoformas del IR. En primer lugar, los niveles de

los receptores de TNF- α fueron muy similares en ambas líneas celulares (datos no mostrados). Se observó ya una asociación basal entre la IRA y los receptores de TNF- α mientras que dicha asociación basal no se producía con la isoforma B del IR (Figura 8C). Además, el TNF- α progresivamente aumentaba la asociación basal entre la IRA y TNF-R1 de forma tiempo dependiente. Sin embargo, la unión del TNF- α disminuía la asociación basal entre la IRA y el TNF-R2.

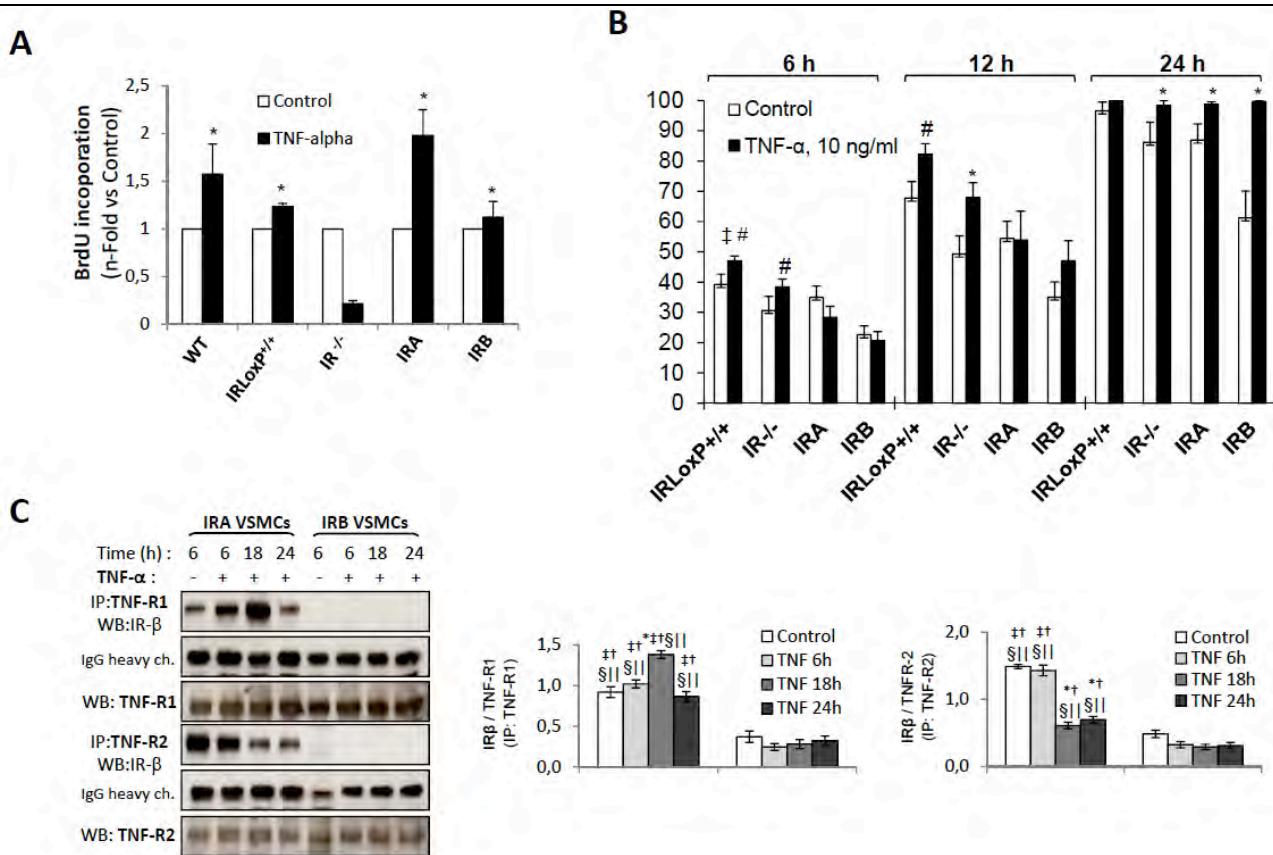


Figura 8

Figura 8. Efecto del TNF- α en las VSMCs. Se valoró el efecto del TNF- α en la proliferación por incorporación de BrdU (A) y en la migración (B) de VSMCs. (C) Geles representativos y cuantificación de las asociaciones de los dos isoformas del IR, IRA o IRB, con los receptores de TNF- α , TNF-R1 o TNF-R2. En los experimentos de proliferación: *p<0,05 vs cada control. En los experimentos de migración: *p<0,05 vs. cada control; †p<0,05 vs. IR^{-/-} VSMCs; ‡ p<0,05 vs. IRA VSMCs; #p<0,05 vs. IRB VSMCs. Y en los experimentos de asociación de IR con TNFRs: *p<0,05 vs. Control (IRA VSMCs); ‡p<0,05 vs. Control (IRB VSMCs); †p<0,05 vs. TNF 6h (IRB VSMCs); \$p<0,05 vs. TNF 18h (IRB VSMCs); ||p<0,05 vs. TNF 24h (IRB VSMCs).

Por ello, quisimos determinar si en la aorta de los modelos animales con daño vascular podría haber un aumento de la expresión del receptor de alta afinidad TNF-R1 y una posible asociación con la isoforma A. Así, se observó un aumento significativo de TNF-R1 y de su asociación con la IRA en la aorta del ratón ApoE^{-/-} y BATIRKO 52 semanas comparado con sus respectivos controles (Figure 9A y B). En este sentido, estudios previos han descrito que la señalización a través de TNF-R1 en la pared arterial contribuye en las fases tempranas o

de rápido crecimiento, mucho más que en fases más tardías, ya que induce un aumento significativo de la expresión de quimioquinas y moléculas de adhesión así como un aumento en la migración y proliferación de las células de músculo liso vascular (34).

Además, nos planteamos en uno de los modelos empleados, BATIRKO 52 semanas, hacer un tercer grupo que estuvieran tratados con un anticuerpo monoclonal anti-TNF- α en las últimas seis semanas, ya que en el animal BATIRKO de 52 semanas el aumento concertado en la

secreción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α por parte de ambos tejidos adiposos, podría ser el responsable de las alteraciones vasculares observadas. Con el tratamiento con anti-TNF- α , se observó una mejora en la obesidad, en las alteraciones metabólicas y vasculares, una disminución de la expresión de la IRA, TNF-R1 e IGF-1R además de un descenso significativo en la asociación entre la IRA y el TNF-R1 y una menor presencia de receptores híbridos IRA/IGF-1R (Figura 9). Esta disminución de la formación de receptores híbridos inducida por el tratamiento con anti-TNF- α podría mejorar la resistencia a la insulina vascular como previamente habíamos descrito (18).

Finalmente, una mayor presencia de la IRA podría contribuir al proceso aterosclerótico mediando las acciones proaterogénicas de IGF-2. Está bien establecido que la

IRA une IGF-2 con una afinidad muy superior que la IRB (6). Además, los receptores híbridos IRA/IGF-1R están fuertemente activados por IGF-1 e IGF-2 mientras que los otros receptores híbridos IRB/IGF-1R estarían fuertemente activados por IGF-1 y débilmente activados por IGF-2 (11). En nuestro trabajo, hemos descrito in vitro que el IGF-2 o el TNF- α son capaces de aumentar la expresión de IRA e IGF-1R y favorecer la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R en VSMCs y como estos resultados se confirman in vivo en dos modelos experimentales. Hay que destacar que IGF-2 se ha descrito que tiene un papel clave en el crecimiento de la placa aterosclerótica (35) y la mayor presencia de la IRA como ocurre en los modelos descritos favorecería la formación de receptores híbridos con IGF-1R permitiendo la señalización de IGF-2.

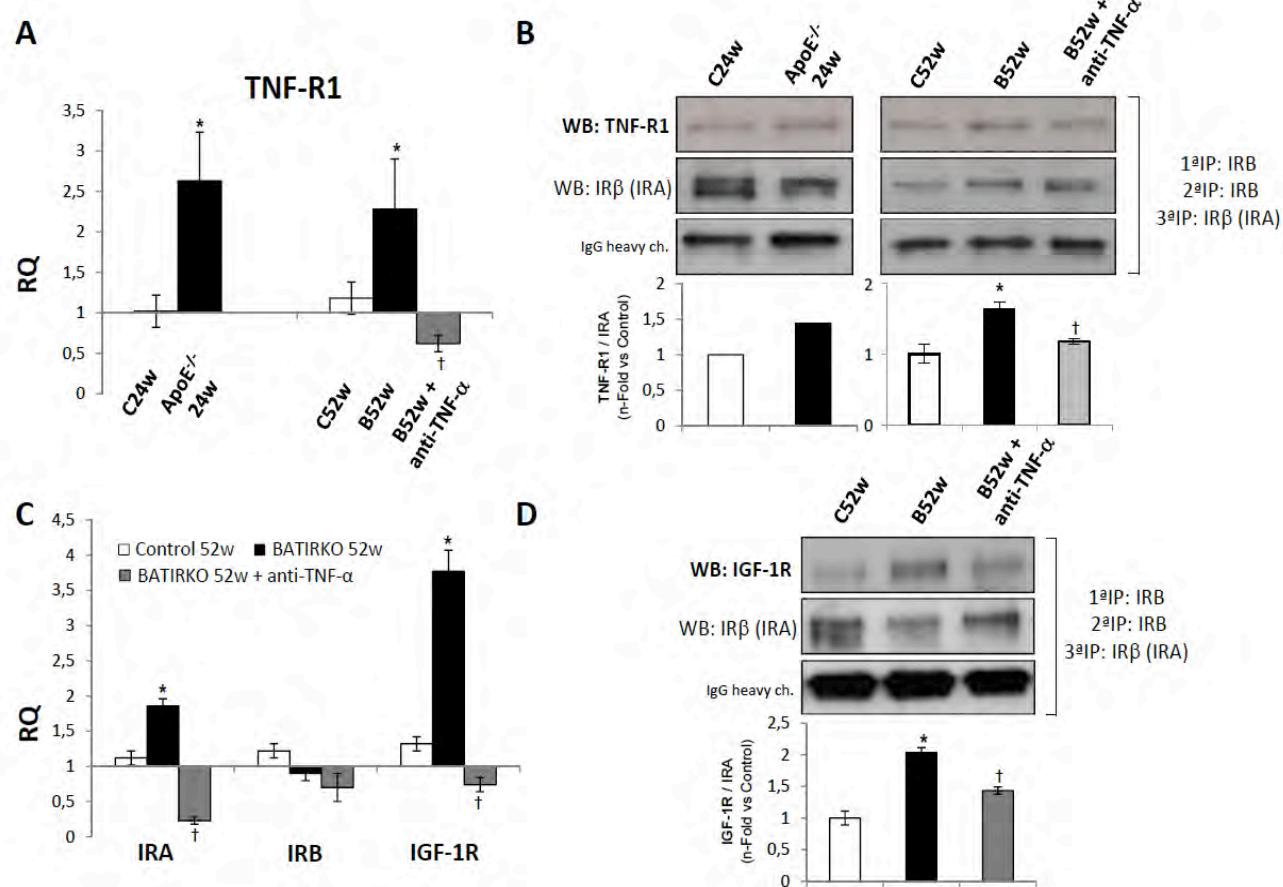


Figura 9

Figura 9. Expresión de las isoformas del TNF-R1 y sus asociaciones con IRA en dos modelos experimentales de daño vascular. Efecto del anti-TNF α . (A) Análisis por qRT-PCR de la expresión de TNF-R1 en la aorta del ratón ApoE^{-/-}, BATIRKO y BATIRKO tratado con anti-TNF- α (B). Geles representativos y sus cuantificaciones de las asociaciones de TNF-R1 con IRA en la aorta del ratón ApoE^{-/-}, BATIRKO y BATIRKO tratado con anti-TNF- α . Efecto del tratamiento anti-TNF- α en la expresión de IRA, IRB e IGF-1R (C) así como su asociación con la isoforma A del IR en la aorta de los tres grupos del modelo BATIRKO (D). Grupo control de 24 semanas (C24w; n=5); grupo ApoE^{-/-} de 24 semanas (ApoE^{-/-} 24w; n =5); grupo control de 52 semanas (C52w; n=6); grupo BATIRKO de 52 semanas (B52w; n=5); grupo BATIRKO de 52 semanas tratados con anti-TNF- α (B52w + anti-TNF- α ; n=3). *p<0.05 vs. cada Control; †p<0.05 vs. grupo BATIRKO de 52 semanas.

4. CONCLUSIONES

Nuestros datos sugieren que la isoforma A del receptor de la insulina y la formación de receptores híbridos con TNF-R1 o IGF-1R, confieren una ventaja proliferativa a las células de músculo liso vascular, principalmente en respuesta a TNF- α o IGF-2. Además, la migración de las VSMCs inducida por insulina, IGF-1 e IGF-2, podría estar favorecida por el aumento de la expresión de IRA e IGF-1R. Por ello sugerimos que la IRA confiere a las células de músculo liso vascular una ventaja proliferativa y migratoria en respuesta a distintas señales inflamatorias y siendo claves para el crecimiento de la placa durante las fases iniciales del proceso aterogénico.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos SAF2007/60058, SAF2008/00031 y SAF2011/22555 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423) y CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM, ISCIII, Spain), Spain. Quería agradecer a Gema García y Silvia Fernández por su asistencia técnica.

6. REFERENCIAS

1. Myers MG Jr, White MF. Insulin signal transduction and the IRS proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:615-58.
2. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordán J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 1997;11:701-13.
3. Seino S, Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;15:312-6.
4. Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 1989;3:1263-9.
5. Goldstein BJ, Dudley AL. The rat insulin receptor: primary structure and conservation of tissue-specific alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol* 1990;4:235-44.
6. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:3278-88.
7. Belfiore A. The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr Pharm Des* 2007;13:671-86.
8. Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, Häring HU. The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:1013-8.
9. Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes* 2009;58:820-8.
10. Sciacca L, Prisco M, Wu A, Belfiore A, Vigneri R, Baserga R. Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1. *Endocrinology* 2003;144:2650-8.
11. Pandini G, Vigneri R, Costantino A, Frasca F, Ippolito A, Fujita-Yamaguchi Y, Siddle K, Goldfine ID, Belfiore A. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res* 1999;5:1935-44.
12. Sciacca L, Costantino A, Pandini G, Mineo R, Frasca F, Scalia P, Sbraccia P, Goldfine ID, Vigneri R, Belfiore A. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* 1999;18:2471-9.
13. Vella V, Sciacca L, Pandini G, Mineo R, Squatrito S, Vigneri R, Belfiore A. The IGF system in thyroid cancer: new concepts. *Mol Pathol* 2001;54:121-4.
14. Cohick WS, Clemons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993;55:131-153.
15. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995;16:143-63.
16. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999;19:3278-88.
17. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 2009;30:586-623.
18. Gómez-Hernández A, Otero YF, de las Heras N, Escribano O, Cachofeiro V, Lahera V, Benito M. Brown fat lipotrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction. *Endocrinology* 2012;153:1242-55.
19. Polanco JI, Albajar M, Pocoví M, Rodríguez Rey JC. Induction of insulin-like growth factor receptor (IGF IR) mRNA levels by low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:917-22.
20. von der Thüsen JH, Borensztajn KS, Moimas S, van Heiningen S, Teeling P, van Berkel TJ, Biessen EA. IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol* 2011;178: 924-34.
21. Okura Y, Brink M, Zahid AA, Anwar A, Delafontaine P. Decreased expression of insulin-like growth factor-1 and apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1777-89.

22. Engberding N, San Martín A, Martin-Garrido A, Koga M, Poukova L, Lyons E, Lassègue B, Griendling KK. Insulin-like growth factor-1 receptor expression masks the antiinflammatory and glucose uptake capacity of insulin in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:408-15.
23. Bartolomé A, Guillén C, Benito M. Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology* 2010;151:3084-94.
24. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362: 801-9.
25. Kahn AM, Allen JC, Seidel CL, Zhang S. Insulin inhibits migration of vascular smooth muscle cells with inducible nitric oxide synthase. *Hypertension* 2000;35:303-6.
26. Abhijit S, Bhaskaran R, Narayanasamy A, Chakraborty A, Manickam N, Dixit M, Mohan V, Balasubramanyam M. Hyperinsulinemia-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation is mediated by converging mechanisms of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 2013;373:95-105.
27. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 1994;93:1266-74.
28. Duan C, Bauchat JR, Hsieh T. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 2000;86:15-23.
29. Polanco JI, Albajar M, Pocoví M, Rodríguez Rey JC. Induction of insulin-like growth factor receptor (IGF IR) mRNA levels by low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226: 917-22.
30. Ross R. Cellular and molecular studies of atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997;131 Suppl, S3-4.
31. Schwartz SM. The intima: a new soil. *Circ Res* 1999;85:877-9.
32. Hsueh WA, Jackson S, Law RE. Control of vascular cell proliferation and migration by PPAR-gamma: a new approach to the macrovascular complications of diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:392-7.
33. Faries PL, Rohan DI, Takahara H, Wyers MC, Contreras MA, Quist WC, King GL, Logerfo FW. Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *J Vasc Surg* 2001;33:601-7.
34. Zhang L, Peppel K, Sivashanmugam P, Orman ES, Brian L, Exum ST, Freedman NJ. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1087-94.
35. Zaina S, Pettersson L, Ahrén B, Bränén L, Hassan AB, Lindholm M, Mattsson R, Thyberg J, Nilsson J. Insulin-like growth factor II plays a central role in atherosclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 2002;277:4505-11.



A historical overview of protein kinase PKR: from its discovery and mechanism of action to its clinical and therapeutic implications

Title in Spanish: Una visión histórica de la proteína quinasa PKR: desde su descubrimiento y mecanismo de acción hasta sus implicaciones clínicas y terapéuticas

María Ángel García Chaves¹

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain.

ABSTRACT: The protein kinase R (PKR, also called EIF2AK2) is an interferon-inducible double-stranded RNA protein kinase with multiple effects on cells. PKR plays an active part in the cellular response to numerous types of stress, with a critical role in the host's interferon-induced antiviral defence mechanisms. PKR has been extensively studied and documented for its relevance as a cell growth regulator, and more recently analysed in connection with metabolism, inflammatory processes, cancer, and neurodegenerative diseases. The present review will summarise, in chronological order, the state of the knowledge about this kinase as well as the contributions we have done at the National Centre of Biotechnology regarding the regulation and mechanisms of action of PKR. Specific mention will be made of the studies that the author leads at the University Hospital Complex of Granada, showing the importance that PKR has as a target of both conventional chemotherapeutics and novel drugs, and its potential as a biomarker and therapeutic target in various pathologies.

RESUMEN: PKR, también llamada EIF2AK, es una proteína quinasa de respuesta a ARN de doble cadena inducida por interferón que participa en múltiples efectos en las células. PKR contribuye de forma activa en la respuesta celular a numerosos tipos de estrés, teniendo una importante función en el mecanismo de defensa antiviral del hospedador inducido por los interferones. PKR ha sido estudiada intensamente a lo largo del tiempo documentando su relevancia también como modulador del crecimiento celular, y más recientemente implicándola en metabolismo, procesos inflamatorios, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. En esta revisión se resume de forma cronológica, el conocimiento adquirido sobre esta quinasa y nuestras contribuciones en el mecanismo de acción y regulación de PKR llevadas a cabo en el Centro Nacional de Biotecnología. Además, con especial interés, se describen los estudios que la autora lidera en el Complejo Hospitalario Universitario de Granada mostrando la importancia que PKR tiene como diana molecular de quimioterápicos convencionales y nuevos fármacos así como su potencial como biomarcador y diana terapéutica en varias enfermedades.

*Corresponding Author: magciables@yahoo.com

Received: October 13, 2015 Accepted: June 27, 2016

Premio Real Academia Nacional de Farmacia del Concurso Científico 2015 de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. INTRODUCTION

The Protein kinase R (PKR), also called eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 (EIF2AK2), is an interferon-inducible double-stranded RNA protein kinase with multiple effects in cells (1, 2). PKR actively contributes to the cellular response to numerous types of stress, with a critical role in the antiviral defence mechanism of the host induced by interferons. Interferon cytokines (IFNs) have a wide range of biological functions, including antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties (3). The cloning of interferon genes, the structure of the ligand and their receptors, and the signalling pathways and transcription of IFN-induced genes have been instrumental in reaching an understanding of how these molecules exert their function in the cell (4, 5). Among the molecules with important biological function induced by IFN is PKR, which was

discovered after the important observations carried out by the Metz and Kerr groups in the National Institute for Medical Research, London. In August 1972, an article by Dr Metz and Dr Esteban published in the *Nature* journal showed how viral RNA could be detected in cells pretreated with interferon and infected with vaccinia virus, and how protein synthesis ceased early after infection. They concluded that the effect of interferon must therefore be at the stage of translation rather than transcription (6). A few months later, Dr Kerr's group described the inhibition of viral encephalomyocarditis messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts (7). Subsequently, they showed the effect that the synthetic form of dsRNA (poly dIdC) had on translation (8). These seminal studies led to the identification in 1976 of a protein with dsRNA-dependent kinase activity involved in translation modulation (9). The kinase activity responsible

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 143-167

Language of Manuscript: English

for inhibition was then under active search in different laboratories after the demonstration that a dsRNA-dependent kinase could inhibit translation through phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) in rabbit reticulocyte lysates (10). In addition to eIF2 α , the kinase activity was found to phosphorylate a p68 protein in human cells and a p65 protein in murine cells (11). The generation of polyclonal and monoclonal antibodies against the human p68 protein allowed determining that this was the kinase itself (12). To achieve its cloning, which was performed at the Pasteur Institute (13), this kinase first had to be purified by immunoaffinity with specific monoclonal antibodies (14). Then, the purified protein was injected into mice in presence of poly(A).poly(U) (15). Different names were given to this kinase, such as p68 protein kinase, DAI (Double stranded Activated Inhibitor), dsRNA-dependent protein kinase, and P1/eIF2 α kinase, until the decision was made to give PKR a consensus name: Protein Kinase dsRNA-dependent (16). The human PKR gene consists of 17 exons (whereas the mouse gene has 16) and is encoded from a single gene located on human chromosome 2p21-22 and on mouse chromosome 17E2 (17). PKR, which is expressed constitutively in mammalian cells, has an IFN-stimulated response element (ISRE) in its determined promoter, required for transcriptional induction by type I IFN, but also a kinase conserved sequence (KCS) motif with an important role in basal transcription in absence of cytokine treatment (18).

Since these findings were made, PKR has been extensively studied to document its relevance as a first-line defence mechanism against infection and as regulator of cell growth, and more recently it has also been analysed for its role in metabolism, inflammatory processes, and age-related diseases. In fact, numerous pieces of original research and reviews regarding PKR action have been published over the years. My research about the mechanism of action of this kinase started in close collaboration with Dr Gil and co-workers in the group led by Dr Esteban at the National Centre for Biotechnology (from 2000 until 2008), and has provided key insights into the consequences that PKR activation has at the cellular level but also at the clinical and therapeutic levels. For this reason our group was invited to review the knowledge of PKR in 2006-2007 (1, 2). These reviews are being referenced by other studies looking into the mechanism of action and the clinical implications of this kinase in several pathologies. In fact, the reviews we published under the direction of Dr Esteban, with my contribution as the first author, in the journals *Microbiology and Molecular Biology Reviews* and *Biochimie* have been cited over 600 times to this date (Scopus database).

The present review will perform a chronological account of our major contributions to the knowledge of the mechanisms of action and regulation of PKR, as well as the decisive contributions of several international groups. Specific mention will be made of the studies that the author leads at the University Hospital Complex of

Granada (Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, ibs.GRANADA) since 2009, in the group currently directed by Dr Marchal, which show the importance that PKR has as a target of conventional chemotherapeutics and novel drugs. In addition, special consideration will be given to future studies necessary to validate its use as a biomarker and a therapeutic target in various pathologies.

2. MECHANISM OF ACTION OF PKR

PKR is a serine-threonine kinase composed of a kinase domain, shared by the other eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) kinases: general control nonrepressed 2 serine/threonine-protein kinase (GCN2), heme-regulated serine/threonine-protein kinase (HRI), and PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) (19). In addition, PKR has two dsRNA binding domains that constitute the regulatory domain (20). Although the main direct PKR activator is dsRNA (produced during infection by several viruses and detected at low doses in mammalian cells), PKR is also activated by a variety of forms of cellular stress described throughout the manuscript. PKR, in response to specific stress signals, is activated by autophosphorylation and leads to the phosphorylation of eIF-2 α impairing its activity, which results in the inhibition of protein synthesis and the induction of apoptosis (1, 2). In addition to its translational regulatory function, PKR has a role in signal transduction and transcriptional control through the inhibitor of kB (IkB)/nuclear factor kB (NF- κ B) pathways. Furthermore, PKR is involved in various pathways that activate and engage a number of transcription factors controlling the expression of multiple genes, including interferon regulatory factor 1 (IRF-1), signal transducers and activators of transcription factors (STATs), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and p53, among others (1, 2). All these events indicate that PKR protein needs to be highly regulated. In fact, numerous studies have found PKR to be dysregulated in most cancers, neurodegenerative diseases, and other pathologies.

The main mechanisms of PKR activation by dsRNA, as well as its effects on the inhibition of protein synthesis through the phosphorylation of eIF2 α , had already been thoroughly characterised before the start of my research in the field. However, the mechanism by which PKR activation induces the activation of the transcription factor NF- κ B was still in the early stages of research when I joined Dr Esteban's group, where we made, along with Dr Gil, Dr Alcami and co-workers, some key contributions. These researchs, along with those of other groups, will be discussed in the following sections

2.1. PKR activation

Although the main direct PKR activator is dsRNA, PKR is also activated by a variety of cellular stresses, including cytokine, calcium stress, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, lipo-stress, amyloid- β ($A\beta$) peptide accumulation, polyanions such as heparin, and several drugs among others (1, 2, 21, 22), or through the

A historical overview of protein kinase PKR...

PKR associated activator (PACT) (23, 24). PKR is also an intermediary in TLR signalling (25). PKR is engaged in dsRNA-activated TLR3 signalling, recruited by a TAK1-containing complex in response to dsRNA binding to the TLR3 receptor. In addition, PKR integrates and transmits these signals not only to eIF2 α and the translational machinery, but also to various factors such as STAT IRF1, p53, JNK, and p38, as well as engages the NF- κ B pathway (1, 2, 26). In non-stressed cells, PKR is in a monomeric latent state due to the autoinhibitory effect of its dsRBD, which occludes the KD and regulates the activation of the kinase. The different dsRNA molecules are recognised and bound by PKR through the two N-terminal dsRBM, resulting in PKR activation and autophosphorylation (27). The structure of the PKR dsRNA binding domain was determined by nuclear magnetic resonance (28) offering a satisfactory explanation for the length required of dsRNA molecules to be effective PKR activators. Most natural dsRNA activators of PKR are synthesised in virus-infected cells as by-products of viral replication or transcription. For RNA viruses, dsRNA replicative forms are obligatory intermediates for the synthesis of new genomic RNA copies. Complex DNA viruses such as vaccinia virus (VV), adenovirus, or herpes simplex virus (HSV) have open reading frames in opposite orientation; they produce overlapping mRNA transcripts that can fold to form dsRNA stretches responsible for PKR activation in infected cells (1, 2). After binding dsRNA, PKR undergoes a number of conformational changes that relieve the autoinhibitory interactions of the enzyme and allow subsequent substrate recognition. Biochemical and genetic data have underscored the importance of homodimerisation in PKR activation (29). After homodimerisation, PKR undergoes rapid autophosphorylation in a stretch of amino acids termed the activation segment. Among others, residues Thr446 and Thr451 in this segment are consistently phosphorylated during activation (29, 30). This further stabilises PKR dimerisation, which in turn increases the catalytic activity of the kinase. Whether of viral origin or pIC, dsRNA thus not only induces effects on translation, but also influences various signal transduction pathways that affect different transcriptional activities. As such, PKR mediates the dsRNA-induced transcription of many genes through engagement of multiple transcription pathways (1, 2, 26).

2.2. Translation regulation by PKR

A number of reports have provided insights into the mechanism of PKR activation and eIF2 α phosphorylation, which consists of a three-step pathway in which dimerisation of the kinase domain triggers autophosphorylation, in turn promoting specific recognition of eIF2 α . PKR activation-segment phosphorylation on Thr446 promotes substrate recognition and phosphorylation, although it has been reported that phosphorylation at tyrosine residues in PKR also contributes to the binding to dsRNA, autophosphorylation, and eIF2 α phosphorylation (31). To this day, a total of 14 phosphorylation sites have been identified in PKR, but

only 12 are biochemically verified, and 8 have been functionally characterised (32). Although phosphorylation of most sites serves to augment kinase activity toward eIF2 α , only phosphorylation of T451 is required to generate an active kinase (32). As predicted for a translation regulator, PKR is associated to ribosomes, mainly to 40S subunits (33). Ribosomal association of PKR appears to be mediated by the dsRBD, strengthening the role of these domains in the correct regulation of PKR activity. PKR localisation in ribosomes offers a satisfactory explanation for its local activation in response to limited stimulus, as reported by several studies (1, 2, 33). Two models have recently suggested new evidence for a sentinel model of ribotoxin-induced PKR activation (34). One possibility is a sentinel model in which PKR monomers basally associate with the ribosome and rRNA. Upon interaction with a ribotoxin, one or more portions of rRNA reposition and thereby promote dimerisation of the PKR monomers followed by autophosphorylation and self-activation. A second possibility is a sequential mode whereby a ribotoxin first associates with rRNA and inflicts damage and/or alters its structure, thereby exposing new double-stranded (ds)rRNA regions. This could sequentially elicit the binding of two or more PKR monomers in close proximity to the damaged site, followed by the dimerisation of these monomers and finally the autophosphorylation and self-activation of the kinase (34).

2.3. NF- κ B activation by PKR: identification of TRAF family proteins linking PKR with NF- κ B activation

The NF- κ B family of transcription factors controls the expression of genes involved in immune and inflammatory responses, cell differentiation, and apoptosis, among others (35). NF- κ B activation is primarily regulated through its interaction with the family of inhibitory proteins I κ B which retain NF- κ B in the cytoplasm. Phosphorylation of I κ B on two conserved serine residues is mediated by the I κ B kinase complex (IKK complex) in response to a variety of stimuli, leading to its subsequent ubiquitin-dependent degradation by the 26S proteasome. This allows NF- κ B translocation to the nucleus, where it can activate the transcription of a number of genes including those encoding cytokines, chemokines, cell surface receptors, and adhesion molecules (36). The IKK complex contains a structural protein termed IKK γ or NEMO and two kinase subunits, IKK α and IKK β (37). The first clues suggesting a role for PKR in NF- κ B activation arose from observations in 1989 that dsRNA could induce NF- κ B activity in different cell lines (38). Subsequent experiments using the kinase inhibitor 2-aminopurine suggested a role for PKR in this process. Additional evidence came from the analysis of NF- κ B activation following dsRNA treatment in cells lacking PKR expression. When PKR expression was downregulated using 2-5A antisense oligonucleotides, diminished NF- κ B activation was observed in response to dsRNA, with no significant change in the response to TNF- α (39). The design of mice deficient in PKR expression in 1995 allowed carry out many critical experiments for studying the mechanism of action of the

kinase (40). In fact, experiments performed with PKR^{-/-} MEF showed that NF-κB activation was impaired in response to pIC treatment. As a consequence of the NF-κB activation impairment, PKR^{-/-} MEF show defects in IFN production compared with wt MEF (40). The first experiments to show the ability of PKR to activate NF-κB in the context of viral infection came from the laboratory of Dr Esteban in 1999-2000. These experiments were

performed with human cells and vaccinia virus recombinants expressing PKR in an inducible manner (Figure 1), showing that IκBα phosphorylation on serines 32 and 36 precedes its degradation and translocation of NF-κB to the nucleus (41, 42).

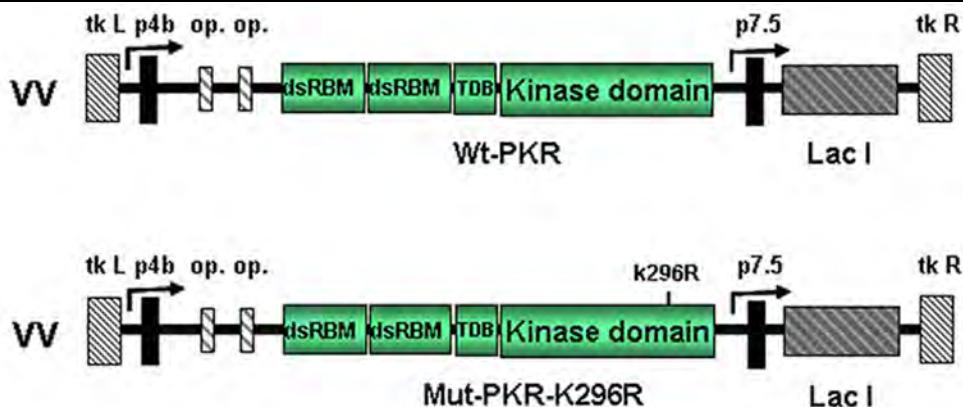


Figure 1. Scheme of the recombinant vaccinia virus vectors. The Western Reserve strain of vaccinia virus was used to generate recombinant viruses expressing the human wild type (WT) and the mutant PKR proteins. The recombinant genes were inserted in the TK locus of viral genome. PKR expression is regulated by the lac I repressor gene that is under the control of VV early-late promoter p7.5. The mutant PKR, K296R has lost the catalytic activity of PKR due to substitution of the lysine 296 by arginine. These vectors allow over-express proteins in culture cell lines under IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosido) induction. Most of our interest genes were over-expressed using these recombinant vectors.

Initial reports indicated that PKR was the protein kinase that phosphorylated IκBα directly in response to dsRNA, based on *in vivo* and *in vitro* evidence (43). Although PKR appears to be necessary for transducing this signal (1, 2, 43, 44), later evidence pointed to an indirect role for PKR in IκB phosphorylation. Mutant cells lacking IKKγ were unable to induce NF-κB in response to pIC treatment (45). Although the kinase NIK was initially proposed to be downstream of PKR in the IKK activation process, the participation of NIK in this pathway seems dubious by virtue of current knowledge of IKK signalling (1, 2, 37). Although the evidence is consistent with PKR playing a role in the activation of IKK in response to dsRNA, the nature of such role is still unclear. In fact, research groups have disagreed on whether the catalytic activity of PKR was necessary or not for the successful activation of NF-κB. In this regard, the studies led by Dr Esteban's group made significant contributions and provided some interesting experiments demonstrating the essential action of the catalytic domain of PKR. In this exciting and pioneering environment is where I began my research of the mechanism of action of PKR as a PhD student under the direction of Dr Esteban. Our experiments showed that the association with the IKK complex seems to involve the PKR catalytic domain, as mutational analysis suggested (46). Experiments using PKR^{-/-} cells suggested that PKR catalytic activity is needed for IKK activation using vaccinia virus recombinants expressing several PKR mutants (Figure 1), (46). Similar results were found by Dr Williams's group, in a study in which the

complementation of PKR^{-/-} MEF with plasmid expressing wt PKR (but not with a catalytically inactive mutant) restored appropriate NF-κB and IRF-1 activation (44). However, experiments from other groups carried out on NIH 3T3 cells suggested that a catalytically inactive PKR mutant is a poor IKK activator, but when PKR is expressed at high levels it can activate IKK efficiently (47). Purified PKR, either wt or mutant K296R, activated the recombinant IKK protein, suggesting that PKR catalytic activity was not needed in the process (48, 49). It has been suggested that the variety of models used in the different groups can yield either result, also accepting that the catalytic activity of PKR may or may not be necessary to activate NF-κB depending on the type of stimulus triggering the process, and the cellular stress stage.

A major part of my doctoral thesis looked into ways to decipher the mechanism by which PKR activates NF-κB transcription factor. Sharing first authorship with Dr Gil, in 2004 we published an original article in *Molecular and Cellular Biology* about how TRAF family proteins link PKR with NF-κB activation. Since then, this piece of research has been cited over 80 times. Several pathway-specific adapter proteins, such as members of the TRAF (TNF receptor associated factors) family, MyD88, TIRAP, and TRIF, act as mediators that link different pathways with IKK activation (1, 2, 50). TRAF proteins have emerged as key signal transducers not only downstream of TNF receptors, but also in other pathways (50). We identified two putative TRAF-interacting motifs in the PKR sequence, and the viability of the PKR/ TRAF

A historical overview of protein kinase PKR...

interaction was suggested by bioinformatic analysis and confirmed *in vivo* (51). The interaction between PKR and TRAF2 or TRAF5 was shown to be dependent on PKR dimerisation and is functionally relevant, as we demonstrated in cells genetically deficient in TRAF2 and TRAF5 or after expression of TRAF dominant negative molecules, suggesting that TRAF family proteins act downstream of PKR and signal towards the activation of NF- κ B (51). With our study as a starting point, other groups have linked PKR/TRAF with several signalling pathways with significant relevance in the induction and

activation of Interferon type I, such as TLR-related pathways (52). Recently PKR/TRAFs have been also involved in the protection against a disease caused by a non-viral pathogen (53).

3.4. PKR involvement in different signalling pathways: New PKR networks through microarray analysis

The number of functions that PKR plays is in correlation with its participation in numerous signalling pathways that have been described over several studies (1, 2, 26) (Figure 2).

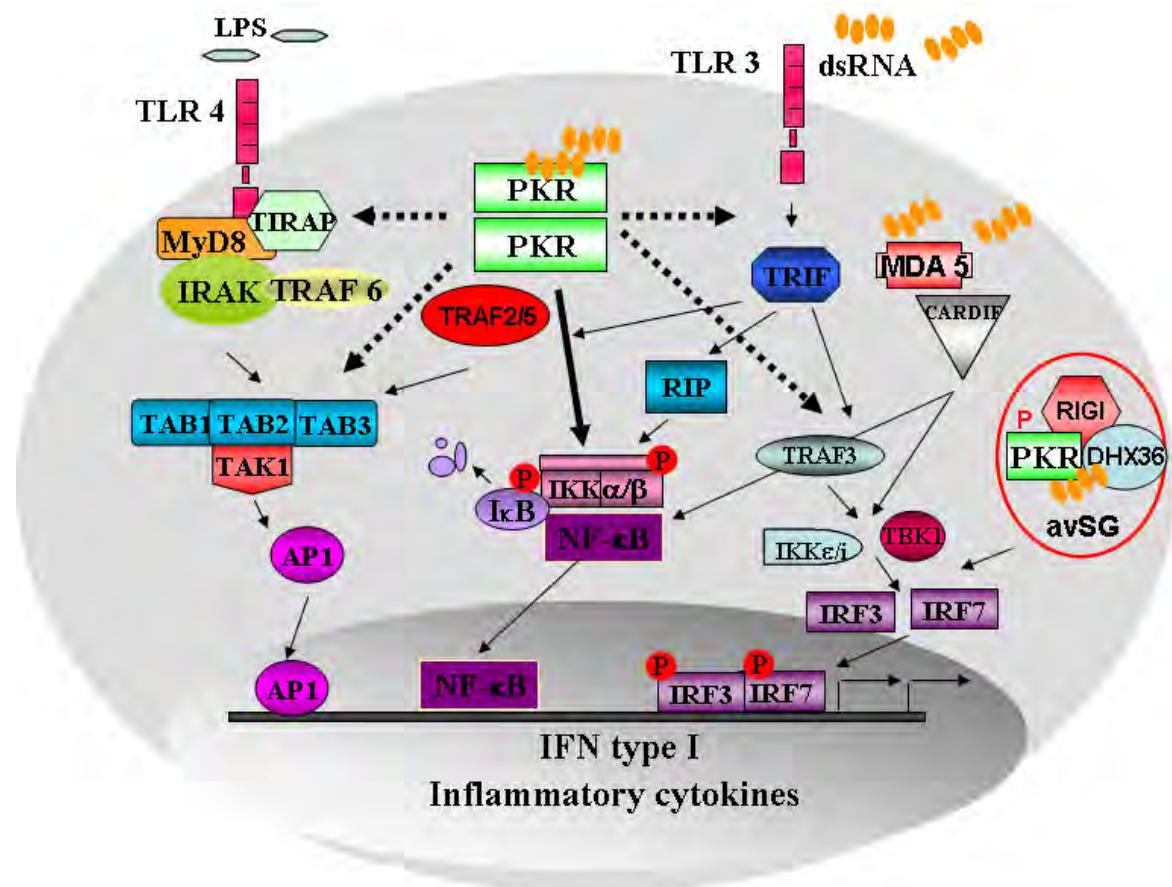


Figure 2. PKR is a cellular sensor implicated in the detection of viral RNA and subsequent interferon (IFN) gene expression. Viral RNA sensors as retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5), and the membrane sensors as the Toll-like receptors TLRs were discovered after PKR, adding complexity to viral host recognition. PKR is an intermediary component in TLR signalling. PKR is implicated in the LPS/TLR4-mediated pathway probably recruited by the TIRAP complex. PKR is also involved during the dsRNA/TLR3 pathway, recruited by a TAK1-containing complex. Moreover, PKR is crucial for the IFN- α/β production in response to MDA5-dependent viruses. In addition PKR link RIG-I in the antiviral stress granules function and formation.

PKR was one of the first cellular sensors implicated in the detection of viral RNA and subsequent interferon (IFN) gene expression. However, this clear picture of PKR antiviral function was complicated by the discovery of cytosolic viral RNA sensors such as retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), and membrane sensors as the toll-like receptors TLRs (Figure 2), (54). Since then, the role of PKR as RNA sensor was minimised, and the focus moved to the role of other sensors. However, it has been demonstrated that PKR plays an essential role in IFN- α/β

production in response to viral infections by regulating the integrity of IFN- β transcripts. By using PKR-deficient cells, it has been possible to show that PKR is crucial for IFN- α/β production in response to MDA5-dependent viruses like encephalomyocarditis virus (EMCV), Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) and Semliki Forest virus (SFV), but not to RIG-I-dependent viruses such as Sendai virus or influenza (55). However, it has been suggested recently a new link between PKR and RIG-I in the antiviral stress granules function and formation (56, 57). In addition, the idea of PKR as key

regulator of IFN protein synthesis has been also supported by other studies demonstrating that PKR plays a non-redundant role in the IFN response to viral infections (54).

On the other hand, it is well-known that PKR is a potent activator of NF- κ B, thereby inducing IFN transcription in concerted action with interferon regulatory factors 3 and 7 (IRF-3/7). PKR has been also implicated in the activation of interferon regulatory factor 1 (IRF 1), whose expression is strongly upregulated upon viral infection, and which acts mainly as a transcriptional activator of IFN- α / β gene expression (5, 44, 54). PKR also controls IFN and dsRNA signalling pathways by modulation of STAT1 and STAT3 transcription factors. PKR-knockout cells are defective in STAT1 phosphorylation on Ser727, resulting in a 4-fold decrease in STAT1 dependent transactivation (58). STAT1 is also a target for PKR-mediated activation in response to lipopolysaccharide (LPS) in glial cells (59). PKR also associates to STAT3, and is required for full STAT3 activation in response to platelet-derived growth factor (PDGF). As proposed for STAT1, PKR regulates the Erk activation ultimately involved in STAT3 phosphorylation (60). On the other hand, since it also regulates STATs transcription factors, PKR has recently been described to be involved in the differentiation of chondrocytes through the modulation of STAT1 and Sox-9 expression (61).

In addition to its well-established role in the interferon response, PKR is involved in many cellular pathways exerting various functions on cell growth and tumourigenesis (1, 2, 26). For example, the link between PKR and p53 has been described fundamentally in cancer cells where there is a bidirectional and complex regulatory relationship between both proteins. PKR interacts directly with the C-terminal part of p53 and phosphorylates p53 at the Ser392 residue (62). In addition, PKR is able to promote the proteasomal degradation of p53 in association with GSK-3 β and mouse double minute 2 homologue (Mdm2), independently of translational control (57). Moreover, it has been demonstrated that the ability of p53 to cause cell cycle arrest and regulate transcription of target genes was impaired in PKR-knockout cells (62). In fact, it has been suggested that PKR is a p53 target gene that plays an important role in the tumour-suppressing function of p53 (63).

Moreover, PKR is an activator for signalling cascades involving stress-activated protein kinases, and is described to mediate Jun kinase (JNK) and mitogen-activated protein kinase p38 (MAPK) activation in response to specific stimuli (1, 26). For full activation in response to LPS or cytokines such as IFN- γ , interleukin (IL)-1, or tumour necrosis factor (TNF)- α , both p38 and JNK are dependent on PKR (64). Moreover, PKR interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation (65).

In order to improve the state of knowledge about new host genes affected by PKR, we used human cDNA microarrays to identify, in infected cells, genes differentially expressed after PKR expression, and

analysed the requirements of catalytic activity of the enzyme (66). To express PKR, we used vaccinia virus recombinants producing wild type PKR and the catalytically inactive mutant K296R (Figure 1). Most regulated genes were classified according to biological function, including apoptosis, stress, defence, and immune response. A total of 111 genes were regulated specifically by PKR catalytic activity, highlighting the upregulation of the ATF-3 transcription factor, involved in stress-induced β -cell apoptosis. Using null cells for ATF-3 and for the p65 subunit of NF- κ B, we showed that induction of apoptosis by PKR at late times of infection was dependent on ATF-3 expression and regulated by NF- κ B activation. The host genes affected by PKR, identified using human cDNA microarrays, together the ATF3 implication were published by Dr Guerra and co-workers in 2005 under the direction of Dr Esteban in the *Journal of Biological Chemistry* (66).

2.5. PKR is a potent pro-apoptotic protein: caspases activation by intrinsic and extrinsic routes

Cell death by apoptosis is a genetic program of multicellular organisms which implements the ordered removal of damaged or unwanted cells during development and in adult life. Deregulation of the apoptotic process can lead to pathological conditions such as cancer, autoimmunity, and neurodegeneration (67). Induction of apoptosis is a common response to viral infection. Although it may represent an antiviral mechanism that acts by rapidly eliminating infected cells and preventing viral spread, virus-induced apoptosis can also have important pathological implications. Moreover, apoptosis cell death is an important event during some chemotherapy treatments in cancer diseases.

The first evidence that PKR was involved in apoptosis was suggested by Dr Esteban's group in 1994 using HeLa cells infected with a VV recombinant vector that expressed the enzyme under inducible conditions (Figure 1), (68). The role of PKR in apoptosis was reinforced by studies developed by other groups with 3T3 cells expressing a noncatalytic mutant PKR or using MEF derived from PKR^{-/-} mice (69, 70). Since then, it has been clearly demonstrated that PKR mediates the apoptosis induced by several viruses such us poxviruses, influenza, EMCV, VSV, etc., probably through dsRNA production (1, 2). PKR also regulates apoptosis induced in the absence of viral infection. PKR was shown to mediate the apoptosis observed during Alzheimer's disease (71) and induced by oncogenes such as IRF1 or E2F-1, or triggered in response to dsRNA, TNF α , LPS, tunicamycin, serum starvation, or IL-3 withdrawal (1, 2). Many of the stimuli that trigger PKR-dependent apoptosis in the absence of viral infection rely on PACT/RAX activation. PACT/RAX mediates PKR activation and subsequent apoptosis in response not only to cytokines and serum withdrawal, but also to chemotherapy, ethanol, and viral infection (23, 24, 72). Analysis of the role of PKR effectors in mediating cell death suggests an intricate pathway. To distinct degrees, at least eIF-2 α , NF- κ B, ATF-3, and p53 have been implicated

A historical overview of protein kinase PKR...

in mediating PKR-induced apoptosis (1, 2, 26). Our research has provided interesting results involving all these factors. Initial evidence that PKR phosphorylation of eIF-2 α is involved in apoptosis induction came from studies showing that PKR-mediated apoptosis can be inhibited by expressing an eIF-2 α dominant-negative mutant (73). Using the VV expression system (Figure 1), the group of Dr Esteban showed that apoptosis induced by PKR expression was prevented by coexpression of an eIF-2 α S1A mutant (73). Moreover, they described the involvement of NF- κ B activation in the apoptosis induced by PKR using proteasome inhibitors that block I κ B α degradation, or by coexpressing dominant negative forms of I κ B α . These observations may appear paradoxical, as NF- κ B is often classified as a prosurvival factor that prevents apoptosis. However, there is considerable evidence for the context of NF- κ B as a pro- or antiapoptotic factor, depending on the stimulus that triggers the apoptosis (1, 2, 41, 42). Subsequently, we contributed to the discovery of a new transcription factor involved in the apoptosis induced by PKR (66). The ATF-3 transcription factor, involved in stress-induced β -cell apoptosis, was upregulated after PKR over-expression. Activation of endogenous PKR with a VV mutant lacking the viral protein E3L, a PKR inhibitor, triggered an increase in ATF-3 expression that was not observed in PKR-knockout cells. Using null cells for ATF-3 and for the p65 subunit of NF- κ B, we showed that induction of apoptosis by PKR at late stages of infection was dependent on ATF-3 expression and regulated by NF- κ B activation (66). Other potential mediators of PKR-induced apoptosis are the components of the Arf/p53 pathway. The p53 pathway is a critical regulator of apoptosis (1, 2), and the link between PKR and this pathway has been established at several levels. Our recently published work in the field is discussed below. IRF-1 is another PKR target involved in apoptosis induction (44).

To understand how the activation of PKR effectors regulates apoptosis induction, it is necessary to understand how the apoptotic machinery integrates these signals. Proteolytic enzymes such as caspases are important effector molecules in apoptosis. Caspases are synthesised as inactive proforms and, upon activation, they cleave next to aspartate residues. Activation of caspases can be

initiated from different entry points, as for example at the plasma membrane upon ligation of death receptor (receptor pathway/extrinsic pathway) or at the mitochondria (mitochondrial pathway/intrinsic pathway) level. Stimulation of death receptors of the tumour necrosis factor (TNF) receptor superfamily, such as CD95 (APO-1/Fas) or TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors, results in activation of the initiator caspase-8, which can propagate the apoptosis signal by direct cleavage of downstream effector caspases such as caspase-3. The mitochondrial pathway is initiated by the release of apoptogenic factors such as cytochrome c, among others, from the mitochondrial intermembrane space. The release of cytochrome c into the cytosol triggers caspase-3 activation through formation of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9-containing apoptosome complex. Links between the receptor and the mitochondrial pathway exist at different levels. Upon death receptor triggering, activation of caspase-8 may result in cleavage of Bid and Bax, Bcl-2 family proteins which in turn translocate to mitochondria to release cytochrome c, thereby initiating a mitochondrial amplification loop. Finally, activation of caspase-3 triggers the induction of cell death by apoptosis (1, 74), (Figure 3).

Our research on the mechanism of action involved in apoptosis induced by PKR has been very active. The group led by Dr Esteban showed that PKR-induced apoptosis involves mainly the FADD/caspase 8 pathway. Expression of a FADD dominant-negative mutant or MC159L (from molluscum contagiosum virus, MCV) by using VV recombinants blocked PKR-induced apoptosis and decreased caspase 8 activity, showing that PKR triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 (75). In 2002, we found that PKR expression by VV recombinants also induces caspase 9 activation, which correlates with Bax protein translocation to the mitochondria and cytochrome c release to the cytoplasm, resulting in mitochondrion depolarisation (76). The PKR-induced caspase 9 biochemical process occurred downstream of caspase 8 activation, as treating cells with an inhibitor of caspase 9 results in partial prevention of PKR-induced apoptosis (76). Also a part of my doctoral thesis, this work showed both the extrinsic and intrinsic pathways that PKR induces during apoptosis (Figure 3).

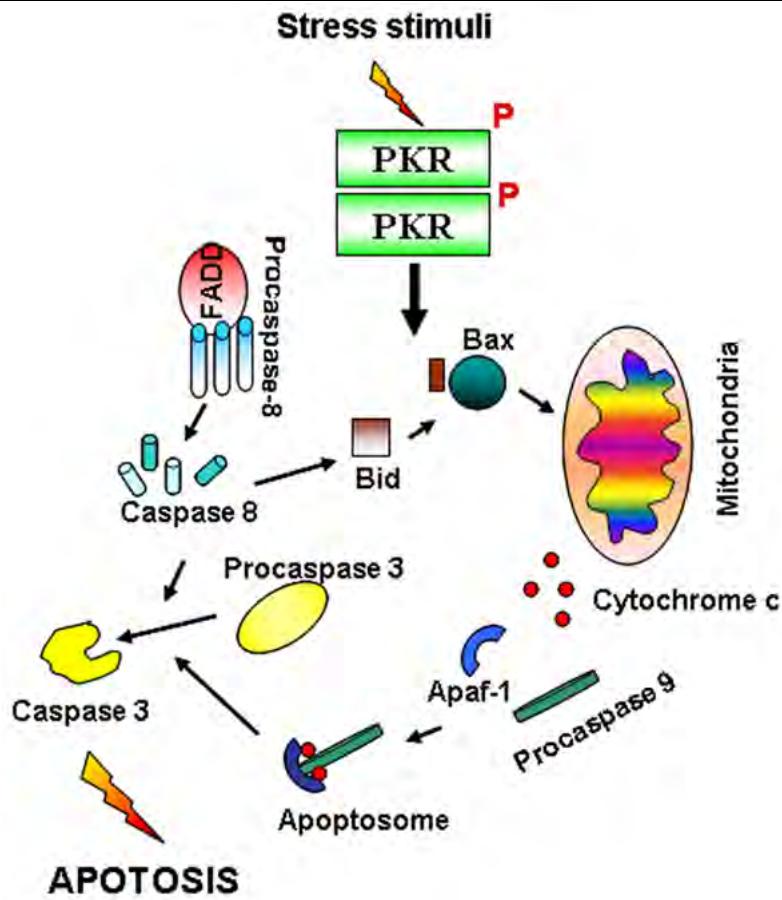


Figure 3. PKR induces apoptosis activating both, the extrinsic and the intrinsic routes of caspases activation. Through interaction with FADD, PKR activates caspase-8, which in turn activates the conversion of Procaspase-3 and provokes Bid/Bax interaction, release of cytochrome c from the mitochondria and formation of the apoptosome (Apaf-1/cytochrome c/caspase-9). Both pathways result in activation of caspase-3 and degradation of DNA, thus resulting in programmed cell death or apoptosis.

3. PKR REGULATION

The importance of PKR function in antiviral defence, cell growth, differentiation, stress response, and immune modulation is further highlighted by the existence of specific direct and indirect modulators.

3.1. Viral modulators of PKR effect: E3L from vaccinia virus, LANA 2 from Kaposi's sarcoma herpesvirus, and polyprotein from hepatitis c virus as subjects of our interest

Since the IFN-induced cellular antiviral response is the primary defence mechanism against virus infections, many viruses have developed a means to counteract the induction or effects of IFN (1, 2). Viruses use a number of strategies to counteract dsRNA-dependent pathways, and specifically to avoid the deleterious effects of the PKR and other IFN-induced systems. Numerous viral proteins have been identified as able to avoid the PKR effect, directly binding PKR or indirectly preventing eIF2 α phosphorylation. One recently-researched mechanism that contributes indirectly by inhibiting the effect of PKR is mediated by growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34), which physically interacts with

phosphatase-1 cofactor PP1c leading to enhanced dephosphorylation of eIF2 α (77). In addition, some viral mRNA could initiate translation in an eIF2-independent manner by means of a dedicated RNA structure that stalls the scanning 40S ribosome on the initiation codon (78). Viral inhibitors are normally expressed from the onset of infection to maintain PKR inactive until the virus cycle is completed. Elimination of PKR inhibitors from these viruses generally has a severe impact on virus replication and pathogenesis. Viruses disarmed of PKR inhibitors usually replicate at lower levels than wild-type viruses in normal cultured cells, and show an attenuated phenotype in animals. A detailed analysis of different viral proteins inhibiting PKR was made in our reviews in 2006 (1, 2). In the present review, an update with new viral proteins is displayed in Table 1. In addition, our contribution to the study of different viral proteins modulating the PKR effect is also discussed.

Vaccinia virus (VV) and its derivative viruses have been widely used by the group of Dr Esteban, and are still being researched as very promising vaccines against several infections and diseases (HIV, HCV, malaria, cancer, etc.) (79). VV is relatively resistant to the antiviral

A historical overview of protein kinase PKR...

effects of IFN and is able to rescue the replication of IFN-sensitive viruses such as VSV and EMCV following co-infection. Earlier findings suggested that VV resistance to IFN was related to interference between the virus and the IFN system (80). Later studies showed a more complex landscape, with the VV genome encoding secreted proteins that bind to receptors and ligands of cytokines and chemokines (1, 2, 81), and at least two proteins, K3L and E3L, with the ability to inhibit intracellular IFN-induced pathways. More recently, another protein (K1) has been identified as a possible PKR inhibitor (82). The K3L protein is expressed early in VV infection. K3L protein binds directly to PKR in vitro, and yeast two-hybrid interaction assays have localised the K3L protein-binding site to the C-terminal half of the PKR kinase domain. Competition binding experiments and sequence homology between K3L and the N-terminal one-third of eIF-2 α (72% similarity and 28% identity) suggest that PKR recognises K3L and eIF-2 α by a common mechanism (1, 2). In this way, K3L protein inhibits autophosphorylation of PKR, blocking the subsequent inhibition of protein synthesis (1, 2, 83). The role of the E3L gene as an inhibitor of apoptosis was first detected after infection of HeLa cells with an E3L deletion mutant of VV by Dr Esteban's group (1, 68). The VV E3L gene encodes two proteins, p25 and p20, expressed early in infection. E3L is a host range gene, necessary for efficient VV replication in several cell lines, and is required for VV pathogenesis. The E3L protein is a dsRNA-binding protein where the carboxy-terminal domain of E3L encodes the conserved motif that binds dsRNA. The N-terminal domain required for neurovirulence is involved in the direct inhibition of PKR activation, nuclear localisation, and Z-DNA binding (1, 2, 84). E3L also inhibits PKR by direct interaction with PKR, leading to heterodimer formation (1, 85). Our contribution in the study of E3L protein showed that E3L expression in NIH 3T3 cells conferred antiapoptotic and oncogenic properties. To analyse E3L effects over cellular metabolism in a virus-free system, we generated stable mouse 3T3 cell lines expressing E3L (86). Expression of E3L resulted in inhibition of eIF-2 α phosphorylation and I κ B α degradation in response to dsRNA. Antiviral responses induced by IFN- α/β were partially impaired in 3T3-E3L cells, as we determined by a viability assay upon VSV infection. E3L expression also conferred resistance to dsRNA-triggered apoptosis. Interestingly, cells expressing E3L grew faster than control cells, and showed increased expression of cyclin A and decreased levels of p27kip1. E3L cooperated with H-ras in a focus formation assay, and

NIH3T3 E3L cells formed solid tumours when injected in nude mice. Overall, our findings reveal that interference of E3L protein with several cellular pathways results in promotion of cellular growth, impairment of antiviral activity, and resistance to apoptosis (86). These results (which we published with my contribution as the first author in *Oncogen* journal in 2002) together with the previously described works, led me to writing my doctoral thesis "Mechanism of action and regulation of Protein Kinase induced by Interferon: PKR/ Mecanismo de acción y regulación de la Proteína Quinasa inducida por Interferón:PKR", which received the Special Award (Premio Extraordinario) of the Autonomous University of Madrid.

Recently, in collaboration with the group of Dr Rivas, we have described the regulation of the E3L protein by small ubiquitin-like modifier proteins. E3L interacts with SUMO1 through a small ubiquitin-like modifier (SUMO)-interacting motif (SIM). SIM integrity is required for maintaining the stability of the viral protein and for the covalent conjugation of E3 to SUMO1 or SUMO2, a modification that has a negative effect on the E3L transcriptional transactivation of several apoptotic genes (87). My collaboration with Dr Rivas started in 2003, and since then we have made several significant contributions to the knowledge about the link between tumour suppressors and antiviral activity, resulting in some of the works described in the present review.

Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV). In collaboration with Dr Rivas, we showed that the viral protein LANA2 codified by KSHV inhibits apoptosis and the PKR-mediated translational block (88), and we identified a nuclear export signal with important implications for the function of this viral protein (89).

Hepatitis C virus (HCV). We looked deeper into the mechanisms of action of other viral proteins modulating PKR and, in order to analyse the effects of hepatitis C virus (HCV) on the antiviral response of the host, we developed a novel vaccinia virus (VV)-based delivery system polyprotein expression (VT7-HCV7.9), where structural and nonstructural (except part of NS5B) proteins of HCV ORF from genotype 1b were efficiently expressed and produced, and timely regulated in mammalian cell lines. HCV polyprotein expression caused a severe cytopathological effect in human cells as a result of the inhibition of protein synthesis and apoptosis induction triggered by the activation of the IFN-induced enzymes PKR and RNase L systems (90).

Table 1: Viral inhibitors of PKR effect

| Viruses | Inhibitor Proteins | References |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Family Adenoviridae Adenovirus | E1B-55K/E4orf6 | (91) |
| Family Bunyaviridae Hantavirus Rift valley fever, RVFV | ANDV NP NSs | (92) (93) |
| Family Coronaviridae Infectious bronchitis virus, IBV | Nsp2 | (94) |
| Family Filoviridae Ebola viros EBOV | Vp35 | (95) |
| Family Flaviviridae Japanese encephalitis virus, JEV Dengue virus, DENV Hepatitis C Virus, HCV | NS2A NS4A NS5A E2 | (96) (97) (98) (99) |
| Family Herpesviridae Herpes simplex virus, HSV Epstein Barr, EBV Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KHSV Cytomegalovirus, CMV | US11, γ34.5 SM LANA2 vIRF-2 TRS1, IRS1 | (100) (101) (88) (102) (103) |
| Family Orthomixiviridae Influenza A virus | NP NS1 | (104) (105) |
| Family Paramixoviridae Respiratory sincitial virus, RSV | RSV NP | (106) |
| Family Reoviridae Reovirus | P17 | (107) |
| Family Retroviridae Human Immunodeficiency virus | TAT | (108) |
| Family Togaviridae Chikungunya | Nsp4 | (77,109) |
| Family Poxviridae Vaccinia virus, VV | E3L K3L K1 | (68, 84) (83) (82) |

3.2. PKR modulation by cellular components

Other functions of PKR (apart from its antiviral activity) have surfaced with the discovery of numerous proteins and other cellular structures modulating the kinase. Moreover, some cellular proteins also modulate PKR to regulate the antiviral and immunomodulatory responses.

p58IPK. A member of the tetratricopeptide repeat family, p58IPK is the first reported cellular inhibitor of PKR (110). p58IPK interacts directly with PKR and inhibits its kinase activity by preventing dimerisation. Influenza virus partially evades the host's antiviral response by recruiting p58IPK to repress PKR-mediated eIF-2 α phosphorylation (1, 2, 111). In the absence of viral infection, p58IPK overexpression results in malignant transformation. Although the exact mechanism has not been defined, it has been suggested that p58IPK transforms cells by interfering with PKR-regulated pathways. PKR inhibition by p58IPK can stimulate cell growth by disrupting PKR-dependent control of mRNA translation and by blocking PKR-dependent apoptosis (1, 112). Interestingly, an independent antiviral link has recently been identified between both proteins, PKR and p58IPK, involving joint degeneration in mice (113).

PACT. The first protein described as PKR activator was PACT (PKR activating protein) able to activate PKR in response to several stresses (1, 23, 24, 72). PACT is a ubiquitously expressed protein that belongs to the family of dsRNA-binding proteins and has three dsRNA-binding domains. Although most studies show that PACT is necessary for PKR activation in response to different toxic compounds, such as arsenic, H₂O₂, and tunicamycin, PACT-knockout cells and mice did not exhibit significant differences in the response to stressful stimuli compared to a wild-type phenotype (114). Recently, a possible role of PACT as an inhibitor of PKR during HIV-1 replication has been described (115).

TRBP. Trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) is a potent PKR modulator that, in turn, regulates PACT protein. TRPB has generated great interest because of its role in RNA interference and microRNA (miRNA) processing (116). Since TRBP inhibits PACT and PKR activation, both modulators are under intensive analysis as potential therapeutic targets. TRBP is a cellular RNA-binding protein isolated by its ability to bind human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) TAR RNA (117, 118). Proposed TRBP functions include inhibition of PKR activation, regulation of cell proliferation, PKR-independent translational activation, modulation of HIV-1 gene expression through its association with TAR, and the control of mRNA translation. TRBP and PKR form a complex using direct protein-protein interaction through their dsRBDs that prevents PKR activation (116).

Chaperones. Chaperones are PKR modulators that have a spectrum of inhibitors currently being tested in preclinical studies with promising expectations (119). PKR is negatively regulated by the heat-shock protein 90 (Hsp90). The drug geldanamycin, an inhibitor of Hsp90,

disrupts the interaction of the PKR-Hsp90-p23 complex, allowing PKR activation (1, 2). It has been suggested that Hsp90 contributes to chemotherapy resistance, and its inhibition has potential therapeutic interest. Similar to Hsp90, Hsp70 binds to PKR, inhibits PKR phosphorylation, and prevents apoptosis (120). In stressed cells, Hsp70 binds to the Fanconi anemia complementation group C (FANCC) protein and forms a ternary complex with PKR (1, 2). Consequently, hematopoietic cells with FANCC mutations or downregulated Hsp70 show constitutive PKR activation and sensitivity to various cell stress signals as well as to IFN-based therapy (121). Overall, the evaluation of HSPs in cells with different basal levels of PKR activation may open an interesting field of study on the regulation of PKR and its therapeutic modulation.

NPM. Nucleophosmin (NPM; also known as B23) is an abundant and ubiquitously expressed nucleolar phosphoprotein implicated in ribosome biogenesis (1, 122). It binds nucleic acids, has intrinsic RNase activity and also acts as a molecular chaperone shuttling between the nucleus and cytoplasm. NPM has also been implicated in the acute response to environmental stress and controls cell proliferation (1, 2). NPM is frequently overexpressed in tumours of diverse origin (123), and it is translocated in lymphomas and leukemias. NPM interacts with PKR, inhibiting eIF-2 α phosphorylation and PKR-mediated apoptosis (124). It was suggested that the capacity of NPM to inhibit PKR activation could explain how NPM promotes cell proliferation and suppresses the apoptosis pathway (1). We have identified a novel function for NPM involving PKR activity with important antitumour and antiviral consequences, as we analyse in the next section.

3.3. PKR regulation by miRNAs

The first miRNA identified acting on PKR is the noncoding RNA (pre-miR-886) called nc886 (125, 126). MiRNAs, small noncoding regulatory factors 18–25 nt in length, could affect gene expression leading to translational and transcriptional regulation of numerous genes and consequently affect protein expression including kinases. MiRNAs have crucial roles in diverse biological processes, including apoptosis and cell growth. Multiple studies have reported altered miRNA levels in stressed cells or in various disease states, including cancer and neurodegenerative pathologies. Because of its stability and easy detection in body fluids, they are being explored as important biomarkers in various diseases. The extent of miRNA involvement in PKR regulation and activity is still not fully understood, but studies have begun to identify miRNA-mRNA targets of kinases involved in different pathologies. The pre-microRNA nc886 suppresses PKR via direct physical interaction, whereas artificial suppression of nc886 in cholangiocyte cells activated the canonical PKR/eIF2 α cell death pathway (126). The importance of the detection of nc886 has been recently revealed in two studies with oncologic patients where nc886 levels in the tumour were related with the progression of the disease (127). Methylation studies

conducted in PBMCs from acute myeloid leukemia and healthy patients have shown epigenetic variability of nc886 (128), suggesting that the expression levels of this regulator will be variable, and may be decisive in diseases where PKR activity is deregulated.

3.4. PKR regulation by compartmental localisation and post-translational modifications: identification of a novel PKR modification by Sumoylation

Although PKR has been identified in nuclear and cytoplasmic fractions, most activities attributed to PKR occur in the cytoplasm; hence, the role of nuclear PKR remains unclear. However, recent studies have attributed clinical and pathological significance to nuclear PKR, mainly in neurodegenerative diseases (21, 129). Moreover, we and others have shown that PKR can be sequestered in the nucleus by nucleophosmin (1, 2). In acute leukemia, it has been found that PKR exists in diverse molecular weight forms in the nucleus, suggesting that this variance in protein weight is the result of post-translational modifications (129). In fact, PKR can be regulated by different post-translational modifications, including phosphorylation, ubiquitination, and ISGylation. Recent observations resulting from the cooperation between our group and that of Dr Rivas reveal a post-translational modification of PKR by SUMOylation, with a direct role in PKR activation and control of virus infection (130). These results indicate that PKR is modified by both SUMO1 and SUMO2, *in vitro* and *in vivo*. We identified lysine residues Lys-60, Lys-150, and Lys-440 as SUMOylation sites in PKR. Moreover, these results show that SUMO is required for efficient PKR-dsRNA binding, PKR dimerisation, and eIF2 α phosphorylation. SUMO potentiated the inhibition of protein synthesis induced by PKR in response to dsRNA, whereas a PKR SUMOylation mutant was impaired in its ability to inhibit protein synthesis and showed reduced capability to control vesicular stomatitis virus replication and to induce apoptosis in response to vesicular stomatitis virus infection (130). Hence, the analysis of the post-translational regulation and compartmentalisation of PKR offer interesting possibilities to control their role in various diseases.

4. PKR INVOLVEMENT IN SEVERAL DISEASES: ITS POTENTIAL AS A BIOMARKER AND THERAPEUTIC TARGET

The study of the mechanism of action and regulation of PKR has opened the door to a new understanding of the implications and therapeutic possibilities of this protein in several diseases as we have recently published in *FASEB Journal* in the review titled “The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer” under my leadership as corresponding and last author (131). Although further analysis are required involving patient samples, PKR translational research, carried out only in recent years, shows great potential for this kinase as a biomarker and therapeutic target.

My incorporation at the University Hospital

Complex of Granada as a Researcher of the National Health System (Miguel Servet Program) was in 2009, with the aim of transferring our knowledge of PKR and Interferon to certain diseases, conducting studies with patients in order to define their clinical utility. Today, I lead a line of research based on the study of Interferon and PKR in several diseases at the Institute of Biomedical Research of Granada (ibs.GRANADA)/University Hospital Complex of Granada, in the group directed by Dr Marchal, collaborating also in the discovery of novel antitumour drugs.

4.1. The role of PKR in Cancer

In addition to its well-established role in the interferon response, PKR is involved in many cellular pathways exerting various functions on cell growth and tumorigenesis (1, 2, 131). However, PKR's exact role in cancer biology remains controversial. Initially, PKR was thought to be a tumour suppressor. The first evidence that PKR controls cell growth, and consequently may function as an inhibitor of cell proliferation, was obtained after overexpression of PKR in mammalian, insect, and yeast cells, where PKR was observed to suppress cell growth (132, 133). Conversely, the expression of several PKR dominant-negative mutants leads to malignant transformation of NIH 3T3 cells, and is able to cause tumorigenesis in nude mice (134, 135). The apoptotic role of PKR was also in agreement with the notion that this protein could be a tumour suppressor. PKR is able to activate the intrinsic and extrinsic apoptotic routes in cancer cells in response to several stimuli, including antitumour drugs (22, 76). Moreover, PKR has been suggested as an essential part of the antitumour activity of tumour suppressors, such as p53 and PTEN (62, 63, 136). The link between PKR and p53 has been described fundamentally in cancer cells where there is a bidirectional and complex regulatory relationship between both proteins. PKR interacts directly with the C-terminal part of p53 and phosphorylates p53 at the Ser392 residue (1, 2, 62). In addition, PKR is able to promote the proteasomal degradation of p53 in association with GSK-3 β and mouse double minute 2 homologue (Mdm2), independently of translational control (131). Moreover, it has been demonstrated that the ability of p53 to cause cell cycle arrest and regulate transcription of target genes was impaired in PKR-knockout cells (1, 2). In fact, it has been suggested that PKR is a p53 target gene that plays an important role in the tumour-suppressor function of p53 in response to DNA damage stress. In addition, PKR could be transcriptionally regulated by p53 activity in response to some genotoxic stresses (63). On the other hand, we have evaluated the antitumour activity of overexpressed PKR using VV recombinant (Figure 1) with interesting oncolytic results in mice xenotransplanted with prostate cancer cells, publishing these data as first author in 2010 in *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (137). PKR overexpression was able to reduce tumour volume with the advantage of minimising the specific antibodies induced by the animal against the viral vector in

A historical overview of protein kinase PKR...

comparison with the control empty vector, suggesting the potential of VV-PKR construction as an oncolytic vector for cancer (137). A possible mechanism of evasion of PKR activation has been suggested by some cancer cells that are unable to induce apoptosis despite eIF2 α phosphorylation status (131). Moreover, it has been reported that PKR is suppressed or inactivated in some malignancies, and increased PKR expression has been shown to correlate with better prognosis in head and neck cancer, melanoma, lung, and colon cancer (1, 131, 138, 139). Furthermore, some evidence shows that PKR may act as a tumour suppressor in leukemia and could play an important role in haematological disorders (129, 131). Other evidence supporting the antitumour role of PKR comes from studies

demonstrating the importance of PKR/eIF2 α status in cancer response to chemotherapy. Chemotherapeutic drugs such as 5-Fluorouracil, doxorubicin and etoposide are able to induce and activate PKR protein, triggering apoptosis (22, 63, 131, 140).

However, evidence also suggests an antagonist role of PKR in cancer that has challenged the proposed function of PKR as a tumour suppressor. It is now well established that activation of PKR leads to the induction of pro-survival as well as pro-death pathways whose balance depends on the intensity and nature of the activating stimulus as well as the activation or level of expression of the PKR's modulators (Figure 4).

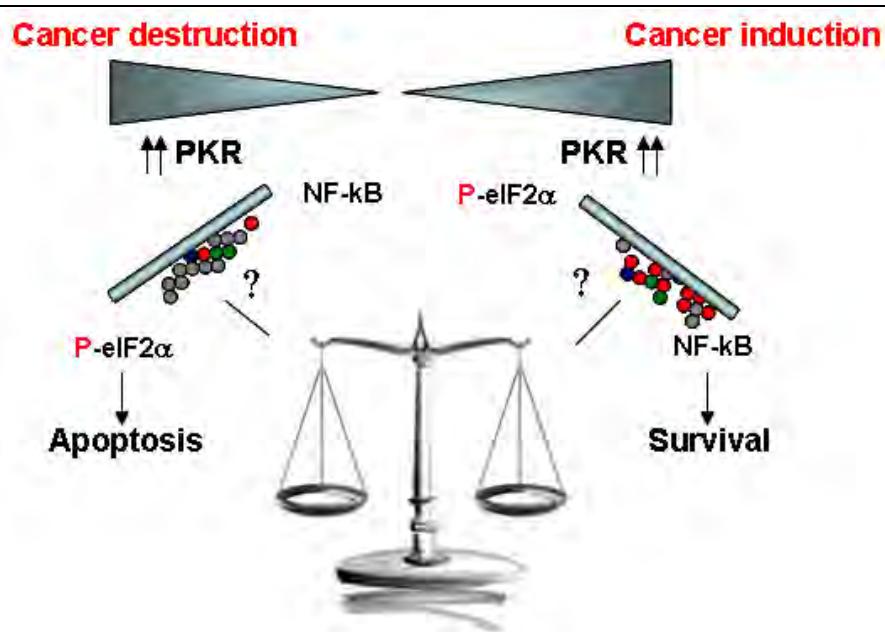


Figure 4. PKR plays an antagonist role in cancer. PKR activation can induce both pro-survival and pro-death pathways. The nature and the intensity of activation stimuli as well as the level of expression of PKR's modulators could decant the balance of consequences of PKR activation. Understanding the cellular factors and signals that regulate PKR in the different diseases would be extremely valuable from a clinical point of view.

In fact, it has been reported that PKR was overexpressed and linked with malignancy in thyroid carcinoma, bronchoalveolar carcinoma, colon, melanoma, lung, breast, liver cancers and some haematological disorders (131, 141, 142). Moreover, PKR involvement has been suggested in the neoplastic process of the proliferative transcription factor NF-κB (143). Curiously, the finding of different expression patterns of PKR/eIF2 α /NF-κB activity, even in the same type of cancer, points to the complexity of the role of PKR in cancer (126). It is important to note that some clinical studies related to PKR analysis did not follow a standardised protocol, differing in the number of tumour samples analysed and in the inclusion criteria of patients, which makes it difficult to compare results between groups. This fact, together with the complexity of PKR signalling and its regulation, highlights the need for consensus on a standardised protocol, specifying patient inclusion criteria, the appropriate number of samples, and

the methodology employed.

4.1.a. PKR involvement in the antiviral activity of several tumour suppressors: p53, Arf, and Rb

An increasing number of tumour suppressor genes are induced by interferons and may play an important role in the control of cell proliferation induced by this cytokine. In addition, pathways triggered by both tumour suppressors and IFN converge as common targets for non-related tumour viruses. The inhibition of the IFN response by animal viruses is explained by the fundamental role that IFN plays to control virus infection. However, the reasons why many viruses, including those that do not require the replication of the host, target tumour suppressor pathways are varied and remain under investigation. In fact, oncogenic viruses frequently target the pathways controlled by tumour suppressor genes, suggesting an extra function for these proteins as antiviral factors.

The classical tumour suppressor induced by IFN is p53,

a protein classified as tumour suppressor by its capacity to induce cell cycle arrest and apoptosis in response to a variety of cellular stresses like DNA damage, transcription inhibition, depletion of nucleotide pools, oncogene expression, and heat shock, among others (144). The induction of p53 by IFN was showed by Takaoka et al. in 2003, and the antiviral activity of this tumour suppressor was reinforced by the fact that it is frequently targeted by viral proteins (145). We demonstrated in an elegant way that VSV is impaired as a result of apoptosis induction via p53 activation, using a mice model expressing an extra-copy of p53 called “super p53 mice” (146). Although in this model we did not directly address the role of PKR in the antiviral effect of p53, the close link between both proteins described above suggests great potential for PKR as a mediator, which should be the subject of other, more specific studies.

The alternative reading frame (ARF) is one of the two unrelated products encoded by the INK4a–ARF locus, one of the most frequently mutated genes in cancer. Initially, ARF activity was linked to p53 stabilisation after oncogenic stress, but p53-independent functions have been also described, placing this tumour suppressor as sensor of different types of stress (147). The control exerted by the tumour suppressor Arf on cellular proliferation is crucial to restrict tumour development. Several reports described the activation of ARF after the expression of viral proteins, type I IFN treatment, or after virus infection, suggestive of a physiological role for ARF during virus infection (1, 2). However, due to the well-known connection between ARF and p53, a direct antiviral activity for ARF independently of p53 activation had not been considered before. Our results revealed that ARF can be induced by viral infection and that the expression of ARF reduces viral infectivity. In fact, ARF is protective against IFN-sensitive viruses such as VSV, Sindbis virus, or a recombinant VV rendered IFN sensitive by deletion of the PKR inhibitory gene, E3L. We have shown that this antiviral effect depends in part, on PKR activation mediated by its release from inhibitory complexes with NPM (148). These results provided a new link between tumour suppression and antiviral host defence, an important step to understand the tumourigenic activity of viruses and a crucial learning for the forthcoming use of viruses as therapeutic agents. Under the direction of Dr Rivas, and in collaboration with Dr Esteban and Dr Serrano, these results were published with my contribution as the first author in the prestigious *EMBO Journal* in 2006 (148).

In addition, we suggested other links between tumour suppression and antiviral host defence, with PKR playing a role in the activation of the NF- κ B pathway through viral infection. The retinoblastoma protein Rb is a tumour suppressor involved in cell cycle control, differentiation, and inhibition of oncogenic properties (149). We showed that virus replication was increased by the absence of Rb tumour suppressor gene expression, and that Rb was required for the activation of the NF- κ B pathway in response to virus infection (150). An analysis of PKR

activation in Rb knockout and wild-type MEFs in response to VSV infection revealed decreased levels of both phospho-PKR and phospho-eIF2 α proteins in the knockout cells, suggesting PKR as a possible mediator. These results revealed a novel role for tumour suppressor Rb in viral infection surveillance and further extend the concept of a link between tumour suppressors and antiviral activity. These results were published in 2009, under the direction of Dr Rivas and Dr Esteban, with my contribution as first author in *Plos One* journal (150).

In summary, these data highlight an important role of different tumour suppressors in the complex innate antiviral host defence, due in part to the involvement of PKR activity. While the field of tumour suppressors with antiviral function is in its infancy, future work will unravel a wider significance of tumour suppressors in host cell defence against pathogens. Understanding how tumour suppressors exert their antiviral function will be relevant in the potential use of viruses as oncolytic agents and for gene therapy in cancer, as we have reviewed in depth in both *Carcinogenesis* and *Future Virology* journals (151, 152).

4.1.b. PKR as a molecular target of the 5-fluorouracil chemotherapeutic drug

The chemotherapeutic drug 5-FU is widely used in the treatment of a range of cancers, being the first and second line of treatment in combination in colorectal cancer patients, and the third line in the palliative care of numerous cancer types. However, adverse effects and resistance to the drug remain major clinical problems. Since defects in the mediators of apoptosis may account for chemoresistance, the identification of new targets involved in 5-FU-induced apoptosis is of great clinical interest. The p53 tumour suppressor has been reported as an important protein involved in 5-FU-induced apoptosis (153). However, several works have shown that apoptosis can also occur in mutant p53 cell lines by a mechanism still unknown, with p53 playing the role of a biomarker of response to 5-FU in tumours pending to find new targets involved in 5-FU sensibility or resistance. We have identified PKR as a key molecular target of 5-FU involved in apoptosis induction in human colon and breast cancer cell lines (154). We analysed PKR distribution and activation, apoptosis induction, and cytotoxic effects during 5-FU and 5-FU/IFN α treatment in several colon and breast cancer cell lines with different p53 status. PKR protein was activated by 5-FU treatment in a p53-independent manner, inducing phosphorylation of eIF-2 α and cell death by apoptosis. Furthermore, PKR interference promoted a decreased response to 5-FU treatment and those cells were not affected by the synergistic antitumour activity of 5-FU/IFN α combination. We have shown that PKR is activated in absence of p53 expression and, whereas PKR knockdown decreased 5-FU-mediated apoptosis, cell death was completely abolished in absence of both PKR and p53 proteins. These results suggest the importance of both proteins in 5-FU-induced apoptosis, and the relevance acquired by PKR in

A historical overview of protein kinase PKR...

tumour cells where p53 is mutated, considering that more than 50% of colon tumours are deficient in p53 activity. These results, taken together, provide evidence that PKR is a key molecular target of 5-FU with potential relevance in the clinical use of this drug (Figure 5), (154). A method of obtaining useful data to assess and predict the response to treatment with pyrimidine analogues has been protected by international patent (155). My contribution in this field was as corresponding author of published data in *Plos One* journal in 2011 and the main inventor of the patent. Moreover, we have recently published a patent review of 5-FU derivates from 2012 to 2014 and their implications for standard and novel therapies in *Expert Opinion on Therapeutic Patents* journal (157). I am currently the principal investigator of two projects funded by the Andalusian regional government and the Carlos III Institute of Health (ISCIII) whose main objective is to analyse the biomarker potential of PKR in patients with colon cancer treated with therapies based on 5-FU drugs.

4.1.c. Novel antitumour drugs with high capacity to induce eIF2 α phosphorylation and cell death by apoptosis: Bozepinib, a promising drug against cancer stem cells, induces PKR-mediated apoptosis and synergises with IFN

Dr Campos, Dr Marchal, Dr Aranega and co-workers have a long history designing and researching new antitumour drugs that are more effective and less toxic than currently standard cancer chemotherapy. My contribution to the group actually directed by Dr Marchal has helped determine the effectiveness of various drugs to induce the phosphorylation of eIF2 α and/or PKR-mediated apoptosis. Moreover, my experience with IFN has contributed to create a new line of research in the group that aims to enhance the effectiveness of these novel drugs in combination with biological therapies like interferons, among others.

The most studied drug by our group is called Bozepinib [(RS)-2,6-dichloro-9-[1-(p-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9H-purine], which was designed by the group directed by Dr Campos at the University of Granada (Figure 6), (157). Bozepinib is a potent antitumour compound that is able to induce apoptosis in breast cancer cells, as we published in 2011, showing a 50% inhibitory concentration (IC50) of 0.166 μ M against the MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cell line and inducing high levels of apoptosis in tumour cells without acute toxicity in mice (157). My contribution in 2013 as corresponding author and last author of the data published in the *Drug Design, Development and Therapy* journal showed that Bozepinib also has antitumour activity in colon cancer cells, showing inhibitory concentration (IC50) values 50% lower than those described for breast cancer cells, and suggesting great potential for this synthetic drug in the treatment of cancer (158). We identified PKR as a target of Bozepinib, being upregulated and activated by the drug. However, p53

was not affected and was not necessary for the induction of apoptosis in either breast or colon cancer cells. In addition, the efficacy of Bozepinib was improved when combined with IFN α cytokine, which enhanced Bozepinib-induced apoptosis with involvement of protein kinase PKR (Figure 5). Moreover, we reported for the first time that, in combined therapy, IFN α induces a clear process of autophagosome formation. Finally, we observed that a minor population of caspase 3-deficient MCF-7 breast cancer cells persisted during long-term treatment with lower doses of Bozepinib and the Bozepinib/IFN α combination. Curiously, this population showed β -galactosidase activity and a percentage of cells arrested in S phase, suggesting that tumour cells enter in senescence, more evidently so in cells treated with the Bozepinib/IFN α combination than in cells treated with Bozepinib or IFN α alone. Considering the resistance of some cancer cells to conventional chemotherapy, these data suggested that combinations enhancing the diversity of the cell death outcome might succeed in delivering more effective and less toxic chemotherapy (158).

Given the great potential exhibited by Bozepinib, we have recently looked into its mechanism of action with very interesting results (159). Bozepinib shows selectivity on cancer cells and an inhibitory effect over kinases involved in carcinogenesis, proliferation, and angiogenesis. The cytotoxic effects of Bozepinib were observed in both breast and colon cancer cells expressing different receptor patterns. Bozepinib inhibited HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) signalling pathway and JNK (c-Jun-N terminal kinase) and ERKs (extracellular signal regulated kinases) kinases. In addition, Bozepinib has an inhibitory effect on AKT (protein kinase B) and VEGF (vascular endothelial growth factor) together with anti-angiogenic and anti-migratory activities. Interestingly, Bozepinib inhibited both mammo- and colonospheres formation regulating genes related to stem properties such as c-MYC, β -CATENIN, SOX2 and GLI-3 hedgehog-signalling repressor ,suggesting activity against cancer stem-like cells (Figure 5). Finally, Bozepinib shows *in vivo* anti-tumour and anti-metastatic efficacy in xenotransplanted nude mice without presenting sub-acute toxicity. These findings support the need for further studies on the therapeutic potential of Bozepinib for cancer patients and were recently published in the *Oncotarget* journal under my leadership as corresponding author (159).

Also designed by the group lead by Dr Campos, other purines-derived compounds with antitumour efficacy that we have characterised as potent inducers of eIF2 α phosphorylation and apoptosis include the (R,S)-Benzofused 1,5-Oxatetepine moiety tethered to purines compounds, the (RS)-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxaheteroin-2-ylmethyl)-9H-purines agents, and several enantiospecific heterocycles linked to purines (160-162).

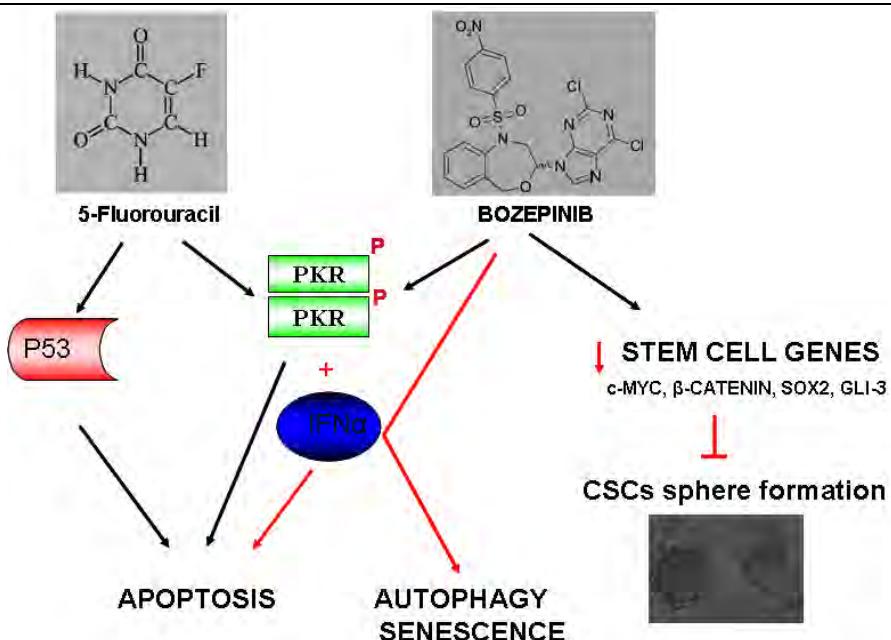
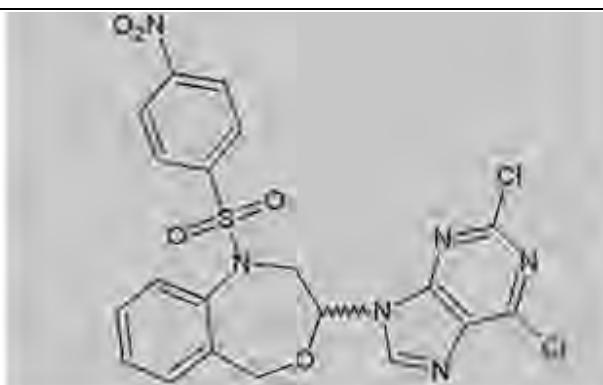


Figure 5. PKR is a molecular target of both anticancer drugs, the chemotherapeutic 5-Fluorouracil and the novel compound Bozepinib. 5-FU and Bozepinib activates PKR inducing cancer cell death by apoptosis. Whereas 5-FU induces PKR activation in a p53-independent manner, Bozepinib does not activate p53. Both drugs synergized its antitumour effect in combination with IFN α . Moreover Bozepinib is able to induce autophagy and senescence in cancer cells in combination with IFN α . In addition Bozepinib inhibits both mammo and colono-spheres formation regulating genes related to stem properties such as c-MYC, β -CATENIN, SOX2 and GLI-3 hedgehog-signaling repressor.



Bozepinib

[(RS)-2,6-dichloro-9-[1-(p-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9H-purine]

Figure 6. Bozepinib structure [(RS)-2,6-dichloro-9-[1-(p-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9H-purine]. We have previously published Bozepinib structure in Lopez-Cara *et al.* (157).

4.2. PKR as a molecular target in neurodegenerative diseases

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder marked by senile plaques composed of amyloid- β

(A β) peptide, neurofibrillary tangles made of hyperphosphorylated T-tau protein, neuronal loss, and neuroinflammation, where the apoptotic death characterises most of affected neurons. In 2002, histological methods showed that activated PKR was

A historical overview of protein kinase PKR...

accumulated in degenerating neurons in the brain of patients with AD (163). Moreover, a number of recent studies have implicated PKR in the pathogenesis of other neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis (164-166). Previously, it had been demonstrated that the A β peptide could induce PKR activation in primary neuronal cultures, triggering cell death by apoptosis (131). Therefore, PKR activation was considered as a secondary consequence of extracellular senile plaque formation contributing to neuronal degeneration. However, recent evidence indicates a direct involvement of PKR activation in the pathology of the disease promoting BACE I expression, an enzyme involved in the accumulation of A β peptide (131, 167). Moreover, PKR is also involved in the mechanism of senile plaque formation through tau phosphorylation via glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) activation (168). On the other hand, PKR seems to be involved in the inflammatory process that has been suggested to contribute to AD (131, 169). Several works have shown how PKR inhibition prevented the neuronal loss by apoptosis, suggesting the high potential of PKR as a therapeutic target in neurodegenerative diseases (131, 169). In addition, data showing PKR involvement in learning and memory suggest that PKR inhibition could benefit humans, especially those experiencing age-related memory loss or the most devastating memory loss associated with AD (170). Although different chemical compounds and specific peptides protect neurons from apoptosis by inhibiting PKR, unfortunately they also display high toxicity, induce undesirable effects outside the nervous system, or are not able to cross the blood brain barrier (131, 169). It is therefore necessary to continue looking for new specific inhibitors of PKR. Due to the fact that PKR is an ubiquitous and multifunctional protein, the knowledge of the components involved in how and why PKR is more active in these pathologies would help find alternative drugs to target the abnormal activation of PKR and contribute to the therapeutic control of neurodegenerative diseases.

4.3. Is PKR involved in inflammatory diseases?

Since PKR is induced by IFN α and the proinflammatory NF- κ B transcription factor is a target of the kinase, its involvement in inflammatory processes has been suggested in several works (1, 2). In fact, experiments using primary mouse cocultures containing neurons, astrocytes, and microglia have shown that inhibition of PKR prevents activation of NF- κ B, as well as a strong decrease in production and release of tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β), (171). Several studies have shown a significant increase in various inflammatory mediators in plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with AD compared to age-matched controls (172). Interestingly, levels of both total PKR and phospho-PKR were modified in blood lymphocytes of patients with AD compared with control individuals, and the upregulation of these proteins in cerebrospinal fluid was suggested as a potential biomarker

for AD (131, 169).

Moreover, NF κ B regulates the cytokines involved in several inflammatory diseases like rheumatoid arthritis and lupus erythematosus, such as IL-6, TNF- α , and IL-1. The kinase PKR has been involved in the induction of TNF- α and IL-6 in response to lipopolysaccharide (LPS) in fibroblasts and alveolar macrophages (173). Interestingly, transcription of IL-1 β , TNF- α and IL-6 decreased in mice deficient in the expression of PKR when subjected to a high-fat diet (174). The inhibition of PKR with the C16 compound in PBMCs isolated from patients significantly decreased the expression and production of cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-6, suggesting that the inhibition of PKR at the peripheral level can decrease the inflammatory process in Alzheimer's patients (172). However, the effect of PKR inhibition over these cytokines in autoimmune diseases has not yet been explored.

Recently, it has been shown that PKR is an important key element of the inflammasome complex in macrophages. PKR interacts with the NOD-like receptor family, which, together with caspase 1 (Casp-1), integrates this interesting complex, inducing high levels of the HMGB1 cytokine (175). High levels of this cytokine and of IL-1 β have also been linked with inflammatory processes involved in AD, autoimmune diseases, and cancer (131). In addition, the PKR gene deletion, or specific drug inhibition, severely diminished inflammasome activation in response to various stimuli (131). Therefore, the analysis of PKR in cancer, neurodegeneration, and autoimmune diseases in the context of the inflammasome complex can provide new evidence on the connection of PKR with these pathologies with an interesting therapeutic potential.

5. CONCLUDING REMARKS AND FUTURE PROSPECTS

Since PKR was discovered, its mechanism of action has been gradually brought to light in several international publications, an effort to which we have made important contributions. The involvement of PKR in interferon-mediated activities, in the induction of apoptosis, in the activation of proinflammatory transcription factor NF κ B, along with its role in signalling pathways linking numerous biological events which include antiviral defence and cell growth, are clear indicators of the great potential that this protein may have in a variety of pathologies (Figure 7). The identification of PKR as a target of both conventional chemotherapeutic and novel drugs highlights the need to carry out translational studies with patients to validate its potential as a biomarker of important diseases like cancer and neurodegeneration. Moreover, the PKR deregulation showed in diseases like Alzheimer and inflammatory processes underlines the need to find applicable inhibitors of this kinase. Since PKR is expressed in almost all cells, its therapeutic potential could arise from the factors involved in its regulation. In fact, understanding the cellular factors and signals that regulate the role of PKR in the different diseases would be extremely valuable from a clinical point of view.

The present review has shown the importance to conduct continued basic molecular and preclinical studies. Further along the road, clinical studies could show how an application could be made to diagnostics and

pharmacology. With personalised medicine looming in the future and the genetic and proteomic background of each patient determining specific approaches, PKR could play an extremely relevant clinical role.

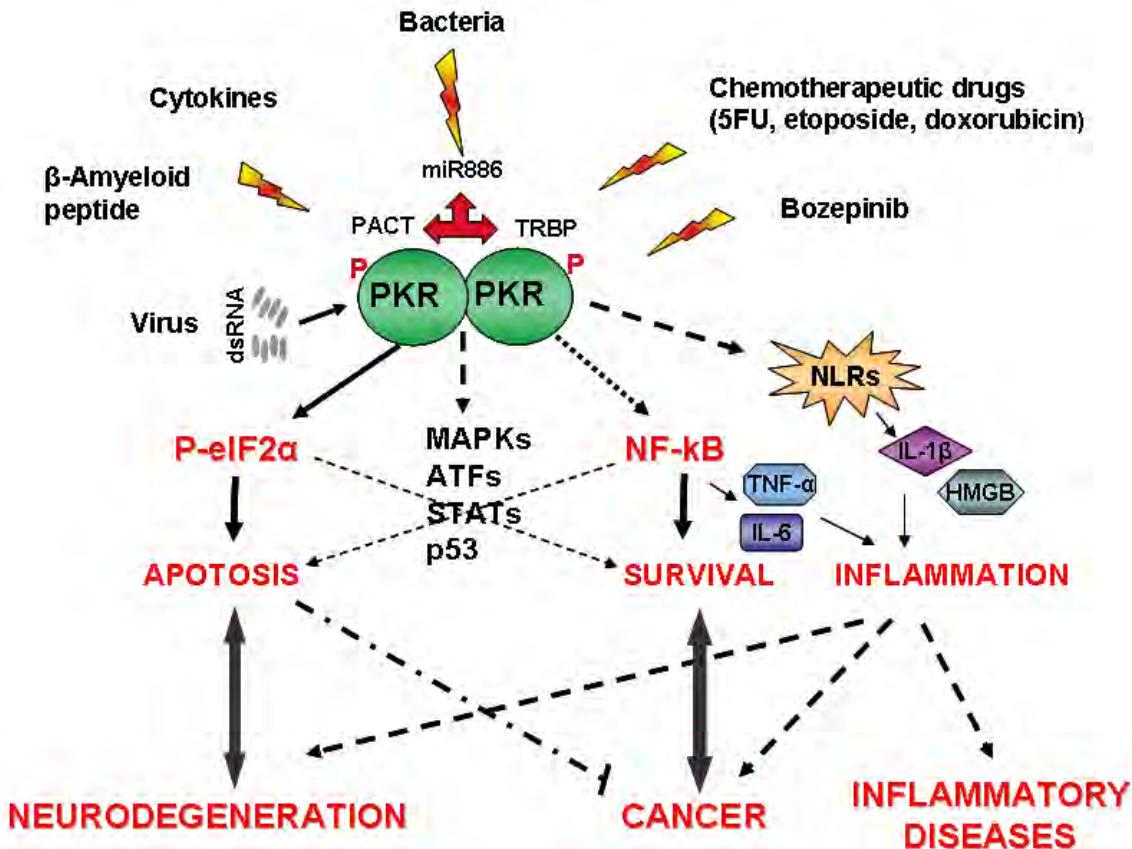


Figure 7. Representative diagram of PKR activation and modulation: pathological consequences of an unbalanced PKR activity. PKR is activated by a variety of cellular stresses including viral and bacterial infections, cytokines, and chemotherapeutic drugs. PKR activation involves its autophosphorylation, which triggers the phosphorylation of translation initiation factor eIF2 α and the activation of the proinflammatory NF- κ B transcription factor. Both effects contribute to induce apoptosis cell death or to induce cell proliferation depending on the stimulus and unknown factors. In addition, PKR is involved in inflammasome activation and cytokines liberation as IL-6, TNF α and HMGB among others. Moreover PKR is involved in various pathways that engage multiple genes, including MAPKs, ATF, STATs, and p53, among others. Diverse PKR modulators have been identified, highlighting the PKR activator PACT, the inhibitor TRBP, and the microRNA miR886. An unbalanced effect induced by dysregulated PKR activity could contribute to neurodegeneration, cancer and inflammatory diseases.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The author is thankful to members of the Drs Esteban and Marchal groups who worked on the PKR project for their contribution. Special thanks to Dr Esteban for giving me the opportunity to work in the exciting world of PKR kinase, and special thanks to Dr Marchal to facilitate my leadership in this research. Garcia MA is funded by the Andalusian regional government and the Carlos III Institute of Health.

6. REFERENCES

1. Garcia MA, Gil J, Ventoso I, et al. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70:1032-60.

2. Garcia MA, Meurs EF, Esteba M. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie* 2006; 89:799-811.
3. Samuel CE. Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology* 1991;183(1):1-11.
4. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8-32.
5. Borden EC, Williams BR. Interferon-stimulated genes and their protein products: what and how?. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31(1):1-4.

A historical overview of protein kinase PKR...

6. Metz DH, Esteban M. Interferon inhibits viral protein synthesis in L cells infected with vaccinia virus. *Nature* 1962;238(5364):385-8.
7. Friedman RM, Metz DH, Esteban M, et al. Mechanism of interferon action: inhibition of viral messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts. *J Virol* 1972;10(6):1184-98.
8. Kerr IM, Brown RE, Ball LA, et al. Increased sensitivity of cell-free protein synthesis to double-stranded RNA after interferon treatment. *Nature* 1974; 250:57-59.
9. Roberts WK, Hovanessian A, Brown RE, Clemens MJ, Kerr IM. Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature* 1976;264:477-480.
10. Farrell PJ, Balkow K, Hunt T, Jackson RJ, Trachsel H. Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. *Cell* 1977;11 (1):187-200.
11. Krust B, Galabru J, Hovanessian AG. Further characterisation of the protein kinase activity mediated by interferon in mouse and human cells. *J Biol Chem* 1984;259(13):8494-8.
12. Laurent AG, Krust B, Galabru J, Svab J, Hovanessian AG. Monoclonal antibodies to an interferon-induced Mr 68,000 protein and their use for the detection of double-strandedRNA-dependent protein kinase in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(13): 4341-5.
13. Meurs E, Chong K, Galabru J, et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon, *Cell* 1990; 62 (2) 379-390.
14. Galabru J, Katze MG, Robert N, Hovanessian AG. The binding of double-stranded RNA and adenovirus VAI RNA to the interferon-induced protein kinase, *Eur. J. Biochem.* 1989; 178 (3) 581-589.
15. Hovanessian AG, Galabru J, Riviere Y, Montagnier L. Efficiency of poly(A).poly(U) as an adjuvant. *Immunol. Today* 1988; 9 (6) 161-162.
16. Clemens MJ, Hershey JW, Hovanessian AC, et al. PKR: proposed nomenclature for the RNA-dependent protein kinase induced by interferon, *J. Interferon Res.* 1993; 13 (3) 241.
17. Kuhen KL, Shen X, Carlisle ER, Richardson AL, Weier HU, Tanaka H, Samuel CE. Structural organization of the human gene (PKR) encoding an interferon-inducible RNA-dependent protein kinase (PKR) and differences from its mouse homolog. *Genomics* 1996; 36:197–201.
18. Kuhen KL and Samuel CE. Isolation of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase Pkr promoter and identification of a novel DNA element within the 5'-flanking region of human and mouse Pkr genes. *Virology* 1997; 6;227(1):119-30.
19. Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A. The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci* 2013; 70, 3493–3511.
20. Patel S, Bllose JM, Sokoloski JE, et al. Specificity of the double-stranded RNAbinding domain from the RNA-activated protein kinase PKR for double-stranded RNA: insights from thermodynamics and small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* 2012; 51, 9312–9322.
21. Morel M, Couturier J, Lafay-Chebassier C, Paccalin M, Page G. PKR, the double stranded RNA-dependent protein kinase as a critical target in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2009;13:1476-88.
22. Garcia MA, Carrasco E, Aguilera M, et al. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes PKR-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells. *PLoS ONE* 2011; 6, e23887.
23. Marques JT, White CL, Peters GA, Williams BR, Sen GC. The role of PACT in mediating gene induction, PKR activation, and apoptosis in response to diverse stimuli. *J. Interferon Cytokine Res.* 2008; 28, 469–476.
24. Singh M, Patel RC. Increased interaction between PACT molecules in response to stress signals is required for PKR activation. *J. Cell. Biochem.* 2012; 113, 2754–2764.
25. Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, et al. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptorassociated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signalling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (19) 16713-16719.
26. Williams BR. Signal integration via PKR, *Sci. STKE* 2001; 89-RE2.
27. Clemens MJ. PKR- a protein kinase regulated by double-stranded RNA, *Int J. Biochem Cell Biol.* 1997; 29 (7) 945-949.
28. Nanduri S, Carpick B, Yang Y, Williams BR, Qin J. 1H, 13C, 15N resonance assignment of the 20 kDa double stranded RNA binding domain of PKR, *J. Biomol. NMR* 1998; 12 (2) 349-351.
29. Dey M, Cao C, Dar AC, et al. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition, *Cell* 2005;122 (6) 901-913.
30. Zhang F, Romano PR, Nagamura-Inoue T, et al. Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop, *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (27) 24946-24958.
31. Su Q, Wang S, Baltzis D, Qu LK, Wong AH, Koromilas AE. Tyrosine phosphorylation acts as a molecular switch to full-scale activation of the eIF2alpha RNA-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103 (1) 63-68.

32. Dey M, Cao C, Dar AC, *et al.* Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* 2005; 122, 901–913
33. Wu S, Kumar KU, Kaufman RJ. Identification and requirement of three ribosome binding domains in dsRNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochemistry* 1998; 37 (39) 13816-13826.
34. Zhou HR, He K, Landgraf J, Pan X, Pestka JJ. [Direct activation of ribosome-associated double-stranded RNA-dependent protein kinase \(PKR\) by deoxynivalenol, anisomycin and ricin: a new model for ribotoxic stress response induction.](#) *Toxins (Basel)*. 2014; 6(12):3406-25.
35. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16:225–260.
36. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002;109 S81-S96
37. Hinz M, Scheidereit C. [The IκB kinase complex in NF-κB regulation and beyond.](#) *EMBO Rep.* 2014; 15(1):46-61.
38. Visvanathan KV, and Goodbourn S. Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human betainterferon promoter. *EMBO J.* 1989; 8:1129–1138.
39. Maran AR, Maitra K, Kumar A, *et al.* Blockage of NF-kappa B signaling by selective ablation of an mRNA target by 2'-5A antisense chimeras. *Science* 1994; 265:789–792.
40. Yang, YL, Reis LF, Pavlovic J, *et al.* Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 1995; 14: 6095–6106.
41. Gil J, Alcami J, Esteban M. Induction of apoptosis by doublestranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-κB. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19:4653–4663.
42. Gil J, Alcami J, Esteban M. Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* 2000; 19:1369–1378.1999.
43. Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BR. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:6288–6292.
44. Kumar A, Yang YL, Flati V, *et al.* Deficient cytokine signalling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. *EMBO J.* 1997 ; 16:406–416.
45. Yamaoka SG, Courtois C, Bessia ST, *et al.* Complementation cloning of NEMO, a component of the IκB kinase complex essential for NF-κB activation. *Cell* 1998 ; 93:1231–1240.
46. Gil J, Rullas J, Garcia MA, Alcami J, Esteban M. The catalytic activity of dsRNA-dependent protein kinase, PKR, is required for NF-kappaB activation. *Oncogene* 2001; 20:385–394.
47. Chu WM, Ostertag D, Li ZW, *et al.* JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* 1999; 11:721–731.
48. Bonnet MC, Daurat C, Ottone C, Meurs EF. The N-terminus of PKR is responsible for the activation of the NF-kappaB signaling pathway by interacting with the IKK complex. *Cell Signal.* 2006;18(11):1865-75.
49. Dabo S, Meurs EF. dsRNA-Dependent Protein Kinase PKR and its Role in Stress, Signaling and HCV Infection. *Viruses* 2012;4, 2598-2635.
50. Chung JY, Park YZ, Ye H, Wu H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J. Cell Sci.* 2002; 115:679–688.
51. Gil J, Garcia MA, P. Gomez-Puertas P, *et al.* TRAF family proteins link PKR with NF-κB activation. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24:4502–4512.
52. Oganesyan G, Saha SK, Guo B, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006; 439:208– 211.
53. Ogolla PS, Portillo JA, White CL. The protein kinase double-stranded RNA-dependent (PKR) enhances protection against disease cause by a non-viral pathogen. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003557.
54. Munir M, Berg M. The multiple faces of proteinkinase R in antiviral defense. *Virulence* 2013; 4:1, 85–89.
55. Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J. Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe* 2010; 7:354-61.
56. Yoo JS, Takahasi K, Ng CS, *et al.* [DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation.](#) *PLoS Pathog.* 2014;10(3):e1004012.
57. Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, *et al.* [Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity.](#) *PLoS One.* 2012;7(8):e43031.
58. Ramana CV, Grammatikakis N, Chernov M, *et al.* Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways, *EMBO J.* 2000; 19 (2) 263-272.
59. Lee JH, Park EJ, Kim OS, *et al.* Doublestranded RNA-activated protein kinase is required for the LPS-induced activation of STAT1 inflammatory signaling in rat brain glial cells, *Glia* 2005; 50 (1) 66-79.
60. Deb A, Zamanian-Daryoush M, Xu Z, Kadereit S, Williams BR. Protein kinase PKR is required for platelet-derived growth factor signalling of c-fos gene

A historical overview of protein kinase PKR...

- expression via Erks and Stat3, EMBO J. 2001; 20 (10) 2487-2496.
61. Morimoto H, Baba R, Haneji T, Doi Y. Double-stranded RNA-dependent protein kinase regulates insulin-stimulated chondrogenesis in mouse clonal chondrogenic cells, ATDC-5. *Cell Tissue Res.* 2013;351(1):41-7.
 62. Cuddihy AR, Wong AH, Tam NW, Li S, Koromilas AR. The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* 1999;18, 2690–2702
 63. Yoon CH, Lee ES, Lim DS, Bae YS. PKR, a p53 target gene, plays a crucial role in the tumor-suppressor function of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106, 7852–7857.
 64. Goh KC, deVeer MJ, Williams BR. The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin, *EMBO J.* 2000;19 (16) 4292-4297.
 65. Silva AM, Whitmore M, Xu Z, Jiang Z, Li X, Williams BR. Protein kinase R (PKR) interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation. *J Biol Chem.* 2004; 3;279(36):37670-6.
 66. Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Garcia MA, Zaballos A, Esteban M. Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:18734–18745.
 67. Driver JA, Beiser A, Au R, et al. Inverse association between cancer and Alzheimer's disease: results from the Framingham Heart Study. *BMJ* 2012; 344, e1442.
 68. Lee SB, Esteban M. The interferon-induced double-strandedRNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 1994; 199:491–496.
 69. Der SD, Yang YL, Weissmann C, Williams BR. A doublestranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:3279–3283.
 70. Srivastava SP, Kumar KU, Kaufman RJ. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:2416–2423.
 71. Onuki R, Bando Y, Suyama E, et al. An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycininduced apoptosis and Alzheimer's disease, *EMBO J.* 2004;23 (4) 959-968.
 72. Bennett RL, Blalock WL, May WS. Serine 18 phosphorylation of, R.A.X., the PKR activator, is required for PKR activation and consequent translation inhibition, *J. Biol. Chem.* 2004; 279 (41) 42687-42693.
 73. Gil J, Alcami J, Esteban M. Induction of apoptosis by doublestranded- RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kB. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19:4653–4663.
 74. Ashkenazi A. [Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions](#). *J Clin Invest.* 2015;125(2):487-9.
 75. Gil J, Esteban M. The interferon-induced protein kinase (PKR) triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* 2000; 19:3665–3674.
 76. Gil J, Garcia MA, Esteban M. Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett.* 2002; 529:249–255.
 77. Clavarino G, Cláudio N, Couderc T et al. Induction of GADD34 is necessary for dsRNA-dependent interferon-β production and participates in the control of Chikungunya virus infection. *PLoS Pathog.* 2012; 8(5):e1002708.
 78. Domingo-Gil E, Toribio R, Nájera JL, Esteban M, Ventoso. [Diversity in viral anti-PKR mechanisms: a remarkable case of evolutionary convergence](#). *PLoS One.* 2011; 2;6(2):e16711.
 79. Sánchez-Sampedro L, Perdigero B, Mejías-Pérez E, García-Arriaza J, Di Pilato M, Esteban M. [The evolution of poxvirus vaccines](#). *Viruses.* 2015; 7(4):1726-803.
 80. Paez E, Esteban M. Resistance of vaccinia virus to interferon is related to an interference phenomenon between the virus and the interferon system. *Virology* 1984; 134:12–28.
 81. Symons JA, Alcami A, Smith GL. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 1995; 81:551–560.
 82. Willis KL, Langland JO, Shisler JL. [Viral double-stranded RNAs from vaccinia virus early or intermediate gene transcripts possess PKR activating function, resulting in NF-κappaB activation, when the K1 protein is absent or mutated](#). *J Biol Chem.* 2011;286(10):7765-78.
 83. Carroll K, Elroy-Stein O, Moss B, Jagus R. Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:12837–12842.
 84. Kim YG, Muralinath M, Brandt T, et al. A role for Z-DNA binding in vaccinia virus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100:6974–6979.
 85. Sharp TV, Moonan F, Romashko A, Joshi B, Barber GN, Jagus R. The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 1998; 250:302–315.

86. Garcia MA, Guerra S, Gil J, Jimenez V, Esteban M. Antiapoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L. *Oncogene* 2002; 21:8379–8387.
87. de la Cruz-Herrera CF, Campagna M, García MA, et al. *Activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by small ubiquitin-like modifier (SUMO)*. *J Biol Chem*. 2014; 289(38):26357-67.
88. Esteban M, Garcia MA, Domingo-Gil E, Arroyo J, Nombela C, Rivas C. The latency protein LANA2 from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits apoptosis induced by dsRNA-activated protein kinase but not RNase L activation. *J. Gen. Virol.* 2003; 84:1463–1470.
89. Munoz-Fontela C, Collado M, Rodriguez E, Garcia MA, et al. Identification of a nuclear export signal in the KSHV latent protein LANA2 mediating its export from the nucleus. *Exp. Cell Res.* 2005; 311:96–105.
90. Gomez CE, Vandermeeren A M, Garcia MA, Domingo-Gil E, Esteban M. Involvement of PKR and RNase L in translational control and induction of apoptosis after hepatitis C polyprotein expression from a vaccinia virus recombinant. *Virol. J.* 2005; 2:81.
91. Spurgeon ME, Ornelles DA. *The adenovirus E1B 55-kilodalton and E4 open reading frame 6 proteins limit phosphorylation of eIF2alpha during the late phase of infection*. *J Virol.* 2009;83(19):9970-82.
92. Wang Z, Mir MA. *Andes virus nucleocapsid protein interrupts protein kinase R dimerization to counteract host interference in viral protein synthesis*. *J Virol.* 2015; 89(3):1628-39.
93. Ikegami T, Narayanan K, Won S, Kamitani W, Peters CJ, Makino S. *Dual functions of Rift Valley fever virus NSs protein: inhibition of host mRNA transcription and post-transcriptional downregulation of protein kinase PKR*. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1171 Suppl 1:E75-85.
94. Wang X, Liao Y, Yap PL, Png KJ, Tam JP, Liu DX. Inhibition of protein kinase R activation and upregulation of GADD34 expression play a synergistic role in facilitating coronavirus replication by maintaining de novo protein synthesis in virus-infected cells. *J Virol.* 2009 ; 83(23):12462-72.
95. Schümann M, Gantke T, Mühlberger E. Ebola virus VP35 antagonizes PKR activity through its C-terminal interferon inhibitory domain. *J Virol.* 2009; 83(17):8993-7.
96. Tu YC, Yu CY, Liang JJ, Lin E, Liao CL, Lin YL. *Blocking double-stranded RNA-activated protein kinase PKR by Japanese encephalitis virus nonstructural protein 2A*. *J Virol.* 2012; 86(19):10347-58.
97. Chen X, Xia J, Zhao Q, et al. Eukaryotic initiation factor 4AI interacts with NS4A of Dengue virus and plays an antiviral role. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 22;461(1):148-53.
98. Sudha G, Yamunadevi S, Tyagi N, Das S, Srinivasan N. *Structural and molecular basis of interaction of HCV non-structural protein 5A with human casein kinase 1α and PKR*. *BMC Struct Biol.* 2012; 13;12:28.
99. Dabo S, Meurs EF. *dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection*. *Viruses.* 2012;4(11):2598-635.
100. Lussignol M, Queval C, Bernet-Camard MF, et al. The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J Virol.* 2013;87(2):859-71.
101. Poppers J, Mulvey M, Perez C, Khoo D, Mohr I. Identification of a lytic-cycle Epstein-Barr virus gene product that can regulate PKR activation. *J Virol.* 2003; 77(1):228-36.
102. Burýsek L, Pitha PM. Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double-stranded RNA-activated protein kinase. *J Virol.* 2001;75(5):2345-52.
103. Bierle CJ, Semmens KM, Geballe AP. *Double-stranded RNA binding by the human cytomegalovirus PKR antagonist TRS1*. *Virology.* 2013; 20;442(1):28-37.
104. Sharma K, Tripathi S, Ranjan P, et al. *Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation*. *PLoS One.* 2011;6(6):e20215.
105. Min JY, Li S, Sen GC, Krug RM. *A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis*. *Virology.* 2007; 20;363(1):236-43.
106. Groskreutz DJ, Babor EC, Monick MM, Varga SM, Hunninghake GW. *Respiratory syncytial virus limits alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2alpha) phosphorylation to maintain translation and viral replication*. *J Biol Chem.* 2010;285(31):24023-31.
107. Chi PI, Huang WR, Lai IH, Cheng CY, Liu HJ. The p17 nonstructural protein of avian reovirus triggers autophagy enhancing virus replication via activation of phosphatase and tensin deleted on chromosome 10 (PTEN) and AMP-activated protein kinase (AMPK), as well as dsRNA-dependent protein kinase (PKR)/eIF2α signaling pathways. *J Biol Chem.* 2013; 1;288(5):3571-84.
108. Yoon CH, Kim SY, Byeon SE, et al. p53-derived host restriction of HIV-1 replication by protein kinase R-mediated Tat phosphorylation and inactivation. *J Virol.* 2015; 89(8):4262-80.
109. Rathore AP, Ng ML, Vasudevan SG. Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2α phosphorylation. *Virol J.* 2013; 28;10:36.
110. Lee TG, Tang N, Thompson S, Miller J, Katze MG. The 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is a member of the tetratricopeptide

A historical overview of protein kinase PKR...

- repeat family of proteins. Mol. Cell. Biol. 1994; 14:2331–2342.
111. Jiang P, Wen J, Song H, Chen X, Sun Y, Huo X, Zhang D. Characterization of porcine P58IPK gene and its up-regulation after H1N1 or H3N2 influenza virus infection. *J Clin Virol.* 2013;58(1):120-6.
112. Gale M, Blakely CM, Darveau A, Romano PR, Korth MJ, Katze MG. P52rIPK regulates the molecular cochaperone P58IPK to mediate control of the RNA-dependent protein kinase in response to cytoplasmic stress. *Biochemistry* 2002; 41:11878–11887.
113. Gilbert SJ, Meakin LB, Bonnet CS, et al. Deletion of P58(IPK), the Cellular Inhibitor of the Protein Kinases PKR and PERK, Causes Bone Changes and Joint Degeneration in Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:174.
114. Peters GA, Seachrist DD, Keri RA, Sen GC. The double-stranded RNA-binding protein, PACT, is required for postnatal anterior pituitary proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009; 106, 10696–10701.
115. Clerzius G, Shaw E, Daher A, et al. The PKR activator, PACT, becomes a PKR inhibitor during HIV-1 replication. *Retrovirology* 2013; 10, 96.
116. Daniels SM, Gatignol A. The multiple functions of TRBP, at the hub of cell responses to viruses, stress, and cancer. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76, 652–666.
117. Sanghvi VR, Steel LF. The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of double-stranded RNA-dependent kinase PKR. *J. Virol.* 2011; 85, 12614–12621.
118. Singh M, Castillo D, Patel CV, Patel RC. Stress-induced phosphorylation of PACT reduces its interaction with TRBP and leads to PKR activation. *Biochemistry* 2011; 50, 4550–4560.
119. Chan CT, Reeves RE, Geller R, et al. Discovery and validation of small-molecule heat-shock protein 90 inhibitors through multimodality molecular imaging in living subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109, 2476–2485.
120. Zhao M, Tang D, Lechpammer S, et al. Doublestranded RNA-dependent protein kinase (pkr) is essential for thermotolerance, accumulation of HSP70, and stabilization of ARE-containing HSP70 mRNA during stress. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 44539–44547.
121. Pang Q, Keeble W, Christianson TA, Faulkner GR, Bagby GC. FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *EMBO J.* 2001; 20, 4478–4489.
122. Itahana K, Bhat P, Jin A, et al. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol. Cell* 2003; 12:1151– 1164.
123. Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, Dinjens WN, Bosman FT. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J. Pathol.* 1996; 178:48–52.
124. Pang Q, Christianson TA, Koretsky T, et al. Nucleophosmin interacts with and inhibits the catalytic function of eukaryotic initiation factor 2 kinase PKR. *J. Biol. Chem.* 2003 ; 278:41709–41717.
125. Lee K, Kunkeaw N, Jeon SH, et al. Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA* 2011;17, 1076–1089.
126. Kunkeaw N, Jeon SH, Lee K, et al. Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2012; 32,3722–3731.
127. Lee HS, Lee K, Jang HJ, et al. Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis *Oncotarget.* 2014;5(11):3472-81.
128. Treppendahl MB, Qiu X, Søgaard A, et al. Allelic methylation levels of the noncoding VTRNA2-1 located on chromosome 5q31.1 predict outcome in AML. *Blood.* 2012;119(1):206-16.
129. Blalock WL, Bavelloni A, Piazz M, et al. Multiple forms of PKR present in the nuclei of acute leukemia cells represent an active kinase that is responsive to stress. *Leukemia* 2011; 25, 236–245.
130. de la Cruz-Herrera CF, Campagna M, García MA, et al. Activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by small ubiquitin-like modifier (SUMO). *J Biol Chem.* 2014;289(38):26357-67.
131. Marchal JA, Lopez GJ, Peran M, et al. The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer. *FASEB J.* 2014; 28(5):1965-74.
132. Chong KL, Feng L, Schappert K, et al. Human p68 kinase exhibits growth suppression in yeast and homology to the translational regulator GCN2. *EMBO J.* 1992;11, 1553–1562.
133. Meurs EF, Galabru J, Barber GN, Katze MG, Hovanessian AG. Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*1993; 90, 232–236.
134. Koromilas AE, Roy S, Barber GN, Katze MG, Sonenberg N. Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science*1992; 257, 1685–1689.
135. Barber GN, Jagus R, Meurs EF, Hovanessian AG, Katze MG. Molecular mechanisms responsible for malignant transformation by regulatory and catalytic domain variants of the interferon-induced enzyme RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* 1995; 270, 17423–17428.
136. Mounir Z, Krishnamoorthy JL, Robertson GP, et al. Tumor suppression by PTEN requires the activation of

- the PKR-eIF2alpha phosphorylation pathway. *Sci. Signal.* 2009; 2,ra85.
137. Garcia MA, Krupa M, Esteban M. Antitumoral activity of oncolytic vaccinia virus expressing the interferon induced ds-RNA dependent protein kinase PKR. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 2010; 327-342.
138. Guo C, Shao R, Correa AM, et al. Prognostic significance of combinations of RNA-dependent protein kinase and EphA2 biomarkers for NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* 2013; 8, 301–308.
139. He Y, Correa AM, Raso MG, et al. The role of PKR/eIF2alpha signaling pathway in prognosis of non-small cell lung cancer. *PLoS ONE* 2011; 6, e24855.
140. Peidis P, Papadakis AI, Muaddi H, Richard S, Koromilas AE. Doxorubicin bypasses the cytoprotective effects of eIF2alpha phosphorylation and promotes PKR-mediated cell death. *Cell Death Differ.* 2011; 18, 145–154.
141. Terada T, Maeta H, Endo K, Ohta T. Protein expression of double-stranded RNA-activated protein kinase in thyroid carcinomas: correlations with histologic types, pathologic parameters, and Ki-67 labeling. *Hum. Pathol.* 2000; 31, 817–821.
142. Roh MS, Kwak JY, Kim SJ, et al. Expression of double-stranded RNA-activated protein kinase in small-size peripheral adenocarcinoma of the lung. *Pathol. Int.* 2005; 55, 688–693.
143. Delgado Andre N, De Lucca FL. Knockdown of PKR expression by RNAi reduces pulmonary metastatic potential of B16-F10 melanoma cells in mice: possible role of NF-kappaB. *Cancer Lett* 2007; 258, 118–125.
144. Nag S, Qin J, Srivengopal KS, Wang M, Zhang R. The MDM2-p53 pathway revisited. *J. Biomed. Res.* 2013; 27, 254–271.
145. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, et al. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature*. 2003; 424(6948):516-23.
146. Muñoz-Fontela C, Garcia MA, Garcia-Cao I, et al. Resistance to viral infection of super p53 mice. *Oncogene* 2005; 24,18, 3059 – 3062.
147. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr JC. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24:985–996.
148. Garcia MA, Collado M, Munoz-Fontela C, et al. Antiviral action of the tumor suppressor ARF. *EMBO J.* 2006; 25:4284–4292.
149. Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 910–917.
150. Garcia MA, Gallego P, Campagna M, et al. Activation of NF-kB pathway by virus infection requires Rb expression. *PLoS ONE* 2009; 4 – 7 e6422.
151. Muñoz-Fontela C, García MA, Collado M, et al. Control of virus infection by tumour suppressors. *Carcinogenesis* 2007; 28 - 6, 1140 - 1144.
152. Garcia MA, Muñoz-Fontela C, Collado M, Marcos-Villar L, Esteban M, Rivas C. Novel and unexpected role for the tumor suppressor ARF in viral infection surveillance. *Future Virology* 2007; 2 - 6, pp. 625 - 629.
153. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 330–338.
154. Garcia MA, Carrasco E, Aguilera M, et al. The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes PKR-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells. *PLoS ONE* 2011; 6, e23887.
155. Garcia MA, inventor. Servicio Andaluz de Salud. Método de obtención de datos útiles para evaluar, predecir y/o pronosticar la respuesta al tratamiento con análogos de pirimidina. International Patent PCT/ES2012/070115. 2012 Feb.
156. Carrillo E, Navarro SA, Ramírez A, et al. 5-Fluorouracil derivatives: a patent review (2012 - 2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2015; 25(10):1131-44.
157. Lopez-Cara LC, Conejo-Garcia A, Marchal JA, et al. New (RS)-benzoxazepin-purines with antitumour activity: The chiral switch from (RS)-2,6-dichloro-9-[1-(p-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazep in-3-yl]-9H-purine. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(1):249-258.
158. Marchal JA, Carrasco E, Ramirez A, et al. Bozepinib, a novel small antitumor agent, induces PKR-mediated apoptosis and synergizes with IFNalpha triggering apoptosis, autophagy and senescence. *Drug Des Devel Ther.* 2013; 7:1301-1313.
159. Ramírez A, Boulaiz H, Morata-Tarifa C, et al. HER2-signaling pathway, JNK and ERKs kinases, and cancer stem-like cells are targets of Bozepinib small compound. *Oncotarget*. 2014;5(11):3590-606.
160. Kimatrai M, Conejo-Garcia A, Ramirez A, et al. Synthesis and Anticancer Activity of the (R,S)-Benzofused 1,5-Oxathiepine Moiety Tethered to Purines through Alkylidenoxy Linkers. *ChemMedChem*. 2011; 6(10):1854-9.
161. Conejo-García A, García-Rubiño ME, Marchal JA, et al. Synthesis and anticancer activity of (RS)-9-(2,3-dihydro-1,4-benzoxaheteroin-2-ylmethyl)-9H-purines. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(9):3795-80.
162. García-Rubiño ME, Conejo-García A, Núñez MC, et al. Enantiospecific synthesis of heterocycles linked to purines: different apoptosis modulation of enantiomers in breast cancer cells. *Curr Med Chem.* 2013; 20(38):4924-34.

A historical overview of protein kinase PKR...

163. Chang RC, Suen KC, Ma CH, Elyaman W, Ng HK, Hugon J. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J. Neurochem.* 2002; 83, 1215–1225.
164. Onuki R, Bando Y, Suyama E, et al. An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *EMBO J.* 2004; 23, 959–968.
165. Peel AL, Rao RV, Cottrell BA, Hayden MR, Ellerby LM, Bredesen DE. Double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, binds preferentially to Huntington's disease (HD) transcripts and is activated in HD tissue. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10, 1531–1538.
166. Bando Y, Onuki R, Katayama T, et al. Double-strand RNA dependent protein kinase (PKR) is involved in the extrastriatal degeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Neurochem. Int.* 2005; 46, 11–18.
167. Mouton-Liger F, Paquet C, Dumurgier J, et al. Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2alpha pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 2012; 1822, 885–896.
168. Bose A, Mouton-Liger F, Paquet C, et al. Modulation of tau phosphorylation by the kinase PKR: implications in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2011;21, 189–200.
169. Paquet C, Dumurgier J, Hugon J. [Pro-Apoptotic Kinase Levels in Cerebrospinal Fluid as Potential Future Biomarkers in Alzheimer's Disease](#). *Front Neurol.* 2015;6:168.
170. Zhu PJ, Huang W, Kalikulov D, et al. Suppression of PKR promotes network excitability and enhanced cognition by interferon-gamma-mediated disinhibition. *Cell* 2011; 147, 1384–1396.
171. Couturier J, Paccalin M, Morel M, et al. Prevention of the beta-amyloid peptide-induced inflammatory process by inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase in primary murine mixed co-cultures. *J. Neuroinflammation* 2011; 8, 72.
172. Couturier J, Morel M, Pontcharraud R, et al. Interaction of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) with the death receptor signaling pathway in amyloid beta (Abeta)- treated cells and in APPSLPS1 knock-in mice. *J. Biol. Chem.* 2010; 285, 1272–1282.
173. Cabanski M, Steinmüller M, Marsh LM, Surdziel E, Seeger W, Lohmeyer J. PKR regulates TLR2/TLR4-dependent signaling in murine alveolar macrophages. [Am J Respir Cell Mol Biol.](#) 2008; 38(1):26-31.
174. Carvalho-Filho MA, Carvalho BM, Oliveira AG, et al. Double-stranded RNA-activated protein kinase is a key modulator of insulin sensitivity in physiological conditions and in obesity in mice. *Endocrinology* 2012; 153, 5261–5274.
175. Lu B, Nakamura T, Inouye K, et al. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 2012; 488, 670–674.



Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results

Title in Spanish: *Metodologías de modelado molecular en el diseño, síntesis y explicación racional de resultados*

José María Sánchez Montero^{1,*}

¹Grupo de Biotransformaciones, Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España.

ABSTRACT: Computational Chemistry integrates basic concepts of chemistry to solve problems through graphical representations that attempt to explain the events studied. Molecular modeling is a useful tool because it allows rationally interpret for example the process of interaction between a molecule and its target, and provides reliable data that can predict system behavior. Moreover, the boom experienced by Structural Biology and Nuclear Magnetic Resonance has allowed in recent years to increase the number of 3D structures for use in modeling. Undoubtedly, the great advances in the field of bioinformatics, associated with the use of increasingly sophisticated computational means, portend the ability to draw sound conclusions from chemical processes, so this research area has experienced considerable recognized increase in 2013 by the Royal Swedish Academy of Sciences awarding the Nobel Prize in Chemistry. In this paper we review some of the achievements in the field of molecular modeling by our group in the past, mainly applied to Biocatalysis, and the results obtained in the present in the field of controlled drug release and posit models prediction that can be used in the near future in the field of great interest in medicine.

RESUMEN: La Química computacional integra los conceptos básicos especializados de la Química, para la solución de problemas por medio de representaciones gráficas que tratan de explicar los sucesos estudiados. El Modelado Molecular es una herramienta de gran utilidad, pues permite interpretar de manera racional por ejemplo el proceso de interacción entre una molécula y su diana, y proporciona datos fiables que permiten predecir el comportamiento del sistema. Por otra parte el auge experimentado por la Biología estructural así como la Resonancia Magnética Nuclear ha permitido incrementar en los últimos años el número de estructuras en 3D para su utilización en modelado. Sin duda, los grandes avances en el campo de la Bioinformática, asociados al empleo de medios computacionales cada vez más sofisticados, auguran la capacidad de extraer conclusiones racionales de los procesos químicos, por lo que esta área de investigación ha experimentado un considerable aumento reconocido en el año 2013 por la Real Academia Sueca de las Ciencias con la concesión del Premio Nobel de Química. En el presente trabajo revisamos algunos de los logros obtenidos en el campo de la modelización molecular realizados por nuestro grupo en el pasado, aplicados fundamentalmente a la Biocatálisis, así como los resultados obtenidos en el presente en el campo de liberación controlada de fármacos y postulamos modelos de predicción que pueden utilizarse en un futuro próximo en este campo de gran interés en Medicina.

*Corresponding Author: jmsm@ucm.es

Received: October 7, 2015 Accepted: June 20, 2016

Premio Real Academia Nacional de Farmacia del Concurso Científico 2015 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 168-184

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La importancia de la utilización del modelado molecular en Química fue reconocida en 2013 por la Real Academia Sueca de las Ciencias, con la concesión del Premio Nobel de Química por el desarrollo de modelos multiescala de sistemas químicos complejos a Martin Karplus, Michael Levitt y Arieh Warshel. Estos modelos avanzados son unas herramientas sobre todo predictivas, que permiten acercarse a la realidad y pueden establecer si una reacción va a ocurrir o no, diseñar nuevos materiales o fármacos, conocer cómo responden determinadas proteínas

a contaminantes o a fármacos, determinar las interacciones fármaco-receptor e innumerables aplicaciones más. Actualmente, estos modelos tienen tal poder predictivo que se pueden hacer experimentos de química en ordenador en lugar de en el laboratorio convencional, lo que ahorra tiempo y dinero.

Respecto al gran auge del modelado molecular en Biocatálisis y en general en el diseño de fármacos realizados mediante estas técnicas tienen un común denominador y es el rápido avance producido en biología estructural, lo que ha puesto de manifiesto la estructura

tridimensional de muchos biocatalizadores. Su conocimiento es fundamental para ambas disciplinas. En muchas ocasiones la predicción de la actividad y selectividad de un biocatalizador ante un sustrato no natural puede ser compleja. En este sentido, el modelado molecular es la herramienta que conecta estas estructuras con las observaciones experimentales. El modelado molecular puede definirse como una descripción simplificada o idealizada de un sistema molecular o proceso entre moléculas, ideada para facilitar cálculos y predicciones. Desde el punto de vista de la utilización de estas enzimas o células para llevar a cabo reacciones fuera de su medio natural, es decir en los seres vivos, la Biocatálisis se enriquece cuando los fenómenos que generan y modulan la actividad catalítica de las enzimas se estudian con una visión multidisciplinar. Las tecnologías y herramientas moleculares han avanzado rápidamente en los últimos 50 años, de tal manera que es posible plantear hipótesis, diseñar experimentos e interpretar resultados utilizando información tanto experimental como teórica.

Las Biotransformaciones serían, aquellos procesos en los que se emplean biocatalizadores para la transformación de sustratos no naturales para dicho biocatalizador y se obtienen productos de alto valor añadido.

La Biocatálisis, al igual que la química orgánica, que ha evolucionado a partir de una descripción empírica a una disciplina basada en el mecanismo y una ciencia basada en la estructura, está también evolucionando a un diseño racional de la ciencia basada en la estructura. El comienzo de la biocatálisis estuvo marcado por aproximaciones empíricas como el cribado, (*screening*) o simples extrapolaciones de sustratos conocidos. El modelado molecular puede ayudarnos a responder a importantes preguntas que se plantean al llevar a cabo un proceso biocatalizado: i) Explicar a nivel molecular el comportamiento, en mucho casos conocido de una enzima. ii) Sugerir como cambia la selectividad de una reacción por modificación del sustrato, enzima o condiciones de reacción. iii) Predecir cuantitativamente el grado de estereoselectividad de una reacción catalizada por una enzima.

No obstante, una vez diseñada la molécula cabeza de serie diremos que el fármaco es un ligando de una diana terapéutica, es decir el receptor biológico. Cuando el fármaco está incorporado en el vehículo adecuado para su administración terapéutica y puede alcanzar el proceso bioquímico que debe modular, podemos hablar en términos de medicamento, del cual decimos que el fármaco es el principio activo.

El diseño de fármacos multidiana (“multi-target”) es decir, capaces de atacar varios objetivos simultáneamente, más eficientes y con menos efectos secundarios, constituye un punto de inflexión en la tendencia de la investigación farmacológica, ya que propone que la solución a una patología sea sistémica en lugar de específica. Así un medicamento puede constar de varios principios activos (1). Actualmente se está trabajando en la combinación de varios componentes activos en una única píldora, la

“*Polypill*”, en personas con diagnóstico de enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial o diabetes para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

En la Tabla 1A se presenta una primera clasificación general de los métodos computacionales en función de que sean métodos de cálculo directos o indirectos.

En la Tabla 1B podemos ver la evolución de las distintas técnicas computacionales en función del conocimiento que se tenga del sitio de unión o del receptor. Podemos decir de un modo general, que las dos estrategias seguidas habitualmente en modelado, son las denominadas directas e indirectas tal y como se muestra en la Tabla 1A. En la primera se tienen que conocer las características tridimensionales de un receptor generalmente a partir de datos cristalográficos y se interpreta la actividad o inactividad de las moléculas en términos de complementariedad con el receptor. Esto es lo que se conoce por el término de “*docking*”. Los programas de docking, anglicismo que puede traducirse por acoplamiento se han utilizado tradicionalmente para realizar una exploración exhaustiva ligando proteína. Su objetivo es la obtención de la estructura del complejo receptor-ligando de energía más baja (se debe cumplir que $\Delta E < 0$), y el análisis de las principales interacciones implicadas en la unión fármaco-receptor.

En la Figura 1A, podemos ver la interacción que se produciría entre la acetil colinesterasa de *Torpedo californica* (receptor), el cloruro de donepezilo (ligando) y el THC (1). Por otra parte se comparan los valores de energía con análogos desarrollados en nuestro grupo de investigación y diseñados inicialmente en el ordenador mediante técnicas computacionales y posteriormente sintetizados en nuestro laboratorio Figura 1B, para el tratamiento de las fases iniciales de la enfermedad de Alzheimer. El fármaco bloquea el sitio catalítico de la enzima lo que impediría que se produjese la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina que es su sustrato natural. Este conocimiento permitiría diseñar nuevos análogos más potentes (2).

La segunda estrategia, (estructura tridimensional del receptor no conocida), se basa en el análisis comparativo de las características estructurales de sustancias conocidas activas o inactivas con el fin de definir un farmacóforo (parte de la molécula que produce los efectos fisiológicos específicos de un medicamento) apropiado para la actividad biológica estudiada siendo la aplicación mas destacada las relaciones cuantitativas estructura actividad en tres dimensiones (QSAR 3D).

La predicción cuantitativa *in silico* de la actividad enzimática y la selectividad sigue siendo un objetivo de gran interés en Biocatálisis.

Los estudios de las dos últimas décadas han demostrado cómo las enzimas pueden utilizarse adecuadamente, tanto en disolución acuosa como en entornos no convencionales para éstas, como por ejemplo disolventes orgánicos, líquidos iónicos, etc., lo que permite poner en práctica nuevas metodologías, incluso en los ambientes más extremos.

Las simulaciones moleculares nos permiten la construcción de modelos virtuales de sistemas químicos. El principal interés del modelado molecular en Biocatálisis es el conocimiento a nivel molecular de las interacciones enzima-sustrato. En muchos casos persiguiendo como meta, la predicción de la actividad y selectividad, como comentamos anteriormente. Hay distintos algoritmos que

nos sirven para predecir el docking de un sustrato en el centro activo de una enzima, así como para el cálculo de su energía de interacción y para la simulación de su energía de solvatación. La aplicación de estos métodos a la biocatálisis está basada en el cálculo de la energía libre de la reacción que a su vez deriva de la simulación del estado de transición.

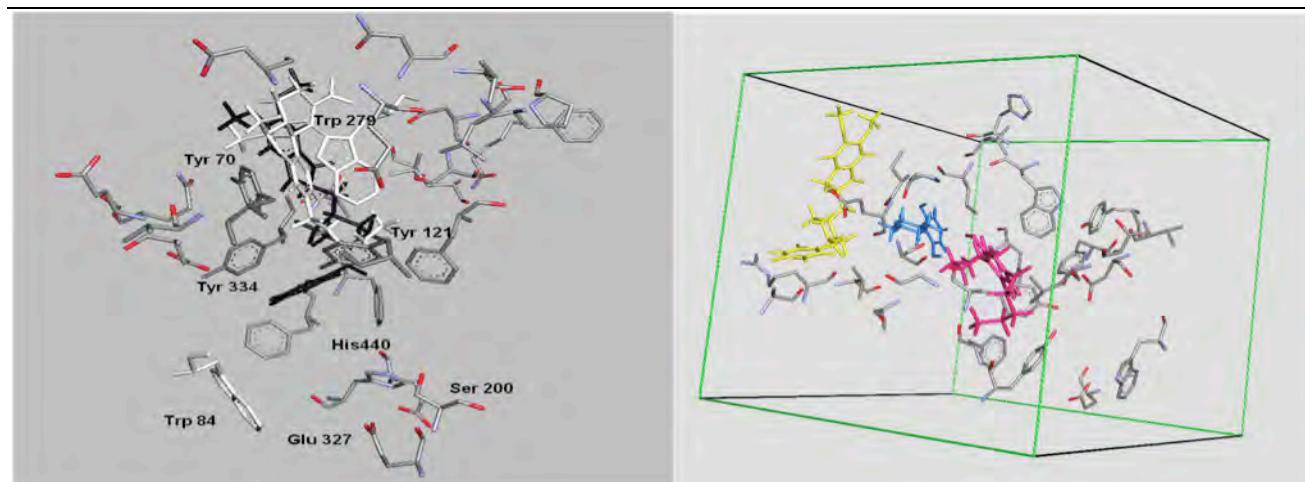


Figura 1 (A). Interacción de un fármaco (donepezilo, representado en negro) con su diana (acetilcolinesterasa humana, aminoácidos representados en gris), y tetrahidrocannabinol (representado en blanco). **(B)** Valores de energía de interacción mediante modificaciones estructurales de la molécula de THC. Se compara con el Donepezilo amarillo -6,68 Kcal/mol. Comp. fucsia -7,40 Kcal/mol. Comp. azul - 8,20 Kcal/mol obtenidos por técnicas computacionales.

En el presente trabajo, haremos una revisión de las diferentes etapas de nuestra investigación mencionando algunos resultados obtenidos fundamentalmente en el campo de la Biocatálisis, hasta el momento actual en que utilizamos los modelos tridimensionales en la liberación controlada de fármacos. En la parte final del trabajo se presenta una tabla de fármacos agrupados en sus familias terapéuticas, en la que a partir de sus potenciales de

interacción y energía de docking se puede predecir cualitativamente el comportamiento cinético que tendrá el fármaco en la matriz.

Un ejemplo de lo anteriormente dicho se muestra en la investigación mostrada a continuación por nuestro grupo en dos etapas muy diferentes en el tiempo y que demuestra el poder predictivo de estas técnicas (3):

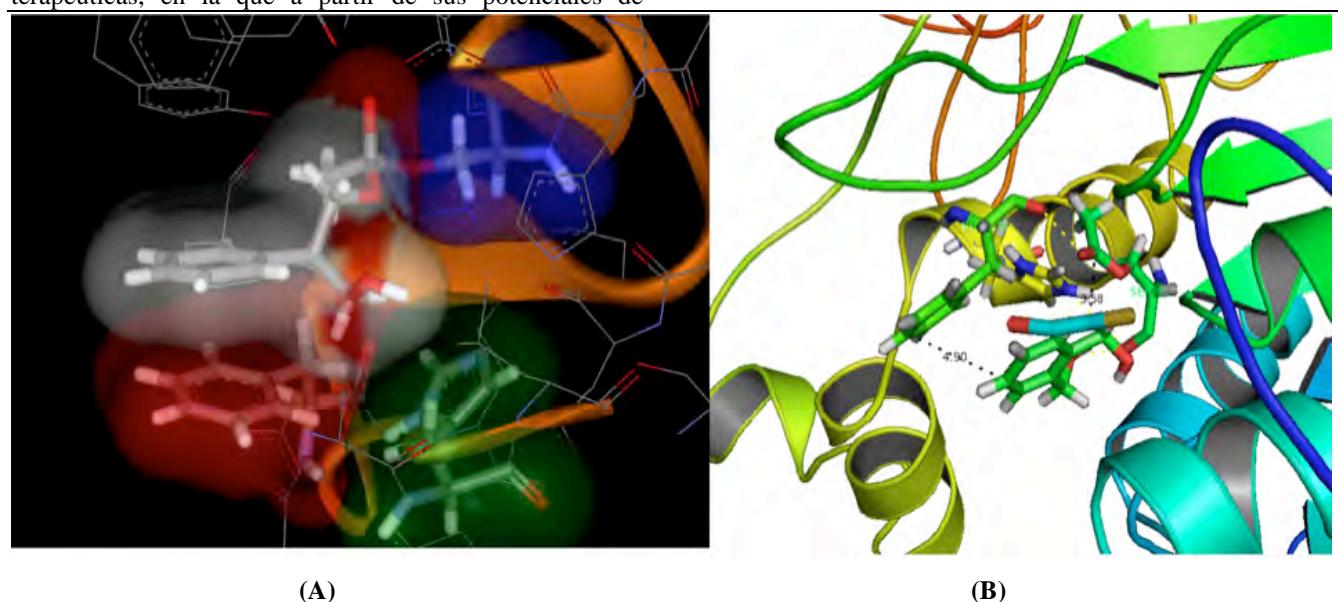


Figura 2. (A) docking manual para el 2-fenil-1,3-propanodiol. (B) docking automático para el 2-fenil-1,3-propanodiol.

Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results

En la acilación de diferentes (1,n)-alcanodioles utilizados como intermedios en la preparación de una gran variedad de compuestos de interés como agentes antibacterianos entre otros, se utilizó la lipasa de páncreas porcino mediante la realización de un docking manual de los diferentes sustratos en la estructura descrita del centro activo, para el 2-fenil-1,3-propanodiol (Figura 2A). Se postuló el posible papel del residuo Phe216 como importante para el correcto reconocimiento del sustrato, ajustando las dimensiones de los sustratos a un triángulo cuyas dimensiones coinciden con los residuos Ser153, His264 (correspondientes a la tríada catalítica) y la mencionada Phe 216. Un estudio más refinado de docking realizado por nuestro grupo años después ha confirmado dicha hipótesis, al verificar las distancias previstas y las interacciones propuestas (Figura 2B).

Cuando los fenómenos son demasiado complejos para ser simulados, se usan otros métodos de cálculo, tales como la quimiometría, que es la ciencia de las mediciones realizadas sobre un sistema o proceso químico sobre el estado del sistema por aplicación de métodos matemáticos o estadísticos. Consta de una serie de técnicas heterogéneas, entre las cuales el diseño estadístico de experimentos y análisis estadísticos multivariante son los más importantes para la aplicación en biocatálisis.

Un diseño estadístico experimental permite conocer los factores que tienen mayor impacto sobre los resultados. Usando este método, muchas variables pueden ser estudiadas al mismo tiempo, y utilizando esta información, las condiciones experimentales se pueden mejorar hasta llegar a las condiciones óptimas.

Todos los métodos estadísticos multivariable tienen la capacidad de extraer la información relevante contenida en un sistema complejo descrito por un amplio número de variables (hasta varios miles) y esta información se representa en un espacio de dimensionalidad reducida, haciendo así posible su interpretación. Los métodos estadísticos multivariable están basados en diferentes bases matemáticas. En particular los métodos QSAR usan las propiedades estructurales de las moléculas (generalmente adquiridas por métodos de simulación) como la base de partida para el análisis estadístico, que eventualmente encuentra correlaciones entre la estructura molecular y respuestas medibles experimentalmente.

Debido a su capacidad inherente de simplificar el análisis de sistemas complejos, la quimiometría encuentra una amplia aplicación para el estudio y optimización de procesos industriales.

Tabla 1A. Métodos computacionales en diseño de fármacos.

| Métodos computacionales en diseño de fármacos | | | | | |
|-----------------------------------------------|--------------|-------------|--------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------|
| directos | Modelización | Docking | Binding | | |
| | | | $L + R \xrightarrow{\Delta G_{int}(L)} LR$ | ΔG_{int}^H | $L' + R \xrightarrow{\Delta G_{int}(L')} L'R$ |
| indirectos | QSAR | Farmacóforo | | Diversidad Molecular | |

Tabla 1B. Evolución de las técnicas computacionales en función del conocimiento de la estructura del ligando y el receptor.

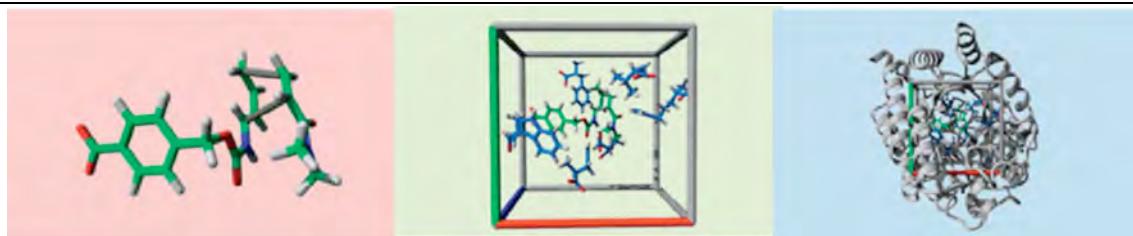
| ESTRUCTURA DEL LIGANDO | ESTRUCTURA DEL RECEPTOR | |
|------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| | CONOCIDA | DESCONOCIDA |
| CONOCIDA | Interacciones ligando-receptor | Modelos de farmacóforos |
| | Dinámica Molecular y Técnicas de docking | Búsquedas 3D basadas en el ligando/ farmacóforo QSAR 2D y 3D |
| DESCONOCIDA | Diseño de novo | Generar estructuras en 3D |
| | Búsquedas 3D basadas en el diseño | Medidas de Similitud y Diversidad Molecular Química Combinatoria |

2. MODELADO MOLECULAR E INGENIERÍA RACIONAL DE ENZIMAS

Algunos de los logros más relevantes de las técnicas computacionales en Biocatálisis provienen de la ingeniería racional de enzimas. Esta aproximación a la evolución del biocatalizador es a veces vista en competencia con la evolución dirigida. La modelización molecular es muy adecuada para optimizar interacciones enzima-sustrato así como el mecanismo catalítico de la enzima. Sin embargo, el diseño computacional en general es mucho menos eficiente en la identificación de los efectos de las mutaciones que se encuentran alejadas del centro activo: estas mutaciones pueden todavía alterar la estructura de la proteína y modificar el comportamiento del catalizador o

la estabilidad de la enzima. En este contexto, la evolución dirigida puede ofrecer una solución al problema.

Estudios recientes han puesto de manifiesto la utilización de los métodos de simulación molecular en la inducción de la promiscuidad catalítica de las enzimas, es decir reacciones para las que en principio un ligando no es el sustrato natural de esa enzima. En el ejemplo mostrado en la figura 3 se propone un estado de transición para la reacción deseada, posteriormente se propone un centro activo capaz de estabilizar el estado de transición por métodos de mecánica cuántica y posteriormente se acopla ese centro activo en un andamio adecuado utilizando algoritmos como Rosetta.

**Figura 3.** Modificación de un centro activo para la consecución de la actividad deseada.

3. RECONOCIMIENTO ENZIMA-SUSTRATO Y SELECTIVIDAD DE LA ENZIMA

Las técnicas de modelización molecular se han convertido en herramientas de rutina en la descripción de las interacciones enzima-sustrato. Más temas de interés tales como la mejora de la estabilidad de la enzima y la modelización de efecto del disolvente sobre las reacciones biocatalizadas han sido investigadas en una proporción

menor. En el primer caso, esto se debe a que la estabilización de la enzima se consigue más a menudo a través de diferentes rutas (por ejemplo, mediante evolución dirigida).

La mayoría de los estudios computacionales realizados en el campo de la Biocatálisis se concentran en la predicción de la selectividad de la enzima. Esto implica el cálculo de la constante de la selectividad (k_{cat}/K_M), que

depende de la energía libre del estado transición de la reacción. En este sentido, los denominados métodos *ab initio* de la Mecánica Cuántica (QM) son capaces de reproducir los datos experimentales sin emplear parámetros empíricos. Como es lógico al aumentar el número de núcleos y de electrones, es mayor el número de funciones de base precisas para construir los orbitales moleculares (OMs), con las consiguientes dificultades de cálculo que acarrea. En razón de la evaluación completa o no de todas las integrales electrónicas, se puede hablar de métodos *ab initio* y de métodos semiempíricos. El inconveniente principal de la utilización de los métodos *ab initio* es que la complejidad del cálculo restringe sus aplicaciones a dianas químicas a nivel de unas pocas decenas de átomos. Por tanto, la complejidad de un sistema biocatalítico limita drásticamente la posibilidad de aplicar métodos de QM, forzando a la Química Computacional hacia el uso de métodos de Mecánica Molecular Clásica (MM), basados en un conjunto de ecuaciones y parámetros denominados Campos de Fuerza).

La MM considera los átomos de una molécula como un conjunto de masas interaccionando vía fuerzas armónicas o elásticas. Esto permite la simulación de macromoléculas (como las proteínas), pero la naturaleza empírica de los campos de fuerza que deben ser correctamente parametrizados, hace que el tratamiento de cualquier efecto electrónico sea inviable. Se han ajustado empíricamente las ecuaciones y los parámetros para que coincida con los resultados experimentales. A un conjunto de ecuaciones y parámetros se denomina campo de fuerza y la mayoría de programas de modelado molecular pueden elegir entre varios campos de fuerza, como por ejemplo MM2 (o sus posteriores versiones MM3 y MM4) para moléculas pequeñas (4), Amber (5) para las proteínas (mejor opción, puesto que contempla las interacciones electrostáticas de una forma más adecuada) o CHARMM (6).

Los métodos mecanocuánticos (QM) pueden superar estas limitaciones, ya que se basan en la solución de la ecuación de Schrödinger y aunque este enfoque sigue siendo computacionalmente demasiado caro para ser útil como herramienta de predicción de rutina, el continuo crecimiento del poder computacional se espera que haga más asequible los cálculos de QM.

Una solución intermedia se basaría en la utilización de métodos híbridos de QM-MM, los cuales tratan la parte reactiva relativamente pequeña de los sistemas biocatalíticos a nivel de QM y todo lo demás por MM, ofreciendo una buena alternativa de cálculo.

4. SIMULACIÓN DE ANÁLOGOS DEL ESTADO DE TRANSICIÓN

La cinética de las reacciones biocatalizadas depende de la energía libre de sus estados de transición, en las que las especies químicas no son estables. Sin embargo, los métodos de MM solo pueden usarse cuando las estructuras son estables y además son incapaces de tratar la ruptura y formación de enlaces. La estrategia más común para modelar *in silico*, las interacciones entre las enzimas hidrolíticas y sus sustratos a nivel de la MM es la simulación del intermedio tetraédrico, que es una especie química estable unida covalentemente al residuo catalítico de la proteína y que imita el estado de transición de la reacción.

En la Figura 4 se representa el complejo acil enzima de la lipasa de *Candida rugosa*, y el R-y S-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa de *C. rugosa*, enantiómero preferentemente reconocido en la hidrólisis estereoselectiva a partir de la mezcla racémica (7). Para la obtención de estos complejos en primer lugar se obtuvieron los conformadores de mínima energía por Mecánica Molecular y posteriormente se realizó una dinámica Molecular.

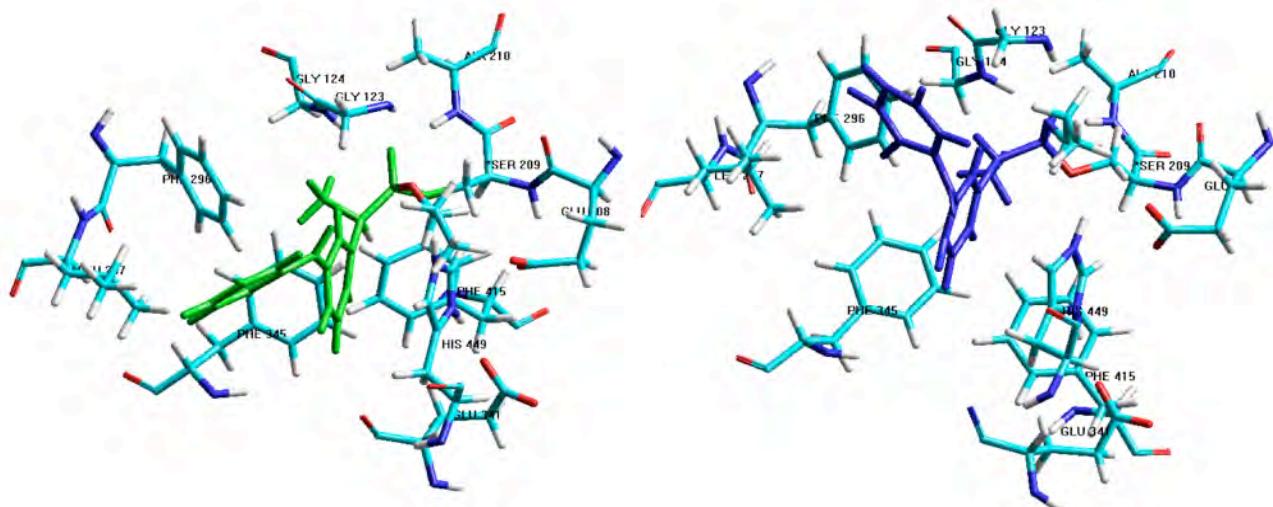


Figura 4. Simulación del complejo tetraédrico acil enzima, entre el R-ketoprofeno y el S-ketoprofeno.

En el caso del R-ketoprofeno, el anillo de benceno más externo queda hacia fuera del centro activo compuesto por

los aminoácidos Ser209, His449, Glu341, mientras que en el S-ketoprofeno el anillo queda más hacia el interior del

centro activo, y en este caso hay interacciones π -stacking con la Phe-296 y 345, mientras que en el caso del R, solo con la Phe-245. Por tanto podemos concluir que la interacción con el R es menos favorable ya que los anillos están prácticamente dispuestos perpendicularmente el uno respecto del otro. De esta forma podríamos predecir la selectividad de esta enzima tanto en las reacciones de hidrólisis de sus ésteres como en la reacciones de síntesis de los ácidos correspondientes.

En otros experimentos llevados a cabo por otros grupos se ha visto que mediante la simulación de análogos del estado de transición para la hidrólisis de una serie de diésteres se pudo demostrar que la enantioselectividad es una función de la longitud de la cadena del ácido.

5. DESCRIPCIÓN GRID DE LA NATURALEZA DEL CENTRO ACTIVO

El enfoque GRID que complementa la simulación de análogos del estado de transición permite una descripción más precisa de la interacción enzima-sustrato (8) y fue aplicado en el estudio de la selectividad de la penicilina G amidasa (PGA) (9,10). Además de proporcionar directrices para el acoplamiento de los sustratos en el centro activo de la enzima, la visualización de los campos de interacción molecular (MIF) generados por diferentes sondas (hidrofóbicas, dadores de enlaces-H, aceptores de enlaces-H y grupos cargados) permitió una exploración fácil y rápida de la naturaleza química del centro activo, consiguiendo así un esquema completo de los requerimientos estructurales del sustrato para el reconocimiento óptimo del mismo. Además, el estudio

estableció las normas generales para la enantiodiscriminación ilustrando cómo los enantiómeros tienen diferentes interacciones con dos porciones químicamente distintas del centro activo. Las tasas de acilación determinados experimentalmente fueron utilizadas para validar el modelo, que proporciona sólo una predicción cualitativa. El docking con los ácidos S y R ketoprofeno confirmó los resultados predichos en el apartado anterior, ya que la energía de interacción fue más favorable en el caso del S y la distancia respecto al residuo catalítico fue menor en el S-ketoprofeno que en el R (2,96 Å del S frente a 9 Å del R) como puede apreciarse en la Figura 5.

Aunque en los ejemplos expuestos hasta ahora se alcanzaron buenos resultados en la racionalización de las estrategias experimentales, todos fallan en hacer una predicción cuantitativa de la selectividad enzima, incluso cuando el análisis GRID se combina con aproximaciones al análogo al estado de transición.

Esta limitación se debe a que todos los enfoques descritos se basan en varias aproximaciones significativas (11).

El primer problema se puede achacar a la naturaleza simplificada de los cálculos del campo de fuerza empleado. Por otra parte, el segundo gran problema viene del hecho de que las pequeñas diferencias de energía originan grandes variaciones en la selectividad, que pueden ser enmascaradas por las grandes fluctuaciones causadas por el movimiento normal de las proteínas.

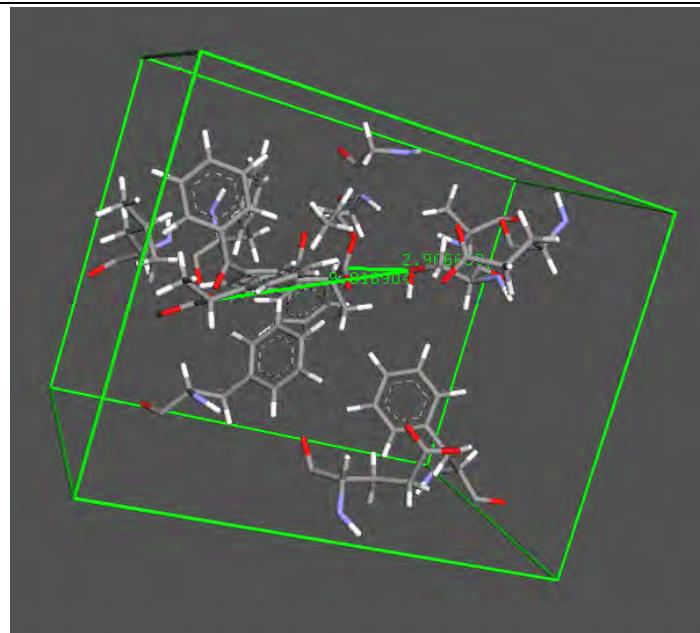


Figura 5. Docking automático entre R-ketoprofeno y el S-ketoprofeno y el centro activo de la lipasa de *Candida rugosa*.

6. PREDICCIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA ENZIMA POR MÉTODOS DE MECÁNICA CUÁNTICA Y/O MECÁNICA MOLECULAR

El primer y más clásico estudio sobre la predicción cuantitativa de la diferencia de energía libre entre los dos

intermedios tetraédricos de dos enantiómeros fue descrito por Colombo y cols. (12) en la resolución de una mezcla racémica de 1-feniletanol por acilación catalizada por subtilisina. El enfoque consistió en un modelo con todos los átomos con solvatación explícita completa, energía

libre de perturbación (FEP), simulaciones de MD (dinámica molecular), y cargas atómicas derivadas de metodologías de QM y/o MM.

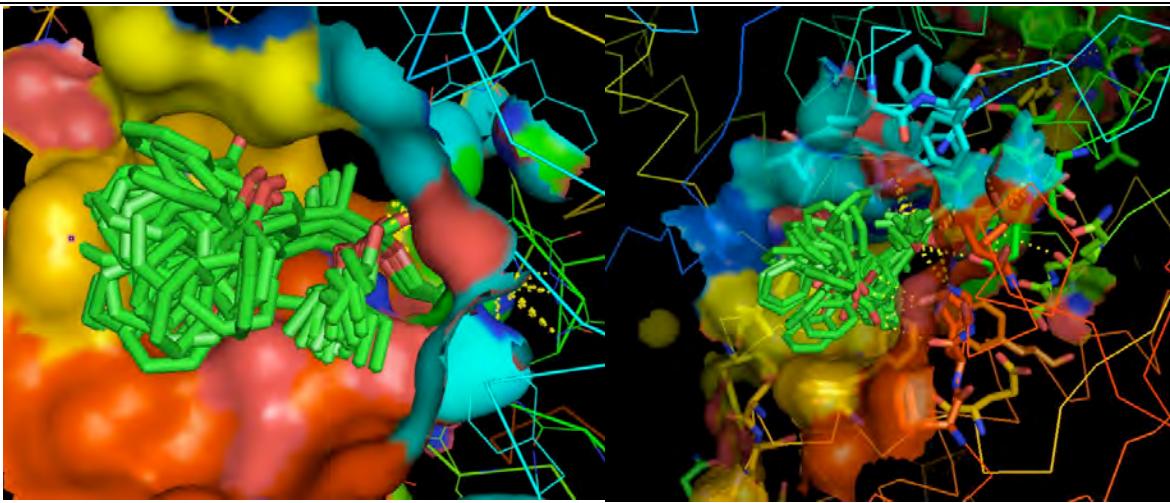


Figura 6. Superposición de confórmeros del *R*- y *S*-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa donde se pone de manifiesto las diferentes orientaciones del sustrato.(Figura original, no publicada).

Los resultados en ese estudio de 1999 probablemente representan la mejor predicción cuantitativa de la enantioselectividad descrita hasta ahora en la bibliografía, pero a pesar de todo, la tasa de error aún puede considerarse como elevada. Sin duda, la principal dificultad a la hora de llevar a cabo una predicción cuantitativa adecuada de la enantioselectividad deriva del hecho de que, aunque se pueda establecer de una forma muy precisa cual es la energía libre del estado de transición del enantiómero preferentemente reconocido dentro del centro activo, el otro enantiómero puede tener diferentes tipos de orientaciones, que implican interacciones con diferentes zonas del centro activo (13-14) como se puede visualizar en la figura adjunta en el estudio realizado por nuestro grupo de investigación (Figura 6). Esta diferente orientación del *R* y *S*-ketoprofeno en el centro activo de la enzima conlleva una diferente estereoselectividad y que puede predecirse *in silico* cualitativamente y por tanto saber que enantiómero será reconocido preferentemente.

6.1. Correlación entre la selectividad de la enzima y descriptores moleculares

Dado que el cálculo preciso de la energía libre de una reacción biocatalizada sigue siendo una tarea difícil, el desarrollo de las alternativas más simples y directas es un área activa de investigación.

Cabe señalar que para que una herramienta de predicción sea atractiva debe ser competitiva con el tiempo empleado en el laboratorio para realizar un experimento. En general, no hay motivos para esperar dos meses para la predicción de una medida que puede ser realizada experimentalmente en dos semanas (15).

En este sentido, los métodos de MD, FEP, y QM no son probablemente los más apropiados para el desarrollo de modelos de predicción, al menos a la luz de los instrumentos de cálculo comúnmente disponibles.

Como consecuencia, varias estrategias alternativas se han desarrollado, destinadas a simplificar cálculos y evitar el cálculo de la energía del estado de transición de la reacción.

Estas ideas se han aplicado en el estudio de enantioconocimiento de alcoholes terciarios por carboxilesteras (16). Demostraron cómo una predicción cuantitativa de la enantioselectividad se puede realizar evitando el cálculo de la energía libre del estado de transición.

El análisis geométrico de los intermedios tetraédricos, construido por docking manual y simulaciones de MD, puso de manifiesto la correlación cuantitativa entre la enantioselectividad y un descriptor geométrico único, definido como la distancia entre el nitrógeno de la histidina catalítica y uno de los átomos de oxígeno del sustrato. Aunque la validez de este tipo de descriptores no se puede asumir como general, la identificación de correlaciones similares en diferentes sistemas biocatalíticos representa una ruta original y sencilla para la predicción de la enantioselectividad en un plazo razonable de tiempo.

7. QSAR 3D PARA LA PREDICCIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD

Los métodos QSAR 3D (relaciones cuantitativas estructura-actividad en tres dimensiones) utilizan los datos provenientes de simulaciones moleculares como entrada para el análisis estadístico multivariante y representan la fusión entre el Modelado Molecular y la Quimiometría. Aunque el uso de QSAR 3D está bien establecido en el diseño de fármacos, la aplicación de estos métodos en Biocatálisis se ha llevado a cabo no hace muchos años. Los trabajos pioneros de Tomić y cols (17-19) representan un ejemplo de cómo las predicciones cuantitativas de k_{cat} / K_M son viables a través de un enfoque QSAR 3D, que correlaciona los descriptores sistema químico con los datos

experimentalmente medibles. La predicción cuantitativa de la enantioselectividad de la lipasa de *Burkholderia cepacia* se logró mediante el desarrollo de un método en el que la energía libre de unión se calcula de manera aproximada a través de una combinación lineal de la energía de interacción del complejo enzima-sustrato y la superficie polar y no polar accesible al disolvente. El peso de cada parámetro se calculó por análisis PLS, y el alto coeficiente de correlación de predicción ($Q^2 = 0,84$) confirma la validez de la aproximación (18). Por otra parte, el QSAR 3D también puede emplearse en Biocatálisis en sistemas en los cuales no se conoce la estructura tridimensional del biocatalizador, mediante el empleo de estudios CoMFA (acrónimo de Comparative Molecular Field Analysis). Aplicando esta metodología, se pudo predecir la estructura del sustrato modelo en la biorreducción de diferentes cetonas empleando células enteras de *G. candidum* y *S. octosporus*, representados en la Figura 7. El código de colores es el que sigue: i) Zonas de bajo impedimento estérico (verde). Son zonas donde la presencia de restos químicos del sustrato favorece la interacción enzima-sustrato. ii) Zonas de alto impedimento estérico (amarillo). Son zonas donde la presencia de grupos en el sustrato disminuye la afinidad de la ADH por el sustrato. iii) Zonas electrostáticas: rojas, donde una elevada densidad electrónica favorece la interacción y azules donde una elevada densidad de carga negativa desfavorece la interacción. La principal ventaja de esta metodología para modelar el centro activo de una enzima desconocida es que permite predecir, sin siquiera haberla aislado (20).

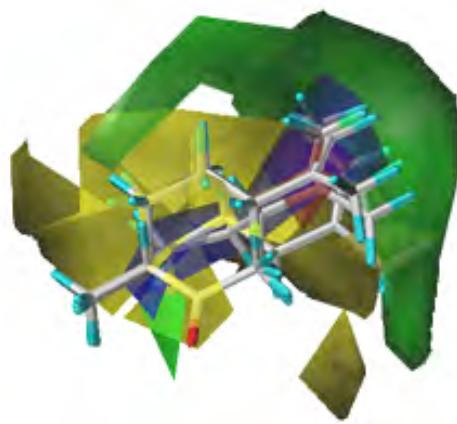


Figura 7. Aplicación del método COMFA para la predicción de las zonas de reconocimiento de la enzima utilizando diferentes sustratos.

8. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISOLVENTES

El efecto de la solvatación debe ser estudiado ya que el Modelado Molecular debe intentar interpretar y predecir resultados experimentales y los procesos biocatalíticos se llevan a cabo en presencia de disolventes.

Inicialmente, la mayoría de los cálculos de modelado incluyen las moléculas de agua que se encuentran en la estructura de cristal, pero no las moléculas de agua adicionales del disolvente, cuyo efecto generalmente se

simula utilizando un parámetro dieléctrico dependiente para intentar imitar la solvatación. Ke y cols. (21) utilizaron un método mejorado para simular el agua disolvente, un modelo electrostático continuo, pero los resultados fueron similares a los obtenidos del modelo más simple. Este tratamiento incompleto de solvatación es claramente una aproximación. Está claro que el disolvente puede cambiar la selectividad de la enzima, aunque existe aún desacuerdo sobre por qué esto ocurre.

Una de las posibles explicaciones propuesta atribuye la capacidad de estereodiscriminación a la diferente solvatación de los complejos diastereoisoméricos enzima-sustrato. En este sentido, Ke y Klibanov (22) estudiaron la enantioselectividad de la α -quimotripsina en la acilación de un diol proquiral, encontrando que el estado de transición que conducía hacia la acilación en el hidroxilo *pro-R* colocaba un resto de 3,5-dimetoxifeno en un bolsillo de la enzima, mientras que el estado de transición conducente a la acilación en el hidroxilo *pro-S* dejaba este resto arilo expuesto hacia disolvente. La propuesta de estos autores correlacionaba la enantioselectividad observada con los coeficientes de actividad termodinámica de la zona aromática expuesta, no como una predicción cuantitativa, sino una correlación directa en el sentido de mejor solvatación de partes expuestas, mayor enantioselectividad. Sin embargo, este método no pudo ser extrapolado a otros sustratos. La capacidad de ciertas enzimas para trabajar de manera eficiente en medios no acuosos (disolventes orgánicos, líquidos iónicos o fluidos supercríticos) es ampliamente conocida. Las lipasas son enzimas especialmente interesantes, dado su excepcional actividad en disolventes orgánicos, por lo que el estudio mediante Modelado Molecular de su comportamiento en dichos medios constituye un campo de trabajo muy habitual. Una aplicación interesante la constituyen las enzimas termoresistentes. En este caso cuando se utilizan para trabajar en líquidos iónicos, debido a la naturaleza de estos disolventes pueden resistir temperaturas de hasta 393 K, muy por encima de su temperatura de estabilidad (23). Nuestro grupo ha demostrado recientemente al estudiar mediante dinámica molecular el comportamiento de estas enzimas, concretamente con lipasa de *Bacillus thermocateuolatus* en el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil imidazolio, que la energía necesaria para romper un puente de hidrógeno es el doble en el caso del líquido iónico respecto del agua. (Figura 8). La estabilidad en disolvente iónico a alta temperatura se justifica parcialmente por la alta energía necesaria para la ruptura de los puentes de hidrógeno disolvente-proteína, aunque efectos hidrofóbicos podrían contribuir muy significativamente a la estabilidad. Para realizar este experimento ha sido necesaria la construcción de una caja de moléculas de líquido iónico para realizar la dinámica molecular tal y como se ve en la figura 8A, así como una caja de moléculas de agua, figura 8B. La temperatura de simulación fue de 363 K (24).

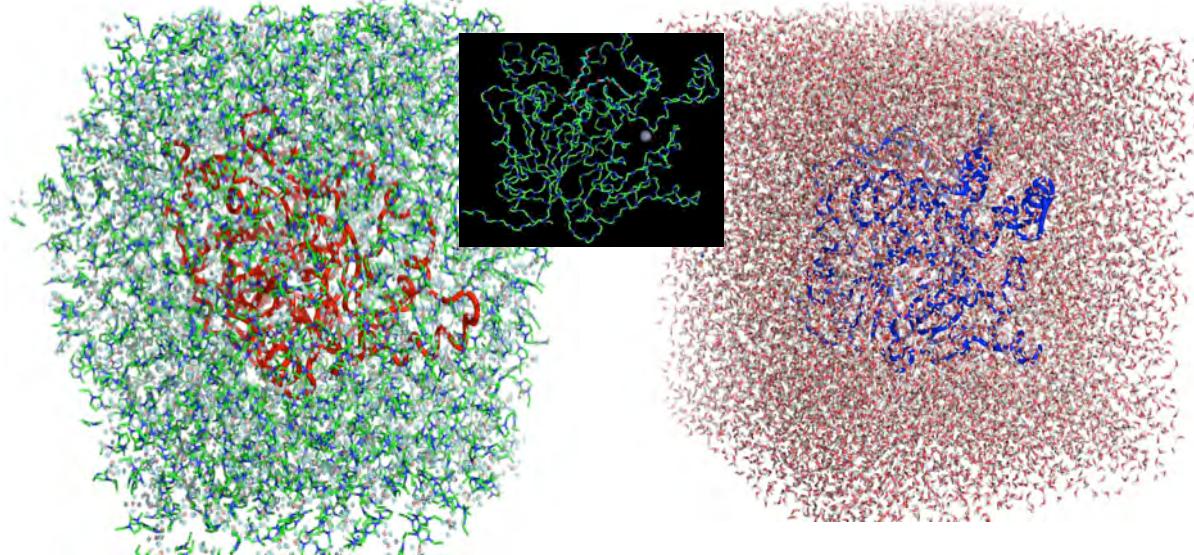


Figura 8. Caja de moléculas de disolvente en la lipasa de *Bacillus thermocatenulatus*. Líquido iónico (A), agua (B).

9. MODELADO MOLECULAR PARA LA EXPLICACIÓN RACIONAL DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

El conocimiento adquirido en estos años en Modelado Molecular nos ha servido para acometer esta nueva línea de investigación de la que a continuación exponemos algunos resultados. El diseño de vehículos eficaces para la liberación local controlada de fármacos activos contra las infecciones del hueso es un tema de gran interés.

Aplicado a los materiales mesoporosos ordenados basados en sílice y con el software apropiado, se puede construir la estructura de un material mesoporoso, como por ejemplo el MCM-48 y el SBA-15 (25,26), MCM-41 (25), entre otros, en una representación tridimensional y calcular la energía de la estructura a considerar, en base a cálculos mecanocuánticos de los potenciales electrostáticos, que describen la interacción entre los átomos en el material. En la Figura 9, se muestra un ejemplo del modelo SBA-15 construido por nuestro grupo. Este hecho facilita las cosas, porque no hay bastante información experimental para determinar la estructura de ese material que se quiere estudiar. Sin embargo, la potencia de cálculo informático de los modelos teóricos sí que proporcionan la información necesaria para comprender estos procesos y es por ello, por lo que deben de ser herramientas esenciales para el químico experimental en general, y para el estudio de los materiales mesoporosos ordenados en particular.

Pero eso no es todo, los modelos teóricos permiten determinar también las interacciones que se producen entre la matriz y la droga, dentro del poro o fuera de él, en especial las de las fuerzas electrostáticas.

Como ejemplo (Figura 10), la vancomicina es un antibiótico glicopeptídico para uso parenteral obtenido de la *Nocardia orientalis*. Es eficaz solo contra bacterias gram-positivas. La vancomicina se absorbe bastante mal por vía oral lo que hace de él un candidato idóneo para

retenerlo en este tipo de matrices (26) y tratar infecciones por *Staphylococcus aureus*.

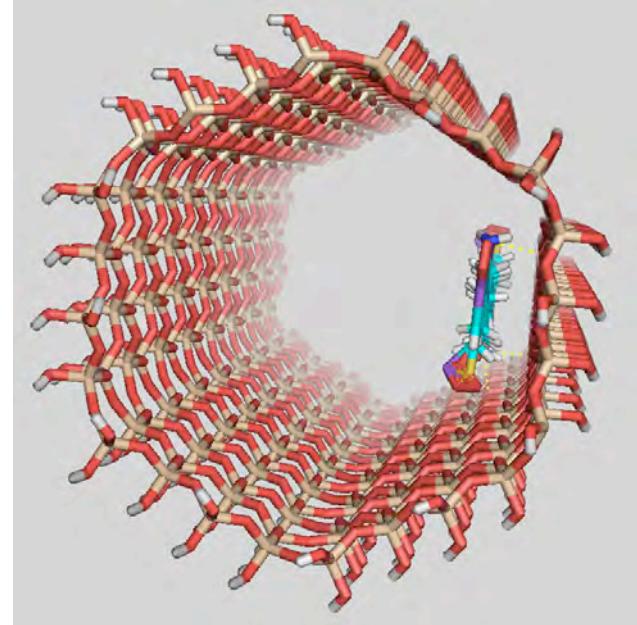


Figura 9. Representación del modelo tridimensional de SBA-15 con la molécula de Chicago SkyBlue acoplada en su interior.

Uno de los descriptores más útiles en modelización molecular es la energía de interacción de una molécula con un grupo químico determinado evaluada en puntos del espacio alrededor de la molécula estudiada lo que nos permite calcular valores de energía potencial de interacción.

Los potenciales de interacción molecular se pueden utilizar para predecir reacciones, sectores de la molécula que actúan como receptores de un medicamento, y la interacción enzima-substrato, gracias a que los potenciales electrónicos de las dos especies moleculares de una reacción pueden “verse” uno a otro y posteriormente

“percibirse” por medio del acercamiento y anclaje de las especies químicas. Así, estas superficies son usadas ampliamente para interpretar y predecir el comportamiento reactivo de una variedad de sistemas químicos en reacciones nucleofílicas o electrofílicas. Los MEPs

también permiten el estudio de procesos biológicos y las interacciones de enlaces o puentes de hidrógeno; son consideradas como una herramienta muy útil en el estudio de la reactividad molecular.

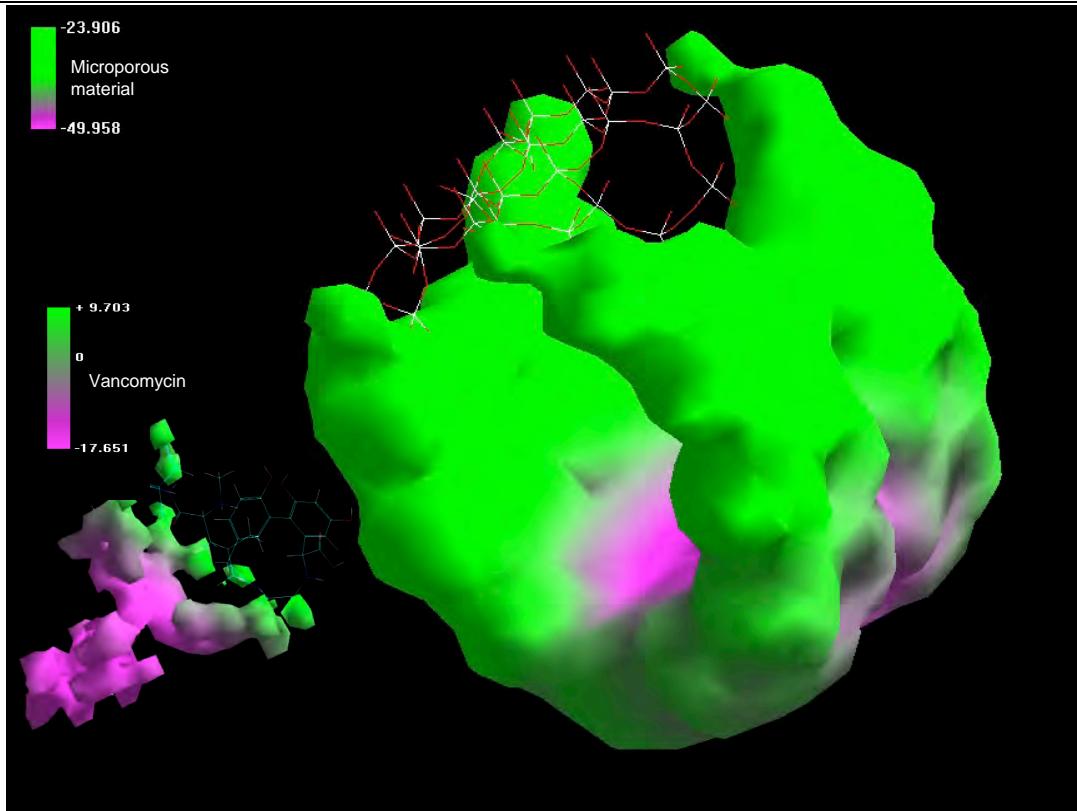
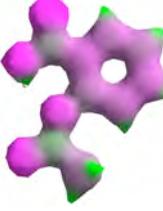
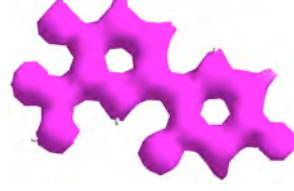
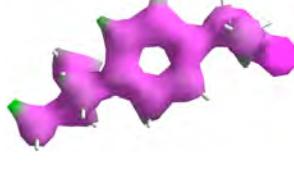


Figura 10. Potenciales electrostáticos de la vancomicina y el material mesoporoso SBA-15.

Los estudios cinéticos encontrados en la bibliografía mostraban una liberación del fármaco cuando se utilizaba como matriz el SBA-15. No obstante los estudios de potencial electrostático realizados sobre el material mesoporoso y la vancomicina mostraron la baja compatibilidad entre los potenciales electrostáticos del modelo de sílice puro y la molécula de vancomicina, ya que ambos son esencialmente negativos por lo que pudimos demostrar que la vancomicina no podía penetrar en el material mesoporoso (26). Basándonos en esta idea y en un trabajo previo (130), nuestro grupo de trabajo ha

realizado un estudio de los potenciales electrostáticos de interacción molecular de los fármacos más comúnmente utilizados en el tratamiento de las diferentes patologías, las matrices utilizadas en liberación controlada así como los potenciales electrostáticos determinados mediante aplicación de distintas técnicas computacionales (Tabla 2). De esta forma en función del fármaco utilizado podría predecirse *a priori* si éste entraría o no en la matriz mesoporosa. A modo de ejemplo presentamos algunos de los fármacos estudiados.

Tabla 2. Modelos de fármacos y matrices mesoporosas ordenadas en silice (SMMs) como sistemas de liberación de fármacos, acción farmacológica y el diagrama en 3D del potencial electrostático molecular.

| Categoría | Modelos Fármaco –SMM | Estructuras Moleculares | Referencia |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Anti-inflamatorios no-esteroidicos | Aspirina (Acido acetilsalicilico) Fibrinolitico Antipiretico Inhibidor Ciclooxygenasa Matrices: MCM-41, MCM-41-Al, MCM-41-APTES, SBA-15 |  | (30-33) |
| | Diflunisal Derivado acido Saliclico Analgesico Matriz: MCM-41-Al |  | (34) |
| | Fluribuprofeno Analgésico no-narcótico Inhibidor Ciclooxygenasa Matriz: FSM-16 |  | (35) |
| | Ibuprofeno Analgésico no-narcótico Inhibidor Ciclooxygenasa Matrices: MCM-41, MCM-41-NH ₂ , MCM-48, LP-La3d, FDU-5, SBA-15, TDU-1, MCM-41-HMDS, MCM-41-AEPTMS, MCM-41-APTES, MCM-41-DMS, MCM-41-TMS, Ti-SBA-15, SBA-15-GA |  | (27, 36-48) |
| | Indometacina Inhibidor Ciclooxygenasa Cardiovascular Tocolítico supresor gota Matrices: MCM-41, SBA-15, SBA-16 |  | (28,29, 49-50) |
| | Ketoprofeno Analgésico Antipirético Inhibidor ciclooxygenasa Matriz: SBA-15-APTES |  | (51) |

| | | | |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------|
| | | | |
| | Mesalazina Tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal Tratamiento colitis Ulcerosa Matrices: MCM-41, MCM-41-NH ₂ , MCM-41-COOH | | (52) |
| | Naproxeno Analgesico Antipiretico Matriz: MCM-41 | | (53) |
| | Fenilbutazona Analgesico Antipiretico Matriz: SBA-15 | | (28) |
| | Piroxicam Tipo de Oxicam para Tratamiento Artritis Inhibidor ciclooxigenasa Matrices: MCM-41, SBA-15 | | (54, 55) |
| Anti-inflamatorios esteroidicos | Dexametasona Glucocorticoide Antineoplásico Antiemetico Matrices: SBA-15, MCM-41 | | (56) |
| | Metilprednisolona Glucocorticoide Antineoplásico Matrices: SBA-15, SBA-16, MCM-41, FDU-12 | | 57) |
| | Prednisolona Glucocorticoide Antineoplásico Matrices: SBA-15, SBA-3, FDU-12 | | (58) |

Un nuevo enfoque, aún no explorado, sería la utilización de la técnica de docking molecular para evaluar las interacciones existentes entre los distintos fármacos y la matrices mesoporosas. De esta manera, se podría predecir sin dificultad, antes de la fase experimental, si un fármaco será o no retenido por una determinada matriz. Esto, ahorra

tiempo y dinero.

En esta técnica se consideran las moléculas como ligandos flexibles y se describen como elementos de torsión y redes construidas sobre el sitio activo de la matriz. Experimentalmente, *in silico*, el grupo de átomos enlazados que no tienen enlaces rotacionales se ubican en

un punto del sitio seleccionado (diana), para el cual los valores de rotación son energéticamente más estables y diversos. De esta manera, estos valores de energía pueden ser obtenidos y clasificados al final del cálculo de acuerdo a la cantidad de energía. Y eso es lo que hemos hecho recientemente (59) y cuyos resultados -inéditos- y

preparados exclusivamente para este trabajo, se muestran en la Tabla 3. En esta tabla, se describen las energías de interacción entre las diferentes matrices mesoporosas (Figura 11) y los diferentes fármacos estudiados.

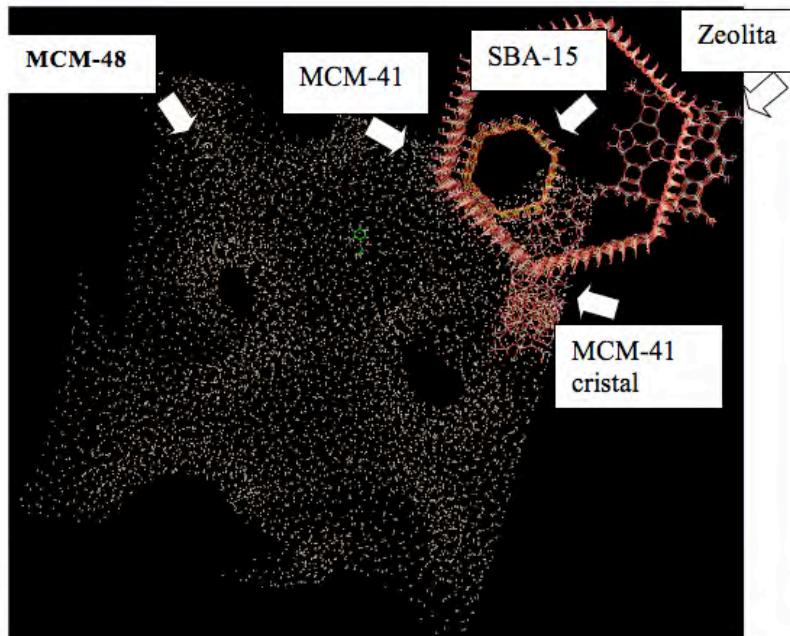


Figura 11. Modelos representativos de las estructuras MCM-41 con un fármaco acoplado (ibuprofeno), MCM-41 cristal, MCM 48, SBA 15 y zeolita, donde se pueden apreciar los tamaños relativos).

Tabla 3. Energías de interacción obtenidas mediante docking molecular entre los fármacos y las diferentes matrices

| Compuesto | E(Kcal/mol) SBA-15 | Zeolita | E(Kcal/mol) MCM41 | E(Kcal/mol) MCM41cristal | E(Kcal/mol) MCM48 |
|--------------------------|-----------------------|---------|----------------------|---------------------------------|--------------------------|
| aspirina | -3.82 | -4.08 | -3.84 | -4.15 | -3.61 |
| dexametasona | -4.58 | -5.24 | -4.66 | -4.58 | -4.18 |
| diflunisal | -4.04 | -4.37 | -4.09 | -4.15 | -3.80 |
| flurbiprofeno | -3.97 | -4.39 | -4.03 | -3.93 | -3.71 |
| ibuprofeno | -3.86 | -4.30 | -3.9 | -3.91 | -3.59 |
| indometacina | -4.08 | -4.59 | -4.15 | -4.10 | -3.77 |
| ketoprofeno | -3.9 | -4.31 | -3.94 | -4.00 | -3.64 |
| mesalazina | -4.03 | -4.21 | -4.05 | -4.28 | -3.85 |
| metilprednisolona | -3.85 | -4.39 | -3.93 | -3.93 | -3.38 |
| naproxeno | -4.0 | -4.32 | -4.06 | -4.02 | -3.73 |
| fenilbutazona | -3.92 | -4.43 | -3.96 | -3.89 | -3.59 |
| piroxicam | -4.22 | -4.63 | -4.25 | -4.31 | -3.92 |
| prednisolona | -4.45 | -5.15 | -4.62 | -4.59 | -4.17 |

10. REFERENCIAS

1. Agis-Torres A, Söllhuber M, Fernández M, Sánchez-Montero JM. Multi-Target-Directed Ligands and other Therapeutic Strategies in the Search of a Real Solution for Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology* 2014;12:2-36.
2. Muñoz Solano D, Sánchez-Montero JM. Diseño, síntesis y evaluación de la actividad biológica de nuevos inhibidores de acetilcolinesterasa. Tesina de licenciatura. Madrid: UCM, 2011.
3. Borreguero I, Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV, Rumbero A, Hermoso JA, Alcántara AR. Regioselective resolution of 1,n-diols catalysed by lipases: a rational explanation of the enzymatic selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2001;11:1013-24.
4. Nevins N Allinger NL. Molecular mechanics (MM4) vibrational frequency calculations for alkenes and conjugated hydrocarbons. *Journal of Computational Chemistry* 1996;17:730-46.
5. Case DA, Cheatham TE, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM, Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* 2005;26:1668-88.
6. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM - A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* 1983;4:187-217.
7. Sanchez-Montero JM. Modelado molecular como herramienta en el diseño racional de fármacos. Mesa Redonda sobre innovación farmacéutica. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia, 2009.
8. Goodford, PJ. A computational-procedure for determining energetically favorable binding-sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* 1985;28:849-57.
9. Basso A, Braiuca P, Ebert C, Gardossi L, Linda P, Benedetti F. GRID/tetrahedral intermediate computational approach to the study of selectivity of penicillin G acylase in amide bond synthesis, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics* 2002;1601:85-92.
10. Basso A, Braiuca P, Clementi S, Ebert C, Gardossi L, Linda P. Computational analysis of the aminic subsite of PGA explains the influence of amine structure on enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2002;19-20:423-30.
11. Kazlauskas RJ. Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4:81-8.
12. Colombo G, Toba S, Merz KM. Rationalization of the enantioselectivity of subtilisin in DMF. *J Am Chem Soc* 1999;121:3486-93.
13. Kazlauskas R. Modeling: A tool for experimentalists, *Science* 2001;293:2277-9.
14. Park JH, Ha HJ, Lee WK, Génereux-Vincent T, Kazlauskas RJ. Molecular Basis for the Stereoselective Ammoniolysis of N-Alkyl Aziridine-2-Carboxylates Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *Chembiochem* 2009;10:2213-22.
15. Braiuca P, Ebert C, Basso A, Linda P, Gardossi L. Computational methods to rationalize experimental estrategies in biocatalysis. *Trends Biotechnol* 2006;24: 419-25.
16. Henke E, Bornscheuer UT, Schmid RD, Pleiss J. A molecular mechanism of enantiorecognition of tertiary alcohols by carboxylesterases. *Chembiochem* 2003;4: 485-93.
17. Tomic S, Dobovicnik V, Sunjic V, Kojic-Prodic B. Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase towards 2-methyl-3(or 4)-arylalkanols: An approach based on the stereoelectronic theory and molecular modeling. *Croat Chem Acta* 2001;74: 343-57.
18. Tomic S, Kojic-Prodic B. A quantitative model for predicting enzyme enantio selectivity: application to *Burkholderia cepacia* lipase and 3-(aryloxy)-1,2-propanediol derivatives. *J Mol Graph Model* 2002;21: 241-52.
19. Tomic S, Bertosa B, Kojic-Prodic B, Kolosvary I. Stereoselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase towards secondary alcohols: molecular modelling and 3D QSAR approach. *Tetrahedron-Asymmetr* 2004;15:1163-72.
20. Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV. Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. *An R Acad Nac Farm* 2007;73:1199-1236.
21. Ke T, Tidor B, Klibanov, AM. Molecular-modeling calculations of enzymatic enantioselectivity taking hydration into account. *Biotechnol Bioeng* 1998;57: 741-5.
22. Ke T, Klibanov AM. Insights into the solvent dependence of chymotryptic prochiral selectivity. *J Am Chem Soc* 1998;120:4259-63.
23. Ramos Martín J, Nus M, Sinisterra Gago JV, Sánchez-Montero JM. Selective esterification of phthalic acids in two ionic liquids at hightemperatures using a thermostable lipase of *Bacillus thermocatenolatus*: A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2008;52-53:162-7.
24. Sánchez-Montero JM, Alcántara AR. Aplicaciones del modelado molecular a la biocatálisis. Libro de Texto de la Universidad Nacional de Quilmes, Argentina 2011.
25. Doadrio AL, Sánchez-Montero JM, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M. A molecular model to explain the controlled release from SBA-15 functionalized with APTES. *Microporous and Mesoporous Materials* 2014;195:43-9.
26. Doadrio JC, Doadrio AL, Sánchez-Montero JM, Salinas AJ, Vallet-Regí M. A rational explanation of the vancomycin release from SBA-15 and its derivative by molecular modelling. *Microporous and*

Molecular modeling methodologies in the design, synthesis and rational explanation of results

- Mesoporous Materials 2010;132:559-66
- 27. Doadrio JC, Sousa, EMB, Izquierdo-Barba I, Doadrio AL, Pérez-Pariente J, Vallet-Regí M. Functionalization of mesoporous materials with long alkyl chains as a strategy for controlling drug delivery pattern. *J Mater Chem* 2006;16:462-6.
 - 28. Van Speybroeck M, Barillaro V, Thi TD, et al. Ordered mesoporous silica material SBA-15: A broad-spectrum formulation platform for poorly soluble drugs. *J Pharm Sci* 2009;98:2648-58.
 - 29. Van Speybroeck M, Mellaerts R, Thao DT, et al. Preventing release in the acidic environment of the stomach via occlusion in ordered mesoporous silica enhances the absorption of poorly soluble weakly acidic drugs. *J Pharm Sci* 2011;100:4864-76.
 - 30. Zeng W, Qian, XF, Zhang YB, Yin J, Zhu ZK. Organic modified mesoporous MCM-41 through solvothermal process as drug delivery system. *Mater Res Bull* 2005;40:766-72.
 - 31. Datt A, El-Maazawi I, Larsen SC. Aspirin loading and release from MCM-41 functionalized with aminopropyl groups via co-condensation or postsynthesis modification methods. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 2012;116:18358-66.
 - 32. Huang S, Li C, Cheng Z, et al. Magnetic Fe₃O₄ mesoporous silica composites for drug delivery and bioadsorption. *J Colloid Interface Sci* 2012;376:312-21.
 - 33. Gao L, Sun J, Yuzhen L. Functionalized bimodal mesoporous silicas as carriers for controlled aspirin delivery. *J Solid State Chem* 2011;184:1909-14.
 - 34. Cavallaro G, Pierro P, Palumbo FS, Testa F, Pasqua L, Aiello R. Drug delivery devices based on mesoporous silicate. *Drug Deliv* 2004;11:41-6.
 - 35. Tozuka Y, Arpansiree W, Kyoko K, Kunikazu M, Shigeo Y, Keiji Y. Effect of pore size of FSM-16 on the entrapment of flurbiprofen in mesoporous structures. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2005;53:974-7.
 - 36. Vallet-Regí M, Ramila A, del Real RP, Pérez-Pariente J. A new property of MCM-41: drug delivery system. *Chem Mater* 2001;13:308-11.
 - 37. Heikkila T, Salonen J, Tuura J, et al. Mesoporous silica material TUD-1 as a drug delivery system. *Int J Pharm* 2007;331:133-8.
 - 38. Muñoz B, Ramila A, Pérez-Pariente J, Diaz I, Vallet-Regí M. MCM-41 organic modification as drug delivery rate regulator. *Chem Mater* 2003;15:500-3.
 - 39. Song SW, Hidajat K, Kawi, S. Functionalized SBA-15 materials as carriers for controlled drug delivery: influence of surface properties on matrix-drug interactions. *Langmuir* 2005;21:9568-75.
 - 40. Tang QL, Xu Y, Wu D, Sun YH. Hydrophobicity-controlled drug delivery system from organic modified mesoporous silica. *Chem Lett* 2006;35:474-5.
 - 41. Tang QL, Xu Y, Wu D, et al. Studies on a new carrier of trimethylsilyl-modified mesoporous material for controlled drug delivery. *J Control Release* 2006;114:41-6.
 - 42. Gao L, Sun J, Zhang L, Wang J, Ren B. Influence of different structured channels of mesoporous silicate on the controlled ibuprofen delivery. *Mater Chem Phys* 2012;135:786-97.
 - 43. Wan, MM, Sun XD, Li S, Ma J, Zhu JH. Versatile drug releaser derived from the Ti-substituted mesoporous silica SBA-15. *Microporous Mesoporous Mater* 2014;199:40-9.
 - 44. Brás IR, Fonseca M, Dionisio M, Schönhals A, Affouard F, Correia NT. Influence of nanoscale confinement on the molecular mobility of ibuprofen. *J Phys Chem C* 2014;118:13857-68.
 - 45. Shena S, Nga W, Chiaa L, Hua J, Tan-Reginald BH. Physical state and dissolution of ibuprofen formulated by co-spray drying with mesoporous silica: Effect of pore and particle size. *J Phys Chem* 2011;115:23790-6.
 - 46. Szegedi A, Popova M, Goshev I, Klebert S, Mihaly J. Controlled drug release on amine functionalized spherical MCM-41. *J Solid State Chem* 2012;194:257-63.
 - 47. Vallet-Regí M. Bio-ceramics with clinical applications. India: Wiley 2014.
 - 48. Rehman F, Volpe P, Airolidi C. The applicability of ordered mesoporous SBA-15 and its hydrophobic glutaraldehyde-bridge derivative to improve ibuprofen-loading in realising system. *Colloids Surf B* 2014;119:82-9.
 - 49. Hu Y, Wang J, Zhi Z, Jiang T, Wang S. Facile synthesis of 3D cubic mesoporous silica microspheres with a controllable pore size and their application for improved delivery of a water-insoluble drug. *J Colloid Interface Sci* 2011;363:410-7.
 - 50. Murzin DY, Heikkila T. Modeling of drug dissolution kinetics with sigmoidal behavior from ordered mesoporous silica. *Chem Eng Commun* 2014;201:579-92.
 - 51. Moritz M, Laniecki M. SBA-15 mesoporous material modified with APTES as the carrier for 2-(3-benzoylphenyl)propionic acid. *Appl Surf Sci* 2012;258:7523-9.
 - 52. Popova M, Szegedi A, Yoncheva K, et al. New method for preparation of delivery systems of poorly soluble drugs on the basis of functionalized mesoporous MCM-41 nanoparticles. *Microporous Mesoporous Mater* 2014;198:247-55.
 - 53. Carriazo D, del Arco M, Martín C, Ramos C, Rives V. Influence of the inorganic matrix nature on the sustained release of naproxen. *Microporous Mesoporous Mater* 2010;130:229-38.
 - 54. Ambrogi V, Perioli L, Marmottini F, Giovagnoli S, Esposito M, Rossi C. Improvement of dissolution rate of piroxicam by inclusion into MCM-41 mesoporous silicate. *Eur J Pharm Sci* 2007;32:216-22.

55. Fu T, Guo L, Le K, Wang T, Lu J. Template occluded SBA-15: an effective dissolution enhancer for poorly water-soluble drug. *Appl Surf Sci* 2010;256:6963-8.
56. De Matos MBC, Piedade AP, Álvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Braga ME, de Sousa HC. Dexamethasone-loaded poly (epsilon-caprolactone)/silica nanoparticles composites prepared by supercritical CO₂ foaming/mixing and deposition. *Int J Pharm* 2013;456:269-81.
57. García-Muñoz RA, Morales V, Linares M, González PE, Sanz R, Serrano DP. Influence of the structural and textural properties of ordered mesoporous materials and hierarchical zeolitic supports on the controlled release of methylprednisolone hemisuccinate. *J Mater Chem B Mater Biol Med* 2014;2:7996-8004.
58. Martin A, García RA, Sen Karaman D, Rosenholm JM. Polyethyleneimine-functionalized large pore ordered silica materials for poorly water-soluble drug delivery. *J Mater Sci* 2014;49:1437-47.
59. Doadrio AL, Salinas A, Sánchez-Montero JM, Vallet-Regí M. Drug release from ordered mesoporous silicas. *Current Pharmaceutical Design* 2015;21:6189-213.



Role of glucose-dependent insulinotropic peptide in the nutritional programming of metabolic syndrome

Title in Spanish: Papel del péptido insulíntrópico dependiente de glucosa en la programación nutricional del síndrome metabólico

Juan de Toro Martín^{1*}, Elisa Fernández Millán^{2,3}, Esther Lizárraga Mollinedo², Fernando Escrivá Pons^{2,3}, Carmen Álvarez Escolá^{2,3}

¹Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF), Université Laval. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM).

ABSTRACT: Early nutritional restriction has been associated with increased incidence of metabolic syndrome-associated pathologies in adulthood. However, the underlying mechanisms that determine the development of these diseases are not yet fully known. In the present work, we explored the relevance of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) in the development of these pathologies in a model of Wistar rats. Two groups of dams were fed ad libitum (C) or food-restricted (U) during pregnancy and suckling. At that time, rats were refed a high-fat diet (HFD; CHF and UHF) for 22 weeks. Both male and female UHF rats showed an obese phenotype characterized by hyperphagia, visceral fat accumulation and adipocyte hypertrophy, which was more pronounced than in CHF rats. Oral glucose tolerance tests showed that female UHF rats experienced glucose intolerance, insulin hypersecretion and an exacerbated GIP secretion. Administration of the GIP receptor antagonist, (Pro3)GIP, to UHF female rats markedly reduced visceral fat mass and adipocyte hypertrophy, and these changes were accompanied by improvement of glucose tolerance and insulin sensitivity. In conclusion, the exacerbated production and secretion of GIP seems to represent the stimulus for insulin hypersecretion and insulin resistance shown by UHF female rats, suggesting that GIP may play a critical role in the development of metabolic disturbances related to nutritional rehabilitation.

RESUMEN: La restricción nutricional precoz ha sido asociada con una mayor incidencia de patologías relacionadas con el síndrome metabólico durante la edad adulta. Sin embargo, los mecanismos subyacentes que determinan el desarrollo de dichas patologías aún no se conocen en su totalidad. En el presente trabajo, se analizó el papel del péptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP) en el desarrollo de dichas patologías en un modelo de rata Wistar. Las ratas gestantes fueron alimentadas *ad libitum* (C) o sometidas a restricción nutricional (S) durante el embarazo y la lactancia, al final de la cual las crías fueron realimentadas con dieta grasa (CR, SR) durante 22 semanas. Tanto los machos como las hembras SR mostraron un fenotipo obesogénico caracterizado por hiperfagia, acumulación de grasa visceral e hipertrofia adipocitaria, de manera más pronunciada que la población CR. Los test de tolerancia oral a la glucosa mostraron que las hembras SR experimentaron intolerancia a la glucosa e hipersecreción de insulina y GIP. La administración del antagonista del receptor de GIP, (Pro3)GIP, a las hembras SR dio lugar a una significativa reducción del tejido adiposo y del tamaño adipocitario, junto a una mejora de la tolerancia a la glucosa y de la sensibilidad a la insulina. En conclusión, la exacerbada secreción de GIP parece representar el estímulo para la hipersecreción de insulina y el desarrollo de resistencia a la misma en las hembras SR, lo que sugiere que GIP jugaría un papel esencial en el desarrollo de alteraciones metabólicas asociadas a la rehabilitación nutricional.

*Corresponding Author: juandetoromartin@gmail.com

Received: October 7, 2015 Accepted: June 20, 2016

Premio Juan Abelló del Concurso Científico 2015 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 185-199

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La restricción nutricional durante etapas críticas del desarrollo ha sido asociada al desarrollo de patologías relacionadas con el síndrome metabólico durante la edad adulta, como la obesidad y la diabetes tipo 2. Esta relación ha sido previamente puesta de manifiesto en diferentes estudios epidemiológicos en humanos (1,2), así como en modelos de experimentación animal (3,4). Asimismo, se

ha descrito que una realimentación con dieta grasa induce un empeoramiento del perfil lipídico, así como un deterioro de la homeostasis glucídica, de manera más acusada en individuos sometidos a restricción nutricional precoz que en aquellos no sometidos a ningún tipo de restricción nutricional durante etapas del desarrollo (5). Sin embargo, los mecanismos subyacentes que determinan la aparición de dichas patologías aún no se conocen en su

totalidad. En este sentido, aún son escasos los estudios encaminados a dilucidar el papel del eje entero-insular en la regulación de la homeostasis glucídica y nutricional, así como en las adaptaciones metabólicas que tienen lugar durante la rehabilitación nutricional.

El eje entero-insular representa una red de comunicaciones neuronales, endocrinas y nutricionales entre el tracto gastrointestinal y páncreas endocrino. Entre los péptidos secretados desde el epitelio intestinal se encuentra el denominado péptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP), secretado por las células K en respuesta a la ingesta de nutrientes (6), principalmente glucosa y grasas (7), y capaz de incrementar la secreción de insulina estimulada por glucosa (8). Este efecto, conocido como efecto incretina, se basa en el hecho de que una administración oral de glucosa es capaz de inducir un incremento mucho mayor (entre un 50 y un 70%) de los niveles plasmáticos de insulina en comparación con la misma cantidad de glucosa administrada por vía intravenosa (9,10), debido a la activación del receptor de GIP en las células β pancreáticas, estimulando finalmente la exocitosis de los gránulos de insulina (11). Además de potenciar la secreción de insulina en humanos y roedores, GIP estimula la biosíntesis de insulina, induciendo la expresión del gen de proinsulina, y la expresión de las proteínas implicadas en la detección de glucosa por la célula β , como el transportador de glucosa GLUT-1 y la hexoquinasa 1 (12). Asimismo, estudios en ratones con una delección específica del receptor de GIP en los islotes pancreáticos han puesto de manifiesto la capacidad de GIP para estimular la proliferación e inhibir la apoptosis de las células β (13).

A nivel extrapancreático, las acciones más relevantes de GIP tienen lugar en el tejido adiposo, promoviendo diferentes procesos anabólicos como la síntesis de ácidos grasos, la lipogénesis mediada por insulina, la síntesis de la lipoproteína lipasa (LPL) y reduciendo la lipólisis mediada por glucagón (8). Por tanto, GIP tiene un destacado papel en el metabolismo lipídico y en el desarrollo de obesidad.

La producción y secreción de GIP parece estar coordinada con el estatus nutricional, ya que se ha observado que dietas ricas en grasa aumentan el número de células K, así como la expresión y los niveles circulantes de GIP (14,15). Asimismo, se ha descrito que la secreción de GIP tras una sobrecarga oral de glucosa aumenta si existe una exposición previa a una dieta grasa, hecho que podría contribuir a la hiperinsulinemia que presentan individuos obesos con resistencia a la insulina (16). Aunque la señalización de GIP en los adipocitos no resulta esencial en condiciones de sensibilidad normal a la insulina, sí parece ser indispensable en la efectiva acumulación de lípidos tras una alimentación con dieta grasa (17). En este sentido, el tratamiento farmacológico con análogos de GIP da lugar a un aumento de la actividad LPL y de la acumulación de triglicéridos en el tejido adiposo en ratas diabéticas (18). Además, ratones con una delección específica del receptor de GIP en el tejido

adiposo son resistentes al desarrollo de obesidad inducida por la dieta y exhiben una significativa reducción en los niveles circulantes de triglicéridos (19).

La mayor parte de las acciones de GIP han sido puestas de relevancia mediante estudios farmacológicos, a través de la administración exógena de agonistas de GIP. Sin embargo, la importancia de la acción endógena de GIP en el control de la homeostasis de la glucosa no está del todo definida. Por tanto, el presente trabajo se llevó a cabo para dilucidar la posible implicación de GIP en el desarrollo de patologías asociadas al síndrome metabólico durante la edad adulta tras la rehabilitación nutricional. Dado que los efectos de la programación nutricional precoz pueden permanecer latentes, se utilizó un modelo animal de rata Wistar en el que los animales previamente sometidos a restricción nutricional fueron posteriormente realimentados con dieta grasa tras el destete. Asimismo, se estableció un análisis comparativo previo en función del sexo sobre el impacto de la rehabilitación nutricional con dieta grasa en la homeostasis glucídica.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales de experimentación

Para la realización de este estudio se utilizaron ratas Wistar que se mantuvieron en condiciones ambientales controladas de manera automática (temperatura 25 ± 2 °C, humedad 50-70% y ciclos de luz-oscuridad de 12 h) y tuvieron libre acceso al agua de bebida. La reproducción de las ratas fue controlada para conocer con exactitud la fecha de inicio de la gestación y el día del nacimiento se procedió a uniformar las camadas en grupos de 8 neonatos. El final de la lactancia se marcó en el día 23 de vida y, tras el destete, las ratas fueron dispuestas en grupos de 3-4 animales por jaula. La alimentación de las ratas se llevó a cabo con dos tipos de dietas comerciales en forma de granulado prensado: dieta estándar (2.9 kcal/g; A04, Safe Diets) y dieta grasa (4.1 kcal/g; D12451, Research Diets) (Tabla 1). El alimento fue distribuido ad libitum o racionado en función de la población experimental. Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación y las muestras de sangre troncular se recogieron siempre a la misma hora del día (10:00 a. m.) en condiciones de ayuno (16 h). Para la obtención de suero sanguíneo se utilizaron tubos sin adición de anticoagulantes, mientras que para la obtención de plasma se adicionó EDTA (2 mg/ml) a los tubos de recolección. La sangre fue centrifugada (6500 rpm, 20 min, 4 °C) y, tanto el suero como el plasma se conservaron (-20 °C) hasta el momento de su utilización. Las muestras tisulares se fueron conservadas a -80 °C hasta su posterior utilización.

Todos los estudios realizados en este trabajo se llevaron a cabo de acuerdo a los principios y procedimientos descritos en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (20) y fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

Tabla 1. Tabla comparativa de la composición nutricional de las dietas

| | Dieta estandar | Dieta grasa |
|-----------------------------|----------------|-------------|
| Ingredientes (g/100g) | | |
| Proteínas | 16.3 | 20.3 |
| Lípidos | 2.9 | 20.3 |
| Glúcidos | 48.2 | 39.6 |
| Almidón | 45 | 7.3 |
| Sacarosa | 3.2 | 10.0 |
| Maltodextrina | - | 17.3 |
| Celulosa | 4.5 | 5.0 |
| Mezcla vitamínica y mineral | 4.6 | 5.7 |
| Aporte calórico (% kcal/g) | | |
| Proteínas | 23 | 20 |
| Lípidos | 9 | 45 |
| Carbohidratos | 68 | 35 |

2.2. Modelo de restricción nutricional-realimentación

El modelo de intervención nutricional implantado en este trabajo está basado en un modelo de subnutrición perinatal previo (21), en el cual la restricción nutricional proteico-calórica crónica del 65% se prolonga desde la tercera semana de gestación hasta la edad adulta. A partir de este modelo de restricción nutricional crónica se aplicó un régimen de realimentación con dieta grasa tras el destete. Para ello, tanto la población control (C) como la

subnutrida (S) fueron subdivididas de manera aleatoria tras el destete, dando lugar a dos nuevas poblaciones de ratas adultas: control-realimentada (CR) y subnutrida-realimentada (SR), las cuales recibieron una dieta grasa ad libitum durante 22 semanas (Figura 1). Los parámetros nutricionales y metabólicos de los animales fueron determinados regularmente, y la evolución del peso corporal y de la ingesta calórica fue monitorizada diariamente.

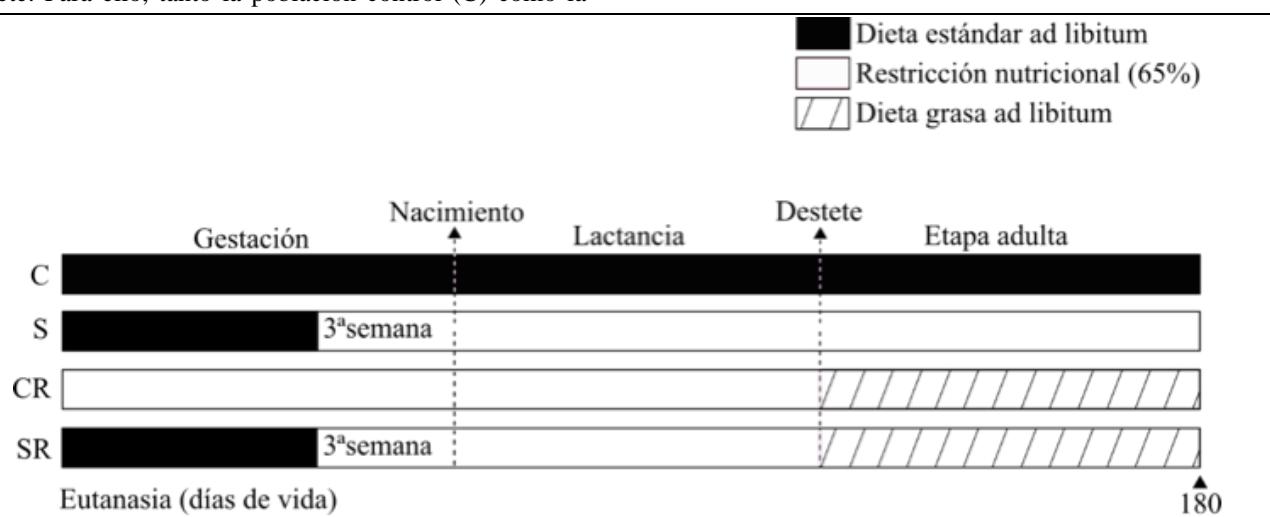


Figura 1. Vista esquematizada del modelo de restricción nutricional-realimentación. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

2.3. Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas

Las muestras hepáticas fueron fijadas en solución de Bouin [solución acuosa saturada de ácido pícrico (75% v/v), formaldehído 37% (20% v/v) y ácido acético glacial (5% v/v)], mientras que las muestras intestinales y de

tejido adiposo fueron fijadas en paraformaldehido (4% p/v). Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en alcoholos de graduación creciente y xileno e incluidas en bloques de parafina (Paraplast Plus, Tyco Healthcare, Mansfield, EEUU). Los bloques de parafina fueron cortados con micrótomo (RM2125RT, Leica, Wetzlar,

Alemania) en secciones de 5 µm, las cuales fueron fijadas sobre portaobjetos con calor (37° C). Los cortes fueron posteriormente desparafinados en xileno y rehidratados con alcoholes de graduación decreciente y agua destilada para llevar a cabo los marcajes histoquímicos e inmunohistoquímicos correspondientes.

El tamaño de los adipocitos y la presencia de lípidos en muestras hepáticas de manera indirecta, se determinó mediante una tinción de hematoxilina/eosina. Para ello, los cortes histológicos fueron incubados con hematoxilina de Harris (Accustain Harris Hematoxylin, Sigma-Aldrich) y eosina (Eosina Amarillenta 1% DC, Panreac, Castellar del Vallés, España) durante un tiempo variable (1-2 min) y, finalmente, lavados con etanol 70° y agua destilada.

La detección inmunohistoquímica de GIP se llevó a cabo en muestras tisulares de duodeno, donde la presencia de células K, productoras y secretoras de GIP, es más abundante y homogénea. Para ello, se utilizó una técnica combinada de biotina-avidina (Vectastain Elite ABC kit, Vector). Los cortes histológicos fueron incubados con anticuerpos primarios frente GIP (24 h, 4 °C) y, tras varios lavados con TBS, se incubaron con anticuerpos secundarios especie-específicos acoplados a biotina (1 h, temperatura ambiente). Finalmente, las muestras se pusieron en contacto con una solución de avidina acoplada a peroxidasa (30 min, temperatura ambiente). El número de células positivas para GIP fue analizado mediante recuento directo y los resultados se expresaron como número de células por unidad de área de epitelio. Las micrografías fueron realizadas con un microscopio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan) acoplado a una cámara digital (XCD-U100CR, Sony, Tokyo, Japan) y fueron analizadas con el software informático Histolab (Microvision Instruments, Evry, Francia).

2.4. Test de tolerancia oral a la glucosa

Los test de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) se llevaron a cabo tras la finalización de las 22 semanas de dieta. Para ello, tras 16 horas de ayuno, las ratas recibieron una dosis oral de glucosa (40% p/v, 2 g/kg) y se recogieron muestras plasmáticas de la cola de los animales a diferentes tiempos (0, 10, 30, 60, 90 y 120 min). Con el fin de evitar la degradación de GIP, las muestras se recogieron en tubos con un inhibidor de la enzima dipeptidil peptidasa-IV (10 µl/ml; DPP-IV inhibitor, Millipore). La determinación de la concentración de insulina y GIP total se llevó a cabo mediante multiplex y la glucemia fue determinada en los tiempos anteriormente descritos con un glucómetro (OneTouch Ultra 2, LifeScan, Milpitas, EEUU). El área bajo la curva (AUC) de glucosa fue calculada aplicando la regla trapezoidal sobre los niveles de glucemia durante 120 minutos tras la sobrecarga oral de glucosa. El índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) fue calculado con la siguiente fórmula: HOMA-IR=

glucosa plasmática (mmol/l) × insulina plasmática (µU/ml)/22.5.

2.5. Antagonismo farmacológico de GIP in vivo

Con el objetivo de determinar el papel de GIP en el desarrollo de un fenotipo obeso-diabético en las hembras de la población subnutrida y posteriormente realimentada con dieta grasa (SR), las ratas fueron inyectadas i.p. (25 nmol/kg) con un antagonista de GIP (Pro3(GIP), Europe GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante los últimos 21 días en dieta. Para llevar a cabo este estudio, un grupo de hembras SR fue inyectado diariamente (17:00 p. m.) con Pro3(GIP), mientras que a otro grupo se le administró un vehículo salino (NaCl 0.9% p/v). La dosis administrada fue seleccionada en función de estudios previos (22,23).

2.6. Análisis estadísticos

Los resultados fueron expresados como la media aritmética de los datos y su error estándar. La significación estadística fue analizada mediante la prueba t de Student, para comparaciones de dos grupos, y mediante la prueba ANOVA, para comparaciones de más de dos grupos. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados para determinar interrelaciones entre variables. La significación fue considerada siempre que P<0.05. Los resultados fueron analizados con el software GraphPad Prism 6 (San Diego, EEUU).

3. RESULTADOS

3.1. Las ratas SR experimentaron hiperfagia, incremento de la adiposidad e hipertrigliceridemia

Tras el destete, independientemente del sexo o del estatus nutricional previo, todas las ratas ganaron peso cuando fueron alimentadas con dieta grasa. Sin embargo, tras 22 semanas en dieta, el peso de las ratas SR no fue superior al mostrado por la población CR (Figura 2a,d).

Tanto los machos como las hembras S mostraron un menor peso corporal respecto a la población C durante todo el desarrollo de los experimentos (Figura 2a,d), así como de la ingesta alimentaria (Figura 2b,e) y calórica (Figura 2c,f). Aunque la cantidad de alimento ingerido por las ratas SR fue significativamente menor, en comparación con la población CR (Figura 2b,e), éstas fueron significativamente hiperfágicas cuando la cantidad de alimento ingerido se corrigió por el peso corporal (Figura 2c,f).

La proporción de grasa visceral mostrada por las ratas S fue significativamente inferior al de las ratas C (Tabla 2) y, de manera más acusada, en las hembras que en los machos (hembras: 4.7 vs machos: 2.2 veces). Sin embargo, tras la alimentación con dieta grasa, los depósitos de grasa visceral mostraron un aumento significativo en las ratas CR y SR, independientemente del sexo (Tabla 2).

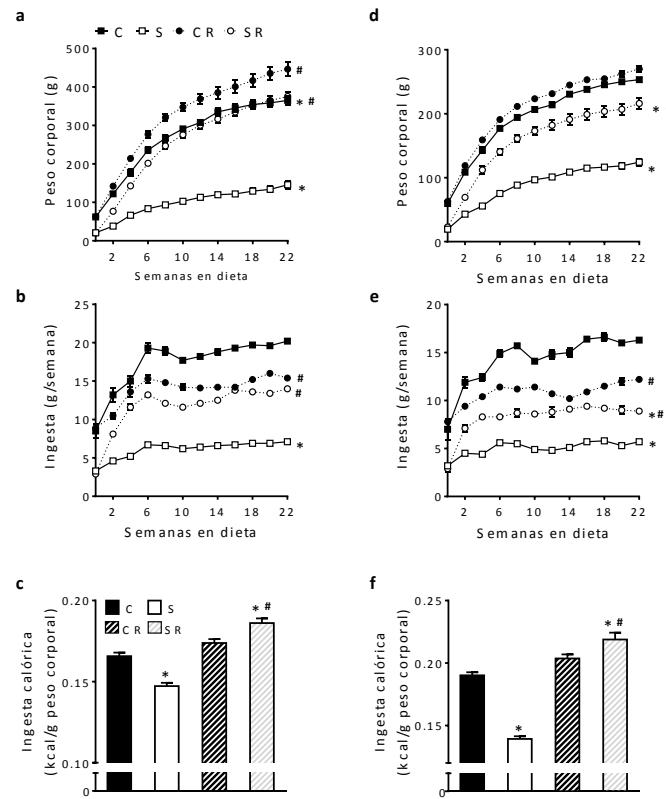


Figura 2. Las ratas subnutridas mostraron hiperfagia tras la realimentación con dieta grasa. Peso corporal, ingesta alimentaria e ingesta calórica en machos (a-c) y hembras (d-f) tras 22 semanas en dieta grasa. Los datos representan la media ± ESM (n=10-12). *P<0.05 S vs C, SR vs CR. #P<0.05 CR vs C, SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

Tabla 2. Características generales de las ratas tras la rehabilitación nutricional con dieta grasa. Parámetros fisiológicos y hormonales de las ratas, machos y hembras, de 180 días de vida (22 semanas en dieta grasa). Los datos representan la media ± ESM (n = 10-12). *P<0.05 S vs C, SR vs CR; #P<0.05 CR vs C, SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

| | C | S | CR | SR |
|---------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Machos | | | | |
| Peso corporal (g) | 365.0 ± 11.7 | 145.4 ± 13.2 ^a | 466.7 ± 10.9 ^b | 369.0 ± 13.7 ^{cd} |
| Grasa visceral (% p.c.) | 2.90 ± 0.16 | 1.34 ± 0.14 ^a | 5.56 ± 0.11 ^b | 4.27 ± 0.26 ^{cd} |
| Peso de hígado (% p.c.) | 2.20 ± 0.07 | 3.34 ± 0.25 ^a | 2.26 ± 0.06 | 1.99 ± 0.05 ^c |
| Peso de páncreas (% p.c.) | 0.24 ± 0.01 | 0.47 ± 0.02 ^a | 0.24 ± 0.02 | 0.26 ± 0.03 ^c |
| Glucosa (mmol/l) | 4.33 ± 0.09 | 3.70 ± 0.41 | 4.49 ± 0.34 | 4.58 ± 0.25 |
| Colesterol (mmol/l) | 1.32 ± 0.11 | 1.33 ± 0.05 | 1.75 ± 0.09 ^b | 1.43 ± 0.10 |
| Triglicéridos (mmol/l) | 0.41 ± 0.03 | 0.37 ± 0.02 | 0.42 ± 0.04 | 0.56 ± 0.02 ^{cd} |
| Hembras | | | | |
| Peso corporal (g) | 248.6 ± 3.73 | 133.0 ± 3.10 ^a | 265.2 ± 0.20 ^b | 203.6 ± 4.80 ^{cd} |
| Grasa visceral (% p.c.) | 2.78 ± 0.30 | 0.59 ± 0.05 ^a | 3.54 ± 0.39 ^b | 3.37 ± 0.25 ^c |
| Peso de hígado (% p.c.) | 2.66 ± 0.09 | 3.21 ± 0.16 ^a | 2.37 ± 0.04 | 2.45 ± 0.02 ^c |
| Peso de páncreas (% p.c.) | 0.31 ± 0.02 | 0.43 ± 0.03 ^a | 0.27 ± 0.01 | 0.31 ± 0.02 ^c |
| Glucosa (mmol/l) | 4.46 ± 0.20 | 5.01 ± 0.12 | 5.37 ± 0.32 ^b | 4.73 ± 0.14 |
| Colesterol (mmol/l) | 1.20 ± 0.14 | 1.36 ± 0.11 | 1.36 ± 0.16 | 1.75 ± 0.13 |
| Triglicéridos (mmol/l) | 0.45 ± 0.05 | 0.44 ± 0.03 | 0.33 ± 0.02 | 0.83 ± 0.09 ^{cd} |

3.2. Los machos SR mostraron un ligero deterioro en la tolerancia a la glucosa y una disminución de la secreción postprandial de insulina

Durante el OGTT, los niveles plasmáticos de glucosa fueron significativamente inferiores en los machos S, respecto a la población C (Figura 3a). Asimismo, los niveles circulantes de insulina mostraron una significativa disminución en dicha población (Figura 3b), tanto en condiciones basales como transcurridos 15 minutos tras la sobrecarga oral de glucosa. A pesar de que tanto los machos CR como los SR mostraron un ligero deterioro de la tolerancia a la glucosa, la respuesta insulino secretora de la población SR fue significativamente menor a la observada en los machos CR (Figura 3b). De acuerdo con estos resultados, los niveles de HOMA-IR fueron significativamente más elevados en la población CR, respecto a los machos SR (Figura 3c), lo que sugería que estos últimos habrían retenido una mayor sensibilidad a la insulina respecto a la población CR.

3.3. Las hembras SR mostraron una severa intolerancia a

la glucosa y un elevado índice de resistencia a insulina

Al igual que se observó en los machos, las hembras S mostraron una menor secreción de insulina en comparación a la población C (Figura 4b). Sin embargo, tras la realimentación con dieta grasa, el deterioro observado en la tolerancia a la glucosa de las hembras SR (Figura 4a) fue significativamente más pronunciado que el exhibido por los machos SR, como muestran los valores de AUC de ambas poblaciones.

Dicho deterioro en la tolerancia a la glucosa se produjo a pesar de la hipersecreción de insulina mostrada por las hembras SR, en comparación a las hembras CR (Figura 4b). Como cabría esperar, las hembras S presentaron valores de HOMA-IR significativamente inferiores a los mostrados por la población C (Figura 4c). Por otro lado, los valores de HOMA-IR fueron significativamente superiores en la población SR, respecto a la CR (Figura 4c). Asimismo, las hembras SR mostraron los valores de HOMA-IR más elevados entre todas las poblaciones estudiadas, tanto machos como hembras.

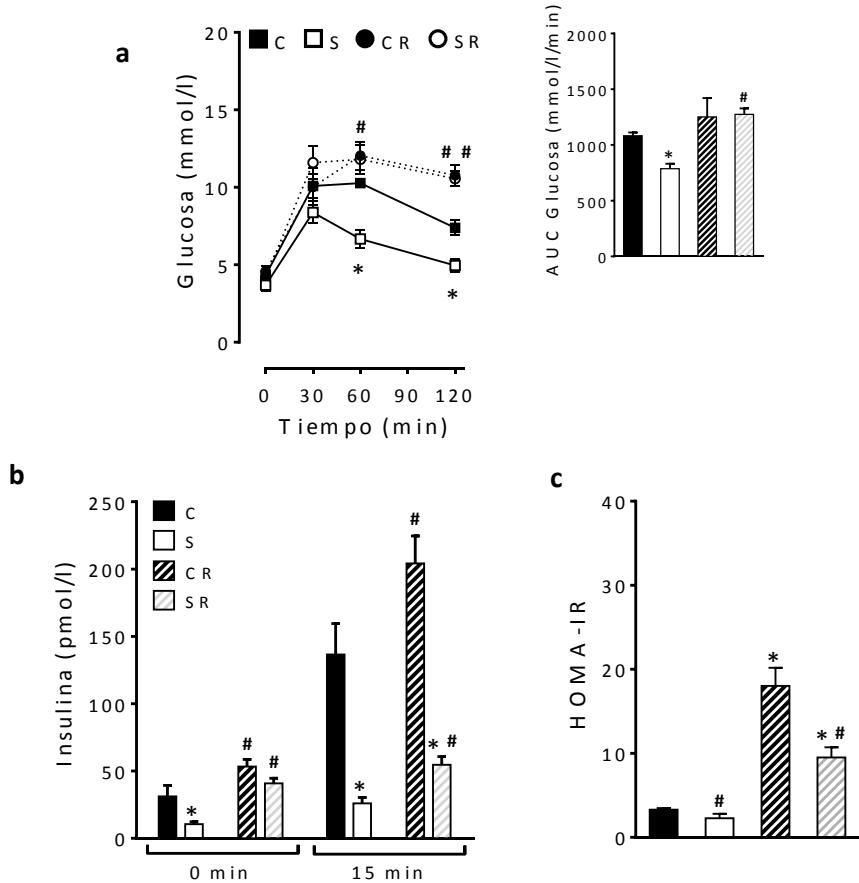


Figura 3. La realimentación con dieta grasa indujo un deterioro de la tolerancia a la glucosa en machos. (a) Niveles circulantes de glucosa, AUC de glucosa y (b) niveles circulantes de insulina durante el OGTT en machos tras 22 semanas en dieta. (c) Índice de resistencia a insulina (HOMA-IR). Los datos representan la media \pm ESM ($n=6$). * $P<0.05$ S vs C, SR vs CR. # $P<0.05$ CR vs C, SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

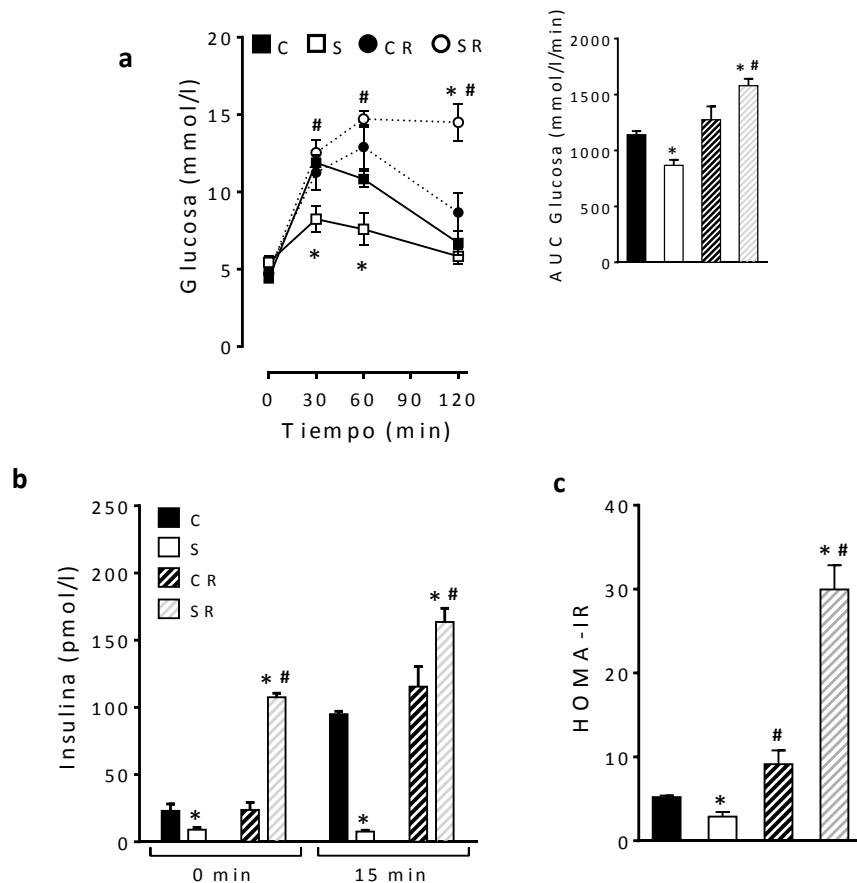


Figura 4. Las hembras SR mostraron intolerancia a la glucosa y una elevada resistencia a la insulina. (a) Niveles circulantes de glucosa, AUC de glucosa y (b) niveles circulantes de insulina durante el OGTT en hembras tras 22 semanas en dieta grasa. (c) Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR). Los datos representan la media \pm ESM ($n=6$). * $P<0.05$ S vs C, SR vs CR. # $P<0.05$ CR vs C, SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

En vista de que los resultados obtenidos tras los OGTT revelaron que los efectos adversos de la rehabilitación nutricional con dieta grasa sobre la homeostasis glucídica, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, tenían lugar principalmente en las hembras, los experimentos encaminados a determinar el papel de GIP en el desarrollo de dichas alteraciones se llevaron a cabo exclusivamente en dicha población.

3.4. La realimentación con dieta grasa indujo un incremento del contenido intestinal y de los niveles circulantes de GIP en las hembras SR

En primer lugar, los resultados de la cuantificación de células K, productoras de GIP, en muestras tisulares de duodeno en hembras, no mostraron diferencias significativas entre ninguna de las poblaciones estudiadas (Figura 5a). Sin embargo, se observó un incremento significativo del contenido intestinal de GIP en las

hembras CR y SR, respecto a sus respectivas poblaciones control (Figura 5b).

El análisis de los niveles circulantes de GIP mostró que, tanto en condiciones basales como tras la sobrecarga oral de glucosa, las ratas S mostraron niveles significativamente disminuidos de GIP respecto a la población C (Figura 5c). Por otro lado, mientras que las hembras CR no mostraron alteraciones significativas en comparación con la población C, los niveles plasmáticos de GIP exhibidos por las hembras SR fueron significativamente superiores a los mostrados por las hembras S, e incluso a los exhibidos por las hembras CR, tanto en condiciones basales como tras la sobrecarga oral de glucosa (Figura 5c).

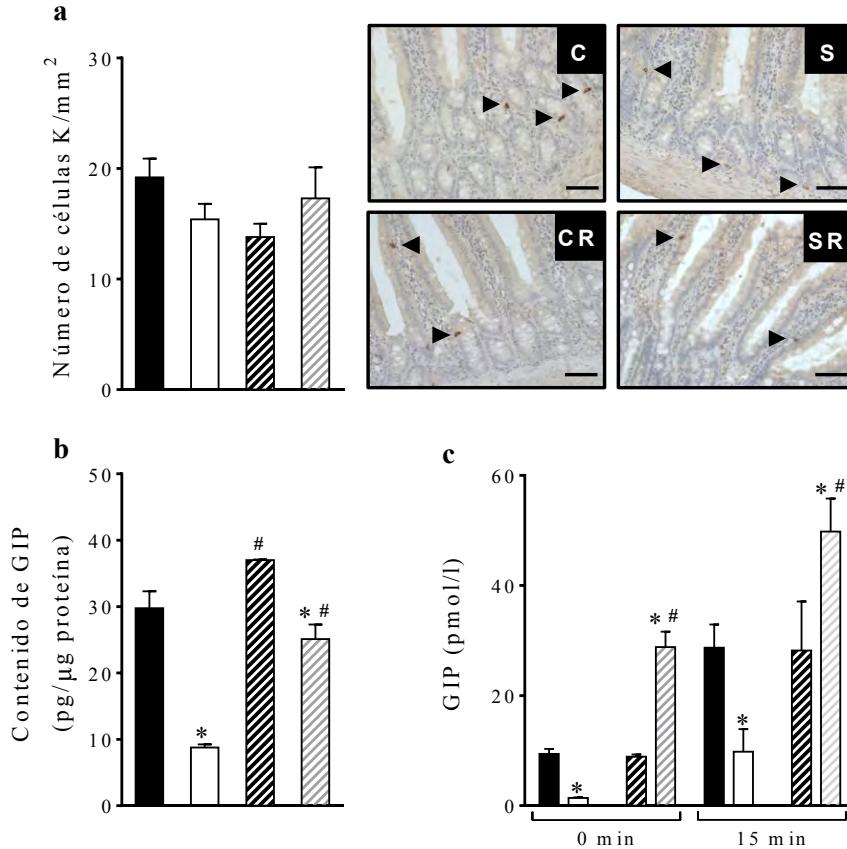


Figura 5. La alimentación con dieta grasa indujo un aumento en el contenido intestinal y en los niveles circulantes de GIP en las hembras SR. (a) Número de células K e imágenes representativas de la inmunolocalización de dichas células. (b) Contenido intestinal de GIP (n=4). (c) Niveles circulantes de GIP durante el OGTT (n=6). Los datos representan la media ± ESM. *P<0.05 S vs C y SR vs CR. #P<0.05 CR vs C y SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

3.5. Las hembras SR experimentaron hipertrofia adipocitaria, un elevado índice de resistencia a insulina y una limitada acumulación ectópica de lípidos

Entre otras acciones, GIP es capaz de actuar sobre el tejido adiposo promoviendo la acumulación de grasa en los adipocitos. Por lo tanto, en vista de los elevados niveles de GIP observados en las hembras SR (Figura 5c) y del significativo aumento de los depósitos de grasa en dicha población (Tabla 2), se analizó la morfología del tejido adiposo visceral y su relación con los niveles circulantes de GIP.

En primer lugar, ambas poblaciones de hembras alimentadas con dieta grasa exhibieron adipocitos de un tamaño significativamente superior al mostrado por sus respectivas poblaciones control (Figura 6a). No obstante, la hipertrofia experimentada por la población SR fue significativamente superior a la mostrada por la población CR ($P<0.05$; SR: 328% vs CR: 69%). Estas alteraciones se reflejaron en un marcado incremento de los niveles de HOMA-IR en las poblaciones alimentadas con dieta grasa, significativamente más elevados en la población SR,

respecto a la población CR (Figura 6b). Los análisis de correlación de Pearson mostraron una correlación positiva y significativa entre el tamaño de los adipocitos y los niveles de HOMA-IR ($r^2=0.88$, $P<0.001$). Asimismo, los niveles basales de GIP mostraron una correlación positiva y significativa con el tamaño de los adipocitos ($r^2=0.73$, $P<0.001$) y con los niveles de HOMA-IR ($r^2=0.81$, $P<0.001$) (Figura 6c).

Por el contrario, el análisis del contenido hepático de lípidos mostró que la acumulación de triglicéridos en el hígado fue significativamente superior en la población CR, respecto a las hembras SR (Figura 7a), mientras que el contenido de colesterol total fue similar en ambas poblaciones (Figura 7b). Asimismo, la observación microscópica del tejido hepático mostró un mayor número de inclusiones lipídicas en el hígado de la población CR (Figura 7c), evidenciando un mayor acúmulo ectópico de lípidos, respecto a la población SR. Por otro lado, tanto el contenido de triglicéridos como de colesterol hepático en las hembras S fue significativamente inferior al mostrado por la población C (Figura 7a,b).

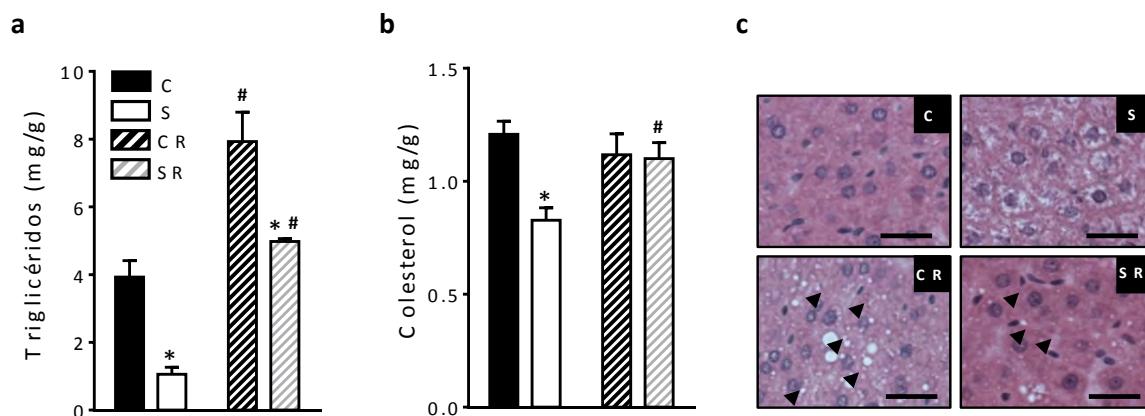
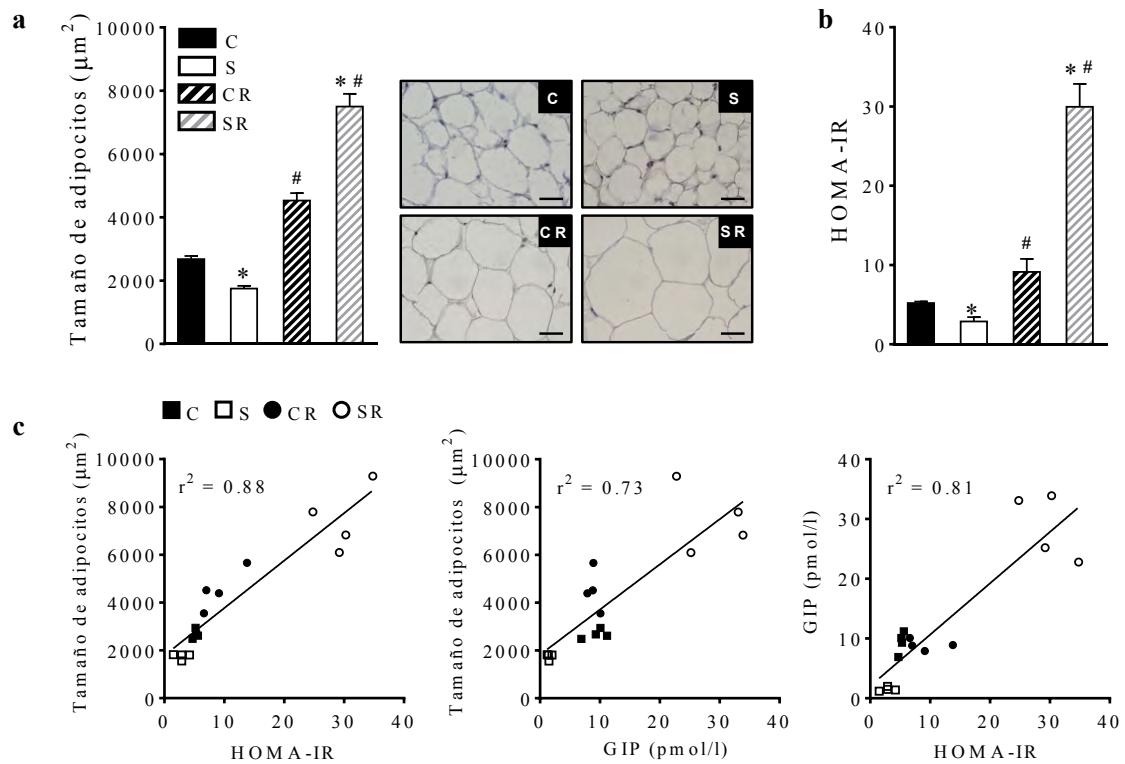


Figura 7. La población SR mostró un menor acúmulo hepático de lípidos que la población CR. (a) Contenido hepático de triglicéridos y (b) colesterol en hembras tras 22 semanas en dieta (n=4). (c) Imágenes representativas de la tinción de hematoxilina, se indica con flechas la presencia de gotas lipídicas (Escala: 10 μ m). Los datos representan la media \pm ESM. *P<0.05 S vs C y SR vs CR. #P<0.05 CR vs C y SR vs S. C: control, S: subnutrida, CR: control-realimentada, SR: subnutrida-realimentada.

3.6. El tratamiento con (Pro3)GIP revirtió parcialmente la intolerancia a la glucosa mostrada por las hembras SR

Los resultados obtenidos sugerían que un aumento crónico de los niveles endógenos de GIP estaba contribuyendo al desarrollo de las alteraciones metabólicas observadas en las hembras SR. Para testar dicha hipótesis, se bloqueó la acción de GIP en las hembras SR durante los últimos 21 días de dieta con un antagonista del receptor de

GIP, (Pro3)GIP. Como población control se utilizó un grupo de ratas SR tratadas con suero salino durante el mismo periodo. La administración diaria de (Pro3)GIP durante 21 días no tuvo repercusiones sobre el peso corporal ni sobre la ingesta alimentaria SR (Figura 8a,b). Por el contrario, los animales tratados con (Pro3)GIP mostraron una mejora sustancial en la homeostasis glucídica. Concretamente, se observó una significativa disminución de los niveles plasmáticos de glucosa a los 30

y 60 minutos, así como del AUC de glucosa durante el OGTT (Figura 8c), respecto a las hembras SR no tratadas. Asimismo, se observó una significativa disminución de la secreción de insulina en respuesta a la sobrecarga oral de glucosa en la población tratada con (Pro3)GIP (Figura 8d). Sin embargo, los niveles de insulina continuaron siendo

considerablemente mayores que los observados anteriormente en las ratas alimentadas con dieta estándar. Los niveles de HOMA-IR también experimentaron un acusado descenso tras la administración de (Pro3)GIP, respecto a la población de ratas no tratadas (Figura 8e).

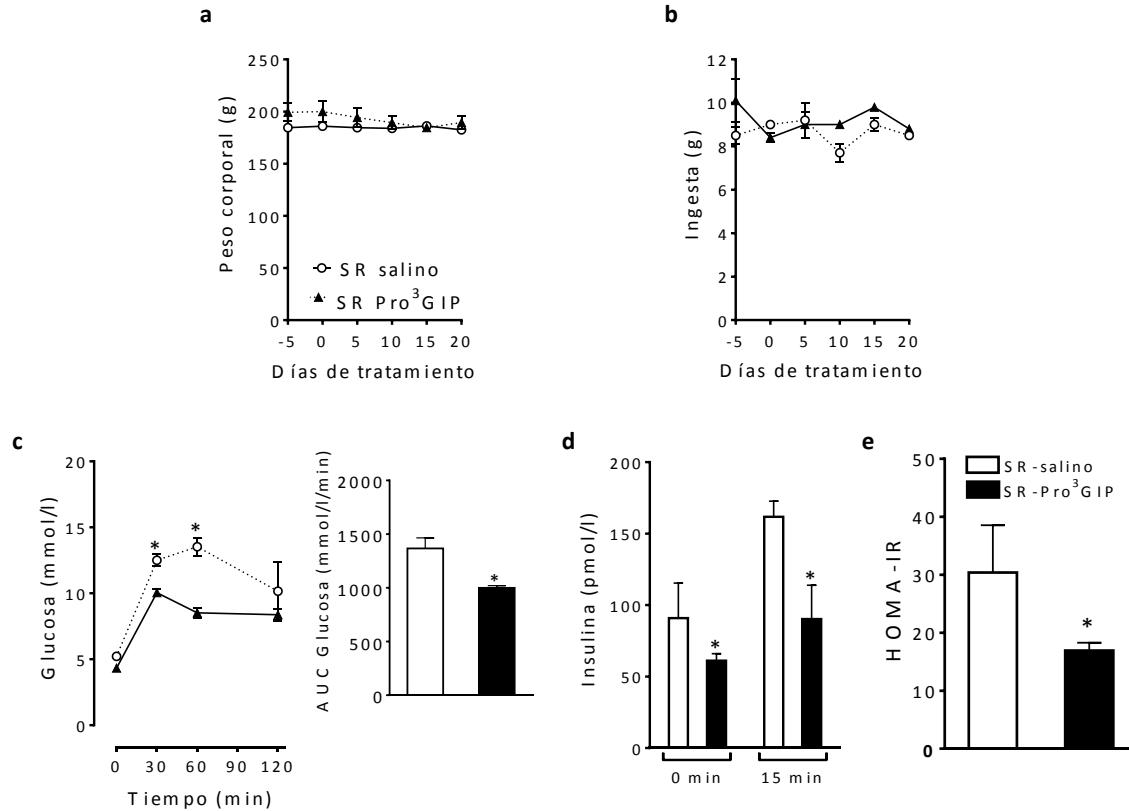


Figura 8. La administración diaria de (Pro³)GIP revirtió el estado de intolerancia a la glucosa de las hembras SR. (a) Evolución del peso corporal y (b) la ingesta en hembras SR tras 21 días de tratamiento con (Pro³)GIP (25nmol/kg/día). (c) Niveles circulantes de glucosa, AUC de glucosa y (d) niveles circulantes de insulina durante el OGTT. (e) Índice de resistencia a insulina (HOMA-IR). Los datos representan la media ± ESM ($n=4$). *P<0.05 SR-Pro³GIP vs SR-salino. SR-salino: subnutrida-realimentada tratada con suero salino, SR-Pro³GIP: subnutrida-realimentada tratada con Pro³GIP.

3.7. Las ratas tratadas con (Pro3)GIP mostraron una disminución del tamaño de los adipocitos y un aumento de los triglicéridos hepáticos

El contenido relativo de grasa visceral disminuyó drásticamente tras el tratamiento con (Pro3)GIP, respecto a las hembras SR no tratadas (Figura 9a). Asimismo, el tratamiento con (Pro3)GIP redujo significativamente el tamaño de los adipocitos (>50%), respecto a la población no tratada (Figura 9b,c). Por otra parte, el bloqueo de la

acción de GIP dio lugar a un significativo incremento en el acúmulo hepático de triglicéridos (Figura 9d) y no se observaron cambios respecto al contenido de colesterol (Figura 9e). Las ratas tratadas con (Pro3)GIP también mostraron una disminución de la trigliceridemia (SR-Pro3GIP: 0.69 ± 0.10 vs. SR-salino: 0.91 ± 0.07 mmol/l), mientras que los niveles circulantes de colesterol no parecieron verse afectados (SR-Pro3GIP: 2.11 ± 0.12 vs. SR-salino: 1.87 ± 0.04 mmol/l).

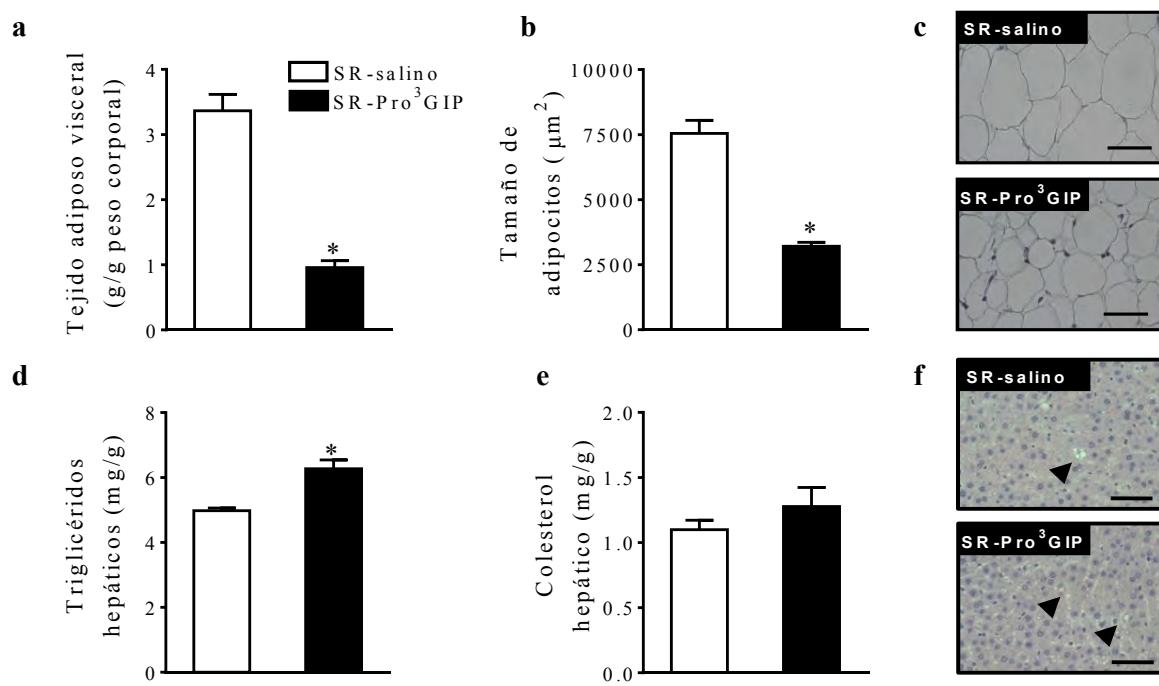


Figura 9. Efecto del tratamiento con (Pro³)GIP sobre el tamaño adipocitario y el contenido hepático de lípidos. (a) Peso del tejido adiposo visceral, expresado como la suma de los depósitos de grasa periovárica y retroperitoneal, relativa al peso corporal. (b) Tamaño medio de los adipocitos del tejido adiposo periovárico y (c) micrografías representativas del tamaño adipocitario. (d) Contenido hepático de triglicéridos y (e) colesterol. (f) Micrografías representativas de la acumulación de gotas lipídicas (flechas) en el hígado (tinción de hematoxilina/eosina). La barra de escala representa 50 μm . Los datos representan la media \pm ESM. (n=4). *P<0.05 SR-Pro³GIP vs SR-salino. SR-salino: subnutrida-realimentada tratada con suero salino, SR-Pro³GIP: subnutrida-realimentada tratada con Pro³GIP.

4. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que un aporte deficiente de nutrientes durante la etapa perinatal induce una respuesta adaptativa que desemboca en la aparición de alteraciones metabólicas cuando el organismo es enfrentado a un incremento del aporte calórico. Asimismo, resaltan la diferente adaptación de la homeostasis glucídica tras la rehabilitación nutricional en función del sexo. Concretamente, las hembras previamente sometidas a restricción nutricional y posteriormente alimentadas con dieta grasa desarrollaron un fenotipo de síndrome metabólico, caracterizado por un incremento de la adiposidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, de manera significativamente más acusada que los machos.

Previamente, se ha descrito que la subnutrición crónica induce hipersensibilidad periférica a la insulina durante la lactancia (24) y en ratas adultas jóvenes (21). En este trabajo se muestra que la mejora de la tolerancia a la glucosa se preserva durante toda la vida de los animales, siempre y cuando se mantengan las condiciones de restricción nutricional. Por el contrario, la rehabilitación nutricional con dieta grasa indujo consecuencias perjudiciales en la homeostasis de la glucosa. Dichas consecuencias evidenciaron una respuesta adaptativa al cambio de dieta en función del sexo, siendo las hembras más propensas a desarrollar alteraciones más severas de la

homeostasis glucídica. En este sentido, estudios previos han mostrado que las alteraciones metabólicas ocurridas durante los procesos de rehabilitación nutricional afectan predominantemente a las hembras (25,26). Asimismo, se ha descrito que los machos sometidos a restricción nutricional estarían protegidos frente a la obesidad y al desarrollo de resistencia a la insulina en la edad adulta, hecho que ha sido asociado a un aumento del catabolismo basal y del gasto energético (27). No obstante, también se ha observado que los machos exhiben una mayor vulnerabilidad al desarrollo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa cuando son enfrentados a una sobrecarga energética (28,29). Las razones para estas discrepancias pueden residir no sólo en el tipo de restricción nutricional, sino en el momento de su aplicación y en la composición dietética de la rehabilitación nutricional. No obstante, mientras que en las publicaciones citadas anteriormente se utilizaron dietas estándar para llevar a cabo los estudios de rehabilitación nutricional, en este trabajo se utilizó una dieta alta en grasa para favorecer la aparición del fenotipo de síndrome metabólico, poniendo de manifiesto la relevancia del tipo de dieta suministrado y la singularidad del presente estudio.

Tras un periodo de restricción nutricional, la elevada tasa de crecimiento durante la fase de rehabilitación nutricional da lugar a un rápido incremento de los depósitos de grasa, que predomina sobre la reconstitución

de la masa magra (30). Asimismo, los riesgos asociados a la obesidad están más estrechamente relacionados con elevados índices de grasa corporal que con que el peso corporal en sí mismo (31). En este trabajo, la hiperfagia exhibida por la población SR dio lugar a la aparición de un fenotipo claramente obesogénico, incluyendo elevados niveles de triglicéridos circulantes y un incremento de los depósitos de grasa visceral superior al resto de poblaciones. Estos resultados sugieren una estrecha relación entre las adaptaciones provocadas por la rehabilitación nutricional y el incremento en la capacidad de acúmulo de lípidos, lo que daría lugar a un empeoramiento de la homeostasis glucídica, particularmente agravado en el caso de las hembras.

En vista del dimorfismo sexual observado respecto a las alteraciones en la homeostasis glucídica y a que GIP ha sido extensamente descrito como un regulador crucial de la secreción de insulina en respuesta a la ingesta de alimentos (32,33), llevamos a cabo estudios encaminados a determinar su papel en la aparición de intolerancia a la glucosa en las hembras sometidas a realimentación con dieta grasa. En primer lugar, el hecho de que el contenido intestinal de GIP se encontrase incrementado tras la rehabilitación nutricional, a pesar de no observar alteraciones en el número de células K, sugiere una preservación de los mecanismos de producción endógena de GIP en respuesta a una administración prolongada de una dieta grasa. Por otro lado, se ha descrito que una alimentación con dieta grasa promueve una elevación de los niveles circulantes de GIP (16). Asimismo, una exagerada secreción de GIP ha sido recientemente descrita en pacientes diabéticos tipo 2 (34). Por tanto, en vista de los elevados niveles postprandiales de insulina mostrados por las hembras SR, es posible sugerir que GIP estaría jugando un papel predominante en la regulación entero-insular de la secreción de insulina durante la rehabilitación nutricional. Igualmente, el hecho de que únicamente las hembras SR muestren una exacerbada secreción de GIP en respuesta a una sobrecarga oral de glucosa revela, por primera vez, la posible existencia de una programación nutricional del eje entero-insular, como resultado de una restricción nutricional precoz y posterior realimentación.

Entre los efectos extrapancreáticos de GIP, destaca su capacidad para promover la diferenciación adipocitaria y la acumulación de lípidos en el tejido adiposo (8). De acuerdo al marcado incremento en los niveles circulantes de GIP mostrado por las hembras SR y a que el tamaño adipocitario es un marcador predictivo de resistencia a insulina (35), la correlación observada entre los niveles basales de GIP, el tamaño de los adipocitos y los niveles de HOMA-IR, refuerza el papel de GIP como mediador en el desarrollo de resistencia a la insulina en el tejido adiposo de estos animales. Asimismo, la drástica reducción de los depósitos de grasa visceral y del tamaño de los adipocitos observada tras el tratamiento con el antagonista farmacológico de GIP fue acompañada con un sustancial restablecimiento de la homeostasis glucídica en las hembras SR. Dado que el crecimiento acelerado tras la

rehabilitación nutricional ha sido ampliamente reconocido por maximizar los mecanismos de conservación de la energía (36), los resultados mostrados en el presente trabajo señalan a GIP como una hormona ahorrativa, que estaría desempeñando un papel esencial en la acumulación de lípidos en el tejido adiposo cuando las ratas sometidas a restricción nutricional precoz son enfrentadas a un aporte calórico excesivo.

Curiosamente, el deterioro de la tolerancia a la glucosa mostrado por las hembras SR fue acompañado de una menor acumulación hepática de lípidos. Previamente, se ha descrito que el incremento de los depósitos de grasa visceral podría estar involucrado en la prevención de la deposición ectópica de lípidos (37). Asimismo, estudios previos han mostrado que la incapacidad para almacenar lípidos en el hígado da lugar a una exacerbación de la hipertrigliceridemia y la hiperglucemias, agravando los estados de resistencia a insulina (38,39). Por tanto, estos estudios sugieren que una óptima redistribución ectópica de lípidos en forma de triglicéridos representa una respuesta allostática del organismo, previniendo su acumulación en otros órganos como el músculo o el páncreas (40).

En este sentido, la mejora de la homeostasis glucídica observada en las hembras SR tras el tratamiento con (Pro3)GIP tuvo lugar en paralelo a un aumento del contenido hepático de lípidos y a una disminución en los niveles circulantes de triglicéridos. Paradójicamente, estudios previos han mostrado que la inhibición farmacológica de GIP está asociada a una reducción del contenido hepático de lípidos (22,41). No obstante, también ha sido descrito que la nutrición perinatal puede programar tanto el almacenamiento como el metabolismo hepático de lípidos en el adulto (42,43). Por tanto, dichas discrepancias podrían residir, precisamente, en el fenotipo ahorrativo mostrado por las hembras SR, dando lugar a un aumento en la acumulación de lípidos a nivel hepático tras el bloqueo farmacológico de la acción de GIP.

A partir de los resultados obtenidos, sin embargo, no es posible establecer si las alteraciones observadas a nivel del eje entero-insular representan un defecto primario, o si se trata de un defecto asociado a otras alteraciones metabólicas. No obstante, individuos sanos alimentados con dieta grasa muestran elevados niveles circulantes de GIP antes del desarrollo de resistencia a la insulina, lo que sugiere que la hipersecreción de GIP precedería a la pérdida de la acción de esta hormona (44). Por tanto, el incremento en los niveles circulantes de GIP parece representar el estímulo necesario para la hipersecreción de insulina y la acumulación de lípidos en el tejido adiposo de estos animales, dando lugar al desarrollo de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina.

El papel de GIP en la aparición de resistencia a insulina ha sido previamente descrito mediante el uso de antagonistas (22) y en pacientes diabéticos tipo 2 sometidos a bypass gástrico (45). No obstante, los resultados mostrados en el presente trabajo indican, por primera vez, que la rehabilitación nutricional tras un

episodio de restricción nutricional precoz da lugar a la aparición de niveles exacerbados de GIP, ejerciendo un efecto perjudicial en la homeostasis glucídica. Por tanto, intervenciones terapéuticas encaminadas a disminuir la acción de GIP parecen representar un método eficaz en la prevención de las patologías asociadas al síndrome metabólico, como la obesidad o la diabetes tipo 2. No obstante, un control nutricional eficaz, orientado a disminuir la ingesta calórica, constituye un factor indispensable para evitar la aparición de dichas patologías.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio ponen de manifiesto que GIP juega un papel determinante en el incremento de la adiposidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, desarrolladas como consecuencia de una rehabilitación nutricional con dieta grasa tras un episodio de restricción nutricional precoz. Asimismo, la existencia de un dimorfismo sexual en la programación nutricional de dichas alteraciones subraya la relevancia de la nutrición materna en la posible transmisión intergeneracional de la predisposición al desarrollo del síndrome metabólico.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011/25420), la Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423) y el Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM, Instituto de Salud Carlos III).

7. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

8. REFERENCIAS

1. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;36:62-7.
2. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019-22.
3. Howie GJ, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal undernutrition during critical windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring. *Br J Nutr* 2012;108:298-307.
4. Bieswal F, Ahn M-T, Reusens B, Holvoet P, Raes M, Rees WD, et al. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity* 2006;14:1330-43.
5. Chen LL, Hu X, Zheng J, Kong W, Zhang HH, Yang WH, et al. Lipid overaccumulation and drastic insulin resistance in adult catch-up growth rats induced by nutrition promotion after undernutrition. *Metabolism* 2011;60:569-78.
6. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept* 2003;114:189-96.
7. Krarup T, Holst JJ, Larsen KL. Responses and molecular heterogeneity of IR-GIP after intraduodenal glucose and fat. *Am J Physiol* 1985;249:E195-200.
8. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132:2131-57.
9. McIntyre N, Holdsworth C, Turner D. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 1964;284:20-1.
10. Elrick H, Stimmmer L, Hlad CJ, Arai Y. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *J Clin Endocrinol Metab* The Endocrine Society; 1964;24:1076-82.
11. Ding W-G, Gromada J. Protein Kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Diabetes* 1997;46:615-21.
12. Wang Y, Montrose-Rafizadeh C, Adams L, Raygada M, Nadiv O, Egan JM. GIP regulates glucose transporters, hexokinases, and glucose-induced insulin secretion in RIN 1046-38 cells. *Mol Cell Endocrinol* 1996;116:81-7.
13. Kim SJ, Winter K, Nian C, Tsuneoka M, Koda Y, McIntosh CH. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and downregul. *J Biol Chem* 2005;280:22297-307.
14. Bailey CJ, Flatt PR, Kwasowski P, Powell CJ, Marks V. Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets. *Acta Endocrinol* 1986;112:224-9.
15. Morgan LM, Tredger JA, Hampton SM, French AP, Peake JC, Marks V. The effect of dietary modification and hyperglycaemia on gastric emptying and gastric inhibitory polypeptide (GIP) secretion. *Br J Nutr* 1988;60:29-37.
16. Gniuli D, Calcagno A, Dalla Libera L, Calvani R, Leccesi L, Caristo ME, et al. High-fat feeding stimulates endocrine, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP)-expressing cell hyperplasia in the duodenum of Wistar rats. *Diabetologia* 2010;53:2233-40.
17. Zhou H, Yamada Y, Tsukiyama K, Miyawaki K, Hosokawa M, Nagashima K, et al. Gastric inhibitory polypeptide modulates adiposity and fat oxidation under diminished insulin action. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:937-42.
18. Kim S-jin, Nian C, McIntosh CH. Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic

- polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 2007;282:8557-67.
19. Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 2002;8:738-42.
 20. National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the care and use of laboratory animals*, 8th edition. The National Academies Press. Washington DC, 2011.
 21. Escrivá F, Rodriguez C, Cacho J, Álvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM. Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol Metab* 1992;263:E1-7.
 22. McClean PL, Irwin N, Cassidy RS, Holst JJ, Gault VA, Flatt PR. GIP receptor antagonism reverses obesity, insulin resistance, and associated metabolic disturbances induced in mice by prolonged consumption of high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:1746-55.
 23. Gault VA, Irwin N, Green BD, Mccluskey JT, Greer B, Bailey CJ, et al. Chemical ablation of gastric inhibitory polypeptide receptor action by daily (Pro3) GIP administration improves glucose tolerance and ameliorates insulin resistance and abnormalities of islet structure in obesity-related diabetes. *Diabetes* 2005;54:2436-46.
 24. Lizárraga-Mollinedo E, Fernández-Millán E, de Toro-Martín J, Martínez-Hondurilla C, Escrivá F, Álvarez C. Early undernutrition induces glucagon resistance and insulin hypersensitivity in the liver of suckling rats. *Am J Physiol Metab* 2012;302:E1070-7.
 25. Van Straten EME, Bloks VW, van Dijk TH, Baller JFW, Huijkman NCA, Kuipers I, et al. Sex-dependent programming of glucose and fatty acid metabolism in mouse offspring by maternal protein restriction. *Gend Med Excerpta Medica, Inc.*; 2012;9:166-79.
 26. Hallam MC, Reimer RA. A maternal high-protein diet predisposes female offspring to increased fat mass in adulthood whereas a prebiotic fibre diet decreases fat mass in rats. *Br J Nutr* 2013;110:1732-41.
 27. Garg M, Thamotharan M, Dai Y, Thamotharan S, Shin BC, Stout D, et al. Early postnatal caloric restriction protects adult male intrauterine growth-restricted offspring from obesity. *Diabetes* 2012;61:1391-8.
 28. Zambrano E, Bautista CJ, Deás M, Martínez-Samayoa PM, González-Zamorano M, Ledesma H, et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 2006;571:221-30.
 29. Sugden MC, Holness MJ. Gender-specific programming of insulin secretion and action. *J Endocrinol* 2002;175:757-67.
 30. Dulloo A, Girardier L. Adaptive changes in energy expenditure during refeeding following low-calorie intake: evidence for a specific metabolic component favoring fat storage. *Am J Clin Nutr* 1990;52:415-20.
 31. Orozco-Sólis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav Elsevier Inc.*; 2009;96:481-92.
 32. Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, et al. Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. *2004;113:635-45.*
 33. Lewis JT, Dayanandan B, Habener JF, Kieffer TJ, Medicine JTL. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist. *Endocrinology* 2000;141:3710-6.
 34. Alsema M, Rijkelkhuizen JM, Holst JJ, Teerlink T, Scheffer PG, Eekhoff EMW, et al. Preserved GLP-1 and exaggerated GIP secretion in type 2 diabetes and relationships with triglycerides and ALT. *Eur J Endocrinol* 2013;169:421-30.
 35. Lundgren M, Svensson M, Lindmark S, Renström F, Ruge T, Eriksson JW. Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and "hyperleptinaemia". *Diabetologia* 2007;50:625-33.
 36. Dulloo AG. Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:155-71.
 37. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:1338-49.
 38. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, et al. Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 2003;111:737-47.
 39. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor γ contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003;278:34268-76.
 40. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, et al. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* 2007;3:e64.
 41. Gault VA, McClean PL, Cassidy RS, Irwin N, Flatt PR. Chemical gastric inhibitory polypeptide receptor antagonism protects against obesity, insulin resistance, glucose intolerance and associated disturbances in mice fed high-fat and cafeteria diets. *Diabetologia* 2007;50:1752-62.

Role of glucose-dependent insulinotropic peptide in the nutritional programming of metabolic syndrome

42. Xu X, Hu J, McGrath BC, Cavener DR. GCN2 in the brain programs PPAR γ 2 and triglyceride storage in the liver during perinatal development in response to maternal dietary fat. *PLoS One* 2013;8:e75917.
43. Burdge GC, Phillips ES, Dunn RL, Jackson AA, Lillycrop KA. Effect of reduced maternal protein consumption during pregnancy in the rat on plasma lipid concentrations and expression of peroxisomal proliferator-activated receptors in the liver and adipose tissue of the offspring. *Nutr Res* 2004;24:639-46.
44. Brøns C, Jensen CB, Storgaard H, Hiscock NJ, White A, Appel JS, et al. Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. *J Physiol* 2009;587:2387-97.
45. Lips MA, de Groot GH, van Klinken JB, Aarts E, Berends FJ, Janssen IM, et al. Calorie Restriction is a Major Determinant of the Short-Term Metabolic Effects of Gastric Bypass Surgery in Obese Type 2 Diabetic Patients. *Clin Endocrinol* 2014;80:834-42.



New therapeutic targets for the treatment of insulin resistance based on the paracrine cross-talk between hepatocytes and Kupffer cells

Title in Spanish: *Nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la resistencia a insulina basadas en la interacción entre hepatocitos y células de Kupffer*

Virginia Pardo Marqués^{1*}, Águeda González-Rodríguez¹, Ángela Martínez Valverde¹

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Instituto de Salud Carlos II, 28029 Madrid, Spain.

ABSTRACT: Chronic low-grade inflammation in adipose tissue during obesity is associated to an impairment of the insulin signaling cascade. In this study we have evaluated the impact of palmitate or oleate overload of macrophages in triggering lipoapoptosis and in the cross-talk with insulin signaling in hepatocytes. Macrophages were stimulated with oleate or palmitate and levels of M1/M2 polarization markers was analyzed. Whereas proinflammatory cytokines were elevated in macrophages stimulated with palmitate, enhanced M2 markers levels was detected in macrophages stimulated with oleate. When hepatocytes were pretreated with conditioned medium from macrophages loaded with palmitate (CM-P) phosphorylation of stress kinases and endoplasmic reticulum (ER) stress signaling was increased, insulin signaling was impaired and lipoapoptosis was detected. Conversely, enhanced insulin receptor (IR)-mediated signaling and reduced levels of the phosphatase protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) was found in hepatocytes treated with CM from macrophages stimulated with oleate (CM-O). In conclusion, oleate and palmitate elicit an opposite cross-talk between macrophages and hepatocytes. Whereas CM-P interferes at the early steps of insulin signaling, CM-O increases insulin sensitization by decreasing PTP1B. Therefore, targeting PTP1B is a therapeutic strategy to combat hepatic insulin resistance in obesity.

RESUMEN: La inflamación crónica de bajo grado en el tejido adiposo durante la obesidad se asocia a una disminución de la señalización de la insulina. Hemos evaluado el impacto de la estimulación de los macrófagos con oleato o palmitato y el efecto sobre la lipoapoptosis y la señalización de la insulina en los hepatocitos. Los macrófagos y las células de Kupffer se estimularon con dichos ácidos grasos para analizar los niveles de marcadores de polarización M1/M2. Los macrófagos estimulados con oleato presentaron mayores niveles de marcadores antiinflamatorios, mientras que los tratados con palmitato presentaron una elevada expresión de citoquinas proinflamatorias. Tras el tratamiento de los hepatocitos con medio condicionado de macrófagos estimulados con palmitato (CM-P) detectamos un incremento en la fosforilación de las quinasas de estrés y marcadores de estrés del retículo endoplásmico (ER), junto con un aumento en la lipoapoptosis y un bloqueo en la señalización de la insulina. Por el contrario, en hepatocitos tratados con el medio condicionado de macrófagos estimulados con oleato (CM-O) observamos un aumento en la señalización de la insulina y una reducción en los niveles de la proteína fosfatasa 1B (PTP1B). En conclusión, oleato y palmitato desencadenan respuestas opuestas entre los macrófagos y los hepatocitos. Mientras que el CM-P bloquea las primeras etapas de la señalización de la insulina, el CM-O aumenta la sensibilidad a la insulina disminuyendo la PTP1B. Por tanto, la inhibición de PTP1B es una estrategia terapéutica para combatir la resistencia a la insulina en el hígado en estados de obesidad.

*Corresponding Author: virchpard@gmail.com

Received: October 13, 2015 Accepted: June 27, 2016

Premio del Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos del Concurso Científico 2015 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 2 (2016), pp. 200-209

Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

Evidences from clinical and epidemiological studies have clearly established that obesity is the most common cause of insulin resistance, type 2 diabetes mellitus (T2DM) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In fact, insulin resistance in peripheral tissues such as liver and skeletal muscle is an early metabolic abnormality in the development of T2DM (1). Although the precise molecular mechanisms underlying insulin resistance

associated to obesity have not been completely elucidated, one major contributor is the chronic low-grade systemic inflammation state which interferes with the early steps of the insulin signaling cascade possibly through the effects of free fatty acids (FFAs) and cytokines secreted by the overgrowing white adipose tissue (WAT) (2-4).

Proinflammatory cytokines impair insulin action by activating stress kinases such as c-jun (NH₂) terminal kinase (JNK), I_KB kinase (IKK) and also protein kinase C

(PKC)-mediated pathways (5, 6). In addition, cytokines down-regulate early key mediators of the insulin signaling cascade such as the insulin receptor (IR) or insulin receptor substrate 1 (IRS1) (7, 8), as well as increase the expression of negative modulators of this pathway such as the protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) (9, 10). On the other hand, circulating FFAs, which are usually increased in insulin resistant states (11-13), also activate these proinflammatory pathways boosting the defects in peripheral insulin actions (14-16).

In addition to the inflammatory effects, the activation of endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated signaling pathways by FFAs has been linked to obesity-associated immunometabolic dysregulation and insulin resistance (17, 18). ER stress is sensed by three main proteins: X-box binding protein 1 (X-BP1), PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) and activating transcription factor-6 (ATF6), which cooperate to mitigate ER stress by reducing protein translation, stabilizing proteins by chaperones and activating ER-associated protein degradation (19). Chemical chaperones (taurooursodeoxycholic acid (TUDCA) and 4-phenylbutyrate) that alleviate ER stress through protein stabilization, improve systemic glucose homeostasis, increase glucose uptake in adipose and skeletal muscle and reduce hepatic glucose production (20). Moreover, a study in obese subjects has revealed that treatment with TUDCA increases insulin sensitivity in liver and skeletal muscle by approximately 30% compared to the placebo therapy (21).

Several studies have reported that besides adipocytes, adipose tissue resident macrophages, which migrate and accumulate in WAT, have a relevant role in obesity-induced chronic inflammation (22-24) through their polarization toward the M1-like state (25). Although the importance of macrophages in the molecular mechanisms triggering insulin resistance in skeletal muscle and adipose tissue has been explored (25-27), it remains unclear whether the inflammatory milieu from hepatic macrophages impact insulin signaling in hepatocytes. On that basis, in this study we have investigated for the first time the effect of Kupffer cells activated by two distinct FFAs, palmitate (saturated) and oleate (unsaturated), on stress-mediated pathways, lipoapoptosis and the insulin signaling cascade in hepatocytes.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

Fetal bovine serum (FBS) (#10270) and culture media DMEM (#41966-029) were obtained from Invitrogen (Life Technologies, Gran Island, NY). TRIzol reagent (#T9424), sodium palmitate (#P9767), sodium oleate (#O7501), bovine serum albumin (BSA) (#A6003), fatty acid free-BSA endotoxin free (#A8806) and insulin (#I0516) were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Bradford reagent, acrylamide, immunoblotting PVDF membrane and Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA).

2.2. Free fatty acid preparation

2.5 mM free fatty acid (FFA) stock solutions were prepared by modification of Spector method (28). Briefly, cold sodium palmitate or sodium oleate were dissolved in 0.1M NaOH by heating at 70°C while 0.5 mM BSA solution was prepared by dissolving fatty acid free-BSA in NaCl 0.9% by heating at 50°C (at maximum). Once BSA and FFA solutions were completely dissolved, palmitate and oleate solutions were diluted 10-times in the BSA solution and mixed by pipetting to achieve a final molar ratio of 5:1. Control BSA was prepared by adding the same amount of 0.1M NaOH into 0.5 mM BSA solution. All preparations were filtered, aliquoted and stored at -20°C.

2.3. Culture of RAW 264.7 murine macrophages

Murine RAW 264.7 macrophage cell line, kindly provided by Dr. Tarín (CNIC, Madrid, Spain), were cultured in RPMI supplemented with 10% heat inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine. Confluent macrophages were treated with BSA or FFAs solutions (750 µM conjugated oleate/BSA or 750 µM conjugated palmitate/BSA) for 24 h to obtain the corresponding conditioned media (CM) (27). CM were centrifuged to remove dead cells and directly added (without dilution) to hepatocytes for several time periods.

2.4. Isolation and culture of Kupffer cells

Kupffer cells were obtained from livers of 3 months-old male C57/BL6 mice. All animal experimentation has been conducted according to the Guide of the care and use of laboratory animals (National Academy of Sciences, USA). For Kupffer cells (KC) isolation, the supernatant from the first centrifugation of the hepatocyte isolation protocol was collected and centrifuged twice at 50 x g for 5 min to discard the pellet with the remaining hepatocytes. The latest supernatant was centrifuged at 500 x g for 5 min at 4°C and the pellet containing the KC was resuspended in attachment media. Cells were mixed by inversion with 50% percoll and centrifuged at 1.000 x g for 30 min without acceleration or brake at room temperature. Finally, KC pellet was washed with PBS 1X, centrifuged twice at 500 x g for 10 min at 4°C to wash out the residual percoll solution and cells were resuspended in RPMI supplemented with 10% heat inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine. Cells were then plated on 12 well-plates and maintained for 24 h before treatments. Conditioned media was prepared as described in RAW 264.7 cells.

2.5. Hepatocyte cell culture.

Human hepatocytes were isolated by the two-step collagenase procedure from non-tumor areas of liver biopsies from patients submitted to a surgical resection for liver tumours after obtaining patients' written consent (29). Primary mouse hepatocytes were isolated from non-fasting male C57BL/6 mice (10-12-week-old) by perfusion with collagenase as described (30). Cells were seeded on 6 well-plate (Corning, New York, NY) and cultured in

media containing Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12 medium (1:1) with 10% FBS, supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1 mM sodium pyruvate (attachment media) and maintained for 24 h before treatments. The generation and characterization of immortalized mouse hepatocyte cell line has been previously described (31). Cells were grown in DMEM plus 10% heat inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine.

2.6. Preparation of protein extracts and Western blot

To obtain total cell lysates, attached cells were scraped off and incubated for 10 min on ice with lysis buffer (25 mM HEPES, 2.5 nM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF and 5 µg/ml leupeptin). After protein content determination with Bradford reagent, total protein were boiled in Laemmli sample buffer and submitted to 8–15% SDS-PAGE. Proteins were transferred to Immunoblot PVDF membrane and, after blocking with 3% BSA or 5% non-fat dry milk, membranes were incubated overnight with several antibodies as indicated. Immunoreactive bands were visualized using the ECL Western blotting protocol. Densitometric analysis of the bands was performed using Image J software. The anti-phospho-PERK (Thr 980) (#3179), anti-phospho-eIF2α (Ser 51) (#9721), anti-phospho-JNK (#9251), anti-phospho-STAT3 (#9131) antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). The anti-JNK (sc-571), anti-IR β (sc-711), anti-eIF2α (sc-11386), anti-CHOP (sc-7351), anti-phospho-p38 (sc-17852), anti-p38 (sc-9212), anti-IRS1 (sc-559), anti-phospho-IR (sc-25103), anti-phospho-Akt (Thr 308) (sc-16646), anti-phospho-Akt (Ser 473) (sc-7985), anti-Akt (sc-8312) and anti-PTP1B (sc-1718) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-α-tubulin (T5168) was from Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

2.7. RNA isolation and qPCR

Total RNA was isolated using Trizol reagent and was reverse transcribed using a SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for qPCR following manufacturer's indications. qPCR was performed with an ABI 7900 sequence detector using the SyBr Green method and d(N)6 random hexamer with primers purchased from Invitrogen. PCR thermocycling parameters were 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 15 seconds, and 60°C for 1 minute. Each sample was run in triplicate and normalized to 18s RNA. Fold changes were determined using the $\Delta\Delta Ct$ method. Primer sequences are available upon request.

2.8. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM, and were compared by using the Bonferroni ANOVA test. All statistical analyses were performed using the IBM SPSS Statistics 21.0 (SPSS Inc. IBM, Armonk, NY) software with 2-sided tests. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

RESULTS

3.1. Insulin signaling is opposite modulated in human hepatocytes pretreated with conditioned medium from macrophages stimulated with palmitate or oleate

The liver is composed primarily of hepatocytes, but also contains blood and lymph vessels, nerves and immune cells. Since all these cell types can potentially respond to a high fat-mediated inflammatory environment *in vivo*, we performed a cell culture-based approach to investigate the specific cross-talk between macrophages and hepatocytes in the context of fatty acid overload. For this goal, RAW 264.7 macrophages were treated with palmitate, a typical saturated FFA found in western diets, for 24 h. Then, culture media (conditioned medium) was removed. Conditioned medium was hereafter called CM-P (collected from RAW 264.7 cells treated with palmitate) or CM-B (from RAW 264.7 cells treated only with BSA as a control). We also obtained conditioned medium from RAW 264.7 cells treated with oleate, a well-known nontoxic monounsaturated FFA. This conditioned medium was hereafter called CM-O (collected from RAW 264.7 cells treated with oleate). Once the conditioned media were prepared, they were added for 24 h to human hepatocytes and after that these cells were stimulated with 10 nM insulin for 10 min. As depicted in Figure 1, insulin induced IR tyrosine phosphorylation and Akt phosphorylation at both residues were enhanced in hepatocytes preincubated with CM-O as compared to control hepatocytes preincubated with control CM-B. Conversely, IR tyrosine and Akt serine/threonine phosphorylations were reduced in presence of CM-P. Moreover, protein levels of IR and IRS1 decreased only in hepatocytes treated with CM-P. Altogether, these results indicate opposite effects of palmitate and oleate in triggering a cross-talk between macrophages and hepatocytes with relevant effects in insulin signaling.

3.2 Differential effects of palmitate and oleate in levels of proinflammatory cytokines expressed by macrophages

In order to confirm the differential effects of oleate and palmitate in a physiological context, we isolated and cultured Kupffer cells from C57/BL6 mice and these resident macrophages were stimulated with oleate or palmitate for 24 h. The purity of Kupffer cells was checked by the analysis of CD68 and F4/80 mRNA levels (Figure 2).

In an attempt to characterize the molecules released by macrophages to the CM, we assessed the expression of proinflammatory cytokines characteristic of M1 macrophage polarization by real-time PCR. Treatment of Kupffer cells with palmitate, but not oleate, increased IL6, IL1β, TNFα and MCP1 mRNA levels. On the other hand, treatment with oleate significantly up-regulated mRNA levels of M2 polarization markers (IL10, Mcr1, Mgl1 and arginase 1) (Figure 3).

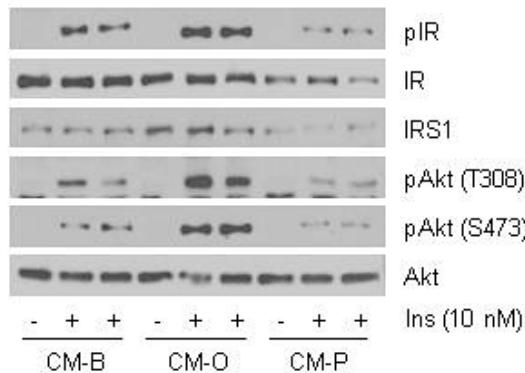


Figure 1. Insulin signaling is differentially modulated in human hepatocytes pretreated with CM-O or CM-P. Conditioned medium from RAW 264.7 macrophages treated with BSA (CM-B), oleate (CM-O) or palmitate (CM-P) was added to human primary hepatocytes for 24 h. Then, cells were stimulated with 10 nM insulin for 10 min. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. (n=4 independent experiments performed in duplicate).

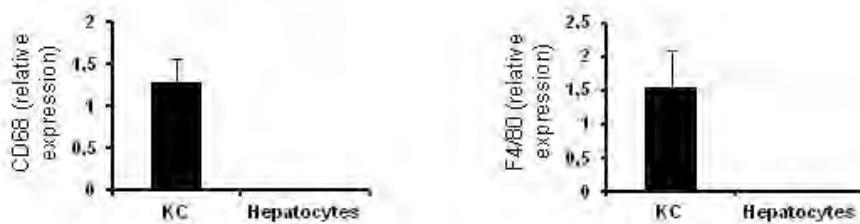


Figure 2. Purity of Kupffer cells. Kupffer cells and hepatocytes were isolated from mice as described in the Experimental Procedures and mRNA levels of CD68 and F4/80 were determined. CD68 and F4/80 were undetectable in hepatocytes (n=3 independent experiments performed in duplicate).

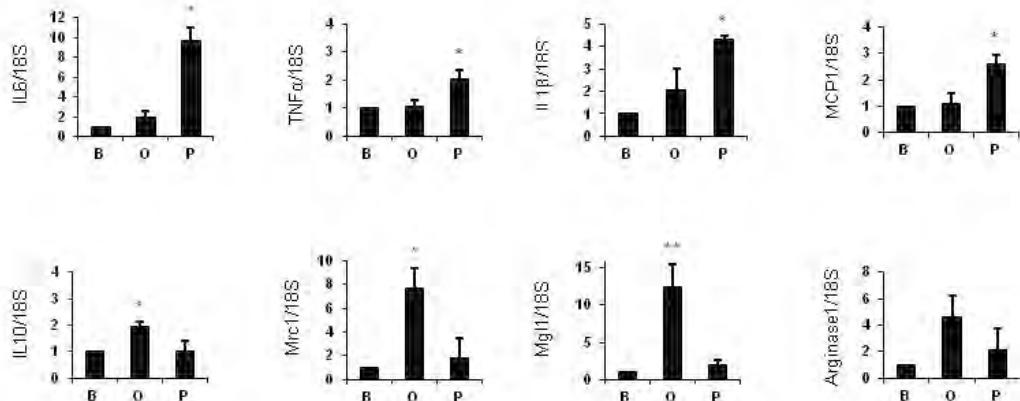


Figure 3. Expression of cytokines and markers of inflammation from Kupffer cells. Primary Kupffer cells were treated with BSA (B), oleate (O) or palmitate (P) for 24 h. TNF α , IL-6, IL-1 β , MCP1, IL-10, arginase 1, Mcr1 and Mg11 mRNA levels were analyzed by qRT-PCR. Results are expressed as fold increase relative to BSA condition (1) and are mean \pm SEM (n=3), *p<0.05, **p<0.01, O or P, respectively, vs B.

3.3. Conditioned medium from Kupffer cells stimulated with palmitate activates stress-mediated signaling pathways

Next, we confirmed data on proinflammatory cytokines by analyzing the activation of stress kinases in primary mouse hepatocytes treated with CM from Kupffer macrophages stimulated with oleate or palmitate (CMK-O

or CMK-P, respectively). As a control, hepatocytes were stimulated with CM from Kupffer cells loaded with BSA (CMK-B). As shown in Figure 4, phosphorylations of STAT3, p38 MAPK, JNK, PERK and eIF2 α were observed exclusively in hepatocytes treated with CMK-P.

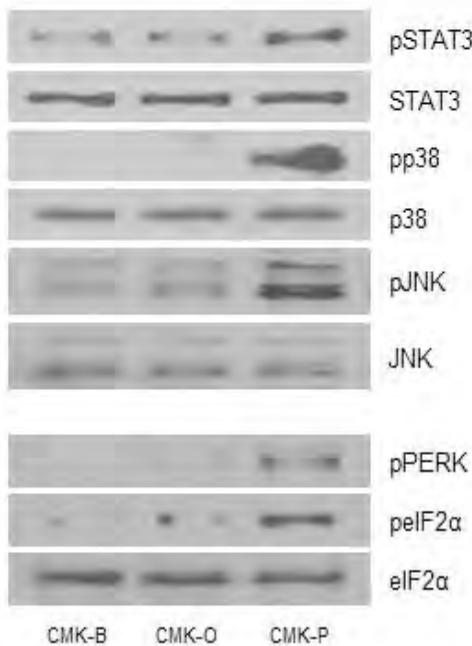


Figure 4. Paracrine effects of primary Kupffer cells stimulated with palmitate or oleate in stress pathways in primary mouse hepatocytes. Conditioned medium from primary Kupffer cells treated with BSA (CMK-B), oleate (CMK-O) or palmitate (CMK-P) was added to primary mouse hepatocytes for 30 min. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown (n=3 independent experiments).

In the light of these data, CHOP and the active fragment of caspase 3, indicators of apoptosis, also were detected only in hepatocytes treated with CMK-P (Figure 5).

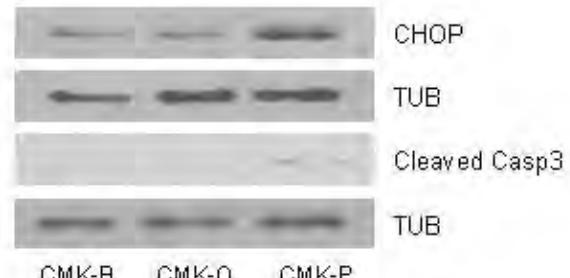


Figure 5. Paracrine effects of primary Kupffer cells stimulated with palmitate or oleate in lipoapoptotic pathways in primary mouse hepatocytes. Conditioned medium from primary Kupffer cells treated with BSA (CMK-B), oleate (CMK-O) or palmitate (CMK-P) was added to primary mouse hepatocytes for 24 h. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown (n=3 independent experiments).

3.4. CMK-P induces insulin resistance, whereas that CMK-O induces insulin hypersensitivity in primary mouse hepatocytes

Next, we analyzed the effects of Kupffer cells-derived products on insulin signaling in hepatocytes. For this goal, primary hepatocytes were treated with CMK-P or CMK-O for 24 h and subsequently stimulated with 10 nM insulin for 10 min. As depicted in Figure 6, insulin-induced tyrosine phosphorylation of the IR and Akt phosphorylation at both Ser 473 and Thr 308 residues was enhanced in hepatocytes pretreated with CMK-O whereas these responses were decreased in hepatocytes pretreated with CMK-P. These results also reflect an opposite paracrine cross-talk between hepatocytes and resident macrophages.

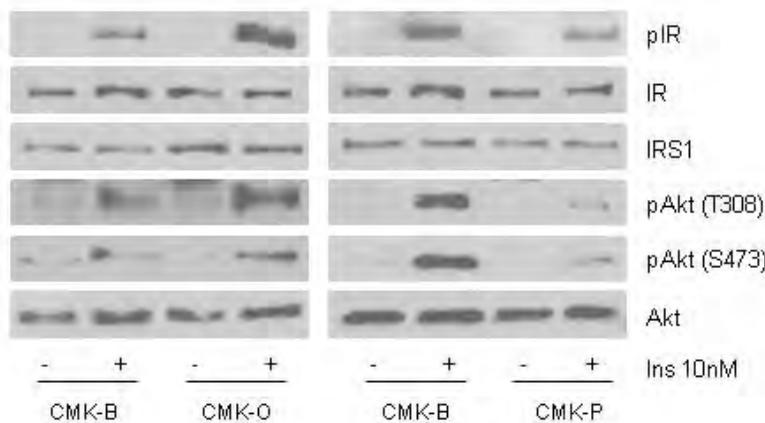


Figure 6. Paracrine effects of primary Kupffer cells stimulated with palmitate or oleate in insulin signaling in primary mouse hepatocytes. CMK was added to primary hepatocytes for 24 h. Then, cells were stimulated with 10 nM insulin for 10 min. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown (n=3 independent experiments).

3.5. Lower levels of PTP1B can contribute to the insulin sensitization induced by CM-O in hepatocytes.

Next, we evaluated the possibility that changes in the expression of negative modulators of the early steps of the insulin signaling could account for the insulin sensitization induced by CM-O or CMK-O in hepatocytes. Among

them, PTP1B was a potential candidate given its ability to directly dephosphorylate tyrosine residues of the IR (48). Consistent with this hypothesis, we measured the expression of this phosphatase in hepatocytes incubated with CM-O. For these experiments we used immortalized neonatal hepatocytes previously generated and validated in

our laboratory (57). As depicted in Figure 7, PTP1B protein content was decreased in hepatocytes treated with

CM-O.

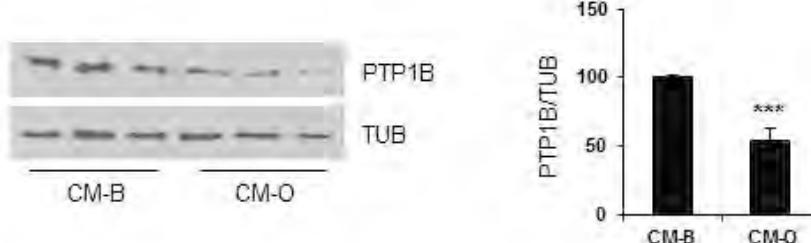


Figure 7. Lower levels of PTP1B contribute to the insulin sensitization induced by CM-O in hepatocytes. Conditioned medium from RAW 264.7 macrophages treated with BSA (CM-B) or oleate (CM-O) was added to immortalized mouse hepatocytes for 24 h. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown. After quantification of all blots, results are expressed as percentage of protein expression relative to CM-B condition (100%) and are mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate), ***p<0.001 CM-O vs CM-B.

As expected, insulin signaling was enhanced in immortalized neonatal hepatocytes preincubated with CM-O whereas impaired insulin signaling was detected in cells pretreated with CM-P (Figure 8).



Figure 8. Insulin signaling is differentially modulated in hepatocytes pretreated with conditioned medium from RAW 264.7 macrophages stimulated with oleate or palmitate. Conditioned medium from RAW 264.7 macrophages treated with BSA (CM-B), oleate (CM-O) or palmitate (CM-P) was added to immortalized mouse hepatocytes for 24 h. Then, cells were stimulated with 10 nM insulin for 10 min. Total protein was analyzed by Western blot using the indicated antibodies. Representative blots are shown (n=4 experiments performed in duplicate).

DISCUSSION

In obesity-associated insulin resistance, M1-like macrophages polarization state has been associated with the enhancement of the proinflammatory milieu by the ability to secrete proinflammatory cytokines. This surrounding insulin resistant adipocytes that trigger proinflammatory signaling pathways in macrophages through their binding to Toll-like receptors (TLRs) (32-34). However, we know now that beyond the interplay between adipocytes and adipose tissue resident macrophages, these inflammatory signals also dysregulate key metabolic responses in other peripheral tissues, thereby exacerbating insulin resistance (3).

The liver is a target organ of the inflammatory mediators. In obesity, the hepatic lipid accumulation (first hit) together with the proinflammatory input (second hit) trigger the necroinflammatory changes that are recognized histopathologically as steatohepatitis (NASH) (35). Of relevance, adipose tissue inflammation has been correlated with hepatic steatosis in humans (36). Furthermore, activation of Kupffer cells, the hepatic resident macrophages, to secrete proinflammatory mediators is a key event in the initiation of NAFLD, and limiting their polarization into an M1 phenotype is considered an attractive strategy against chronic liver inflammation (37-40).

In this study, we have dissected for the first time the molecular cross-talk between signals emerging from macrophage-derived products in response to fatty acid overload and insulin signaling in hepatocytes. A step further, we attempted to compare the responses of hepatocytes to macrophage-secreted cytokines derived from oleate or palmitate together with FFAs mimicking the circulating proinflammatory milieu. Interestingly, an opposite response in insulin-mediated IR tyrosine phosphorylation, the earliest event in the insulin signaling cascade, was found in both mouse and human hepatocytes

exposed to the CM from macrophages or Kuppfer cells treated with oleate or palmitate, with a significant increase or decrease, respectively, as compared to control hepatocytes (treated with CM-B). This opposite response was also evidenced in Akt phosphorylation (at both Ser 473 and Thr 308), a critical node of insulin's metabolic actions in hepatic cells (41). Thus, these results suggested that oleate and palmitate induce different secretory responses in peripheral and liver resident macrophages and this might differentially modulate insulin signaling in liver cells. In the light of these findings, the M1 polarization state induced by palmitate, reflected by elevated TNF α , IL6, IL1 β and MCP1 in agreement to Samokhvalov et al. (26), was not observed in Kupffer cells loaded with oleate. The absence of M1 polarization is critical to understand the modulation of insulin signaling by oleate in hepatocytes as will be discussed below. In fact, increased arginase 1, Mrc1, Mg11 and IL10 levels reflects a M2 profile of macrophages after oleate challenge in agreement with recent results reported by Camell et al. on the role of dietary oleic acid in M2 macrophages polarization (42).

The ER plays a central role in the determination of cell fate under conditions of stress. Increased ER stress has been shown to contribute to the development of NAFLD (17). In this regard, CM-P-treated hepatocytes rapidly activated the PERK branch of UPR by inducing PERK, eIF2 α and JNK phosphorylation, resulting in increased CHOP expression. Under these experimental conditions, STAT3 phosphorylation was also increased, this response is probably mediated by the proinflammatory cytokines IL6 and IL1 β . Moreover, TNF α -mediating signaling might also boost JNK and p38 MAPK activation. The convergence of all these proinflammatory signaling cascades leads to a negative-cross talk with insulin signaling resulting in the degradation of both IR and IRS1 that agrees with results reported in hepatocytes treated with palmitate (43, 44). Therefore, lower IR and IRS1 levels detected in hepatocytes stimulated with CM-P evidence the contribution of the early activation of stress kinases in the reduced insulin-mediated Akt phosphorylation. Neither the early activation of stress kinases nor CHOP expression were detected in

hepatocytes treated with CM-O, highlighting the absence of oleate-mediated proinflammatory responses in the macrophage-hepatocyte axis.

In addition to inflammation, FFAs-induced lipotoxicity contributes to the pathogenesis of NAFLD, being saturated FFAs the more toxic lipid species (45-47). Although the evaluation of the apoptotic responses under inflammatory conditions was not the major goal of this study, we detected cleavage of caspase 3 in hepatocytes treated with CM-P, suggesting that the signals derived from the macrophage M1 polarization are likely involved in lipoapoptosis. This interesting issue deserves future research.

Although PTP1B has been involved in obesity and inflammation (48-50), this is the first study showing the modulation of PTP1B protein levels by a macrophage-derived lipid product from oleate since reduced levels of LTB4 in CM-O paralleled with decreased PTP1B and enhancement of insulin-mediated IR tyrosine phosphorylation in hepatocytes. These data might be of relevance since PTP1B has emerged as a therapeutic target against obesity-mediated insulin resistance by its ability to regulate peripheral (muscle and liver) insulin sensitivity (49, 51-56) as well as the central control of appetite and energy expenditure (48, 57, 58). Based on that, our ongoing research is focused on the modulation of PTP1B expression by bioactive lipid species (eicosanoids) in hepatocytes.

In summary, we have demonstrated a paracrine cross-talk from macrophages/Kupffer cells to hepatocytes, which bears opposite differences depending on the polarization state of the macrophages and the factors secreted by these immune cells as it has been manifested upon treatment with palmitate or oleate. To our knowledge and as summarized in Figure 9, this is the first study providing data of the beneficial effects of oleate in switching macrophages polarization to increase insulin sensitization in hepatocytes through decreasing PTP1B. Therefore, targeting PTP1B is a therapeutic strategy to combat hepatic insulin resistance in obesity.

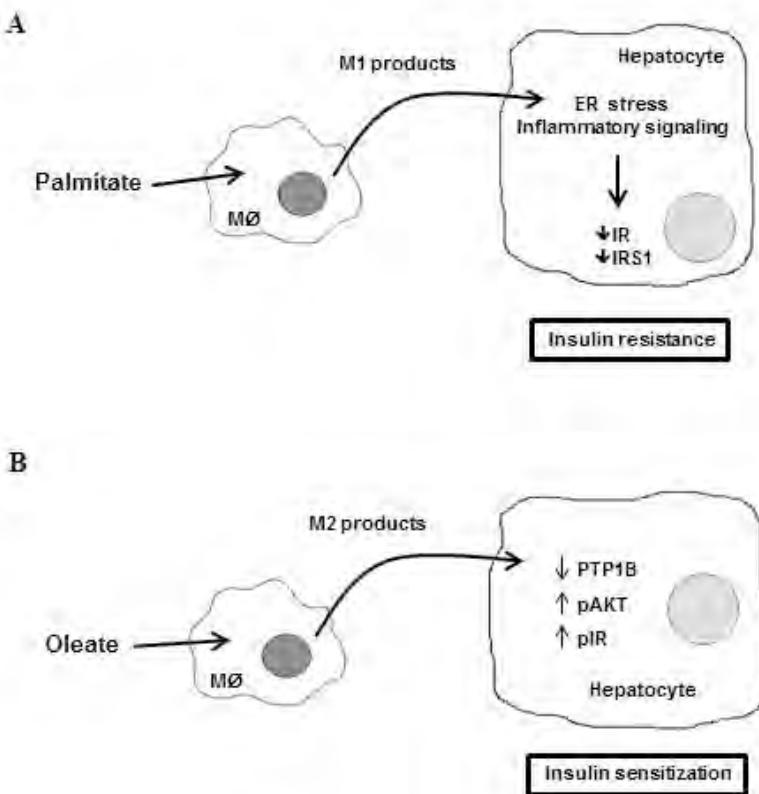


Figure 9. **A.** Schematic representation of palmitate-induced M1 polarization of macrophages that leads to a negative cross-talk with hepatic insulin signaling through decreasing IR and IRS1. **B.** Schematic representation of the beneficial effects of oleate in switching macrophages polarization by inducing M2 state to enhance insulin sensitivity in hepatocytes.

4. CONCLUSIONS

- Palmitate treated macrophages/Kuppfer cells have increased expression of proinflammatory cytokines.
- The CM-P/CMK-P leads to activation of stress pathways and result in insulin resistance in human and murine hepatocytes.
- Oleate treated macrophages/Kuppfer cells express markers of antiinflammatory activity.
- The CM-O/CMK-O produces a hypersensitivity to insulin in human and murine hepatocytes probably by lower levels of PTP1B.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge financial support from grants SAF2012-33283 (MINECO, Spain), Comunidad de Madrid S2010/BMD-2423 (Spain), Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM, Instituto Carlos III, Spain).

This work is dedicated in memory to Professor Margarita Lorenzo who was a member of the RANF.

6. REFERENCES

1. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
2. Attie AD, Scherer PE. Adipocyte metabolism and obesity. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S395-9.
3. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2111-7.
4. Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012;15(5):635-45.
5. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
6. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*. 2010;24(8):2596-611.
7. Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem*. 2009;42(13-14):1331-46.
8. Suchy D, Labuzek K, Machnik G, Kozlowski M, Okopien B. SOCS and diabetes--ups and downs of a turbulent relationship. *Cell Biochem Funct*. 2013;31(3):181-95.
9. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, de Alvaro C, Rondinone CM, Valverde AM, Lorenzo M. Protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient myocytes show increased insulin sensitivity and protection against tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance.

- Diabetes. 2007;56(2):404-13.
10. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, de Alvaro C, Lorenzo M. Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes*. 2008;57(12):3211-21.
 11. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*. 1996;97(12):2859-65.
 12. Park E, Wong V, Guan X, Oprescu AI, Giacca A. Salicylate prevents hepatic insulin resistance caused by short-term elevation of free fatty acids in vivo. *J Endocrinol*. 2007;195(2):323-31.
 13. Schwenger KJ, Allard JP. Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1712-23.
 14. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001;293(5535):1673-7.
 15. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333-6.
 16. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111-9.
 17. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-61.
 18. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes*. 2009;58(3):693-700.
 19. Scull CM, Tabas I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(12):2792-7.
 20. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 2006;313(5790):1137-40.
 21. Kars M, Yang L, Gregor MF, Mohammed BS, Pietka TA, Finck BN, et al. Taurooursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes*. 2010;59(8):1899-905.
 22. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2006;281(36):26602-14.
 23. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
 24. Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Chang B, et al. Common sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):208-12.
 25. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.
 26. Samokhvalov V, Bilan PJ, Schertzer JD, Antonescu CN, Klip A. Palmitate- and lipopolysaccharide-activated macrophages evoke contrasting insulin responses in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(1):E37-46.
 27. Kewalramani G, Fink LN, Asadi F, Klip A. Palmitate-activated macrophages confer insulin resistance to muscle cells by a mechanism involving protein kinase C theta and epsilon. *PLoS One*. 2011;6(10):e26947.
 28. Spector AA. Structure and lipid binding properties of serum albumin. *Methods Enzymol*. 1986;128:320-39.
 29. Pichard L, Raulet E, Fabre G, Ferrini JB, Ourlin JC, Maurel P. Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol*. 2006;320:283-93.
 30. Benveniste R, Danoff TM, Ilekis J, Craig HR. Epidermal growth factor receptor numbers in male and female mouse primary hepatocyte cultures. *Cell Biochem Funct*. 1988;6(4):231-5.
 31. Gonzalez-Rodriguez A, Clampit JE, Escribano O, Benito M, Rondinone CM, Valverde AM. Developmental switch from prolonged insulin action to increased insulin sensitivity in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient hepatocytes. *Endocrinology*. 2007;148(2):594-608.
 32. Nguyen MT, Satoh H, Favelyukis S, Babendure JL, Imamura T, Sbodio JI, et al. JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35361-71.
 33. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2007;282(48):35279-92.
 34. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015-25.
 35. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
 36. Cancello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*. 2006;55(6):1554-61.
 37. Gao B. Natural killer group 2 member D, its ligands, and liver disease: good or bad? *Hepatology*. 2010;51(1):8-11.

38. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, et al. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes*. 2010;59(2):347-57.
39. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11(2):191-8.
40. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2008;7(6):496-507.
41. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):85-96.
42. Camell C, Smith CW. Dietary oleic acid increases m2 macrophages in the mesenteric adipose tissue. *PLoS One*. 2013;8(9):e75147.
43. Ruddock MW, Stein A, Landaker E, Park J, Cooksey RC, McClain D, et al. Saturated fatty acids inhibit hepatic insulin action by modulating insulin receptor expression and post-receptor signalling. *J Biochem*. 2008;144(5):599-607.
44. Lei H, Lu F, Dong H, Xu L, Wang J, Zhao Y, et al. Genistein reverses free fatty acid-induced insulin resistance in HepG2 hepatocytes through targeting JNK. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2011;31(2):185-9.
45. Malhi H, Gores GJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2008;28(4):360-9.
46. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(6):3077-82.
47. Mei S, Ni HM, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, et al. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(2):487-98.
48. Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem*. 2008;283(21):14230-41.
49. Gonzalez-Rodriguez A, Mas-Gutierrez JA, Mirasierra M, Fernandez-Perez A, Lee YJ, Ko HJ, et al. Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced inflammation and peripheral insulin resistance during aging. *Aging Cell*. 2012;11(2):284-96.
50. Grant L, Shearer KD, Czopek A, Lees EK, Owen C, Agouni A, et al. Myeloid-cell protein tyrosine phosphatase-1B deficiency in mice protects against high-fat diet and lipopolysaccharide-induced inflammation, hyperinsulinemia, and endotoxemia through an IL-10 STAT3-dependent mechanism. *Diabetes*. 2014;63(2):456-70.
51. Delibegovic M, Bence KK, Mody N, Hong EG, Ko HJ, Kim JK, et al. Improved glucose homeostasis in mice with muscle-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell Biol*. 2007;27(21):7727-34.
52. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. 1999;283(5407):1544-8.
53. Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 2000;20(15):5479-89.
54. Delibegovic M, Zimmer D, Kauffman C, Rak K, Hong EG, Cho YR, et al. Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes*. 2009;58(3):590-9.
55. Owen C, Lees EK, Grant L, Zimmer DJ, Mody N, Bence KK, et al. Inducible liver-specific knockdown of protein tyrosine phosphatase 1B improves glucose and lipid homeostasis in adult mice. *Diabetologia*. 2013;56(10):2286-96.
56. Gonzalez-Rodriguez A, Mas Gutierrez JA, Sanz-Gonzalez S, Ros M, Burks DJ, Valverde AM. Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice. *Diabetes*. 2010;59(3):588-99.
57. Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, et al. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med*. 2006;12(8):917-24.
58. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell*. 2002;2(4):489-95.



Cannabinoid analogs in the treatment of pain

Title in Spanish: Análogos de cannabinoides en el tratamiento del dolor

José María Sánchez Montero^{1,*}

¹Grupo de Biotransformaciones. Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal, s/n. Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España.

ABSTRACT: The therapeutic use of cannabinoids in the treatment of pain is as far as the knowledge we have of the plant *Cannabis sativa* and yet is still in force. The main way of action of cannabinoids, natural or synthetic, is the activation of CB-1 or CB-2 receptors, G-protein coupled usually transmission of painful stimuli initially dependent glutamate release in the dorsal horn of the spinal cord and in which other neurotransmitters and mediators such as substance P, ATP, various interleukins and TNF, among others are also involved. These substances, which are released by neurons are responsible for the chronicity of pain and play a key role in the development of neuropathic pain component. Cannabinoids are good analgesics, especially for chronic pain. This results from the presence of CB1 receptors in the regions involved in the control of nociception, both cord level and at the supraspinal level. In the case of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), there has been an increased level of endocannabinoids and of cannabinoid receptor expression CB2. The use of selective agonists for CB2 and CB1 receptor depletion and degradation of enzymes SCE, improve the symptoms of the disease and increase survival in studies with transgenic mice cannabis drugs should be considered as a treatment option more, but other classes of drugs which, depending on the case and the patient, may be more or less suitable. The modificationestructuralen molecule THC and CBN calculations using molecular orbital molecular mechanics and molecular docking serve to know that compounds can cross the blood brain barrier and what not, and the energy values obtained by molecular docking. These results give us a criterion for evaluating potential candidates to inhibit acetylcholinesterase and thus be potential anti-Alzheimer candidates and their evaluation for the treatment of chronic pain.

RESUMEN: El uso terapéutico de los cannabinoides en el tratamiento del dolor es tan lejano como el conocimiento que se tiene de la planta *Cannabis sativa* y a pesar de ello sigue aún vigente. La principal vía de actuación de los cannabinoides, naturales o sintéticos, es la activación de receptores CB-1 ó CB-2, generalmente acoplados a proteínas G. La transmisión del estímulo doloroso depende inicialmente, de la liberación de glutamato en el asta posterior de la médula espinal y en la que también se implican otros neurotransmisores o mediadores como la sustancia P, el ATP, diferentes interleuquinas o TNF entre otros. Estas sustancias, que son liberadas por neuronas son responsables de la cronificación del dolor y juegan un papel fundamental en el desarrollo del dolor con componente neuropático. Los cannabinoides son buenos analgésicos, especialmente para el dolor crónico. Esto es consecuencia de la presencia de receptores CB₁ en las regiones que participan en el control de la nocicepción, tanto a nivel espinal como a nivel supraespinal. En el caso de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), se ha observado un incremento del nivel de endocannabinoides y de la expresión del receptor cannabinoide CB2. El uso de agonistas selectivos para CB2 y la depleción del receptor CB1 así como de enzimas de degradación del SCE, mejoran los síntomas de la enfermedad e incrementan la supervivencia en ensayos realizados con ratones transgénicos. Los fármacos derivados del cannabis deben considerarse como una opción de tratamiento más, pero existen otras familias de fármacos que, dependiendo del caso y el paciente, pueden ser más o menos adecuadas. La modificación estructural en la molécula de THC y CBN aplicando cálculos de mecánica molecular, orbitales moleculares y Docking molecular servirá para saber que compuestos podrán atravesar la barrera hematoencefálica y cuales no, así como los valores de energía obtenidos mediante Docking molecular. Estos resultados nos darán un criterio para evaluar los posibles candidatos a inhibir la acetilcolinesterasa y de esta forma ser posibles candidatos anti-Alzheimer así como su evaluación para el tratamiento del dolor crónico.

*Corresponding Author: jmsm@ucm.es

Received: October 7, 2015 Accepted: June 20, 2016

Premio Alcaliber-Iberoamérica del Concurso Científico 2015 de la Real Academia Nacional de Farmacia

1. INTRODUCCIÓN

El *Cannabis sativa* conocido tradicionalmente como marihuana, es una variedad del cáñamo que ha sido cultivado y utilizado por el hombre desde la antigüedad, debido fundamentalmente a sus propiedades médicas y

psicoactivas. De hecho se han encontrado reseñas de su uso en tratados médicos chinos datados en el año 2700 a. C. (1) así como referencias bibliográficas y datos farmacológicos sobre su utilización en países como Egipto e India desde el año 3000 a. C. (2). En Europa se conoce

Cannabinoid analogs in the treatment of pain

su existencia desde el siglo XIII y desde su introducción hasta el siglo XIX fue utilizado en medicina como anticonvulsivo, analgésico, ansiolítico y antiemético.

Los primeros ensayos clínicos fueron realizados por el Dr. O'Shaughnessy en 1843 para determinar, con una base científica, las propiedades terapéuticas de este antiguo remedio habiéndose propuesto en una de las indicaciones más claras, su utilidad como analgésico. De hecho, su uso llegó a ser tan reconocido que en 1890, J. Russell Reynolds, el médico personal de la Reina Victoria escribió a propósito de las propiedades analgésicas del cannabis: "En casi todas las enfermedades que cursan con dolor he encontrado que el cáñamo indio es de lejos la más útil de las drogas" (3).

Posteriormente, a principios del siglo XX, cayó en desuso como consecuencia de la presión social ejercida ya que debido a sus efectos adictivos se consumía en abuso con fines recreativos. A pesar de que en 1924 fue clasificado como narcótico y a partir de entonces su consumo se prohibió, recientemente en algunos países, se ha permitido su uso controlado para el tratamiento de las náuseas y vómitos provocados por los fármacos quimioterápicos y antineoplásicos. También se han evaluado en el síndrome de anorexia-caquexia en pacientes con sida o ciertos tipos de cáncer terminal, en el tratamiento del dolor, en el de la espasticidad muscular y otros síntomas de la esclerosis múltiple. Asimismo tendrían utilidad en la recuperación de traumatismos craneoencefálicos. Existen asimismo datos que muestran que los cannabinoides no poseen efectos tóxicos generalizados habiéndose descrito que los cannabinoides podrían proteger a las neuronas frente al daño producido por agentes oxidantes, isquemia y ciertos neurotóxicos.

El término cannabinoides no sólo se refiere a los productos obtenidos de la marihuana sino que hay que distinguir entre dos nombres. Por un lado, los fitocannabinoides se definen como los componentes naturales del *Cannabis sativa* y de alguna otra especie recientemente descrita, mientras que los endocannabinoides son los sintetizados en el interior de los animales, es decir, que serían los ligandos endógenos de los receptores cannabinoides. Químicamente los fitocannabinoides son hidrocarburos aromáticos oxigenados en el *Cannabis sativa* y bibencilos en las hierbas hepáticas (indicadas para normalizar la función del hígado) *Radula perrottetii* y *Radula marginata*.

Se han identificado hasta 66 cannabinoides en el cannabis, la mayoría de los cuales pertenecen a una de las 10 subclases o tipos principales (4). Los más abundantes son los de los tipos cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) y delta-9 tetrahidrocannabinol ($\Delta 9$ -THC) que es el principal componente activo de la marihuana. La composición en cannabinoides de cada planta es diferente en función de la variedad, en general cada planta contiene sólo de 3 a 4 cannabinoides en concentraciones superiores al 0,1%. El $\Delta 9$ -THC es el que posee una mayor cantidad de efectos terapéuticos, aunque también presenta propiedades

psicoactivas. El $\Delta 9$ -THC da lugar principalmente a dos metabolitos, 11-OH- $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol (11-OH-THC) (metabolito psicotrópico) y el 11 nor-9-carboxi-THC (THCCOOH) (metabolito no-psicotrópico), ambos con similar espectro de acción y perfil cinético que su molécula madre.

Otro fitocannabinóide que cabe destacar por sus efectos terapéuticos es el cannabidiol, CBD, un compuesto no-psicoactivo común en algunas variedades de cannabis y que tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antipsicóticas.

Una de las aplicaciones en las que los cannabinoides parecen poseer un papel muy importante es en el tratamiento del dolor. Podemos definir la nocicepción como una modalidad sensorial somática que tiene una importante función protectora, ya que focaliza la atención en un estímulo nocivo que amenaza la integridad del organismo y que debe, por ende, ser evitado. La capacidad para responder a estímulos nocivos es una característica básica de todos los organismos de la escala filogenética, por ejemplo, los pulpos tienen vías nerviosas que conducen información nociceptiva. Mientras que en otros organismos pertenecientes a los filos de platelmintos, artrópodos y moluscos se han descrito conductas que pueden considerarse antinociceptivas.(5) Teniendo en cuenta que los mecanismos más complejos de respuesta a los estímulos dolorosos se encuentran en los vertebrados, sobre todo en los mamíferos, en los cuales procesos analgésicos sumamente complejos producen un control fino de la aferencia nociceptiva, el sistema cannabinérgico parece tener un papel muy importante, ya que cannabinoides endógenos y sintéticos producen analgesia. Así se ha visto, que agonistas del receptor CB1 aplicados localmente disminuyen la nocicepción ejerciendo su acción de manera periférica (6). También se produce analgesia al microinyectar cannabinoides intracerebralmente en la zona gris periacueductal y en la región rostral ventromedial del bulbo. Esto plantea la posibilidad de que los cannabinoides tengan una acción a nivel central en las zonas donde ejercen su acción analgésica los opioides. (7) De hecho, se han localizado receptores tipo CB1 en áreas del cerebro que procesan información nociceptiva (8). Todo esto ha llevado a proponer un sistema analgésico cannabinérgico similar al opioide y que podría actuar de forma sinérgica o alternativa al mediado por encefalinas (9).

El descubrimiento de receptores para el THC originó la pregunta de si nuestro organismo produce sustancias (endocannabinoides) que también se ligan a los receptores cannabinoides. Entre los principales endocannabinoides se encuentra la anandamida (del sánscrito ananda, que significa "felicidad") y el 2-araquidonil glicerol (2-AG). La virodhamina, un éster del ácido araquídónico-etanolamina, se halla en el tejido cerebral donde actuaría como un antagonista endógeno del receptor CB1. Es una molécula inestable químicamente que se transforma rápidamente en anandamida en medio acuoso. Otras moléculas extraídas de los tejidos animales y

que actúan como lípidos bioactivos son el éter de 2-araquidonil-glicerilo o noladin éter y la n-araquidonildopamina (10-14) (sistema endocanabinoide encontrado en obesidad y síndrome metabólico). Al igual que el THC, estas sustancias se ligan a los receptores de CB1 y los activan.

1.1. Receptores de cannabinoides

Los cannabinoides tanto endógenos como de *C. sativa* y sintéticos actúan en el organismo mediante las mismas dianas moleculares. Se trata de receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células, denominados receptores CB y de los cuales actualmente existen dos tipos bien caracterizados molecular y farmacológicamente, CB1 y CB2. Entre ambos receptores, hay una homología de alrededor del 48%. Es posible que existan en el organismo otros receptores, como GPR55 o TRPV1 que median algunas acciones de los endocannabinoides. Los receptores CB pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y acoplan principalmente Gi/o caracterizados por presentar 7 dominios transmembrana. Además existe una variante del receptor CB1, denominado CB1A que posee menos aminoácidos en su extremo N-terminal que el CB1 por un *splicing* diferente que posee un modelo de distribución muy semejante al CB1 y es hasta un 20% más abundante que este último (15).

A través de las proteínas G, estos receptores modulan rutas de señalización intracelular de gran importancia como la vía de la adenilil ciclase (16) (AC), 3'',5''-monofosfato cíclico (cAMP), proteína quinasa A (PKA) cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos como ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) la generación del esfingolípido ceramida y la vía de la quinasa Akt activan la cascada de las MAPK, vía involucrada en la regulación de fenómenos de proliferación y diferenciación celular (17) estos y otros mecanismos de señalización participan en el control por el sistema endocannabinoide.

Como es lógico pensar, sólo los tejidos que presenten receptores específicos para cannabinoides son dianas de acción de estos compuestos.

La mayor parte de los efectos de los cannabinoides están mediados por el receptor CB1 (18-19). Inicialmente llamado receptor central de cannabinoides. Pero en realidad este receptor presenta una localización muy ubicua y es especialmente abundante en áreas del sistema nervioso central implicadas en el control de la actividad motora (ganglios basales, cerebro), memoria y aprendizaje (corteza, hipocampo) lo que explica también sus efectos anticonvulsivantes, emociones (amígdala), percepción sensorial (tálamo) y diversas funciones autónomas y endocrinas(hipotálamo y médula) lo que lógicamente explica que los endocannabinoides modulen estos procesos y que el consumo de marihuana interfiera en ellos. Se encuentra en bajos niveles en los centros respiratorios del tallo cerebral y también se expresa en las células gliales. Por otro lado, su baja densidad en tallo

cerebral (zona de control de las funciones cardiovascular y respiratoria) (20) explica la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana. Fuera del SNC el receptor CB1 se ha detectado en las terminales nerviosas periféricas que inervan tanto la piel como los tractos digestivo, circulatorio y respiratorio así como tejidos del endotelio vascular, hueso, testículo, útero, ojo, hígado y bazo y tejido adiposo y en distintas células del sistema inmune: linfocitos B y T y monocitos y parecen modular las propiedades inmunosupresoras del cannabis.

En el cerebro los receptores CB1 se expresan también en astrocitos, donde podrían controlar el aporte de nutrientes a las neuronas y mediar procesos de intercomunicación sináptica entre ambos tipos de células, así como en células del endotelio vascular, donde su activación induce vasodilatación.

El receptor CB2 inicialmente denominado receptor periférico de cannabinoides, muestra una distribución más restringida y está presente principalmente en el sistema inmune, tanto en células linfocitos y macrófagos como en tejidos (bazo, apéndice y ganglios). Por ello se piensa que está implicado en la modulación de la respuesta inmune por el sistema endocannabinoide.

Los receptores CB2 actúan por los mismos mecanismos pero a diferencia del CB1, no es capaz de modificar las corrientes de los canales de calcio y potasio (21). Se expresan en células de microglía, donde median la inactivación de dichas células y por tanto un descenso en la liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo que conlleva un atenuación de los procesos neuroinflamatorios.

Aunque se ha sugerido que los ligandos endógenos de estos receptores (endocannabinoides) tendrían cierta selectividad por los diferentes subtipos de receptores para cannabinoides, lo cierto es que pueden unirse y activar ambos subtipos indistintamente (22).

Los endocannabinoides junto con sus receptores y sistemas específicos de síntesis y degradación constituyen el denominado sistema endocannabinoide. Este sistema aparece de forma altamente conservada en la gran mayoría de animales y su función hasta ahora mejor establecida es la de constituir un mecanismo de neuromodulación en el SNC. Así cuando se activan receptores de neurotransmisores en la membrana plasmática de una neurona postsináptica, esta sintetiza precursores de endocannabinoides y los escinde para liberar a la hendidura sináptica endocannabinoides funcionalmente activos. Este mecanismo acontece por ejemplo tras la unión de algunos neurotransmisores como el glutamato a sus receptores inotrópicos o metabotrópicos o el GABA. Es decir los endocannabinoides actúan como mensajeros químicos retrógrados que se unen a receptores CB1 de la neurona presináptica, el resultado es la retro inhibición de la liberación del neurotransmisor y la consiguiente atenuación de la transmisión glutamatérgica y gabaérgica (20). Como es conocido la EA se caracteriza por una hiperfuncionalidad en el sistema glutamatérgico y una hipofuncionalidad en el colinérgico.

La unión de los cannabinoides a los receptores CB1 de la neurona presináptica conlleva el cierre de canales de Ca²⁺ sensibles a potencial VSCCs, (voltaje-sensitive Ca²⁺ channels) por lo que se facilita la salida de iones K⁺ debido a la apertura de canales rectificadores de K⁺ sensibles a proteínas G. Este proceso impide la despolarización de la membrana y los procesos de exocitosis y así se bloquea la liberación del NT.

Aunque el resultado global de la activación de dichos receptores es la retroinhibición de la liberación de NTs y la consiguiente atenuación de la transmisión sináptica, el curso temporal en el que tiene lugar este proceso divide los efectos de los endocannabinoides en 2 tipos. De acción corta y de acción larga. La depresión sináptica a corto plazo está mediada por el cierre de canales de Ca²⁺ y apertura de K⁺, mientras que la depresión a largo plazo depende de la inhibición de la vía AC-cAMP-PKA y consecuentemente de la inactivación de algunas proteínas blanco de esta ruta.

Los principales endocannabinoides son la anandamida y el 2-araquidonil glicerol. Ambos cumplen las condiciones necesarias de todo neurotransmisor ya que son sintetizados y liberados a partir de las neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membranas y ser inactivados por recaptación o degradación enzimática en el interior de la célula. Sin embargo, a diferencia de otros neurotransmisores no se almacenan en vesículas en las neuronas, sino que se sintetizan a partir de un precursor fosfolipídico presente en las membranas celulares. Los niveles de 2-araquidonil glicerol son más altos que los de anandamida. Las concentraciones más altas de anandamida se encuentran en zonas que presentan altos niveles de receptores como hipocampo, corteza o el núcleo estriado.

A fin de demostrar la función moduladora que los endocannabinoides ejercen sobre numerosas funciones cerebrales, se ha sugerido el potencial terapéutico que la manipulación farmacológica de sus niveles o la administración de agonistas cannabinoides podría tener en el tratamiento de diversas patologías que afectan al sistema nervioso (esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington y enfermedad de Alzheimer).

En algunas de estas enfermedades ya se ha podido poner de manifiesto que existen cambios en la expresión de receptores cannabinoides y/o en los niveles de endocannabinoides en ciertas zonas del cerebro. Hoy en día se sabe que bajo determinadas circunstancias, los cannabinoides son capaces de proteger a las neuronas frente a diversas situaciones de daño, lo que podría tener interés para el tratamiento de episodios de daño cerebral agudo y quizás de enfermedades neurodegenerativas. Su participación en los procesos de memoria y aprendizaje hace pensar que los cannabinoides podrían ser de utilidad en trastornos como la extinción de la memoria en situaciones de estrés post-traumático.

A pesar de todo ello la utilización clínica de los cannabinoides y otros compuestos que modulen el sistema cannabinérgico es restrictiva sólo en algunos países se permite la prescripción de cannabinoides. No hay que

olvidar que aunque se trate de compuestos seguros clínicamente hablando, su uso médico estaría dificultado por sus efectos psicoactivos no deseados (euforia, somnolencia, descoordinación, lapsos de memoria, etc.). Aunque estos efectos secundarios sean transitorios y estén dentro de los márgenes aceptados para otros medicamentos, es necesario diseñar cannabinoides que carezcan de las acciones psicótropas. Ya que estas acciones dependen de los receptores CB1 centrales, los objetivos futuros son el diseño de fármacos CB2 selectivos o de compuestos que no atraviesen la barrera hematoencefálica o setta.

2. DEFINICIÓN DE DOLOR

El dolor se define como "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño real o potencial del tejido, o se describe en términos de dicho daño" (International Association of the Study of Pain) (23-24). La ciencia que estudia el dolor se llama algología. El dolor puede ser agudo, o crónico. El dolor agudo es un dolor de corta duración que suele tener una causa fácilmente identificable. Este tipo de dolor normalmente se origina en el sistema nervioso periférico, es decir fuera del cerebro, aunque se procesa e interpreta en él (por parte del sistema nervioso central). De hecho, el dolor agudo actúa como una señal de advertencia de un daño actual o próximo: es la respuesta fisiológica normal ante un estímulo adverso o perjudicial que causa el dolor. Este estímulo puede ser mecánico (una fractura ósea), térmico (una quemadura) o químico (debido a una reacción inflamatoria en el cuerpo durante una enfermedad aguda). Suele responder bien a los analgésicos y por tanto su duración es limitada.

El dolor crónico suele ser independiente de la causa original del dolor, ocurriendo que los nervios sobreactivados sigan enviando la señal de dolor al cerebro. En otras ocasiones, la causa del dolor puede seguir existiendo sin poder ser tratada o eliminada en todos los casos, como en las enfermedades incurables o crónicas, con lo que en ese caso la señal de dolor pierde su función de advertencia y no ayuda al cuerpo a evitar el daño. También se habla del dolor crónico, cuando unos estímulos de dolor sin tratar provocan respuestas de dolor adicionales. Por tanto, el dolor crónico suele ser mucho más difícil de tratar que el agudo; debería considerarse una enfermedad en sí mismo. Los estados de salud que causan este tipo de daño se describen en causas del dolor. Un ejemplo significativo de lo que acabamos de decir lo podríamos ilustrar con el dolor de cabeza o cefalea que es una de las dolencias más frecuentes en la población. La diferencia entre dolor de cabeza y migraña reside en el hecho de que el dolor de cabeza común se manifiesta de una manera general a toda la cabeza mientras que la migraña afecta solo a un lado de la cabeza. La migraña es una enfermedad neurobiológica, mientras que los dolores de cabeza no son más que un síntoma de una enfermedad.

Una de las manifestaciones singulares de la migraña es el "aura", el cual consiste en un déficit neurológico transitorio y reversible, tanto visual como somatosensitivo,

motor o lingüístico (25). La tipología de aura más común es aquella en la que tiene lugar una manifestación visual alterada que anuncia la aparición de un ataque migrañoso (aura típica); ésta se caracteriza por la percepción de manchas negras, centelleos luminosos y líneas brillantes en zigzag, así como por la presencia de áreas de pérdida del campo visual (26). Podemos diferenciar varios tipos de migraña:

La migraña común (sin aura), se caracteriza por náuseas con o sin vómito. El dolor resulta acentuado con movimientos como tos, estornudos, esfuerzos, así como exposición a la luz. La relajación, oscuridad y ausencia de ruido son recomendables para aliviar los síntomas. La duración de los episodios es variable, pudiendo llegar hasta los tres días y se presenta en un lado del cráneo, para extenderse después al resto de la cabeza.

Migraña clásica: (con aura). Se diferencia de la migraña común debido a la aparición de algunas molestias como: hipersensibilidad a la luz y/o al ruido, oscurecimiento del campo visual, percepción de líneas centelleantes o moscas voladoras. La duración de los ataques varía de unas horas a un día.

Cefalea en racimos o cluster (neuralgia hemicraneal): aproximadamente el 1% de los casos de cefalea. Se caracteriza por una extrema intensidad, se presenta al improvisto, normalmente está localizada alrededor de un ojo o en la sien, en general dura pocos minutos y en 24 horas puede presentarse incluso 10 veces o más. El dolor de la cefalea en racimo puede ser tan intenso que la persona que lo sufre puede tener tendencias autolesivas e incluso suicidas.

Esta dolencia, afecta a entre el 11 y el 13 por ciento de la población adulta en los países occidentales. En Estados Unidos, se estima que alrededor de 30 millones de personas sufren de esta dolencia que suelen ir acompañados de náuseas, vómitos e hipersensibilidad a la luz. En Europa el 14% de la población padece migraña crónica (27). En España, se estima que, el 12,6 por ciento de las personas de entre 18 y 65 años, puede padecer, según los criterios de migraña probable de la *International Headache Disorders*. Unas de las causas propuestas por las que se producen estas migrañas podrían deberse a pinzamientos de la arteria vertebral tal y como se ilustra en la Figura 1.



Figura 1. Pinzamiento de la arteria vertebral como causa posible de migrañas.

La señal de alarma que proporciona el dolor desencadena una serie de mecanismos cuyo objetivo es evitar o limitar los daños. Para ello, el organismo dispone de los siguientes elementos:

- Detectores de la señal nociva: Son neuronas especializadas en la recepción del dolor, denominadas nociceptores.

- Mecanismos ultrarrápidos de protección (reflejos): son reacciones rápidas, generadas a nivel de la médula espinal que pueden tener como efecto una reacción de retirada una contractura de la musculatura que bloquea la articulación si se ha producido una lesión articular (es el caso del lumbago después de la lesión de un disco intervertebral tras un movimiento en falso).

- Mecanismos de alerta general (estrés), por activación de los centros de alerta presentes en el tronco cerebral; ello se traduce en un aumento de la vigilancia y de las respuestas cardiovasculares, respiratorias y hormonales que preparan al organismo a hacer frente a la amenaza (mediante la huida o la lucha).

- Mecanismos de localización consciente e inconsciente de la lesión, a nivel del cerebro; la localización es precisa si la lesión se produce en la piel y difusa o incluso deslocalizada si la lesión afecta un tejido profundo.

- Mecanismos comportamentales para hacer frente a la agresión: debido a la activación de centros especializados en el cerebro, aumenta la agresividad y pueden producirse manifestaciones de cólera; estas pulsiones tienen como objetivo movilizar la atención del sujeto e iniciar los comportamientos de huida o lucha para preservar la integridad corporal.

- Mecanismos de analgesia endógenos: en ciertas circunstancias estos mecanismos permiten hacer frente a la amenaza a pesar de que se hayan sufrido graves heridas.

2.1. Sistema cannabinoides y dolor

En todos los sitios donde se han localizado receptores cannabinoides, se ha descrito su papel modulador de la transmisión de las señales nociceptivas. Es un hecho conocido en la bibliografía que, por lo general, la estimulación del sistema cannabinoides provoca una respuesta a un fenómeno de analgesia endógena. En efecto, la unión de cannabinoides endógenos a sus receptores provoca una hiperpolarización de las neuronas, lo que supone una menor frecuencia de descarga, una menor conducción nerviosa y, por lo tanto, una menor activación de las neuronas que transmiten la señal de dolor. Es por ello que los cannabinoides son buenos analgésicos, especialmente para el dolor crónico. Esto es consecuencia

de la presencia de receptores CB₁ en las regiones que participan en el control de la nocicepción, tanto a nivel espinal como a nivel supraespinal (28). Existe además una intensa interacción entre la transmisión endocannabinoide y la opioidérgica (29), incluso se han demostrado efectos sinérgicos, lo que ha llevado a sugerir que los cannabinoides podrían ser utilizados para reducir las dosis de morfina en tratamientos de dolor crónico, sin merma del efecto analgésico pero con una notable reducción del potencial adictivo del opiáceo.

En el dolor inflamatorio se está asimismo estudiando la posibilidad de interferir farmacológicamente mediante la estimulación de receptores cannabinoides de tipo CB₂. Aunque los receptores de tipo CB₂ están presentes de forma mayoritaria en las células del sistema inmune, también se han detectado receptores de este subtipo en terminales nerviosos periféricos y en células gliales, proponiéndose por ello como dianas farmacológicas para el tratamiento del dolor, tanto inflamatorio como neuropático (31). La posibilidad de modular el dolor inflamatorio mediante la activación farmacológica de este receptor CB₂ vendría dada por el hecho de que se ha demostrado su presencia en mastocitos (32). Los endocannabinoides, liberados en respuesta a la inflamación, se unirían a receptores localizados en estos mastocitos y bloquearían la liberación de sustancias proinflamatorias, disminuyendo así la respuesta inflamatoria y con ello el dolor (33).

3. ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y SU RELACIÓN CON LOS RECEPTORES CANNABINOIDES

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad que afecta a la mielina o materia blanca del cerebro y de la médula espinal, provocando la aparición de placas escleróticas que impiden el funcionamiento normal de esas fibras nerviosas. La mielina es una capa grasa que recubre las fibras nerviosas (axones). Los axones recubiertos de mielina tienen un aspecto blanquecino, por lo que se conocen en el cerebro como sustancia blanca. Su misión es aislar y proteger a los axones para que conduzcan los impulsos nerviosos más rápida y eficazmente. La velocidad y eficiencia con que se conducen estos impulsos permiten realizar movimientos suaves, rápidos y

coordinados con poco esfuerzo consciente.

Si por alguna razón desconocida, se produce una anomalía inmunológica, entonces el cuerpo produce anticuerpos contra su propia mielina. Esto provoca, la aparición de lesiones de desmielinización y, posteriormente, cicatrices (placas) en distintos puntos del sistema nervioso central. La desmielinización puede afectar a zonas diversas del sistema nervioso central y la distinta localización de las lesiones es la causa de la variabilidad y multiplicidad de los síntomas (trastornos motrices, sensitivos, del lenguaje, del equilibrio, viscerales, etc...).

Este mecanismo inmunitario activa los glóbulos blancos (linfocitos) del torrente sanguíneo, que entran en el cerebro y debilitan los mecanismos de defensa de éste (es decir, la barrera hematoencefálica). Una vez en el cerebro, estos glóbulos activan otros elementos del sistema inmunitario, de forma tal que atacan y destruyen la mielina.

En esta enfermedad, están implicados tanto los receptores CB₁ como CB₂. Se han desarrollado algunos ensayos clínicos que pretendían explicar los numerosos datos que demuestran un efecto beneficioso de los cannabinoides sobre algunos de los síntomas de la enfermedad, como la espasticidad, en pacientes que se automedicaban con cannabis (34), aunque algunos de estos resultados no son excesivamente fiables. También existen numerosos estudios con modelos animales de la enfermedad en los cuales se ha demostrado como los cannabinoides producen una notable reducción de los signos clínicos.

Se sabe que el SCE (Sistema Cannabinoide Endógeno) se encuentra alterado en situaciones patológicas. En el caso de la ELA, se ha observado un incremento del nivel de endocannabinoides y de la expresión del receptor cannabinoide CB₂ tanto en médulas espinales de modelos transgénicos de ratones así como en muestras de tejido post mortem de pacientes humanos.

Además se ha visto que el uso de agonistas selectivos para CB₂ y la depleción del receptor CB₁ así como de enzimas de degradación del SCE mejoran los síntomas de la enfermedad e incrementan la supervivencia en el modelo de ratón transgénico SOD1.



Figura 2. Representación esquemática de la capa de mielina en los axones de las neuronas.

4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

La enfermedad de Alzheimer (EA), según la Clasificación Internacional de las Enfermedades (CIE-10, Clasificación Internacional de las Enfermedades, 10ª Edición, OMS 1994 -25), se define como: "un síndrome debido a una enfermedad del cerebro, generalmente de naturaleza crónica o progresiva, en la que hay déficit de múltiples funciones corticales superiores que repercuten en la actividad cotidiana del enfermo".

Esta enfermedad, se caracteriza por un deterioro progresivo e irreversible de las funciones cerebrales superiores o cognitivas, con pérdida de memoria, juicio y lenguaje, es decir, clínicamente se manifiesta como una demencia. En algunos casos, en las primeras fases de la enfermedad, se acompaña de síntomas de otro tipo de alteraciones mentales no cognitivas (psicosis, depresión, ansiedad, apatía, etc.) y del comportamiento (agitación, irritabilidad, etc.). Antes o después, según los síntomas que se presentan, se produce una interferencia grave en la realización de las tareas diarias, originándose una gran discapacidad y una dependencia del cuidador, que llega a ser total. El periodo evolutivo puede ser corto, 2 o 3 años en algunos casos extremos, o bastante largo. En España, a falta de datos oficiales, puede considerarse actualmente una duración media de 12 años a partir del diagnóstico definitivo.

La sociedad occidental sufre un progresivo envejecimiento de su población y consecuentemente mayor incidencia de las patologías asociadas con la vejez. El incremento proporcional de las enfermedades neurodegenerativas, muy relacionadas con el envejecimiento, se caracterizan por una progresiva disfunción y muerte neuronal, con la consiguiente pérdida de funciones nerviosas específicas y aparición de síntomas clínicos (35). Las patologías neurodegenerativas más conocidas además de la enfermedad de Alzheimer (EA), son la enfermedad de Parkinson (EP), la Enfermedad de Huntington (EH) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Se estima que mundialmente ya hay 26 millones de personas afectadas por EA. En España 800.000 personas padecen enfermedades neurodegenerativas, de las cuales aproximadamente el 50% sufren EA. La incidencia mundial de demencias casi se duplicará cada veinte años y alcanzará los 65,7 millones para 2030 y los 115,4 millones para 2050, según el Informe mundial sobre EA de 2011, de "Alzheimer's Disease International". El problema económico que genera la EA es de tal magnitud (por valor de 604.000 millones de dólares) que puede hacer cambiar la concepción que tenemos hoy en día de la sanidad si no se encuentran recursos terapéuticos que permitan limitar el progreso de la enfermedad.

La etiología de la enfermedad se desconoce completamente, aunque las últimas investigaciones la relacionan con un origen multifactorial en el que influye tanto la predisposición genética como los factores ambientales, que influyen acelerando o retrasando el avance de la enfermedad. El periodo evolutivo varía en función de un diagnóstico precoz y por consiguiente inicio

del tratamiento farmacológico, pero oscila entre los 2 o 3 años en casos graves hasta bastantes años de evolución. En España, según datos de 2010, la duración media del paciente es de 12 años a partir del diagnóstico definitivo.

Desde el punto bioquímico, la EA se caracteriza, por un lado, por la aparición de placas seniles extracelulares formadas por depósitos anómalos del péptido β -amiloide (β AA). Por otra parte, se presentan ovillos neurofibrilares intracelulares (ONF) a partir de la hiperfosforilación de la proteína tau (τ) (36). Ambas formaciones peptídicas se relacionan con acciones neurodegenerativas que se manifiestan con gran pérdida neuronal y sináptica en las zonas cognitivas clave (37). Otra de las consecuencias de este acumulo proteico es la inducción de un entorno citotóxico que potencia los procesos neurodegenerativos agudos y crónicos (38).

Desde el punto de vista neurofisiológico, la EA se caracteriza por una deficiente transmisión colinérgica a nivel central, debido al déficit del neurotransmisor acetilcolina (ACh). Esto se debe a la afectación específica de las neuronas de la vía colinérgica por estos depósitos proteicos. Dichos niveles de ACh están regulados principalmente por la enzima acetilcolinesterasa, por lo que el diseño de fármacos potenciales puede ir encaminado hacia la inhibición o el bloqueo de la actividad de este enzima.

La función primordial de acetilcolinesterasa (AChE) (EC 3.1.1.7) es la hidrólisis del neurotransmisor de acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas. La reacción de hidrólisis se origina por un ataque nucleófilo al grupo carbonilo, seguido por la acilación de la enzima y liberación del grupo colina, para finalmente hidrolizarse la enzima acilada dando lugar a ácido acético y regenerándose la enzima de nuevo. Se trata de un mecanismo de acción tipo de las hidrolasas.

La estructura tridimensional de AChE de *Torpedo californica*, determinada por rayos-X con una resolución de 2,8 Å, ha mostrado que el centro activo de la enzima se encuentra en el fondo de una estrecha y larga "garganta catalítica" (de unos 20 Å) (39)..

5. USOS MÉDICOS DE LOS CANNABINOIDES

El uso de los cannabinoides en medicina legal está limitado por sus efectos psicoactivos, entre los que se incluyen los de tipo afectivo (euforia), somático (somnolencia, descoordinación motora), sensorial (alteraciones en la percepción temporal y espacial, desorientación) y cognitivo (lapsos de memoria, confusión).

Aunque dichos efectos secundarios están dentro de los márgenes aceptados para otros medicamentos, pueden tener en casos concretos una vertiente positiva (relajación, conciliación del sueño, buen humor) y tienden a desaparecer tras su administración prolongada (proceso que se conoce como tolerancia), está claro que al menos para determinados pacientes y patologías sería deseable diseñar cannabinoides que carecieran de acciones psicotrópicas (40).

El sistema cannabinoido puede ser utilizado en la práctica para proteger las células neuronales (acción neuroprotectora) en diferentes enfermedades que causan un daño crónico o agudo, entre las que podemos citar las enfermedades degenerativas neurológicas (esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington y enfermedad de Alzheimer); así como en el tratamiento del dolor, de la dependencia a opioides, del glaucoma y del cáncer (sobre todo tumores neurológicos). Respecto a esta última enfermedad, recientemente se ha demostrado que la administración de cannabinoides es capaz de detener el avance de las células tumorales en algunos tipos de cáncer como el cerebral o el de mama, actuando además selectivamente sobre las células malignas, sin dañar a las sanas. La proteína JunD es la responsable de la sucesión de respuestas biológicas que culminan en la inhibición de las células tumorales. Se trata de una molécula que actúa como factor de transcripción, es decir, sirve como “interruptor” biológico que regula la expresión de otros genes y que, en este caso, se activa ante la administración de cannabinoides (41).

A pesar de los prometedores usos de los cannabinoides, la mayoría de las pruebas clínicas sobre su uso son anecdóticas y los ensayos clínicos disponibles hasta el momento presentan importantes limitaciones metodológicas (42-43), por lo que sería necesario poner en marcha nuevas investigaciones que permitirán conocer mejor los mecanismos básicos y desarrollar alternativas farmacológicas con efectos más específicos (44).

Como hemos apuntado anteriormente, las indicaciones más prometedoras del uso de estos compuestos están referidas al tratamiento del dolor y otras enfermedades neurodegenerativas. Los cannabinoides disminuyen la reactividad al dolor, tanto en modelos animales de dolor agudo como de dolor crónico, neuropático e inflamatorio. El cannabinoido más estudiado ha sido el THC administrado por vía oral, intravenosa o directamente al cerebro y en la médula espinal en ratas. Otros cannabinoides más hidrosolubles que el THC, como el O-1057 y el ácido ajulémico o CT-3, algunos agonistas cannabinoides sintéticos y ciertos endocannabinoides también han mostrado estos efectos (45-47). En la analgesia experimental inducida por THC habría un componente supraespinal no relacionado con los péptidos opioides y un componente espinal en el que están implicados tanto el receptor CB1 como el receptor opioide κ y su ligando endógeno, la dimorfina (48). En ensayos con animales se ha visto que los cannabinoides y los opioides tienen una acción sinérgica en el control del dolor. Cuando se administran dosis bajas de cannabinoides con dosis subterapéuticas de morfina, se produce una importante potenciación del efecto antinociceptivo (49).

Respecto a la neurodegeneración, los efectos tóxicos generados por la sobreactivación de los receptores de glutamato, es un proceso que influye en los mecanismos de muerte celular en la neurodegeneración aguda y crónica (50) por lo que su estudio resulta de gran importancia para evaluar las propiedades neuroprotectoras de los

cannabinoides naturales, modificados y sintéticos. Como ejemplos podemos señalar, a) el cannabinoido HU-211 que ejerce un efecto protector para neuronas al ser expuestas al efecto de glutamato (51); b) el endocannabinoido palmitoiletanolamida que incrementa la supervivencia neuronal para células granulares del cerebelo en modelos de muerte celular inducida por glutamato (52); d) el derivado WIN 55212-2 ejerce un efecto protector en neuronas del hipocampo en condiciones de apoptosis (53); d) y el compuesto natural Δ9-THC que protege a las neuronas de la médula espinal contra daño neuronal por excitotoxicidad vía actuación CB1 (54). Además, estudios in vivo revelan que el Δ9-THC (55) y la anandamida (56) protegen el cerebro de ratas neonatales contra excitotoxicidad inducida por ouabaina. El HU-210 también ejerce efecto protector contra daño neuronal inducido por amino hidroxi-oxazoles en la zona cortical.

La isquemia cerebral, en términos generales, puede comprenderse como una reducción crítica del flujo de sangre, glucosa y oxígeno. Se ha demostrado que el cannabinoido sintético agonista WIN 55212-2 (57) y el endocannabinoido anandamida ejercen un significativo efecto protector para neuronas corticales en condiciones de hipoxia y ausencia de glucosa (58). Asimismo, el derivado HU-211 suministrado 60 min después de producir isquemia protege eficazmente en condiciones de oclusión e isquemia focal permanente (59). Por otra parte el cannabinoido sintético agonista BAY 38-7271 mostró una eficaz capacidad protectora en caso de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media al ser administrado durante 4 h (vía intravenosa) (60). La participación del sistema canabinoide en el tratamiento de traumas cerebrales se fundamenta en el incremento de los niveles de anandamida observados en la corteza cerebral en neonatos de ratas después de traumas craneales (61). El derivado HU-211 es efectivo en la recuperación motora, memoria, reducción del edema cerebral y reorganización estructural de la barrera hematoencefálica (BHE) después de severos traumas craneales en ratas. Este mecanismo protector se basa en la disminución de los niveles de Ca^{2+} y reducción de los niveles de TNF-α (62). Se ha reportado que el endocannabinoido 2-AG, administrado de manera exógena después de 1 hora del trauma, reduce las dimensiones de la zona isquémica y la recuperación neurológica (47).

El análogo BAY 38-7271 reduce en un 70 % el daño neuronal al ser administrado en forma de infusión intravenosa y la recuperación alcanza el 59 % (60).

En modelos animales de enfermedades neurológicas autoinmunitarias como la esclerosis múltiple, tanto el THC como algunos cannabinoides sintéticos y endógenos, han mostrado efectos antiespástico y sobre el control del temblor. También se ha observado algún efecto beneficioso que impide la progresión de la enfermedad como la remielinización y la reducción de la actividad inflamatoria de la médula espinal. Asimismo han mostrado efectos beneficiosos sobre la hiperreactividad de la vejiga urinaria en estudios experimentales in vivo (62). Aunque

el mecanismo de acción antiespástico del cannabis y sus derivados no se conoce con exactitud, y aun no se ha descrito el papel de los receptores CB1 y CB2 en la producción de estos efectos beneficiosos ni su relación con la liberación de neurotransmisores, se ha hipotetizado que el mecanismo antiespástico podría estar relacionado con un aumento del tono gabaérgico en la sustancia nigra como se ha observado en modelos animales de enfermedad de Parkinson (63). Estudios *in vivo* con modelos animales de esclerosis I/II y el Ministerio de Defensa de USA ha comenzado su evaluación contra agentes neuroparalizantes. múltiple demostraron la eficacia del Δ8-THC y del Δ9-THC incrementando la capacidad de supervivencia neuronal en esta enfermedad (49). En otra enfermedad, la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) el cannabinoide HU-211 ejercía un efecto reductor en la cascada inflamatoria. Todos estos efectos parecen estar mediados por receptores CB1 (64). Cabe destacar también al ácido ajulémico, un cannabinoide sintético y análogo metabólico del THC, que además de no generar efectos psicoactivos muestra actividad analgésica y antiinflamatoria. Su administración intravenosa inhibe la espasticidad en modelos de esclerosis múltiple en ratones, por lo que actualmente se encuentra en fase clínica de investigación.

Los cannabinoides podrían también emplearse para el tratamiento terapéutico de desórdenes neuromusculares de la enfermedad de Parkinson, ya que se ha demostrado que el sistema cannabinoide inhibe la transmisión glutamatérgica en la zona del estriatum, así como reduce la transmisión dopaminérgica (65).

La patogénesis de la enfermedad de Huntington caracterizada por una selectiva pérdida de neuronas GABA-érgicas en el estriatum que genera el típico desorden motor también ha involucrado al sistema canabinoide. Así pues en modelos animales de dicha enfermedad, se ha observado un decrecimiento en el número de receptores cannabinoides así como significativas variaciones en los niveles de endocannabinoides en el estriatum (66). Las primeras evidencias datan de 1993 cuando se observó para esta enfermedad una masiva pérdida de receptores CB1 en la sustancia nigra parsreticulada, lo cual sugirió que los cannabinoides desempeñan una función importante en la progresión de la afección. Posteriormente, se obtuvieron resultados contradictorios en 2 modelos animales de neurodegeneración causados por administración de malonato y ácido-3-nitropropiónico respectivamente, que involucran mecanismos bioquímicos diferentes; el primero, actúa sobre la expresión de caspasas-3, y por lo tanto, induce apoptosis, mientras que el ácido-3-nitropropiónico involucra a la calpaína y la muerte celular se produce vía necrosis. El THC presentó efectos neuroprotectores sólo en el segundo modelo animal empleado (67). En la Tabla I se presenta un resumen sobre los usos de los derivados de cannabis (68).

En relación con el efecto inmunosupresor, se ha propuesto que los cannabinoides podrían ofrecer una

alternativa terapéutica en los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Experimentos con cultivos celulares y en ratones han demostrado que el efecto inmunosupresor del THC podría deberse en parte a la inducción de apoptosis sobre las células inmunitarias, sin embargo, el mecanismo exacto por el que el THC induce la inmunosupresión sigue sin estar claro. McKallip *et al.* hipotetizaron que la exposición al THC lleva a la inducción de la apoptosis en las poblaciones de linfocitos (69).

Un grupo de investigación español dirigido por María de Ceballos del Instituto Cajal de Madrid perteneciente al CSIC ha aportado muchos datos relevantes en la relación entre enfermedad de Alzheimer y el sistema cannabinoide. Recientemente han demostrado que análogos sintéticos de los cannabinoides reducen la inflamación cerebral y previenen el deterioro mental en los enfermos de Alzheimer (70). Su hipótesis era interferir con la marcada activación microglial que existe en la EA que podría estar mediada por el β-amiloide (βA). Además ya existían distintas evidencias de que los cannabinoides eran neuroprotectores frente a daño cerebral agudo como ya hemos comentado anteriormente (isquemia, excitotoxicidad o trauma cerebral). Al comienzo de su trabajo se sabía muy poco sobre la localización, expresión y características de los receptores para cannabinoides en la EA. Este grupo encontró que en la enfermedad neurológica, los receptores CB1 y el CB2 se hallaban en las placas de βA (71) asociado a marcadores de activación microglial y en algunas neuronas supervivientes. Además, la expresión del receptor CB1 se encontraba disminuida en la EA, y aún más su función, posiblemente debido al aumento en la nitración de los receptores cannabinoides como se observó respecto a los controles sanos. Como modelo *in vivo* de la EA utilizaron ratas a las que se les inyectó por vía intracerebral βA durante una semana. Estos animales mostraron una marcada activación microglial al acabar el tratamiento y fueron incapaces de aprender una tarea de navegación espacial a los dos meses de comenzarlo. Cuando los animales recibieron el cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN), junto con el βA, no presentaron activación microglial y aprendieron la tarea como los animales control. Además el WIN previno la pérdida de marcadores neuronales inducida por el tratamiento con βA. Para demostrar la implicación de la microglía en los efectos observados emplearon cultivos primarios. Otro cannabinoide, el HU 210 previno la activación inducida por βA de las células de la microglía en cultivo, observándose cambios morfológicos, un aumento de la actividad mitocondrial (en ausencia de proliferación) y un aumento de la liberación exacerbada del factor de necrosis tumoral (TNF-α). Lo interesante es que han podido reproducir ese último efecto con el WIN, que carece de efectos antioxidantes, y con el JWH-133, agonista CB2 selectivo. Los cannabinoides fueron incapaces de prevenir la toxicidad directa de altas concentraciones de βA sobre neuronas. En cambio sí fueron capaces de impedir la neurodegeneración que ocurre al exponer la microglía activada por

concentraciones menores de β A que no eran neurotóxicas *per se* en co-cultivos neurona/microglía. Además demostraron que compuestos que activan selectivamente el receptor CB2 carecen de efectos psicoactivos y además son capaces de disminuir la activación microglial y la neurodegeneración que le acompaña (72). Por todo ello se puede concluir que las alteraciones en receptores para cannabinoides son importantes en la patología de la EA y que los cannabinoides, que combinan efectos antiinflamatorios y neuroprotectores, pueden sentar las bases para nuevas estrategias terapéuticas para la enfermedad.

Las principales entidades en las que se ha estudiado, con ensayos controlados, la utilidad de los Cannabinoides para paliar el dolor son: - La esclerosis múltiple comentada en el apartado 3.

- La avulsión del plexo braquial,
- El dolor en enfermos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y,
- Dolores neuropáticos de orígenes diversos resistentes

Tabla 1. Usos terapéuticos del cannabis y derivados. Modificado de Cadime, 2002) (76).

| DOLOR | Algunos estudios muestran una eficacia del THC similar a la codeína |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Traumatismo encefálico | El dexabinol ha resultado favorable para disminuir la presión intracranal en pacientes con trauma e isquemia cerebral, en estudios clínicos. |
| Glaucoma | Se ha observado que el uso del cannabis inhalado reduce la presión intraocular un 45 %. |
| Antineoplásico | Hay datos que muestran el potencial de los cannabinoides para inhibir el crecimiento de células tumorales en cultivo, así como en modelos animales. |
| Síndrome de Tourette | La utilización de cannabis inhalado resulta en una disminución de los tics motores y vocales. Este efecto también se observó con THC. |
| Esclerosis múltiple y espasticidad muscular | En estudios controlados con THC, nabilona y cannabis inhalado se han observado mejorías en cuanto a la espasticidad y temblor |
| Enfermedad de Parkinson y alteraciones del movimiento | El cannabidiol fue moderadamente eficaz para controlar las alteraciones del movimiento distónico. El cannabis fue poco eficaz en el temblor causado por el Parkinson |
| Emesis asociada a quimioterapia | El Dronabinol (EEUU) y nabilona están autorizados como terapia auxiliar |

6. ADICCIÓN Y RIESGO ASOCIADO A ESTOS FÁRMACOS

La drogadicción es una enfermedad psiquiátrica que se caracteriza por el consumo abusivo de una sustancia con el fin de obtener una sensación de bienestar y/o prevenir las consecuencias negativas de su abstinencia, y que conlleva una búsqueda compulsiva de la droga, una pérdida de control en el consumo a pesar de las consecuencias negativas del mismo y recaídas sucesivas incluso tras largos períodos de abstinencia (77).

Se estima que entre un 7-10% de la población mundial podrían ser consumidores regulares de cannabis, la mayoría de ellos en regiones donde su uso es ilegal. La droga ilícita más consumida en la Unión, Aproximadamente el 16% de la población de la Unión Europea de edades comprendidas entre los 15 y los 64 años habrían consumido cannabis alguna vez en su vida, España es uno de los países líderes en este consumo,

a otros tratamientos referentes y mala respuesta a los tratamientos tradicionales al uso que tienen en común un curso crónico como las mencionadas anteriormente. En este sentido indicar que el cannabis puede minimizar los efectos de una migraña y otros de origen no especificado. En todos los casos los cannabinoides utilizados: extractos naturales (73) (Wade y cols., 2003), Nabilona (74) o un cannabinoid sintético CT3 (75) han mostrado efecto analgésico significativamente superior a placebo y aunque, como en los casos anteriores, su eficacia analgésica no es alta, no se debe olvidar que se trata de pacientes en los que otros tratamientos han fracasado. No obstante, para el tratamiento del dolor neuropático de curso crónico, en relación a la utilidad de los Cannabinoides es interesante analizar:

- cuáles son los compuestos que se utilizan,
- en qué patologías se ha demostrado fehacientemente su utilidad, y
- cuál es el riesgo que puede asociarse al consumo de estos fármacos.

Tabla 1. Usos terapéuticos del cannabis y derivados. Modificado de Cadime, 2002) (76).

pudiendo estimar que el consumo de cannabis ha aumentado en nuestro país en un 50% en la población de entre 15 a 64 años.

La administración crónica de cannabinoides induce neuroadaptaciones en el circuito de recompensa que son idénticas a las inducidas por las principales drogas de abuso y que se pueden poner de manifiesto mediante el cese de la administración de estos compuestos.

El sistema endocannabinoide participa en las propiedades adictivas de las principales drogas de abuso a través de, al menos, tres mecanismos complementarios. En primer lugar, este sistema está involucrado directamente en las propiedades reforzantes primarias de los cannabinoides, la nicotina, el alcohol y los opioides a través de los efectos de dichas drogas sobre la transmisión mesolímbica dopaminérgica (78-80).

En segundo lugar, el sistema cannabinoide participa en la motivación por la búsqueda de la droga por un

mecanismo independiente de la dopamina, como se ha demostrado para los psicoestimulantes y los opioides.

Finalmente, este sistema está implicado en la recaída a la conducta adictiva asociada a los estímulos ambientales y al nuevo contacto con la droga, actuando sobre la plasticidad sináptica que subyace a los procesos de memoria.

Los antagonistas CB1 podrían representar una nueva generación de compuestos para tratar un amplio rango de procesos adictivos.

La posible aplicación de antagonistas CB1 para el tratamiento de la adicción a otras drogas requiere ser confirmada con nuevos ensayos clínicos que esperamos puedan ser desarrollados en un futuro próximo.

Es inevitable, que el cannabis y sus derivados se comparan con otras drogas de abuso y de ahí que los usos no médicos del cannabis provocaran un alejamiento de su utilización, sobre todo en los inicios del siglo XX, considerándose como drogas de abuso. Esta actitud, que se ha afianzado en algunos profesionales sanitarios, solo podrá cambiarse aportando pruebas convincentes de que la relación riesgo-beneficio está a favor de la utilización de los derivados de cannabis como medicamento. Por ejemplo, en el caso de la diacetilmorfina (diamorfina) existen pruebas evidentes del riesgo de adicción y aún así se comercializa como fármaco en el Reino Unido.

En el debate que existe actualmente sobre el cannabis, se ha hablado mucho de la legalización y de su uso lúdico y recreativo. Aprovechar el debate sobre el uso terapéutico para reforzar otros intereses ligados a la legalización y para extender el mensaje de que el cannabis es inofensivo es una falta de responsabilidad importante.

Aquí hay dos debates totalmente distintos, y no es justo aprovechar la demanda y necesidades de muchos pacientes respecto de la sustancia para defender su uso recreativo, el cual requiere un abordaje y un debate totalmente diferente.

7. SISTEMA CANNABINOIDE E INTERACCIÓN CON OTRAS DROGAS

Existe una relación clara, manifestada en numerosos estudios acerca de la existencia de interacciones de carácter bidireccional entre los sistemas cannabinoide y opioide. Además, ambos sistemas participan en los circuitos neuronales responsables de la mediación de las propiedades adictivas de las principales drogas de abuso. Los receptores cannabinoideos CB1 desempeñan un importante papel en la regulación de las propiedades reforzantes de los opioides. El rimonabant reduce de forma importante la autoadministración de heroína bajo un protocolo en el que las respuestas requeridas para conseguir una infusión de la droga aumentan progresivamente durante la sesión de autoadministración (razón progresiva), mientras que el efecto resulta más modesto en un protocolo de razón fija 5 (en el que se requieren 5 respuestas para obtener una inyección de la droga) y casi desaparece en un protocolo de razón fija 1 (una infusión de droga obtenida por cada respuesta en el manipulando activo) (81). El rimonabant también inhibe el

comportamiento de búsqueda de heroína tras un largo periodo de abstinencia, mientras que el agonista cannabinoide HU-210 restablece esta respuesta de búsqueda (82-83). A pesar de que los efectos reforzantes de los cannabinoides y opioides se basan en su efecto facilitador de la transmisión dopamínérgetica mesolímbica, el rimonabant no modifica el incremento de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducido por la heroína (84).

Diversos estudios también demuestran la existencia de dependencia cruzada entre compuestos de naturaleza cannabinoide y opioide. Así, el rimonabant induce signos somáticos de abstinencia en animales dependientes de la morfina (85). De acuerdo con estos datos, el síndrome de abstinencia a la morfina es menor en ratones que carecen de los receptores CB1 (86). El síndrome de abstinencia física tanto a los opioides como a los cannabinoides se asocia con cambios compensatorios en la vía del AMPc, aunque las estructuras cerebrales involucradas parecen ser diferentes según la droga de que se trate (87). Cambios en la actividad de la vía de las MAP quinasas también se han relacionado con el desarrollo de la dependencia física a ambas drogas (88). Por consiguiente, el sistema endocannabinoide parece ser crucial tanto para la mediación de las propiedades reforzantes como para el desarrollo de la dependencia física de opioides. La existencia de interacciones bidireccionales entre los sistemas cannabinoide y opioide proporciona una base neurobiológica para esta función del sistema endocannabinoide. Podemos concluir por tanto que existe una intensa interacción entre la transmisión endocannabinoide y la opiodérgica (89) incluso se han demostrado efectos sinérgicos, lo que ha llevado a sugerir que los cannabinoides podrían ser utilizados para reducir las dosis de morfina en tratamientos de dolor crónico, sin merma del efecto analgésico pero con una notable reducción del potencial adictivo del opiáceo.

8. FÁRMACOS EN EL MERCADO

La administración del cannabis por vía oral, con fines lúdicos implica la administración de calor que descarboxila los ácidos cannabinoides. La administración a través de las vías respiratorias es muy eficaz para que los cannabinoides lleguen a la circulación sistémica con gran rapidez, lo que ha hecho centrar la investigación en las formulaciones no fumadas para las vías respiratorias.

Sativex es una mezcla químicamente pura del cannabidiol y del THC de origen vegetal, formulado como un spray bucal y aprobado para el alivio del dolor asociado al cáncer, y también está indicado como tratamiento para la mejoría de los síntomas en pacientes adultos con espasticidad moderada o grave debida a la esclerosis múltiple (EM) que no han respondido de forma adecuada a otros medicamentos antiespásticos y que han mostrado una mejoría clínicamente significativa de los síntomas relacionados con la espasticidad durante un período inicial de prueba del tratamiento. En la actualidad, diversos países, entre ellos España, ya han aprobado el uso de un extracto del cannabis, denominado Sativex, para la

esclerosis múltiple.

El dronabinol (Marinol[®]) es la forma sintética del Δ9-THC, aprobado por la FDA en 1986 para el tratamiento de las náuseas y vómitos producidos por quimioterapia y síndrome de anorexia-caquexia (delgadez extrema y falta de apetito) asociado a SIDA. Está comercializado en EE.UU, pero no en Europa. Es útil en el control de determinados tipos de dolor, ya que potencia el efecto analgésico de los derivados de la morfina. También ha demostrado efectos beneficiosos sobre ciertos síntomas (dolor, rigidez, problemas urinarios) de la esclerosis múltiple. Existen casos anecdóticos sobre su posible utilidad en enfermedad de Alzheimer, picor por enfermedades hepáticas, trastorno obsesivo compulsivo...

La nabilona (Cesamet[®]) es un análogo sintético del THC. Está comercializado en EE.UU, Canadá, México y Reino Unido con las mismas indicaciones que dronabinol (náuseas producidas por quimioterapia y anorexia por SIDA). También existen ensayos clínicos que demuestran su eficacia en el manejo del dolor en cáncer avanzado y algunos síntomas de la enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple.

El rimonabant (Acomplia[®]) es un antagonista ("neutralizador") de los receptores CB-1. El fármaco fue aprobado en la Unión Europea en el 2006 para el tratamiento de la obesidad en pacientes con problemas de diabetes o colesterol, contando también con estudios favorables como fármaco para ayudar a dejar de fumar. Sin embargo, en octubre de 2008 se suspendió su comercialización, ante el elevado número de efectos adversos de tipo psiquiátrico (incluyendo suicidios) registrados.

El spray de tetrahidrocannabinol/cannabidiol (THC/CBD) (Sativex[®]) permite la administración sublingual de cantidades fijas de estos cannabinoides, extraídos directamente de la planta. El fármaco está aprobado en Canadá, para el tratamiento del dolor producido por esclerosis múltiple y cáncer. En el momento actual se están llevando a cabo ensayos clínicos con este fármaco para comprobar su eficacia en distintas

enfermedades (náuseas y vómitos por cáncer, dolor por lesión en la médula, rigidez por esclerosis múltiple, artritis reumatoide...). Algunos de estos estudios se están llevando a cabo en Cataluña, con la colaboración de instituciones como el Colegio de Médicos de Barcelona, el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas y el Departamento de Salud de la Generalitat.

Conviene hacer algunas consideraciones sobre estos fármacos. En primer lugar, señalar que, como cualquier otro, tienen sus propias indicaciones, contraindicaciones, efectos adversos, interacciones farmacológicas. Los cannabinoides se absorben mal por vía oral, lo que lleva a que, en principio, fórmulas como el spray de administración sublingual sean más adecuadas y produzcan mayor efecto terapéutico y menos efectos adversos. Hay que tener en cuenta que el cannabis produce un estado modificado de conciencia, que puede ser agradable para algunas personas pero no tanto para otras.

Además pueden aparecer otro tipo de efectos adversos (irritación en la zona de administración, cuadros de mareo, hipotensión...). Señalar también que, hasta el momento este tipo de medicaciones no han demostrado que varíen el curso natural de ninguna enfermedad y se trata de fármacos destinados a aliviar síntomas (lo cual es, en bastantes ocasiones, el objetivo principal de las intervenciones de los médicos). En este sentido, los fármacos derivados del cannabis deben considerarse como una opción de tratamiento más, pero existen otras familias de fármacos que, dependiendo del caso y el paciente, pueden ser más o menos adecuadas.

9. DISEÑO TÉORICO DE FÁRMACOS DE POSIBLE UTILIZACIÓN EN EL TRATAMIENTO PALIATIVO DEL ALZHEIMER Y DOLOR CRÓNICO MEDIANTE DOCKING MOLECULAR

El THC y el cannabidiol (CBN) muestran una similitud estructural con el cloruro de donepezilo, utilizado actualmente en el tratamiento de los pacientes con Alzheimer en sus primeras fases, tal y como se muestra en las Figuras 2 y 3.

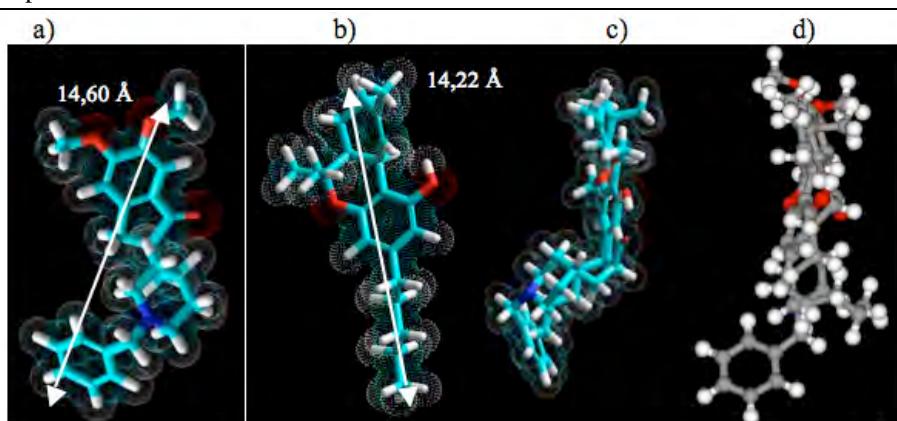


Figura 2. Comparación de distancias y geometrías del donepezilo (a) y THC (b). Geometrías superpuestas (c). Geometrías resultantes del cálculo de Docking. (d) Como puede observarse la distancias son muy similares 14,60 Å para el donepezilo (a) y 14,22 Å para el THC (b) y la superposición forzada de las estructuras utilizando la representación de Van der Waals proporciona una geometría muy similar para ambos compuestos (c).

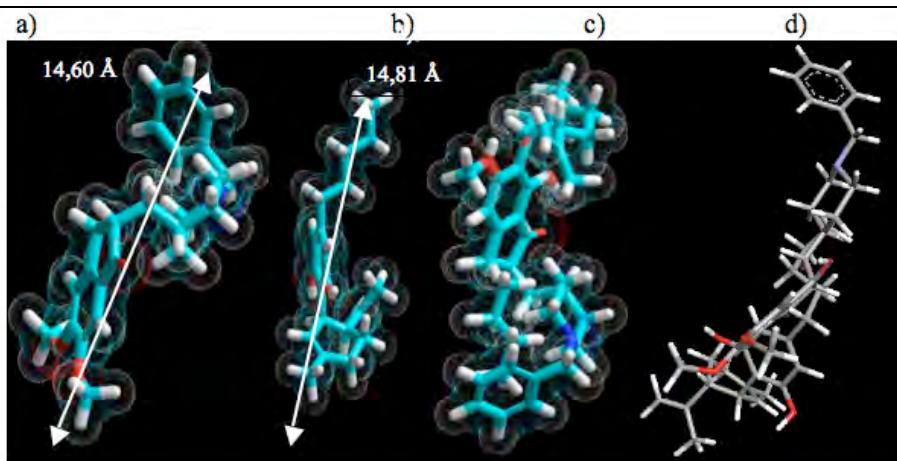


Figura 3. Comparación de distancia y geometrías del donepezilo (a) y CBD (b). Geometrías superpuestas (c). Geometrías resultantes del Docking. (d).

En base a esta idea, estos compuestos y otros cannabinoides fueron acoplados “docked” en la estructura de la AChE de *Torpedo californica* (PDB ID código 1EVE) usando el programa Argus Lab (Marck). A modo de ejemplo se compara el acoplamiento del THC y el donepezilo en el centro activo de la enzima acetilcolinesterasa. (Fig 4). El motor de acoplamiento de ArgusDock implementado en Argus Lab 4.0 se aproxima a un método de búsqueda exhaustiva, que posee similitudes con DOCK y Glide. El acoplamiento flexible de ligandos es posible debido a que el ligando se describe como un árbol de torsión y se construyen redes que se superponen en el sitio de unión. El nodo del ligando raíz (grupo de átomos unidos que no pueden girar) se coloca en un punto de búsqueda en el sitio de unión y se crea un conjunto de rotaciones diversas y enérgicamente favorables. Para cada una de las rotaciones, se construyen torsiones en la amplitud de primer orden- y para aquellos que pasan la búsqueda torsional se guardan. La conformación de más baja de energía se retiene y el conjunto final de conformaciones sometidas a minimización, se reagrupan y clasifican.

Se llevaron a cabo 150 ciclos de cálculo (33 millones de evaluaciones de energía). El tamaño de la caja tenía las dimensiones de 29,30 Å, 30,02 Å, 27,77 Å cuando se utilizó el donepezilo como sustrato en la estructura 1EVE mientras que el tamaño de la caja fue 29,54 Å, 27,33 Å, 28,73 Å cuando se acopló el mismo sustrato en 1B41. La resolución fue de 0.400 Å. Esta caja fue diseñada para incluir regiones del centro catalítico de la denominada garganta “gorge” y del centro periférico aniónico.

Esta configuración es la estándar de acoplamiento que utiliza el programa Argus Lab para los cálculos, una vez que se ha definido el sitio de unión. El programa se implementó en un ordenador Mac Pro de 8 núcleos a 2,86 Hz con 16 GB de RAM DDR2 a 800 MHz, disco duro de 1 TB y procesador gráfico NVIDIA Quadro Fx 5600, 1,5 GB y monitor de 30 pulgadas.

Como paso previo a los experimentos de Docking se llevó a cabo una optimización de la geometría de los ligandos cannabinoides empleados con el programa

Hyperchem 8.0. utilizando los algoritmos minimización Steepest descent y Fletcher-Reeves siendo el criterio de convergencia utilizado de 0,01 Kcal/mol lo que en la práctica quiere decir que se realizan cálculos iterativos hasta que la energía y la estructura no cambian de un cálculo al siguiente y las primeras derivadas caen a cero.

En los experimentos realizados con la estructura de AChE de *Torpedo californica* (PDB ID código 1EVE) que está complejada con donepezilo, este fue suprimido para calcular la energía de interacción de este compuesto y comparar posteriormente con otros sustratos. El donepezilo se mantiene orientado hacia el Trp84 y Trp 279, asimismo se muestra que la energía de interacción de THC con la AChE considerando también el donepezilo y fue de -9,23 Kcal/mol.

Si consideremos ambos sustratos por separado, la energía de interacción en este caso corresponde a un valor de -10,55 Kcal/mol, siendo este valor muy semejante al que tenía con el donepezilo sólo que fue de -10,60 Kcal/mol. El THC por tanto, se une a la AChE de *Torpedo californica* con una afinidad comparable a otros ligandos que se unen al PAS descritos en la bibliografía (90).

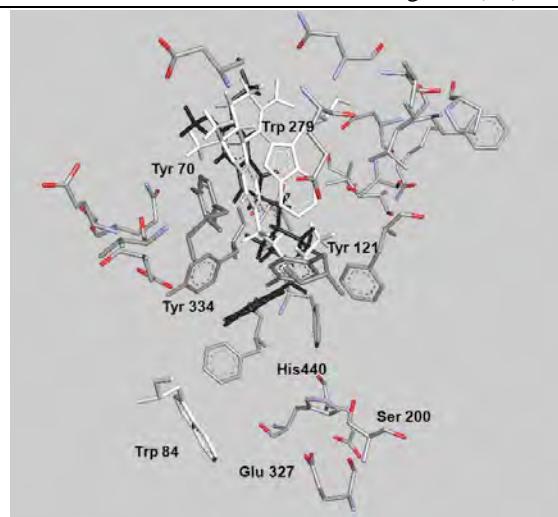


Figura 4. Interacción de donepecilo y dronabinol en la acetil colinesterasa de *Torpedo californica* (Código: 1eve.pdb).

Podemos comprobar que ambos sustratos compiten por el mismo sitio (Figura 4). En la Figura 5(a), se muestra al igual que ocurría con el THC, que ambos inhibidores (donepezilo y CBD) compiten por el hueco, y además existe una interacción por enlaces de hidrógeno entre la Tyr 70 y el OH del CBD (línea punteada) así como con el otro OH y Asp 276. En la Figura 5b se muestra la energía de interacción entre el CBD y la AChE que es del orden de -8,59 Kcal/mol, siendo este valor algo menor al que se obtenía con el THC. Este cálculo fue realizado en presencia del donepezilo, ya que la eliminación de este no varió sustancialmente los resultados de afinidad.

En base a los resultados anteriormente expuestos, se realizaron modificaciones estructurales en la molécula de THC y aplicando cálculos de mecánica molecular orbitales moleculares y Docking molecular se obtuvieron los valores de Log P, necesario para saber que compuestos podrán atravesar la barrera hematoencefálica así como los valores de energía obtenidos mediante Docking molecular. Estos resultados nos darán un criterio para evaluar los posibles candidatos a inhibir la acetil colinesterasa.

En una siguiente fase, se evaluarán también estos candidatos para el tratamiento del dolor crónico. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

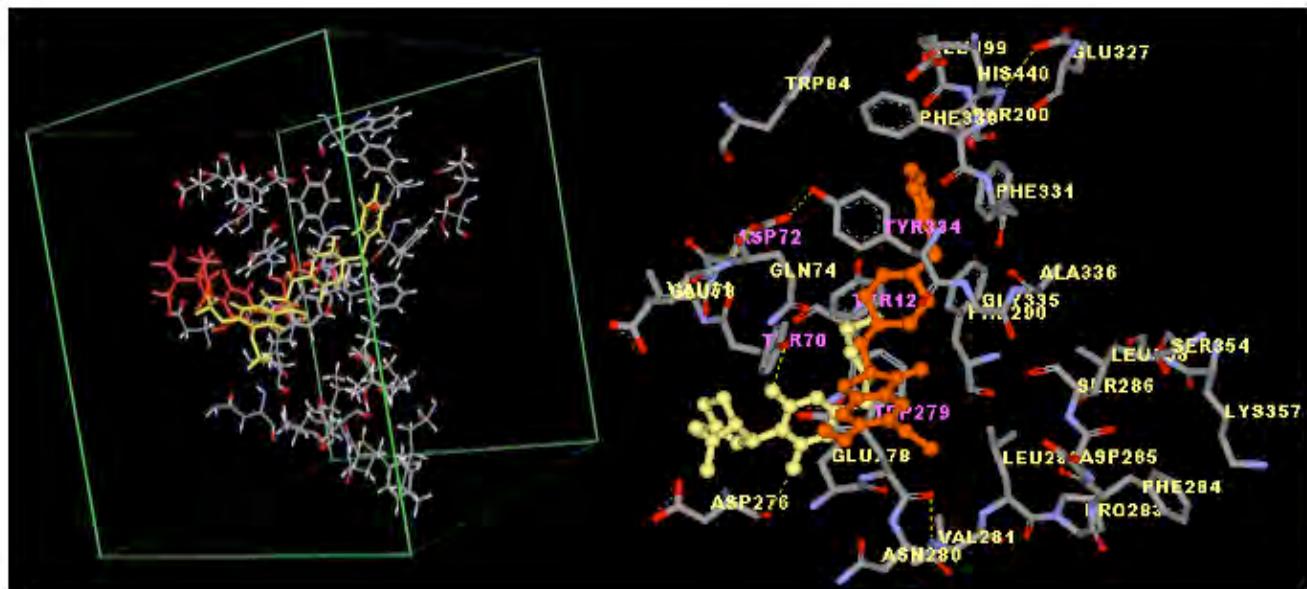


Figura 5 (a) Representación de la caja mostrando la selección de aminoácidos y el inhibidor CBD (rojo) y donepezilo (amarillo). **(b)** Selección de aminoácidos con el inhibidor CBD (amarillo) y donepezilo (naranja). Cuando se realiza el Docking considerando solo el CBD la energía de interacción fue de -8,63 Kcal/mol.

Tabla 2. Análogos de cannabinoides como posibles fármacos para el tratamiento del Alzheimer y el dolor crónico.

| Análogos | Nombre | Log P | Masa(Da) | Volumen(Å ³) | Energía(kcal/mol) |
|----------|--------|-------|----------|--------------------------|-------------------|
| | DC7A5 | 5.3 | 274.46 | 916.96 | -8,06969 |
| | DC7A9 | 3.8 | 276.38 | 902.48 | -8,34005 |
| | DC7A24 | 4.25 | 292.44 | 929.54 | -8,29056 |
| | DC7A19 | 3.47 | 290.36 | 903.12 | -9,00963 |
| | DC7A13 | 3.98 | 288.39 | 917.06 | -7,63201 |
| | DC7A14 | 3.79 | 290.36 | 898.88 | -7,76098 |
| | DC7A18 | 2.84 | 276.33 | 851.90 | -7,94623 |
| | DC7A21 | 3.87 | 304.39 | 960.40 | -9,04501 |

Cannabinoid analogs in the treatment of pain

| | | | | | |
|--|---------------|------|--------|---------|-----------------|
| | DC1A5 | 6.07 | 302.46 | 999.63 | -8,20072 |
| | DC1A9 | 4.57 | 304.43 | 978.57 | -8,56947 |
| | DC1A24 | 5.01 | 320.49 | 1006.53 | -8,47706 |
| | DC1A19 | 4.24 | 318.41 | 980.69 | -9,10065 |
| | DC1A13 | 4.74 | 316.44 | 995.80 | -7,77009 |
| | DC1A18 | 3.61 | 304.39 | 936.58 | -7,98302 |
| | DC1A21 | 4.63 | 332.44 | 1035.72 | -9,18317 |
| | DC13A5 | 4.53 | 304.39 | 941.84 | -8,11023 |
| | DC13A9 | 3.04 | 306.36 | 920.71 | -8,41096 |

| | | | | | |
|--|---------|------|--------|--------|----------|
| | DC13A24 | 3.48 | 322.42 | 948.83 | -8,33066 |
| | DC13A19 | 2.70 | 320.34 | 922.32 | -9,00121 |
| | DC13A13 | 3.21 | 318.37 | 935.98 | -7,70011 |
| | DC13A14 | 3.02 | 320.34 | 917.32 | -7,81183 |
| | DC13A18 | 2.07 | 306.32 | 867.36 | -8,00662 |
| | DC13A21 | 3.10 | 334.37 | 976.93 | -9,22575 |

10. CONCLUSIONES

El sistema cannabinoides puede ser utilizado en la práctica en el tratamiento del dolor, de la dependencia a opioides, del glaucoma y del cáncer (sobre todo tumores neurológicos). También para proteger las células neuronales (acción neuroprotectora) en diferentes enfermedades que causan un daño crónico o agudo, entre las que podemos citar las enfermedades degenerativas neurológicas (esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, corea de Huntington y enfermedad de Alzheimer); No obstante, para el tratamiento del dolor neuropático de curso crónico, en relación a la utilidad de los cannabinoides es interesante analizar también, cuál es el riesgo que puede asociarse al consumo de estas sustancias. El principal problema que plantea el uso del cannabis y que limita su utilidad terapéutica es la presencia de efectos psicoactivos. Este problema puede soslayarse mediante el empleo de cannabinoides no psicoactivos como el CBD o el desarrollo de análogos que no atraviesen la barrera hematoencefálica, y de esta manera aprovechar el potencial terapéutico de los cannabinoides. Mediante el uso de técnicas computacionales, pueden desarrollarse teóricamente análogos que cumplan estos requisitos aunque finalmente deben ser sintetizados en el laboratorio

para demostrar su eficacia en ensayos *in vitro*.

11. REFERENCIAS

- Mechoulam R. The pharmacohistory of Cannabis sativa. In: Mechoulam R, Ed. Cannabinoids as therapeutic agents. Boca raton: CRC Press 1986, 27; pp. 1-19.
- Duran M, Laporte JR, Capellá D. Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoides. Med Clin (Barc) 2004;122(10): 390-8.
- Reynolds JR. Therapeutical uses and toxic effects of Cannabis Indica. Lancet 1980; 22: 637.
- ElSohly M. Chemical constituents of cannabis. In: Grotenhermen F, Russo E, Editors. Cannabis and cannabinoids. Pharmacology, toxicology, and therapeutic potential. Binghamton/New York: Haworth Press 2002; pp. 27-36.
- Olea M. León Evolución filogenética del dolor. Elementos 2002; 46: 19-23.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Pomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. Nature 1998; 394: 277-81.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. An analgesic circuit activated by cannabinoids. Nature 1998; 395: 381-3.

Cannabinoid analogs in the treatment of pain

8. Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol* 2001;63: 569-611.
9. Vega R. Opioides: neurobiología, usos médicos y adicción. *Elementos* 2005;12(60): 11-23.
10. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys Res Commun* 1995;215: 89-97.
11. Mechoulam R, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50: 83-90.
12. Hanus L, et al. 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98: 3662-5.
13. Porter AC, et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301:1020-4.
14. Huang SM, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99: 8400-5.
15. Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 1995 Feb 24;270(8): 3726-31
16. Howlett AC. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 1985;27: 429-36.
17. Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G and Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 1995;312: 637-41.
18. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felser CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International union of pharmacology, XXVII. Clasification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002;54: 161-202.
19. Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in neurobiology* 1999;58: 315-48.
20. Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nature Nsci* 2005;8: 585-9.
21. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1995;48: 443-50.
22. Howlett AC. Pharmacology of cannabinoid receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 607-34.
23. "Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) *Classification of Chronic Pain, Second Edition, International Association for the study of Pain (IASP) Task Force on Taxonomy*, edited by H. Merskey and N. Bogduk, IASP Press, Seattle, 1994.
24. Turk DC, Okifuji A. Pain terms and taxonomies. In: Loeser D, Butler SH, Chapman JJ, et al. *Bonica's management of pain* (3 ed.). Lippincott Williams & Wilkins 2001; pp. 18-25.
25. Berkow R, Beers MH. *Manual Merck de información médica*. Madrid: Océano Grupo Editorial 1999
26. Ferrer M, Ribes C. *Farmacología de la migraña*. Jaen: Formación Alcalá 2006.
27. Stovner LJ, Zwarta JA, Hagena K, Terwindt GM, Pascuale J. Epidemiology of headache in Europe. *European Journal of Neurology* 2006; 13: 333-345
28. Romero J, Lastres Becker I, de Miguel R, Berrendero F, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia: biochemical, pharmacological and therapeutic aspects. *Pharm Ther* 2002; 95: 137-52.
29. Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. Pharmacological and biochemical interactions between opioid and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 287-94.
30. Malan TP, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, et al. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 2001; 93: 239-45.
31. Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A. N-(2-hydroxyethyl)- hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1996; 300: 227-36.
32. Jhaveri MD, Sagar DR, Elmes SJR, Kendall DA, Chapman V. Cannabinoid CB2 receptor-mediated antinociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol* 2007; 36: 26-35.
33. Pertwee RG. Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 2002; 95: 165-74.
34. Arias E, Gallego-Sandín S, Villarroya M, García AG, López MG. Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315(3): 1346-53.
35. Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, Corey-Bloom J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology* 2004; 62(11): 1984-9.
36. Recuero M, Serrano E, Bullido MJ, Valdivieso F. Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *Febs Lett* 2004;570: 114-8.
37. Horiguchi T, Uryu K, Giasson BI, Ischiropoulos H, Lightfoot R, Bellmann C, Richter-Landsberg C, Lee

- VM, Trojanowski, JQ. Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am J Pathol* 2003;163(3): 1021-31.
39. Sussman JL, Harel M, Frolow F., Oefner, C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of Acetylcholinesterase from Torpedo California: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991;253: 872-9.
40. Guzman M. Cannabinoides: del laboratorio a la clínica. *Biojournal net* 2006;4: 1-6.
41. Caffarel MM, Moreno-Bueno G, Cerutti C, Palacios J, Guzmán M, Mechta Grigoriou F, Sánchez C. JunD is involved in the antiproliferative effect of 9-tetrahydrocannabinol on human breast cancer cells. *Oncogene* 2008;27: 5033-44.
42. Institute of Medicine. Marijuana and medicine [formato electrónico] 1999; 196(196) [consultado 03/06/2003]. Disponible en: <http://www.bob.nap.edu/books/0309071550/html>
43. Duran M, Laporte JR, Capellà D. Ús terapèutic del cannabis i els seus derivats. Barcelona: Informe preparado por la Fundació Institut Català de Farmacología para el Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya, 2003.
44. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodríguez de Fonseca F. The endocannabinoid system as target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21: 218-24.
45. Salim K, Schneider U, Burstein S, Hoy L, Karst M. Pain measurements and side effect profile of the novel cannabinoid ajulemic acid. *Neuropharmacology* 2005;48: 1164-71.
46. Karst M, Salim K, Burstein S, Conrad I, Hoy L, Schneider U. Analgesic effect of the synthetic cannabinoid CT-3 on chronic neuropathic pain. *JAMA* 2003; 290:1757-62.
47. Kehl LJ, Hamamoto DT, Wacnik PW, Croft DL, Norsted BD, Wilcox GL, et al. A cannabinoid agonist differentially attenuates deep tissue hyperalgesia in animal models of cancer and inflammatory muscle pain. *Pain* 2003;103: 175-86.
48. Lim G, Sung B, Ji RR, Mao J. Upregulation of spinal cannabinoid-1-receptors following nerve injury enhances the effects of Win 55, 212-2 on neuropathic pain behaviors in rats. *Pain* 2003;105: 275-83.
49. Maldonado R, Valverde O. Participation of the opioid system in cannabinoid-induced. antiception and emotional-live responses. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003;13: 401-10.
50. Yesilyurt O, Dogrul A, Gul H, Seyrek M, Kusmez O, Ozkan Y, et al. Topical cannabinoid enhances topical morphine antinociception. *Pain* 2003;105: 303-8.
51. Eshhar N, Striem S, Biegon A. HU-211, a non-psychotropic cannabinoid, rescues cortical neurones from excitatory amino acid toxicity in culture. *Neuroreport* 1993;5(3): 237-40.
52. Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, et al. The Aliamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxicity death in cerebellar granule neurons. *Proc Nat Acad (USA)* 1996;93(9): 3984-9.
53. Shen M. Cannabinoid receptor agonists protect from exitotoxicity. *Molecular Pharmacol* 1998;54: 459-62.
54. Abood ME, Rizvi G, Sallapudi N, McAllister SD. Activation of CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against exitotoxicity. *Neuroscience Lett* 2001;309(3): 97-201.
55. Van Der Stelt M, Veldhuis WB, Bar PR, Veldink GA, Vliegenthart JF, Nicolay K. Neuroprotection by Delta 9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J Neurosci* 2001;21(17): 6475-9.
56. Van Der Stelt M, Veldhuis WB, van Haften GW, Fezza F, Bisogno T, Bar PR, et al. Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J Neurosci* 2001;21(22): 8765-71.
57. Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, et al. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 1999;9(8): 2987-95.
58. Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA. Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2000;278(3): 157-60.
59. Leker RR, Shohami E, Abramsky O, Ovadia H, et al. Dexanabinol: a novel neuroprotective drug in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurol Sci* 1999;162(2): 114-9.
60. Mauler F, Mittendorf J, Horvath E, De Vry J. Characterization of the diarylether sulfonylester(-)-(R)-3-(2-hydroxymethylindanyl-4-oxy)phenyl-4,4,4-trifluoro-1-sulfonate (BAY 38-7271) as a potent cannabinoid receptor agonist with neuroprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302(1): 359-68.
61. Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Lastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, et al. Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem* 2001;78(6): 1415-27.
62. Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. Cytokine production in the brain following closed head injury after head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol* 1997;72(2): 169-77.
63. Duran M, Laporte JR, Capellà D. Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoides. *Med Clin* 2004;122(10): 390-398. Di Marzo V. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci* 1998;21: 521-8.

Cannabinoid analogs in the treatment of pain

64. Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, et al. Cannabinoids control spasticity and tremor in multiple sclerosis model. *Nature*. 2000;404(6773): 84-7.
65. Cadogan AK, Alexander SP, Boyd EA, Kendall DA. Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J Neurochem* 1997;69(3): 1131-7.
66. Lastres-Becker I, Berrendero F, Lucas JJ, Martin-Aparicio E, Yamamoto A, Ramos JA, et al. Loss of mRNA levels, binding and activation of GTP-binding proteins for 31 cannabinoid CB1 receptors in the basal ganglia of a transgenic model of Huntington's disease. *Brain Res* 2002;929(2): 236-42.
67. Wirguin I, Mechoulam R, Breuer A, Schezen E, Weidenfeld J, Brenner T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by cannabinoids. *Immunopharmacology* 1994;28(3): 209-14.
68. CADIME. Escuela Andaluza de Salud Pública. Derivados del cannabis: papel en terapéutica. *Rev Soc Esp Dolor* 2002;9: 401-4.
69. McKallip RJ, Lombard C, Martin BR, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. (9)-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302: 451-65.
70. Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzmán M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: Neuroprotectin mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 2005;25: 1904-13.
71. Haas C, Selkoe DJ. A technical KO of amyloid-B peptide. *Nature* 1998;391(6665): 339-40.
72. Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, Romero J. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 2003;23: 11136-41.
73. Wade DT, Robson P, House H, Makela P, Aram J. A preliminary controlled study to determine whether whole-plant cannabis extracts can improve intractable neurogenic symptoms. *Clinical Rehab* 2003;17(1): 21-9.
74. Pinsger M, Schimetta W, Volc D, Hiermann E, Riederer F y Pölz W. Benefits of an add-on treatment with the synthetic cannabinomimetic nabilone on patients with chronic pain – a randomized controlled trial. *Wien Klin Wochenschr* 2006;118(11-12): 327-35.
75. Karst M, Salim K, Burstein S, Conrad I, Hoy L, Schneider U. Analgesic effect of the synthetic cannabinoid CT-3 on chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290(13): 1757-62.
76. CADIME. Escuela Andaluza de Salud Pública. Derivados del cannabis: papel en terapéutica. *Rev. Soc Esp Dolor* 2002;9: 401-4.
77. Camí J, Farré M. Drug addiction. *New Eng J Med* 2003;349: 975-86.
78. Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrié P. SR141716, a central cannabinoid (CB(1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine releasing effects of bnicotine in rats. *Behav Pharmacol* 2002;13: 451-63.
79. Caillé S, Parsons LH. SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. *Eur J Neurosci* 2003;18: 3145-9.
80. Hungund BL, Szakall I, Adam A, Basavarajappa BS, Vadasz C. Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 2003;84: 698-704.
81. Solinas M, Panlilio LV, Antoniou K, Pappas LA, Goldberg SR. The cannabinoid CB1 antagonist N-piperidinyl-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methylpyrazole-3-carboxamide (SR-141716A) differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous reinforcement, fixed ratio, and progressive ratio schedules of drugself-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306: 93-102.
82. De Vries TJ, Homberg JR, Binnekade R, Raasø H, Schoffelmeer AN. Cannabinoid modulation of the reinforcing and motivational properties of heroin and heroin-associated cues in rats. *Psychopharmacology* 2003;168: 164-9.
83. Fattore L, Spano MS, Cossu G, Deiana S, Fratta W. Cannabinoid mechanism in reinstatement of heroin-seeking after a long period of abstinence in rats. *Eur J Neurosci* 2003;17: 1723-6
84. Caillé S, Parsons LH. SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. *Eur J Neurosci* 2003;18: 3145-9.
85. Navarro M, Chowen J, Rocío A Carrera M, del Arco I, Villanúa MA. CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport* 1998;9: 3397-4402.
86. Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999;283: 401-4.
87. Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 2004; 47 Suppl 1: 24-32.
88. Rubino T, Forlani G, Viganò D, Zippel R, Parolaro D. Ras/ERK signalling in cannabinoid tolerance: from behaviour to cellular aspects. *J Neurochem* 2005;93: 984-91.
89. Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. Pharmacological and

biochemical interactions between opioid and cannabinoids. Trends Pharmacol Sci 1999;20: 287-294.

90. Haviv H, Wong DM, Silman I, Sussman JL.

Bivalent Ligands Derived from Huperzine a as Acetylcholinesterase Inhibitors. Curr Top Med Chem 2007;7(4): 375-87.



The new levels of redox regulation of S-adenosylmethionine synthesis

Title in Spanish: Los nuevos niveles de regulación redox de la síntesis de S-adenosilmetionina

María Ángeles Pajares^{1,2*}

¹Departamento de Metabolismo y Señalización Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Arturo Duperier 4, 28019, Madrid. ²Grupo de Hepatología Molecular, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid.

ABSTRACT: S-adenosylmethionine is a very versatile compound known to be involved in as many reactions as ATP. Its role as methyl donor is key for the production of a large variety of molecules, as well as, for the modification of proteins and nucleic acids. Therefore, it is not surprising that impairments in the methionine cycle are found in many diseases including liver pathologies, Alzheimer or rare diseases. In most of these cases, reductions in S-adenosylmethionine concentrations correlate with the presence of oxidative stress. This fact prompted the study of a putative redox regulation of the methionine cycle that has been focused especially on methionine adenosyltransferases, the enzymes that synthesize S-adenosylmethionine. This review is intended to provide an outline of the new levels at which the redox control of these enzymes is exerted and their importance for liver pathology, a field in which we have made several key contributions.

RESUMEN: La S-adenosilmethionina es un compuesto muy versátil, conocido por participar en casi tantas reacciones como el ATP. Su papel como donante de grupos metilo es esencial para la producción de una gran variedad de moléculas, así como para la modificación de proteínas y ácidos nucleicos. Por ello, no resulta sorprendente que se hayan detectado alteraciones en el ciclo de la metionina en una gran variedad de patologías, que incluyen desde enfermedades hepáticas hasta el Alzheimer o enfermedades raras. En muchos de estos casos la reducción de los niveles de S-adenosilmethionina se acompaña de la presencia de estrés oxidativo. Este hecho ha inducido el estudio de una posible regulación redox del ciclo de la metionina, que se ha enfocado principalmente a las metionina adenosyltransferasas, que son las enzimas encargadas de la síntesis de S-adenosilmethionina. Esta revisión pretende dar una visión global de los nuevos niveles a los que se ejerce el control redox de estas enzimas y su importancia en hepatopatología, campo en el cual hemos realizado importantes aportaciones.

*Corresponding Author: mapajares@iib.uam.es

Received: October 7, 2015 Accepted: June 27, 2016

Accésit Premio Real Academia Nacional de Farmacia del Concurso Científico 2015 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 82, N° 2 (2016), pp. 231-246

Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

Nature has evolved to create several essential compounds with high versatility, so that a few molecules can be used in a large variety of reactions. Initially, this represents an evolutionary advantage reducing the number of enzymes and compounds required for life. However, this same aspect imposes a serious drawback, since alterations affecting these few processes may lead to disease. Among these versatile compounds two have been shown of special relevance for the cell, ATP and S-adenosylmethionine (SAM). This last metabolite was described for the first time in 1951 by Cantoni as an "active methionine" able to transmethylate in the absence of ATP (1). Although at that moment its exact nature was unknown, in this same paper the author indicated that SAM was a product of the reaction between ATP and methionine. Finally, in 1953 this researcher described the reaction catalyzed by the "methionine activating enzyme" and the chemical nature of SAM (2).

The number and variety of biological processes that

involve the use of SAM has increased along the years, so that nowadays the catalogue of reactions using this metabolite is as large as that of the processes utilizing ATP (3). This versatility of SAM relies in its chemical structure, which contains a quiral sulfonium group through which carbon-sulfur bonds with aminopropyl, methyl and adenosine groups are established. These groups are donated to a large variety of substrates upon nucleophilic attack of the corresponding carbon-sulfur bond (reviewed in (4,5)). Additionally, SAM can also transfer the rybosyl or amino groups in processes that have been described in bacteria or plants (3,6,7).

Methyltransferases consume the majority of the SAM produced in any organism in reactions leading to the synthesis of small molecules (i.e. neurotransmitters, phosphatidylcholine, etc.), the modification of proteins (i.e. histones) and DNA, among others. The remaining SAM is involved in the synthesis of 5'-halogenated derivatives in marine organisms (adenosine group), queuosine (rybosyl group) and other hypermodified

nucleosides (3-amino carboxypropyl group), pelargonic acid (amino group), polyamines, molecules involved in bacterial signaling and ethylene (aminopropyl group). SAM can also be used both as cofactor or substrate by SAM radical proteins, which catalyze probably the last set of reactions involving this compound that has been identified to date (3,8). In mammals, transmethylations consume approximately 95% of the SAM produced and the rest is used for SAM decarboxylation, being decarboxylated SAM the genuine aminopropyl donor for the synthesis of the polyamines spermidine and spermine (4,9).

2. THE METHIONINE CYCLE IN MAMMALS

SAM synthesis is carried out by methionine adenosyltransferases (MATs; EC 2.5.1.6), also known as SAM synthetases, this step being the first and rate limiting of the methionine cycle (4) (Figure 1). Most of the information regarding this pathway has been obtained in liver, where a human adult processes up to 48% of the ingested methionine (9-11), but slowly information

concerning other organs is becoming available (i.e. the cochlea (12)). The need for increasing the existing knowledge in extrahepatic tissues has been emphasized when impairments of the methionine cycle, and especially reductions in SAM concentrations or hyperhomocysteinemia, have been associated with different pathologies. Most of the diseases in which alterations of the pathway have been demonstrated concern the liver (i.e. hepatitis, cirrhosis, acute liver failure, hepatocellular carcinoma) (9,13), but its impairment in cardiovascular diseases (14,15), Alzheimer (16-18), psoriasis (19), rare diseases (i.e. Wilson disease) (20-22) and even hearing loss (12,23) has been also shown. It is not surprising that such a variety of pathological states concur with an anomalous function of the methionine cycle, given not only the large diversity of biological processes involving SAM, but also the connections of this pathway with additional key routes and its dependence on the nutrient status, as will be explained below.

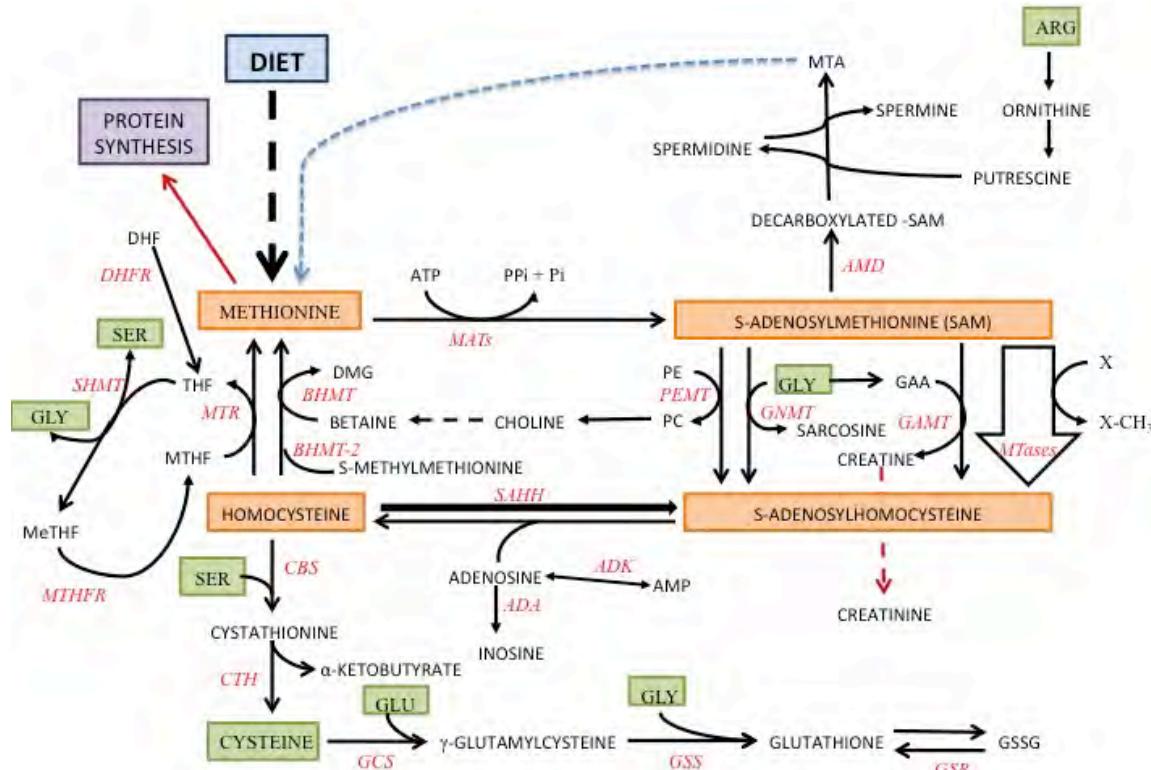


Figure 1. Mammalian methionine cycle and associated pathways. The scheme shows the main reactions involved in the methionine cycle, polyamine synthesis, folate cycle, trans-sulfuration and glutathione synthesis. A discontinuous blue line indicates the methionine salvage pathway. Enzymes and metabolites appear abbreviated as follows: MATs, methionine adenosyltransferases; PEMT, phosphatidylethanolamine N-methyltransferase; GNMT, glycine N-methyltransferase; GAMT, guanidinoacetate N-methyltransferase; MTases, methyltransferases; SAHH, S-adenosylhomocysteine hydrolase; ADK, adenosine kinase; ADA, adenosine deaminase; CBS, cystathione β -synthase; CTH, cystathionease; GCS, γ -glutamylcysteine synthetase; GSS, glutathione synthetase; GSR, glutathione reductase; BHMT, betaine homocysteine methyltransferase; BHMT2, betaine homocysteine methyltransferase 2; MTR, methionine synthase; DHFR, dihydrofolate reductase; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; MTHFR, methylene tetrahydrofolate reductase; MTHF, 5-methyl tetrahydrofolate; MeTHF, methylene tetrahydrofolate; MTA, methylthioadenosine; GSSG, glutathione oxidized form; GAA, guanidinoacetate; X, any methyl acceptor.

Methionine was discovered in 1923 by Mueller (24),

and found to be essential for mammals in 1937, when

The new levels of redox regulation of S-adenosylmethionine synthesis

growth retardation was detected in rats fed methionine-free diets (25). Hence, this amino acid must be obtained from the diet, and after absorption, needs to be distributed to the whole organism, where requirements of each organ are not equal, as mentioned previously. Once into the cell the use of this amino acid is shared between protein synthesis and the methionine cycle, and part of the methionine consumed in these pathways can be recycled. Mammalian cells can recover part of the methionine used in the methionine cycle by homocysteine (Hcy) remethylation and also by the methionine salvage pathway, which has a minor role. Hcy remethylation requires additional methyl donors to synthesize methionine, being those mainly 5-methyl tetrahydrofolate (MTHF), but also betaine and S-methylmethionine (vitamin U). These remethylation reactions are catalyzed by a vitamin B12-dependent methionine synthase (MTR; EC 2.1.1.13), betaine homocysteine methyltransferase (BHMT; EC 2.1.1.5) and BHMT2 (EC 2.1.1.10), respectively (26,27). The Hcy required for this purpose is generated as an intermediate in the trans-sulfuration pathway that converts methionine into cysteine, and in which SAM synthesis by MATs is the first step. Transmethylations then use the methyl donor rendering the methylated products together with demethylated SAM, named S-adenosylhomocysteine (SAH). Three methyltransferases in charge of the synthesis of small compounds are the main consumers of hepatic SAM. Namely, glycine N-methyltransferase (GNMT; EC 2.1.1.20), phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT; EC 2.1.1.17) and guanidinoacetate N-methyltransferase (GANMT; EC 2.1.1.2) which synthesize sarcosine, phosphatidylcholine and creatine, respectively (13).

The byproduct of transmethylations, SAH, is a potent inhibitor of most methyltransferases and its hydrolysis is carried out by SAH hydrolase (SAHH or AHCY; EC 3.3.1.1) in the only reversible reaction of the methionine cycle, which renders adenine and Hcy (9). Elimination of SAH is key in order to maintain an appropriate methylation level that depends on the SAM/SAH ratio, also known as the methylation index. Calculations carried out in several tissues have established that the optimal hepatic ratio is approximately 4, although this number is higher for other tissues such as the lung, where the preferred methylation index is around 9 (28). Preservation of these optimal SAM/SAH ratios depends on an efficient removal of Hcy, adenine or both.

Hcy levels depend on its catabolism through the remaining reactions of the trans-sulfuration pathway leading to cystathione and cysteine, its elimination into the blood or, when methionine levels become low, its remethylation. The metabolic branch point represented by Hcy favors its use for cysteine synthesis through the consecutive activities of cystathione β -synthase (CBS; EC 4.2.1.22) and cystathionase (CTH; EC 4.4.1.1). These two enzymes exhibit higher Km values for Hcy than remethylating proteins, are activated by high levels of SAM and require vitamin B6 (26,29,30). In parallel,

adenosine can be utilized by adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4) or adenosine kinase (ADK; EC 2.7.1.20) to produce inosine or AMP, respectively (26). All these reactions connect the methionine cycle with multiple pathways in which regulators of the former are generated, hence creating a series of feedback loops whose complexity is not totally understood. Moreover, all the reactions described above do not show identical importance in every tissue, due to differences in gene expression patterns, and hence, on the enzymes or isoenzymes encountered in each cell type.

Main players in the regulation of the hepatic methionine cycle are metabolites, from the same or related pathways, hormones and nutrients, some of their key effects being summarized below. Among the metabolites, SAM deserves a special consideration, since its role includes the activation or inhibition of several enzymes such as MATs, CBS and CTH, as well as the inhibition of BHMT expression (29,31,32). SAM further contributes to the inter-regulation between pathways by inhibiting methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR; EC 1.5.1.20) of the folate cycle and regulating AMP kinase (AMPK; EC 2.7.11.31) phosphorylation (33,34). Nutrients such as vitamins of the B group, or their derivatives, also have a relevant role as cofactors or substrates for MTR, CBS and CTH, but also as inhibitors of GNMT in the form of MTHF (35-38). Moreover, methionine levels have been shown to regulate expression of MAT genes (39), and hormones seem to exert their role preferentially at the expression level, as occurs with glucocorticoids and MAT genes (40). Redox regulation is exerted by glutathione, and the ratio of its reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms (41-43), nitric oxide (44), hydroxyl radicals (45), NADP⁺ (46), copper (20,47), etc. on MATs and SAHH. Additionally, oxidative stress inhibits MTR and activates CBS through changes in the redox status of their cofactors, vitamin B12 and the heme group, respectively (48).

3. METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASES

MATs are a family of enzymes highly conserved between Bacteria and Eukaryota. This conservation expands from the amino acid sequence to the protein structure, facts that allowed us to propose MATs as a good phylogenetic marker back in 2004 (49). Moreover, MATs from Archaea despite their low sequence conservation (~18%) still preserve the amino acid residues involved in catalysis (50), suggesting that the mechanism for SAM synthesis has been maintained throughout evolution (5). This family of enzymes uses methionine and ATP as substrates in a reaction that requires Mg²⁺ and K⁺ ions and which takes place in two steps: 1) the transfer of the adenosyl moiety of ATP to the sulfur atom of methionine, generating SAM and triphosphate; and 2) the hydrolysis of the triphosphate originating pyrophosphate and inorganic phosphate and allowing SAM liberation from the active site (4,5).

There are three MAT genes in mammals, named *MAT1A*, *MAT2A* and *MAT2B*, which encode two types of

catalytic subunits, MAT α 1 and MAT α 2, and the regulatory subunit MAT β , respectively (Figure 2). The high level of identity exhibited by MAT α 1 and MAT α 2 (85% at the amino acid level), is not shared by MAT β , which is a non-related protein of the PFAM 04321

oxidoreductase family (4,5). Four splicing forms of MAT β have been detected in hepatoma cells, from which the V1 form is the protein encountered in normal tissues and which has been evaluated in most studies published to date (51).

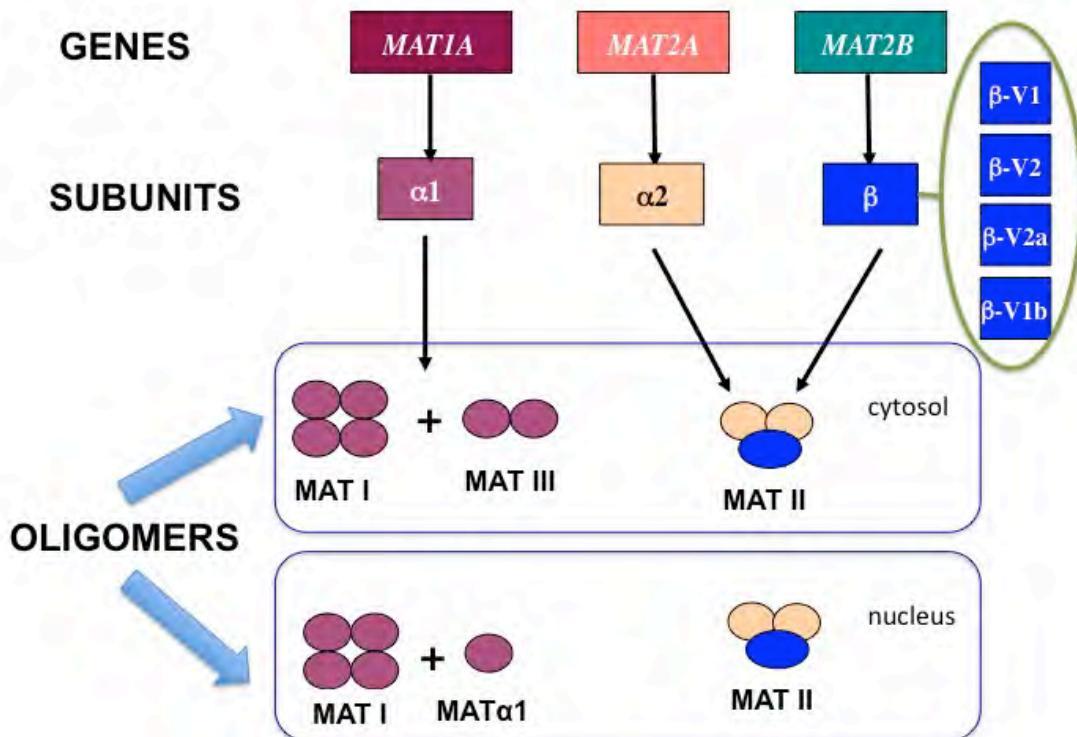


Figure 2. Methionine adenosyltransferase nomenclature. The scheme summarizes the nomenclature used in the field regarding genes, subunits, splicing forms (circled in green) and the oligomeric association of the subunits to render the isoenzymes found in the cytosol and the nucleus.

MAT subunits associate into the three isoenzymes that have been detected in mammalian cells, named MAT I, MAT II and MAT III (Figure 2). Their characterization was carried out after their isolation from liver (MAT I and III) or kidney (MAT II) and found to be homo- or hetero-oligomers (4). Precisely, MAT I and MAT III were identified as homo-tetramers and homo-dimers of MAT α 1 subunits (52-54), respectively, whereas MAT II was classified as a hetero-oligomer of MAT α 2 and MAT β subunits (55,56). The affinity for methionine of the three isoenzymes expands the whole micromolar range (reviewed in (4,5)), some differences being encountered between laboratories, but mean data corresponding to the following values: 3 μ M for MAT II; 30 μ M for MAT α 2 homo-oligomers; 100 μ M for MAT I; and 1 mM for MAT III. In contrast, V_{max} values showed the opposite trend, MAT II < MAT α 2 homo-oligomers < MAT I < MAT III. These kinetic parameters determine the capacity for SAM synthesis of each cell type, under normal or pathological conditions, according to the isoenzyme expressed and the level attained.

The classical knowledge on MATs by the 90s can be summarized as follows (reviewed in (4)): i) normal liver was the sole tissue where MAT1A was expressed; ii)

MAT2A was expressed in extrahepatic tissues, hepatopathologies and fetal liver; iii) MAT2B expression followed that of MAT2A, although at lower levels; iv) MAT isoenzymes were cytosolic proteins; v) MAT II was probably a heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$); vi) binding of MAT β to MAT α 2 increased the affinity of the latter for methionine; vii) SAM inhibits MAT I and II isoenzymes, but is an activator of MAT III; viii) MAT III is activated by dimethylsulfoxide; ix) cysteine residues were found to be important for MAT I/III activity and in order to maintain the association state; and x) SAM was transported from the cytoplasm to other subcellular compartments as required. During my postdoctoral in Mato's group in the early 90s we were able to provide additional evidences concerning MAT I and MAT III (reviewed in (4)). Those included results obtained both *in vitro* and *in vivo*, the main achievements being as follows: i) further insights into the role of the cysteine residues; ii) the modulation of the activity by glutathione levels; iii) regulation of the isoenzyme activity by PKC phosphorylation; iv) the identification of the putative ATP binding site by photoaffinity labeling; v) the regulation by glucocorticoids; and vi) the differential expression pattern during liver development. Based on these accumulated

The new levels of redox regulation of S-adenosylmethionine synthesis

knowledge, several questions remained unanswered, being their response the objective of our group in the last 20 years.

4. OUR CONTRIBUTION TO UNDERSTAND MAMMALIAN METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASES: FROM STRUCTURE TO NEW REGULATORY LEVELS

The objective since we started our independent work by 1994 was to understand several aspects of MAT regulation that were poorly addressed, despite the intensive work of several groups since their discovery. Some of the limiting facts for the field at that time related to the difficult purification procedures to obtain the isoenzymes and the lack of good antibodies or structural information. Therefore, our initial work was focused on these aspects to develop better protocols and tools that allowed progress in the study of MATs, and which latter favored additional studies on animal models, as will be explained below.

4.1. Association of α -subunits is required to obtain active MATs

The first objective of our work was to understand the need for oligomerization of MAT α -subunits, and for this purpose we undertook the crystallization of rat MAT I and MAT III. Our initial attempts were based in the use of the rat liver purified proteins, but the heterogeneity of the

sample precluded crystallization. Next, we tried to use the recombinant protein overexpressed in *E. coli* (53,54), and several important problems had to be faced: 1) the level of soluble protein was very low; 2) it was impossible to separate the recombinant protein from the bacterial MAT due to their high homology and identical chromatographic behavior; and 3) refolding of MAT I/III from the inclusion bodies required a protocol that had to be established. Nevertheless, we decided to pursue the design of a specific refolding protocol (57), rendering large amounts of soluble protein, and that latter revealed its use for additional purposes. The success of this refolding protocol relied on the use of very low protein concentrations, the addition of Mg^{2+} to the buffers, the utilization of two refolding steps (fast and slow), and the maintenance of the 10 cysteines of rat MAT α 1 in a reduced state during the whole procedure (57). Characterization of the refolded protein showed that both MAT I and MAT III isoenzymes could be obtained, and their interconversion was possible just by concentration or dilution of the sample (57). Moreover, kinetic parameters and circular dichroism spectra of the refolded proteins were similar to those of the isoenzymes purified from rat liver (57,58). These facts, together with the large amount of refolded and purified MAT I/III obtained, led us to use these proteins in new crystallization attempts that were successful.

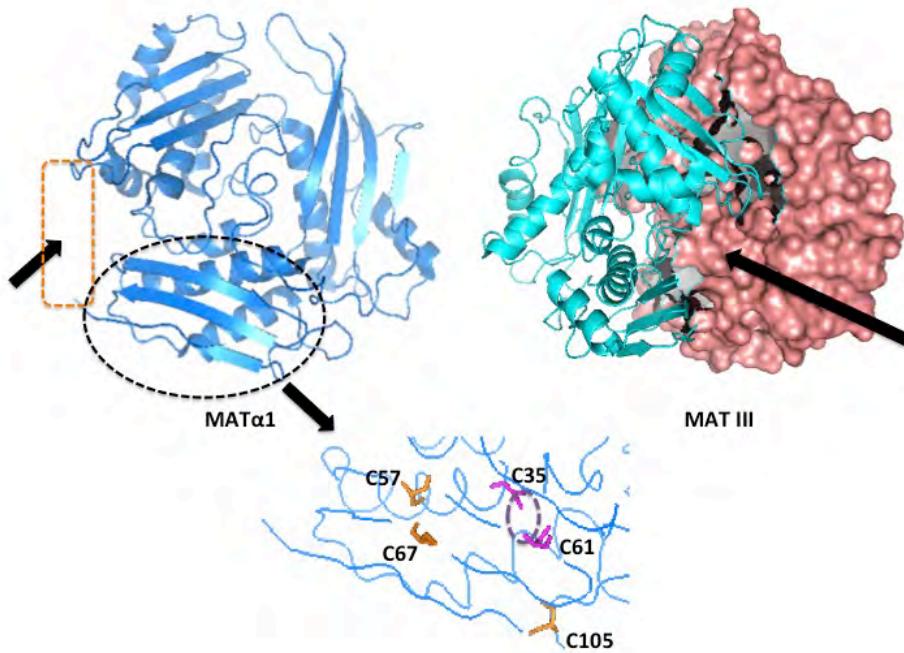


Figure 3. Structural details of MAT α 1 and its dimer. A cartoon representation of the secondary elements found in rat MAT α 1 monomers is shown in the upper left panel. An arrow indicates the position of the flexible loop of access to the active site in the completely folded subunit and the central domain is highlighted. The crystal structure of the MAT III appears on the right side of the figure, an arrow indicating the entrance to the active site located at the dimer interface. The lower part of the figure shows a magnification of the central domain, including the five cysteine residues located in this area (C35, C61, C57, C67, C105). The position of the intrasubunit disulfide (C35-C61) appears indicated by a circle.

The crystal structure of rat MAT I was reported in 2000, becoming the first mammalian structure solved for this family of proteins (59). MAT α 1 monomers showed a three-domain organization similar to that previously

described for the *E. coli* counterpart (5) (Figure 3). The domains were formed by nonconsecutive stretches of the protein chain, each of them containing a β -sheet (59). The three sheets made up a large hydrophobic surface that

constituted the interaction interface between monomers in the dimer. The two active sites of each dimer located at this interface, opposite one to another, and their structure required residues of both subunits for catalysis (59,60). This organization therefore explained the need for association exhibited by MAT α 1 subunits, and the fact that dimers were the minimum active isoenzymes. Production of the crystals in the presence of substrates or certain analogues also allowed the identification of key residues for catalysis (59,60). Precisely, F251 was identified as key for methionine binding (59), whereas the role in ATP binding of a P-loop previously identified by photoaffinity labeling was confirmed (60,61). The next level of association involved the central domains of each monomer, which provided the few residues that allowed tetramerization, being the resulting interaction pattern much more limited than that previously described for *E. coli* MAT (62). How these interactions contribute to the changes in affinity and V_{max} shown between MAT I and MAT III is still unknown and requires further investigation.

4.2. Interconversion between MAT I and III isoenzymes is blocked by an intrasubunit disulfide bond

The next question we addressed concerned the interconversion between MAT I and MAT III, and specifically what blocks this exchange, which is not observed in the liver purified isoenzymes. The sequence of MAT α 1 includes 10 cysteine residues and N-ethylmaleimide modification of just one of them was responsible for a large loss of enzymatic activity. Moreover, modification of an additional sulfhydryl group led to inactive dimers (63). Analysis of mutants generated in all the cysteines confirmed the role of these residues in activity, and demonstrated that those comprised between C35 and C105 were involved in the control of the MAT III/I isoenzyme ratio (64). Latter on, C121 was identified as the target for inactivation by nitric oxide and hydroxylation (44,45,65), a role explained by its location in the loop of access to the active site (59,60). However, our initial studies using chemical modification also revealed that in the isoenzymes purified from rat liver two cysteine residues remained elusive, and that only after reduction they became accessible to N-ethylmaleimide modification (63,66). These data suggested the presence of a disulfide bond within MAT I and MAT III, which was identified as an intrasubunit bond involving C35 and C61 in the isoenzymes isolated from rat liver (66) (Figure 3). The crystal structure of MAT I, obtained under reducing conditions, showed that these residues were well oriented and at a distance short enough to form such an intrasubunit bond (59).

The role of the disulfide was further explored taking advantage of the available refolding procedure and cysteine mutants prepared on MAT α 1 (62). For this purpose, refolding was carried out under reduced (with DTT) or mild oxidative conditions (with GSH/GSSG mixtures). Analysis of the resulting refolded isoenzymes

showed that interconversion between MAT I and MAT III could be produced only when the proteins were fully reduced (62). Moreover, mass spectrometry evaluation of the refolded proteins revealed that this interconversion was blocked by the presence of the C35-C61 disulfide bond in the isoenzymes resulting from refolding under mild oxidative conditions (62). Once more, the use of the available structural data allowed us to propose that the role of this intrasubunit disulfide relies in its ability to stabilize the β -sheet of the central domain involved in dimer-dimer interactions. Therefore, production of the disulfide at different steps during folding would result in stable tetramers or dimers.

4.3. Unfolding of MAT I and MAT III takes place through an intermediate state

Our two-step refolding protocol suggested the requirement of an intermediate state that must be well populated to obtain a correct association pattern of the MAT α 1 monomers into dimers, in order to avoid aggregation (57). Unfolding studies carried out on MAT III using urea as denaturant confirmed this hypothesis, and demonstrated a three-state mechanism that is reversible (58). The intermediate identified by gel filtration chromatography and sedimentation velocity was an inactive monomer with 70% of the native secondary structure, according to circular dichroism results. Moreover, the instability exhibited by the dimer in the presence of the denaturant was due to its dissociation, probably by weakening of the interface interactions between MAT α 1 monomers. In fact, we were able to calculate that approximately 50% of the global stabilization energy of MAT III was due to subunit association, whereas only 25% derived from the interactions stabilizing the intermediate state. MAT I unfolding was also studied taking advantage of the differences in fluorescence intensity exhibited by tetramers and dimers upon 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS) binding. The results obtained suggested that around 65% of the global free energy derives from dimer dissociation, thus supporting a lower stability for dimer-dimer interactions (62). On the other hand, thermal denaturation of MAT I and MAT III was shown to be irreversible, regardless of the techniques used to follow the process. Only one transition was observed for both tetramer and dimer denaturation, hence suggesting that stability of MAT I is highly dependent on that of the dimer (67). Using two-dimensional infrared spectroscopy and the structural data it was possible to ascribe the earliest changes to the most exposed elements, α -helices and β -turns.

The high level of sequence and structural conservation among α -subunits suggested no large differences in folding pathways for MAT α 1 and MAT α 2 monomers, although association steps may diverge due to the incorporation of MAT β into MAT II hetero-oligomers. However, this initial hypothesis was demonstrated to be partially wrong when refolding of MAT α 2 was performed.

The new levels of redox regulation of S-adenosylmethionine synthesis

In fact, this subunit followed a similar pathway to produce MAT α 2 dimers, and only in a latter step association of MAT β takes place (46). Data regarding folding pathways *in vivo* remain very limited, although *E. coli* MAT was identified several years ago among the substrates for the chaperonin GroEL (68).

All this information regarding folding and structure could be of help to understand the impact of the different *MAT1A* mutations detected in patients with isolated persistent hypermethioninemia, and in fact we performed this exercise in 2011 (69). Most of these patients are asymptomatic, although demyelination and other central nervous system manifestations have been described in several cases (70,71). The number of patients is still small, but newborn screenings in search for *CBS* defects are aiding in the identification of hypermethioninemias due to *MAT1A* mutations. Most mutations follow a recessive autosomal inheritance trait, although a dominant pattern has been described for the transition leading to the R264H protein mutant (72). The presence of early stop codons leading to shorter MAT α 1 subunits has been reported, as well as the possibility of longer chains due to mutations in the stop codon or splice-donor sites (70,71,73). Analysis of some of these mutant proteins has been carried out upon overexpression in *E. coli* and/or COS cells and their effects on activity evaluated. The early stop codons identified to date lead to proteins lacking from part (386X) or most (350X) of the C-terminal domain, to others in which even information for a complete domain is absent (92X and 185X). Additional early stop codons (351X) result not only in the loss of half of the C-terminal domain, but also in a change of sequence that affects a portion of the central and the remaining C-terminal domains. In contrast, longer subunits resulting from the stop codon mutation (X396Y-464X) present with the whole wild type sequence, and hence the information for the whole N- and central domains plus an extended C-terminal domain. Longer monomers due to splice-donor mutations on exon III, will result in proteins whose sequence is drastically altered, and hence, their folding and structure. If not eliminated by proteolysis, the shortest MAT α 1 subunits are expected to result in a complete change in the folding pattern, precluding association. However, those mutants in which the sequences for the N- and central domains remain intact, and even part of the C-terminal domain is preserved, may achieve an intermediate state that allows association (69).

This is the case for mutations leading to MAT α 1 subunits of approximately 350 residues, which were the first identified in patients with demyelination. In fact, Hazelwood *et al.* proposed that this type of subunits might associate with MAT α 2 monomers, leading to an inactive hetero-oligomer (74). Although plausible, given the high level of sequence identity between MAT α 1 and MAT α 2 subunits, the availability of new structural data showed

that there are small differences in the orientation of the monomers. Moreover, these mutants ~350 residues long lack the C-terminal domain sequence involved in monomer-monomer interface, including the β -sheet that participates in dimer association. These divergences together will impose a rearrangement to avoid exposure of amino acids that are hidden in the wild type MAT α 1, and hence reducing the probability of association with MAT α 2 (69). Once again, additional experiments are needed for verification of the folding pathways followed by the mutants, their putative ability to hetero-oligomerize with wild type subunits, etc.

4.4. Oxidative stress induced by copper accumulation impairs SAM synthesis in early stages of Wilson disease

Several models of liver disease that induce oxidative stress by different mechanisms have been explored along the years regarding the alterations induced in SAM synthesis. Just to name some, carbon tetrachloride intoxications (75,76), treatments with buthionine sulfoximine (BSO) (42), Long Evans Cinnamon (LEC) rats (20-22), etc. all concur with a reduction in MAT activity and SAM levels. Now that the role of cysteines in MAT I and MAT III is known this is no longer a surprise, but since most of these models were explored earlier there was a need to revisit certain aspects. Among them, the case of the Wilson disease model provided by LEC rats remained underexplored, probably because of the rare condition of this pathology. The available data referred only to activity parameters and were determined in an advanced stage of the disease, where hepatitis was already present. Therefore, we decided to explore early pathological stages to get insight into the copper effects on SAM synthesis. For this purpose, we examined 9-week old LEC rats, which already presented with copper deposits in the liver, but no signs of hepatitis (20).

Hepatic copper accumulation at this early step led to changes in expression that were unexpected for MAT genes (20). The *Mat1a/Mat2a* expression switch was already detected in LEC rats at this age, but *Mat2b* expression was dramatically reduced, hence following an opposite pattern to that classically described in liver disease. These effects on *Mat2b* expression were prevented by neocuproine, a chelator of Cu (I) (Figure 4). Reductions in SAH concentrations were larger than effects on SAM levels, probably due to the effects of copper on SAHH (47). Activity measurements carried out under conditions that allowed distinction between the three MAT isoenzymes indicated a decrease in MAT III activity, together with an increase in the combined activity of MAT I and MAT II. These effects on activity correlated with an enhancement in the MAT I content together with a reduction in that of MAT III, according to analytical gel filtration chromatography (AGFC) and dot blot detection of MAT α 1 (20).

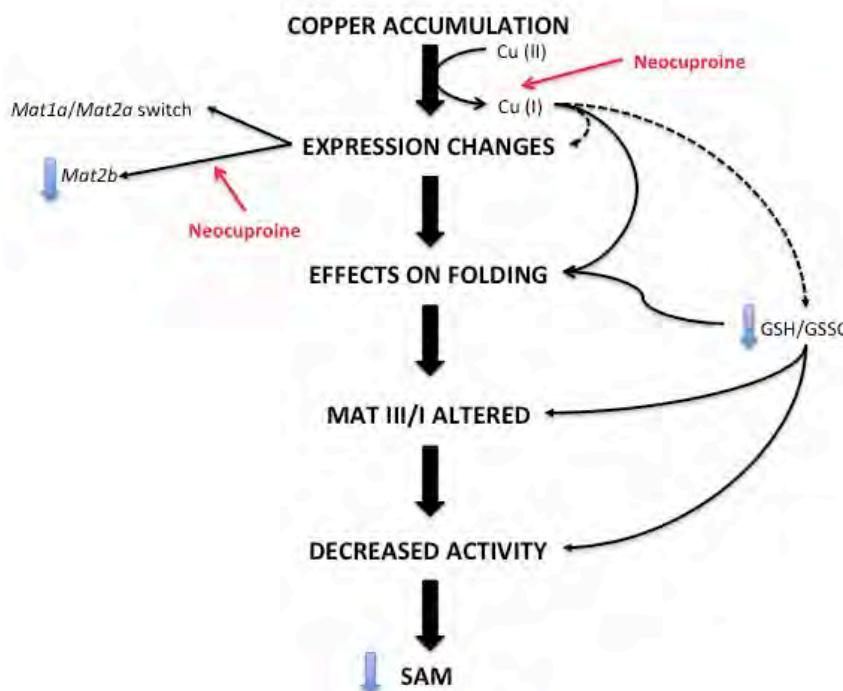


Figure 4. Summary of the effects detected on S-adenosylmethionine synthesis in LEC rats. The different levels at which copper accumulation alters SAM synthesis are shown, as well as the modifications prevented by neocuproline administration.

Further analyses of copper effects on MAT proteins were carried out *in vitro* taking advantage of the refolding protocol. These experiments showed effects on folding of MAT α 1 and MAT α 2, the presence of copper reducing the amount of soluble protein obtained, but having no effect in the association state attained. Moreover, addition of copper to correctly folded MATs had a direct effect on their activity (20). MAT α 2 dimers were more susceptible to inhibition than MAT I and MAT III under reducing conditions, whereas this pattern was opposite when reducing conditions were milder. This effect of copper on activity correlated with the generation of high-Mr aggregates, further supporting its role in the folding of MATs. In this case, the residues affected by oxidative stress remain unknown, and hence further studies should be carried out to understand the mechanism of copper effects on these proteins.

4.5. The affinity between MAT II subunits is increased by NADP⁺ binding

Several years latter crystal structures of human MAT α 2 homo-oligomers became available, monomers showing the same organization than MAT α 1, including three domains and a similar pattern for dimerization. Following this achievement structures of MAT β homo-oligomers were solved and the presence of a Rossman-fold including NADP⁺ demonstrated (77). However, no explanation of the cofactor's role in the protein was provided. Therefore, we adapted the refolding protocol of the laboratory for human MAT α 2 production, and improved the methods for recombinant human MAT β production and purification (46). Using isothermal titration

calorimetry we were able to determine the affinity parameters for NADP⁺ binding to MAT β , to demonstrate that the cofactor increases the affinity of MAT β for MAT α 2 subunits, and finally that MAT II is a heterotrimer composed by a MAT α 2 dimer and a single MAT β subunit (46).

The structural data available also allowed the preparation of models for MAT II structure, the best approach suggesting that the interaction between the MAT α 2 dimer and MAT β not only involves the NADP⁺ binding site, but takes place close to the protein active site. The role of MAT β residues postulated to bind the cofactor was proven by site-directed mutagenesis, whereas additional mutants lacking part of the N-terminal (similar to the V2 splicing form) showed altered kinetic properties upon their association with MAT α 2 dimers (46). Several of our findings were confirmed by Murray et al. in 2014, including the stoichiometry between MAT α 2 and MAT β subunits (2:1), and the fact that the N-terminal end of MAT β regulates the activity of MAT II (46,78). However, their crystal structures of MAT II showed a different interaction surface for the subunits, suggesting a role for the C-terminal end of MAT β (in this case the V2 splicing form) and a tunnel at the interface of the MAT α 2 dimer (78). Again, and in spite of the effort already performed, more structural work is needed to clarify the disparities reported to date.

4.6. MAT1A expression is not restricted to the liver

Northern blots carried out on samples from animal models or human biopsies showed MAT1A expression in liver, together with a switch towards MAT2A expression in

The new levels of redox regulation of S-adenosylmethionine synthesis

liver disease (4,13,79,80). Moreover, the *Mat1a^{-/-}* mouse developed severe hepatic pathology with age, most of these mice showing hepatocellular carcinoma (81). In contrast, most patients with hypermethioninemia due to mutations in this same gene either do not develop symptoms or those are neurological, including a few cases showing signs of demyelination by magnetic resonance imaging (MRI), as explained in a previous section (70,71,82). Therefore, in our opinion, there was a need to reexamine the tissue expression profile of *MAT1A*. Using real-time RT-PCR this analysis was performed in rat tissues, where expression was detected in almost all of those examined. Several expression levels were found: 1) high, shown in liver; 2) medium, exhibited by pancreas and lung; and 3) low, found in the rest of the tissues examined (83). This same pattern was further confirmed by western blot using an anti-MAT α 1 antibody developed in the last years in our laboratory using highly purified preparations of the protein (64,83).

4.7. MATs are cytoplasmic and nuclear proteins

Localization of MATs to the cytoplasm was a well-established characteristic, based mainly in traditional subcellular fractionation studies and activity measurements. However, lack of good antibodies precluded confirmation of this statement for a long time. Again, using the new available antibody and immunohistochemistry we were able to detect MAT α 1 in both the cytoplasm and the nucleus, although nuclear localization was preferred in extrahepatic rat tissues (83). This discovery led to new questions regarding whether there was nuclear MAT activity and which were the isoenzymes present in that subcellular compartment. The answer to these points required the development of improved subcellular fractionation protocols and activity measurements that allowed not only detection of the small amount present in the nucleus, but also, and more important, to guarantee lack of contamination from the cytoplasm. In order to detect nuclear MAT activity, a highly concentrated nuclear extract from a whole rat liver was required, together with 4-fold increased levels of the radioactive tracer and longer reaction times. In parallel, LDH activity was measured to ensure complete elimination of the cytoplasm, and even more critical, the activity measurements (LDH and MAT) were carried out in the supernatant before nuclear protein extraction to ensure that the detected activity was specific of the nuclear compartment. Following this protocol, the specific MAT activity detected in the nucleus was approximately 250-fold lower than in the cytoplasm (83). Regarding the nuclear isoenzymes, AGFC followed by dot-blot detection of MAT α 1 showed the protein as tetramers and monomers, the amount of MAT I being small (83). Therefore, the low nuclear MAT activity measured correlated with the presence of equivalent levels of MAT I in this compartment.

4.8. Overlapping areas of the C-terminal end are involved in the subcellular distribution of MAT α 1

SAM is a small compound that can be transported through the nuclear pore, but this structure limits the size of the proteins that can be translocated from one side to another of the nuclear membrane to near 50 kDa. This is almost the size of MAT α -subunits and is far below that of MAT I (180 kDa). Thus, understanding how MAT α 1 is distributed between the nucleus and the cytoplasm was our next objective. Many nuclear proteins present localization signals (NLSs) in their sequence (84), others contain conformational signals that mimic the classical NLSs (85), and in other cases binding to proteins including appropriate signals is preferred (piggy-back)(86). Among NLSs, the best-known or classical signals are mono- and bi-partite sequences rich in basic residues, for whose identification several bioinformatic tools are available. Using this software we were unable to identify a classical NLS in the rat MAT α 1 sequence, and hence the crystal structure was utilized to determine the existence of exposed clusters of basic residues that could mimic such NLSs. Our analysis revealed that the C-terminal of MAT α 1 is abundant in basic residues, and those exposed to the surface were selected for site-directed mutagenesis. The subcellular distribution of the mutants was analyzed by confocal microscopy and subcellular fractionation and the combined results allowed the identification of two overlapping areas in the monomer structure that were involved either in nuclear localization or cytoplasmic retention (83).

Subcellular localization was independent of MAT activity, since an inactive mutant prepared on a residue involved in methionine binding (F251D) showed the same distribution than the wild type protein (83). Moreover, deletions at the C-terminal end, similar to those found in some patients showing demyelination (lacking 45 residues), favored nuclear localization of the truncated MAT α 1 (83). Additionally, it was demonstrated that nuclear localization of MAT α 1 correlated with increased levels of the trimethylation of lysine 27 in histone 3 (me3K27H3) (83), a well-known epigenetic repression mark. In contrast, other histone methylations examined were increased by overexpression of MAT α 1, independently of the subcellular distribution observed for the mutants.

In 2011, MAT α 2 was also found in the nucleus during a proteomic analysis in search for protein-protein interactions of the MafK transcription factor (87). This study showed MAT α 2 acting as a transcriptional corepressor of MafK on the heme oxygenase 1 (HO-1) gene. Moreover, a role for MAT β and MAT activity in this repression system was described. This manuscript together with an Editorial in the same issue of Molecular Cell (87,88), supported the hypothesis, previously postulated by our group (83), suggesting that MATs are transported to nuclear locations where SAM synthesis is needed, whereas organelles such as the mitochondria use transport systems to obtain the compound from the cytoplasm.

4.9. Nuclear accumulation of MAT α 1 is induced during

acute liver injury

The results described in the previous section suggested that changes in MAT α 1 subcellular distribution might be related to disease development. In order to examine this possibility, we chose two rat models of acute liver injury that were previously used for partial characterization of alterations in cytosolic methionine metabolism (89-91). Precisely, D-galactosamine and paracetamol intoxications were known to induce reductions in MAT activity and SAM levels (89,90,92). These changes in the D-galactosamine model were ascribed to an anomalous ratio of the MAT isoenzyme activities towards enhanced MAT III activity (89,90). We were able to reproduce these previous results in the cytosol, reductions in total MAT activity being more modest for paracetamol than for D-galactosamine treatments (92,93). The mechanism of action of both drugs is quite different, D-galactosamine inducing depletion of the uridine pool (94), and thus highlighting the interest of analyzing putative expression changes in that model. After 48 hours of D-galactosamine treatment, changes in the mRNA levels of most genes in the methionine cycle were evident, namely: i) the *Mat1a/Mat2a* expression switch, followed by a more modest increase in *Mat2b* expression; ii) increased mRNA levels for *Ahcy* and *Mtr*; iii) enhanced expression of genes involved in glutathione synthesis; and iv) decreased expression of *Gnmt* and *Bhmt* (93). In general, genes considered "exclusively hepatic" showed lower expression.

Additional analyses carried out showed that the changes induced by D-galactosamine in the cytosolic protein levels of MAT α 1, BHMT, SAHH and GNMT closely matched the alterations observed in their expression (93). Focusing specifically on MAT α 1, the protein levels were reduced by ~50%, this decrease

correlating with a severe alteration in the isoenzyme pattern according to AGFC profiles, where only a small amount of MAT III was detected (93)(Figure 5). Altogether these results followed the previously published pattern detected by activity measurements in the cytosol (89). Paracetamol intoxication produced a more modest decrease in cytosolic MAT α 1 protein levels together with a completely different pattern in the MAT isoenzyme profile by AGFC, where an increase in MAT I content was readily observed. Moreover, while the MAT III/I activity ratio increased in the cytosol of paracetamol treated livers, the opposite trend was followed by the protein ratio, thus suggesting a certain degree of inactivation of MAT I in these samples (93).

Analysis of the nuclear effects of the treatments revealed accumulation of MAT α 1 in this compartment both by D-galactosamine and paracetamol intoxications (93). AGFC revealed increased levels of MAT I and a reduction in those of MAT α 1 monomers in nuclear fractions of D-galactosamine-treated livers, which correlated with the detection of enhanced nuclear MAT activity (Figure 5). In contrast, paracetamol induced a modest increase in nuclear MAT I levels, but no significant changes in activity were measured. However, in both models enhanced levels of the me3K27H3 repression mark were also detected. This lack of correlation between activity and the histone modification in paracetamol intoxication prompted us to evaluate nuclear SAM levels. However, the procedures needed to purify nuclear fractions precluded this measurement, given the exchange through the nuclear pore that takes place during the extensive washing steps required for isolation. These measurements will be only possible when appropriate imaging techniques become available.

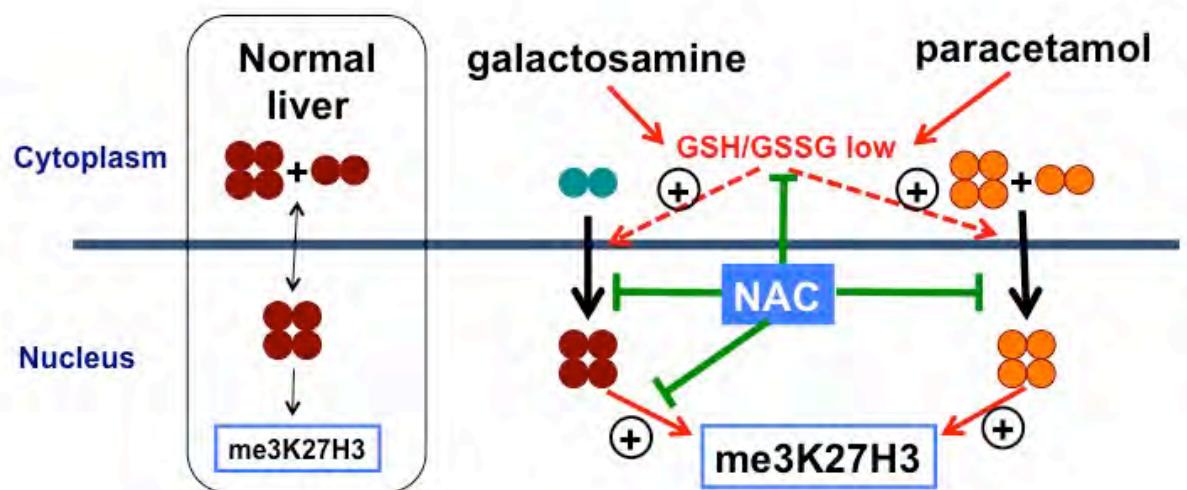


Figure 5. Summary of the effects detected in animal models of acute liver injury. A schematic representation of the hepatic changes induced by acute D-galactosamine and paracetamol intoxications on glutathione levels, MAT α 1 subcellular localization and a repression signal in liver are depicted. The preventive effects of N-acetylcysteine (NAC) are also shown.

4.10. Changes in the ratio between reduced and oxidized glutathione forms controls the nucleocytoplastic

distribution of MAT α 1.

D-galactosamine and paracetamol are known to induce

The new levels of redox regulation of S-adenosylmethionine synthesis

redox stress and to reduce the GSH/GSSG ratio. Although the mechanism by which D-galactosamine exerts this effect seems rather indirect, this is not the case for paracetamol, whose detoxification requires GSH consumption, thus leading to altered GSH/GSSG ratios (94). As mentioned previously, my own work demonstrated in 1992 that MAT I and MAT III activities were modulated by the GSH/GSSG ratios and, at extreme concentrations of GSSG, even the association state was modified (41). Therefore, we decided to explore whether glutathione ratios exerted an additional role in the control of MAT α 1 subcellular distribution using a cellular system, which allowed multiple combinations of drugs. Available hepatic cell lines include hepatomas and iPS-hepatocytes with low or no *MAT1A* expression (79,95), and primary cultures of hepatocytes rapidly loose expression of this gene (40,96). Therefore, transfection was needed to explore MAT α 1 behavior in any of these systems, among which we chose the hepatoma H35 cell line for overexpression of tagged-MAT α 1 (93). D-galactosamine treatment in this system reproduced the changes detected in the rat model: i) reduction in the GSH/GSSG ratio; ii) decreased cytosolic levels of MAT α 1; iii) accumulation of MAT α 1 in the nucleus; and iv) increase of the me3K27H3 signal. Agents that serve as sources of cysteine for glutathione synthesis, N-acetylcysteine (NAC) and SAM, were then combined with D-galactosamine treatment and their preventive effects evaluated (Figure 5). Among them, only NAC was effective in preventing all the changes induced by the drug (93).

In this same cellular system the effects induced by paracetamol in the rat model were also reproduced, namely: i) GSH depletion with the concomitant decrease in the GSH/GSSG ratio; ii) nuclear accumulation of MAT α 1; and iii) increased levels of the me3K27H3 repression mark. However, in this case the combination of paracetamol with NAC only prevented effects on glutathione levels and MAT α 1 localization, whereas me3K27H3 levels remained elevated (93). Further confirmation of the role of GSH/GSSG ratio in the regulation of MAT α 1 subcellular distribution was obtained using BSO, a compound that inhibits glutathione synthesis. Again, BSO treatment reduced the GSH/GSSG ratio and nuclear MAT α 1 accumulation was induced in the cells, these effects being prevented by addition of glutathione ethyl ester (93). Differences between D-galactosamine and paracetamol intoxications may relay not only in their effects on glutathione levels, but also in the ability of the paracetamol intermediate NAPQI for protein modification. Such modification involves again sulfhydryl

groups, which are essential for MAT I and MAT III function, and hence additional studies are required to address this aspect.

5. INTEGRATED FOR MATS AND FUTURE RESEARCH MODEL OF REDOX REGULATION

Altogether the available data concerning redox regulation of MATs expand from expression to subcellular localization and were summarized in a hypothesis recently proposed by our group (97) (Figure 6). This new theory expands a previous proposal that we made back in 1992 (98), by adding the accumulated knowledge obtained in these years. Since the purpose of this review is not to revisit these hypotheses, only a few data will be highlighted.

Most efforts in the last decades have been concentrated in understanding the regulation of *MAT* expression, rendering information from transcription factors acting on the promoter (i.e. NF κ B), the different gene methylation levels according to the liver state, stabilization of the mRNAs (i.e. AUF1 and HuR binding), etc. Our own work has been concentrated however in the proteins themselves, our results concerning from the structure (i.e. intrasubunit disulfide bond), to cofactor regulation (i.e. NADP $^+$ binding) and, more recently, subcellular distribution of MAT α 1 and its relationship with disease. Briefly, the proposal indicates that the high SAM levels found in normal liver depend on: 1) low methylation levels of the *MAT1A* promoter allowing gene expression; 2) high *MAT2A* promoter methylation levels, together with decreased *MAT2A* mRNA stability by binding of meHuR; 3) the normal ratios of GSH/GSSG preserving high MAT I/III activity in the cytosol and keeping MAT α 1 transport to the nucleus at low ratios, therefore maintaining adequate methylation levels of histones and DNA. In contrast, the low SAM levels found in damaged liver are due to the combination of: 1) an inversion of the promoter methylation levels, which become high for *MAT1A* and low for *MAT2A* promoters; 2) enhanced *MAT2A* and *MAT2B* transcription by the action of redox regulated transcription factors; 3) destabilization of *MAT1A* mRNA by AUF binding, together with stabilization of *MAT2A* transcripts by HuR binding; 4) increased oxidative stress leading to higher levels of NADP $^+$ and reduced GSH/GSSG ratios, which together favor cytosolic MAT II accumulation, the low V_{max} MAT; and 5) reduced GSH/GSSG ratios induce nuclear accumulation of MAT α 1 and MAT I providing higher nuclear SAM concentrations for epigenetic mechanisms.

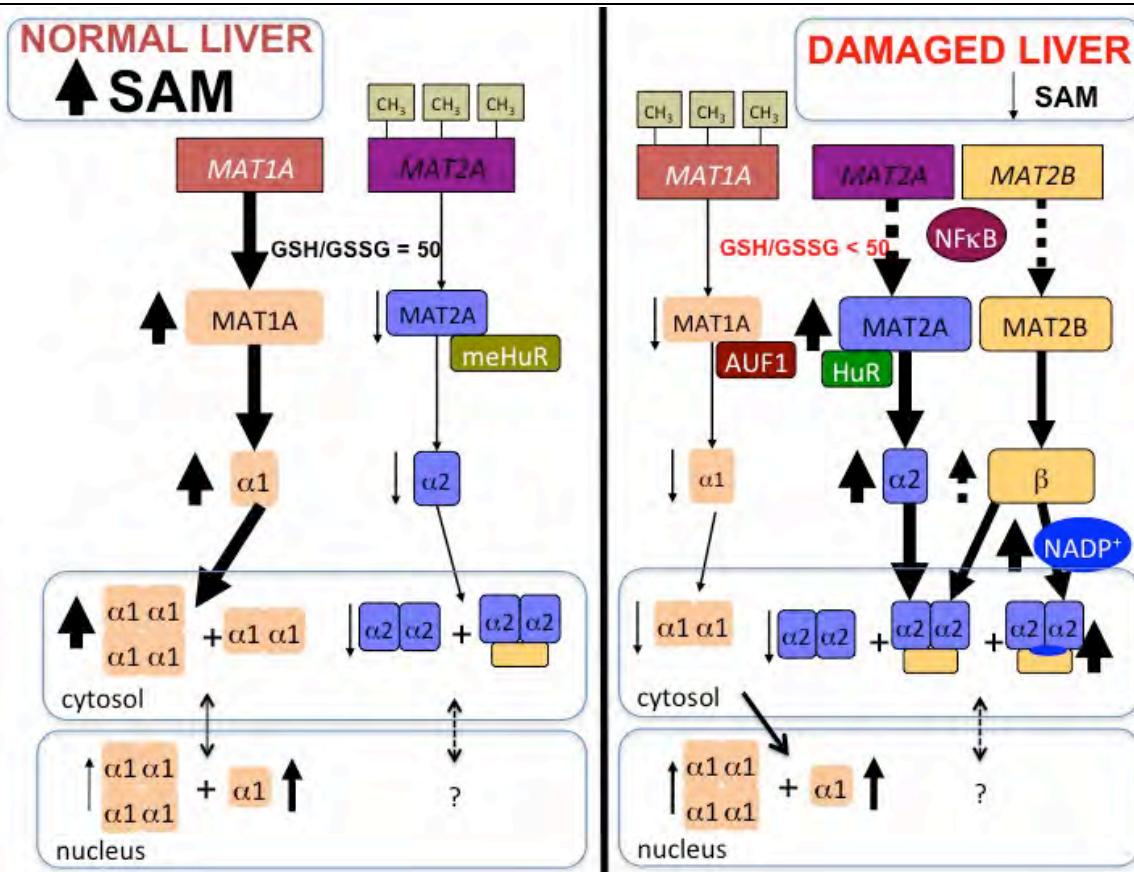


Figure 6. Actualized version of the model proposed for redox regulation of MATs. The proposal includes the most significant data regarding normal liver (left) and damaged liver (right). Mean GSH/GSSG ratios in each situation are included, together with the changes detected in expression due to gene methylation or stabilization/destabilization of the mRNAs. Effects on the proteins include those derived from increased levels of the cofactors, altered association patterns and subcellular distribution rendering finally, high or low SAM levels in normal and damaged livers respectively.

Redox regulation is probably the best-known mechanism controlling MAT function in disease states, but still questions regarding how copper exerts its effects on these enzymes remain unsolved. Additionally, the role of other actors in redox stress, such as NAD⁺/NADH or NADP⁺/NADPH ratios, should be explored in the whole methionine cycle and special attention should be paid on subcellular distribution. The number of enzymes of this pathway found in the nucleus is increasing (SAHH, GNMT, MATs) and their role in this compartment is underexplored. Possibilities such as moonlighting activities cannot be forgotten, neither the protein-protein interactions in which they might be involved.

6. CONCLUSION

In the last 20 years our group has developed protocols and tools for the study of MATs and the methionine cycle and, as a result of this effort, new data have been obtained both *in vitro* and *in vivo*. Altogether, these results have shown the existence of new levels of regulation for MATs that might be key for understanding their role in disease, but which could also be considered as putative targets for the development of new treatments. Moreover, some aspects uncovered during our work might be useful as biomarkers of disease, provided the adequate tissue

samples and tools are available. In the near future, work in this field will require a larger effort on the solution of structures, the role of post-translational modifications, the identification of protein-protein interactions and development of imaging techniques able to evaluate subcellular levels of metabolites. Null mice models are valuable tools for the development of the field, but certain aspects concerning the proteins themselves cannot be analyzed in animals that lack their expression. Subcellular localization and its relationship with pathology lay within this category.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

The work reviewed in this manuscript has been supported by grants of the Ministerio de Economía y Competitividad (PB94-0087, PM97-0064, BMC2002-00243, BMC2005-00050, BFU2008-00666/BMC, BFU2009-08977/BMC) and Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/1077, C03/08, PI05/0563).

8. REFERENCES

1. Cantoni GL. Activation of methionine for transmethylation. *J Biol Chem* 1951; 189: 745-54.
2. Cantoni GL. S-adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and

The new levels of redox regulation of S-adenosylmethionine synthesis

- adenosinetriphosphate. *J Biol Chem* 1953; 204: 403-16.
3. Fontecave M, Atta M, Mulliez E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 243-9.
 4. Pajares MA, Markham GD. Methionine adenosyltransferase (s-adenosylmethionine synthetase). *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2011; 78: 449-521.
 5. Markham GD, Pajares MA. Structure-function relationships in methionine adenosyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 636-48.
 6. Sufrin JR, Finckbeiner S, Oliver CM. Marine-derived metabolites of S-adenosylmethionine as templates for new anti-infectives. *Mar Drugs* 2009; 7: 401-34.
 7. Konze JR, Kende H. Interactions of Methionine and Selenomethionine with Methionine Adenosyltransferase and Ethylene-generating Systems. *Plant Physiol* 1979; 63: 507-10.
 8. Frey PA, Hegeman AD, Ruzicka FJ. The Radical SAM Superfamily. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2008; 43: 63-88.
 9. Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 265-80.
 10. Aguilar TS, Benevenga NJ, Harper AE. Effect of dietary methionine level on its metabolism in rats. *J Nutr* 1974; 104: 761-71.
 11. Zeisel SH, Wurtman RJ. Dietary intake of methionine: Influence of brain S-adenosylmethionine. In: Usdin E, Borchardt RT, Creveling CR, Eds. *Transmethylation*. New York: Elsevier 1979; pp. 59-68.
 12. Martinez-Vega R, Garrido F, Partearroyo T, et al. Folic acid deficiency induces premature hearing loss through mechanisms involving cochlear oxidative stress and impairment of homocysteine metabolism. *FASEB J* 2015; 29: 418-32.
 13. Lu SC, Mato JM. S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiol Rev* 2012; 92: 1515-42.
 14. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-28.
 15. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 473-501.
 16. Hooijmans CR, Blom HJ, Oppenraaij-Emmerzaal D, Ritskes-Hoitinga M, Kiliaan AJ. S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine levels in the aging brain of APP/PS1 Alzheimer mice. *Neurol Sci* 2009; 30: 439-45.
 17. Panza F, Frisardi V, Capurso C, et al. Possible role of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and polyunsaturated fatty acids in predementia syndromes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 16: 467-70.
 18. Popp J, Lewczuk P, Linnebank M, et al. Homocysteine Metabolism and Cerebrospinal Fluid Markers for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2009; 18: 819-28.
 19. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Fasting plasma homocysteine as a sensitive parameter of antifolate effect: a study of psoriasis patients receiving low-dose methotrexate treatment. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46: 510-20.
 20. Delgado M, Perez-Miguelanz J, Garrido F, et al. Early effects of copper accumulation on methionine metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 2080-90.
 21. Medici V, Shibata NM, Kharbanda KK, et al. Maternal choline modifies fetal liver copper, gene expression, DNA methylation, and neonatal growth in the tx-j mouse model of Wilson disease. *Epigenetics* 2014; 9: 286-96.
 22. Shimizu K, Abe M, Yokoyama S, et al. Decreased activities of S-adenosylmethionine synthetase isozymes in hereditary hepatitis in Long-Evans rats. *Life Sci* 1990; 46: 1837-42.
 23. Martinez-Vega R, Partearroyo T, Vallecillo N, Varela-Moreiras G, Pajares MA, Varela-Nieto I. Long-term omega-3 fatty acid supplementation prevents expression changes in cochlear homocysteine metabolism and ameliorates progressive hearing loss in C57BL/6J mice. *J Nutr Biochem* 2015; doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.07.011.
 24. Mueller JH. A new sulphur-containing amino acid isolated from hydrolytic products of protein. *J Biol Chem* 1923; 56: 157-69.
 25. Womack M, Kemmerer KS, Rose WC. The relation of dietary methionine and cysteine to growth. *J Biol Chem* 1937; 121: 403-10.
 26. Pajares MA, Perez-Sala D. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2792-803.
 27. Szegedi SS, Castro CC, Koutmos M, Garrow TA. Betaine-homocysteine S-methyltransferase-2 is an S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase. *J Biol Chem* 2008; 283: 8939-45.
 28. Chen NC, Yang F, Capecci LM, et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *FASEB J* 2010; 24: 2804-17.
 29. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Lester L. Transsulfuration in mammals. Microassays and tissue distributions of three enzymes of the pathway. *J Biol Chem* 1965; 240: 4382-92.
 30. Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1694-9.
 31. Ou X, Yang H, Ramani K, et al. Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by

- S-adenosylmethionine and methylthioadenosine. *Biochem J* 2007; 401: 87-96.
32. Castro C, Breksa API, Salisbury EM, Garrow TA. Betaine-homocysteine S-methyltransferase (BHMT) transcription is inhibited by S-adenosylmethionine (AdoMet). In: Milstien S, Kapatos G, Levine RA, Shane B, Eds. *Chemistry and Biology of Pteridines and Folates*. Norwell: Kluwer 2001; pp. 549-56.
 33. Martinez-Chantar ML, Vazquez-Chantada M, Garnacho M, et al. S-adenosylmethionine regulates cytoplasmic HuR via AMP-activated kinase. *Gastroenterology* 2006; 131: 223-32.
 34. Jencks DA, Mathews RG. Allosteric inhibition of methylenetetrahydrofolate reductase by adenosylmethionine. Effects of adenosylmethionine and NADPH on the equilibrium between active and inactive forms of the enzyme and on the kinetics of approach to equilibrium. *J Biol Chem* 1987; 262: 2485-93.
 35. Luka Z, Mudd SH, Wagner C. Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. *J Biol Chem* 2009; 284: 22507-11.
 36. Kery V, Bukovska G, Kraus JP. Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathione beta-synthase is a heme protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 25283-8.
 37. Brown FC, Hudgins WR, Roszell JA. Reactions of cyclic amino acid derivatives with the pyridoxal phosphate of cystathionase. *J Biol Chem* 1969; 244: 2809-15.
 38. Huennekens FM, DiGirolamo PM, Fujii K, Jacobsen DW, Vitols KS. B12 -- dependent methionine synthetase as a potential target for cancer chemotherapy. *Adv Enzyme Regul* 1976; 14: 187-205.
 39. Gonzalez MP, Varela-Moreiras G, Selhub J, Paul L, Pajares MA. Methionine adenosyltransferase expression depends on methionine concentrations in the culture media. *Ann Nutr Metab* 2013; 63: 1342.
 40. Gil B, Pajares MA, Mato JM, Alvarez L. Glucocorticoid regulation of hepatic S-adenosylmethionine synthetase gene expression. *Endocrinology* 1997; 138: 1251-8.
 41. Pajares MA, Duran C, Corrales F, Pliego MM, Mato JM. Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *J Biol Chem* 1992; 267: 17598-605.
 42. Corrales F, Ochoa P, Rivas C, Martin-Lomas M, Mato JM, Pajares MA. Inhibition of glutathione synthesis in the liver leads to S-adenosyl-L-methionine synthetase reduction. *Hepatology* 1991; 14: 528-33.
 43. Martinez-Chantar ML, Pajares MA. Role of thioltransferases on the modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *FEBS Lett* 1996; 397: 293-7.
 44. Avila MA, Mingorance J, Martinez-Chantar ML, et al. Regulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase during septic shock: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25: 391-6.
 45. Sanchez-Gongora E, Ruiz F, Mingorance J, An W, Corrales FJ, Mato JM. Interaction of liver methionine adenosyltransferase with hydroxyl radical. *FASEB J* 1997; 11: 1013-9.
 46. Gonzalez B, Garrido F, Ortega R, et al. NADP(+) Binding to the Regulatory Subunit of Methionine Adenosyltransferase II Increases Intersubunit Binding Affinity in the Hetero-Trimer. *PloS ONE* 2012; 7: e50329.
 47. Li Y, Chen J, Liu J, Yang X, Wang K. Binding of Cu²⁺ to S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *J Inorg Biochem* 2004; 98: 977-83.
 48. Zou CG, Banerjee R. Homocysteine and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 547-59.
 49. Sanchez-Perez GF, Bautista JM, Pajares MA. Methionine adenosyltransferase as a useful molecular systematics tool revealed by phylogenetic and structural analyses. *J Mol Biol* 2004; 335: 693-706.
 50. Lu ZJ, Markham GD. Enzymatic properties of S-adenosylmethionine synthetase from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem* 2002; 277: 16624-31.
 51. Yang H, Ara AI, Magilnick N, et al. Expression pattern, regulation, and functions of methionine adenosyltransferase 2beta splicing variants in hepatoma cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 281-91.
 52. Cabrero C, Puerta J, Alemany S. Purification and comparison of two forms of S-adenosyl-L-methionine synthetase from rat liver. *Eur J Biochem* 1987; 170: 299-304.
 53. Mingorance J, Alvarez L, Pajares MA, Mato JM. Recombinant rat liver S-adenosyl-L-methionine synthetase tetramers and dimers are in equilibrium. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 485-91.
 54. Alvarez L, Mingorance J, Pajares MA, Mato JM. Expression of rat liver S-adenosylmethionine synthetase in *Escherichia coli* results in two active oligomeric forms. *Biochem J* 1994; 301: 557-61.
 55. Halim AB, LeGros L, Geller A, Kotb M. Expression and functional interaction of the catalytic and regulatory subunits of human methionine adenosyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 29720-5.
 56. Kotb M, Geller AM. Methionine adenosyltransferase: structure and function. *Pharmacol Ther* 1993; 59:125-43.
 57. Lopez-Vara MC, Gasset M, Pajares MA. Refolding and characterization of rat liver methionine adenosyltransferase from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Prot Expr Purif* 2000; 19: 219-26.
 58. Gasset M, Alfonso C, Neira JL, Rivas G, Pajares MA. Equilibrium unfolding studies of the rat liver methionine adenosyltransferase III, a dimeric enzyme

The new levels of redox regulation of S-adenosylmethionine synthesis

- with intersubunit active sites. *Biochem J* 2002; 361: 307-15.
59. Gonzalez B, Pajares MA, Hermoso JA, *et al.* The crystal structure of tetrameric methionine adenosyltransferase from rat liver reveals the methionine-binding site. *J Mol Biol* 2000; 300: 363-75.
 60. Gonzalez B, Pajares MA, Hermoso JA, Guillerm D, Guillerm G, Sanz-Aparicio J. Crystal structures of methionine adenosyltransferase complexed with substrates and products reveal the methionine-ATP recognition and give insights into the catalytic mechanism. *J Mol Biol* 2003; 331: 407-16.
 61. Deigner HP, Mato JM, Pajares MA. Study of the rat liver S-adenosylmethionine synthetase active site with 8-azido ATP. *Biochem J* 1995; 308: 565-71.
 62. Sanchez-Perez GF, Gasset M, Calvete JJ, Pajares MA. Role of an intrasubunit disulfide in the association state of the cytosolic homo-oligomer methionine adenosyltransferase. *J Biol Chem* 2003; 278: 7285-93.
 63. Pajares MA, Corrales FJ, Ochoa P, Mato JM. The role of cysteine-150 in the structure and activity of rat liver S-adenosyl-L-methionine synthetase. *Biochem J* 1991; 274: 225-9.
 64. Mingorance J, Alvarez L, Sanchez-Gongora E, Mato JM, Pajares MA. Site-directed mutagenesis of rat liver S-adenosylmethionine synthetase. Identification of a cysteine residue critical for the oligomeric state. *Biochem J* 1996; 315: 761-6.
 65. Avila MA, Corrales FJ, Ruiz F, *et al.* Specific interaction of methionine adenosyltransferase with free radicals. *BioFactors* 1998; 8: 27-32.
 66. Martinez-Chantar ML, Pajares MA. Assignment of a single disulfide bridge in rat liver methionine adenosyltransferase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 132-7.
 67. Iloro I, Chehin R, Goni FM, Pajares MA, Arondo JL. Methionine adenosyltransferase alpha-helix structure unfolds at lower temperatures than beta-sheet: a 2D-IR study. *Biophys J* 2004; 86: 3951-8.
 68. Houry WA, Frishman D, Eckerskorn C, Lottspeich F, Hartl FU. Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* 1999; 402:147-54.
 69. Pajares MA, Pérez C. The relationship between human MAT1A mutations and disease: a folding and association problem? In: Walters EC, ed. *Protein Folding*. New York: Nova Science Publishers 2011; pp. 261-87.
 70. Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: A review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2011; 157C: 3-32.
 71. Chien YH, Abdenur JE, Baronio F, *et al.* Mudd's disease (MAT I/III deficiency): a survey of data for MAT1A homozygotes and compound heterozygotes. *Orphanet J Rare Dis* 2015; 10: 99.
 72. Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Levy HL, Chou JY. Dominant inheritance of isolated hypermethioninemia is associated with a mutation in the human methionine adenosyltransferase 1A gene. *Am J Human Genet* 1997; 60: 540-6.
 73. Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, *et al.* Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Human Genet* 2000; 66:347-55.
 74. Hazelwood S, Bernardini I, Shotelersuk V, *et al.* Normal brain myelination in a patient homozygous for a mutation that encodes a severely truncated methionine adenosyltransferase I/III. *Am J Human Genet* 1998; 75: 395-400.
 75. Gasso M, Rubio M, Varela G, *et al.* Effects of S-adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 25: 200-5.
 76. Corrales F, Gimenez A, Alvarez L, *et al.* S-adenosylmethionine treatment prevents carbon tetrachloride-induced S-adenosylmethionine synthetase inactivation and attenuates liver injury. *Hepatology* 1992; 16: 1022-7.
 77. Shafqat N, Muniz JR, Pilka ES, *et al.* Insight into S-adenosylmethionine biosynthesis from the crystal structures of the human methionine adenosyltransferase catalytic and regulatory subunits. *Biochem J* 2013; 452: 27-36.
 78. Murray B, Antonyuk SV, Marina A, *et al.* Structure and function study of the complex that synthesizes S-adenosylmethionine. *IUCrJ* 2014; 1: 240-9.
 79. Avila MA, Berasain C, Torres L, *et al.* Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000; 33: 907-14.
 80. Huang ZZ, Mato JM, Kanel G, Lu SC. Differential effect of thioacetamide on hepatic methionine adenosyltransferase expression in the rat. *Hepatology* 1999; 29: 1471-8.
 81. Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, *et al.* Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5560-5.
 82. Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Wilson WG, Leonard JV, Chou JY. Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *J Clin Invest* 1996; 98: 1021-7.
 83. Reytor E, Perez-Miguelanz J, Alvarez L, Perez-Sala D, Pajares MA. Conformational signals in the C-terminal domain of methionine adenosyltransferase I/III determine its nucleocytoplasmic distribution. *FASEB J* 2009; 23: 3347-60.
 84. Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 1991; 64: 615-23.

85. Sessler RJ, Noy N. A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II. *Mol Cell* 2005; 18: 343-53.
86. Turpin P, Ossareh-Nazari B, Dargemont C. Nuclear transport and transcriptional regulation. *FEBS Lett* 1999; 452: 82-6.
87. Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, *et al.* Methionine Adenosyltransferase II Serves as a Transcriptional Corepressor of Maf Oncoprotein. *Mol Cell* 2011; 41: 554-66.
88. Gibson BA, Kraus WL. Small molecules, big effects: a role for chromatin-localized metabolite biosynthesis in gene regulation. *Mol Cell* 2011; 41: 497-9.
89. Cabrero C, Duce AM, Ortiz P, Alemany S, Mato JM. Specific loss of the high-molecular-weight form of S-adenosyl-L-methionine synthetase in human liver cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8: 1530-4.
90. Stramentinoli G, Gualano M, Ideo G. Protective role of S-adenosyl-L-methionine on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 1431-3.
91. Friedel HA, Goa KL, Benfield P. S-adenosyl-L-methionine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in liver dysfunction and affective disorders in relation to its physiological role in cell metabolism. *Drugs* 1989; 38: 389-416.
92. Schnackenberg LK, Chen M, Sun J, *et al.* Evaluations of the trans-sulfuration pathway in multiple liver toxicity studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 235: 25-32.
93. Delgado M, Garrido F, Perez-Miguelanz J, *et al.* Acute liver injury induces nucleocytoplasmic redistribution of hepatic methionine metabolism enzymes. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20: 2541-54.
94. Baillie TA, Rettie AE. Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011; 26: 15-29.
95. Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, *et al.* Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab* 2014; 19: 780-94.
96. Gil B, Casado M, Pajares MA, *et al.* Differential expression pattern of S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes during rat liver development. *Hepatology* 1996; 24: 876-81.
97. Pajares MA, Alvarez L, Perez-Sala D. How are mammalian methionine adenosyltransferases regulated in the liver? A focus on redox stress. *FEBS Lett* 2013; 587: 1711-6.
98. Pajares MA, Corrales F, Duran C, Mato JM, Alvarez L. How is rat liver S-adenosylmethionine synthetase regulated? *FEBS Lett* 1992; 309: 1-4.



Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

Durante el segundo trimestre del año 2016 la Corporación realizó un total de dieciséis sesiones científicas, de las cuales tres fueron dedicadas a incorporaciones de Académicos, uno de Número y dos de Honor; una Sesión Necrológica; cuatro mesas redondas, seis conferencias y dos tertulias científicas. También tuvo lugar en nuestra sede la celebración del III Curso Avanzado sobre Obesidad. Además tuvieron lugar una serie de actos organizados en colaboración con diversas instituciones.

TOMAS DE POSESIÓN

El pasado 11 de abril, la RANF tuvo el honor de celebrar la Sesión Solemne de TOMA DE POSESIÓN COMO ACADÉMICO DE HONOR del Excmo. Sr. D. Michel C. Nussenzweig, M.D., Ph.D., de la Rockefeller University, New York quien leyó su discurso titulado "An Immunologist's View of the HIV Problem"; y fue presentado por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF.

El Dr. Nussenzweig nació en la ciudad de São Paulo, Brasil, hace 61 años y creció en Nueva York. Es en esta ciudad donde ha ejercido gran parte de su actividad científica, obteniendo primero el Bachelor in Arts (B.A) en 1975 por el New York University College of Arts and Sciences; el doctorado por la Rockefeller University en 1981 y el título de Doctor en Medicina por la New York University School of Medicine en 1982. Posteriormente entre 1982-1985 realizó como médico interno la residencia sobre enfermedades infecciosas en el Massachusetts General Hospital, seguido de una etapa Postdoctoral en el Department of Genetics del Harvard Medical School en Boston. Al culminar con gran éxito científico su etapa postdoctoral se incorpora a la Universidad Rockefeller y se le nombra primero como Assistant y Associate Professor entre 1990-1996, y del Howard Hughes Medical Institute, luego en 1996 es nombrado full Professor y desde 2013 como Zanvil Cohn and Ralph Steinman Professor de la Rockefeller University.

Su actividad investigadora se ha centrado fundamentalmente en entender los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan el sistema inmune, respuestas adaptativa e innata, aplicando estos conocimientos al tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y tumorales. De hecho el Dr. Nussenzweig es responsable del significado de la célula dendrítica (DC) en su presentación antigenica y de la función que tiene la célula B como productora de anticuerpos. Su trabajo es citado como pionero en la demostración de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro contra el VIH. Junto con Ralph Steinman, que obtuvo el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2011, abrió el campo de presentación antigenica por las células dendríticas, desde la captura de antígenos, a su procesamiento y presentación a los linfocitos T.

El Dr. Nussenzweig produjo el primer anticuerpo monoclonal específico por la célula dendrítica que ha sido esencial para clonar el primer receptor endocítico expresado por la célula dendrítica. Ha desarrollado métodos para llevar antígenos a la célula dendrítica, lo que le ha permitido descubrir aspectos sobre cómo se mantiene la tolerancia y cómo distintas poblaciones de células dendríticas tienen distintos procesamientos antigenicos. Además, el Dr. Nussenzweig resolvió el problema de cómo las DCs se relacionan y divergen de otras células mieloides incluyendo monocitos durante su desarrollo en la médula ósea. En reconocimiento de este trabajo, el Dr. Nussenzweig fue elegido para la conferencia que tenía que haber pronunciado el Dr. Steinman en el discurso del Premio Nobel en Suecia, pero que desgraciadamente falleció prematuramente. Junto con Phil Leder y utilizando ratones transgénicos demostró que los anticuerpos unidos a membrana regulan exclusión alélica y desarrollo linfocitario.

El Dr. Nussenzweig descubrió un intercambio de clase de anticuerpos y que este proceso de recombinación V(D)J activa la respuesta al daño del DNA, abriendo una nueva área en la biología de la célula B. Estableció la importancia de la doble rotura del DNA en el proceso de intercambio de clase de anticuerpos y que esta misma lesión puede resultar en translocaciones cromosómicas entre anticuerpos y el oncogen c-myc.

Su investigación en la formación de los anticuerpos desde los centros germinales le ha servido para encaminar sus investigaciones al desarrollo de vacunas. En los últimos años, los anticuerpos están jugando un papel importante como

agentes terapéuticos frente a procesos como inflamación y cáncer. Recientemente tuvimos la oportunidad en la RANF de celebrar una sesión sobre inmunoterapias en cáncer y de conocer cómo el uso de anticuerpos y de moléculas inhibidoras de los llamados "check-point inhibitors" pueden reducir e, incluso, eliminar el desarrollo tumoral en pacientes, algo que está revolucionado la medicina oncológica.

La investigación del Dr. Nussenzweig va dirigida al clonaje de los genes de anticuerpos a partir de una célula B, lo que le ha permitido definir cómo se desarrolla la tolerancia en individuos normales y posteriormente aplicarlo al problema del escape del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a los anticuerpos. Es en esta área donde la investigación del Dr. Nussenzweig está teniendo actualmente una gran repercusión global sobre el desarrollo de anticuerpos monoclonales muy potentes con amplio espectro de acción frente a los distintos aislados del VIH. Estos nuevos anticuerpos neutralizan el 95% de todos los aislados del VIH y los distintos subtipos. Ha establecido primero en modelos preclínicos de ratón humanizado y en monos que estos anticuerpos previenen y controlan la infección por VIH. De mayor repercusión es que estos anticuerpos controlan la infección por el VIH en personas infectadas, siendo seguros.

Actualmente, el Dr. Nussenzweig está extendiendo estas investigaciones en personas infectadas con la finalidad de entender a nivel funcional y molecular cómo estos anticuerpos ejercen su efecto en el organismo, duración y actividad frente al VIH. Además, pretende establecer protocolos que puedan eliminar los reservorios del VIH en el organismo, es decir "curar", palabra que ya no se considera una utopía si no alcanzable en el tiempo. De hecho la OMS ha propuesto el año 2030 como límite de tiempo para lograr la erradicación del VIH.

Los resultados de sus investigaciones representan más de 300 trabajos publicados en las mejores revistas científicas, como Nature, Science, Cell, Immunity, Journal Experimental Medicine, PNAS, Molecular Cell y otras. Como indicador de su producción científica resaltaré que actualmente tiene en prensa dos artículos en Science, uno en Nature y otro en Cell. Esta destacada trayectoria científica se ha traducido en numerosos honores y premios, entre otros muchos reconocimientos, Member of the National Academy of Sciences; Member of the American Society of Clinical Investigators; Member of the Institute of Medicine of the National Academies; Member of the Brazilian Academy of Sciences; Member of Association of American Physicians.

Ha participado como revisor en numerosos paneles del NIH, como miembro de varios comités científicos, y ha organizado varios congresos sobre células dendríticas y biología de las células B, los conocidos como Keystone Symposium y Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology. Además, es editor de varias revistas como Journal Experimental Medicine, Journal of Immunological Methods, LiFe, Advisory Editor of Nature Reviews Immunology and Editorial Committee of Annual Review of Immunology, y consultor de varias compañías de biotecnología.

El Prof. Mariano Esteban después de presentar resumidamente la trayectoria científica del Dr. Nussenzweig, entra a mencionar el lado más humano y entrañable de la persona. Como dice el refrán, "de tal palo tal astilla", así que no sorprende que la curiosidad científica en él venga de sus progenitores, los Dres. Ruth y Víctor Nussenzweig, dos afamados, universales e incansables investigadores que han trabajado en la New York University School of Medicine, hoy como Emeritus Professors, y han dedicado sus vidas al estudio de la malaria y su patógeno, el parásito Plasmodium. Ambos fueron los pioneros en demostrar que el antígeno del circumsporozoito, la proteína CS, tenía la capacidad de inducir respuestas inmunes humorales y celulares y de controlar el parásito en animales, lo que ha servido para que la primera vacuna humana frente a malaria sea aprobada en fechas próximas después de los ensayos clínicos de fase III llevados a cabo en África. Durante mi estancia en Nueva York como Profesor de la Facultad de Medicina Downstate Medical Center de SUNY, tuve la oportunidad de colaborar con Ruth en el desarrollo de vacunas frente a la malaria, demostrando en varias publicaciones conjuntas protocolos de inmunización combinada de vectores, llamados prime/boost, óptimos para activar las poblaciones de células T CD8+ y controlar la infección por Plasmodium. Estos protocolos están siendo ampliamente utilizados en muchos procesos de vacunación frente a distintos patógenos. Del matrimonio de los Dres. Ruth y Victor Nussenzweig nacieron tres hijos, Sonia, André, que trabaja en integridad genómica en el National Cancer Institute en Bethesda, y Michel, todos con vocación científica. Michel está casado con Svetlana, también científica y descubridora de una de las drogas "blockbusters" con mayor rentabilidad contra diabetes. Sus dos hijos, Philip de 25 años, estudiante de medicina, está trabajando sobre el proceso de edición génica CRISPR/CAS9, y Maya, de 23 años, es estudiante en salud pública.

Lo que más llama la atención cuando uno visita el laboratorio del Dr. Nussenzweig, como Jefe del Grupo de Inmunología Molecular, no es sólo que trabajan muchos investigadores, actualmente 50 mayoritariamente postdoctorales de varias nacionalidades, si no cómo tiene organizado el proceso de investigación traslacional, desde la investigación puramente básica a la aplicación clínica. Una vez que consiguen clonar e identificar un anticuerpo monoclonal de amplio espectro de acción frente al VIH y demostrar su eficacia en modelos animales, lo someten a su aplicación clínica en pacientes infectados por VIH dentro del propio sistema de laboratorios integrados en su departamento, donde como parte de un ensayo clínico terapéutico se trabaja desde la obtención de sangre periférica del paciente, a la transfusión de los anticuerpos monoclonales al paciente y seguimiento de la evolución del proceso terapéutico. De esta forma pueden hacer un seguimiento mucho más integrador y eficaz que cuando se hace en varios centros y hospitales.

Summary:

Combination anti-retroviral therapy (ART) suppresses viremia and extends the lifespan of infected individuals, but the daily burden of ART and its associated toxicities make HIV prevention and cure highly desirable. There are no vaccines and current therapies are not curative because they do not eliminate a pool of long-lived cells harboring immunologically silent but replication-competent proviruses—termed the latent reservoir. This reservoir is refractory to ART and, although not proven, is believed to be the source of viral rebound shortly after discontinuation of standard therapy. While many approaches ranging from gene therapy to immune modulation are being investigated, Dr. Nussenzweig will focus on the roles that broadly neutralizing antibodies (bNAbs) might play in prevention and therapy.

In the decades after HIV-1 was discovered, the identification of anti-HIV-1 bNAbs with extensive breadth and potency was difficult; however, technological advances in antibody cloning from single B-cells and micro-neutralization assays have led to the recent discovery of hundreds of naturally-arising bNAbs, referred to as "next-generation" bNAbs. Some of these bNAbs exhibit remarkable breadth and potency in vitro, and many of these bNAbs can prevent infection in animal models when passively administered at low doses before challenge. Therefore, it is widely believed that a vaccine that could elicit such antibodies would be protective against infection, and the development of such a vaccine remains an important goal. However, most next-generation bNAbs only arise after at least a year of active infection, and many show a number of unusual features, such as high levels of somatic hypermutation, long heavy-chain complementarity-determining region 3 regions, and restricted germline use. Together, these features suggest it will be difficult if not impossible to elicit bNAbs against HIV-1 by standard vaccine approaches. The uncertainties associated with a vaccine have led us, and others, to explore the use of bNAbs in passive transfer experiments for HIV-1 prevention, therapy, and eradication.

El 28 de abril la Real Academia Nacional de Farmacia tuvo el honor de celebrar la Sesión Solemne de Toma de Posesión como Académico de Número del Excmo. Sr. D. Sebastián Cerdán García-Esteller quien leyó su discurso "LA ERA DE LA IMAGEN" y fue contestado por la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto, Académica de Número de la RANF.

El Dr. Sebastián Cerdán García-Esteller es Doctor en Farmacia con Premio Extraordinario de Doctorado por la Universidad Complutense de Madrid, Profesor de Investigación del CSIC y responsable del Laboratorio de Imagen y Espectroscopía por Resonancia Magnética de Alto Campo (LIERM) del CSIC desde 1989. Su trayectoria científica contiene estancias postdoctorales en los Estados Unidos (Universidad de Pennsylvania, John E. Fogarty International Fellow 1980-4) y en Suiza (Biozentrum der Universität Basel, EMBO Long Term Fellow 1986-8). Es autor de ciento cincuenta artículos de investigación, más de doscientas comunicaciones a congresos y cinco patentes. Su objetivo científico general es el desarrollo y evaluación de nuevas aplicaciones biomédicas de la Resonancia Magnética. Entre sus contribuciones más relevantes destacan la caracterización de la interacción metabólica entre neuronas y células de glía en el cerebro adulto, el desarrollo de espectroscopías multinucleares para estudios metabólicos y más recientemente el desarrollo de nuevos abordajes para la caracterización de la obesidad mediante Espectroscopía e Imagen por Resonancia Magnética. En su vertiente de gestión ha sido Director del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC/UAM, Secretario de la Sociedad de Biofísica de España (1996-2002), Vocal y Presidente de la Sociedad Europea de Resonancia Magnética (1996-2000, 2004-10), miembro del Consejo Directivo de la Sociedad Internacional de Resonancia Magnética en Medicina (ISMRM), y Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia (2010). Actualmente, forma parte de paneles editoriales de revistas de difusión internacional de Resonancia Magnética Biomédica (NMR in Biomedicine), de Bioenergética Cerebral (Frontiers in Neuroenergetics), y Metabolismo Cerebral (Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism).

El discurso de ingreso del Prof. Cerdán, titulado "La era de la Imagen", aborda el papel de la imagen en la sociedad actual, incluyendo algunas consideraciones filosóficas. El discurso enfatiza el desarrollo de la imagen biomédica y su influencia en la medicina moderna. Comienza describiendo sus aspectos históricos, como el descubrimiento de la fotografía por Joseph Nicéphore Nièpce, el de los rayos X por Wilhelm Roentgen, el de la resonancia magnética por Isaac Isidor Rabi y el de la imagen PET por Gordon Brownell. Se describe la contribución de los veintidós Premios Nobel que han permitido avanzar la imagen hasta su desarrollo actual, constituyendo una verdadera "era de la imagen" en los siglos XX y XXI. Luego proporciona brevemente una descripción divulgativa de las características generales de las diversas modalidades de imagen, de sus fundamentos y de sus aplicaciones, incluyendo; las tecnologías PET y SPECT, la Tomografía Computerizada de Rayos X, la Imagen Óptica mediante Fluorescencia o Luminiscencia, los Ultrasonidos y la imagen por Resonancia Magnética. En todos estos casos, aborda el desarrollo de los agentes de contraste asociados, que han proporcionado la base para el desarrollo de la imagen molecular actual y sus recientes aplicaciones en la medicina molecular y personalizada. El discurso termina con epílogo, donde se plantean algunas avenidas para la evolución futura del campo de la imagen multimodal, incluyendo los abordajes más recientes de imagen híbrida integral.

El 11 de mayo se celebró la Sesión Solemne de Toma de Posesión como Académico de Honor del Excmo. Sr. D. Juan Carlos Izpisua Belmonte, Profesor en The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, USA quien pronunció su discurso titulado: "Trasplante de Órganos y Células Madre: ¿Realidad o Quimera?". Fue presentado por el Académico de Número de la RANF, Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón.

Cada año decenas de miles de personas en el mundo pueden vivir gracias a un trasplante de órgano. No obstante, aunque el conocimiento médico para la realización de trasplantes ha aumentando exponencialmente, el número de personas

donantes sigue siendo insuficiente. Una manera de resolver este problema es tratar de desarrollar estrategias para desarrollar órganos en el laboratorio. Durante la última década, y mediante diferentes condiciones de cultivo, se han podido obtener y mantener *in vitro* un variado espectro de células pluripotentes cuyas capacidades se asemejan a las células pluripotentes embrionarias. Las distintas características espacio-temporales de estas células en cultivo proporcionan unas herramientas sin precedentes para el estudio de la diferenciación celular y la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario humano. El descubrimiento reciente sobre la capacidad de algunos tipos de células madre para traspasar barreras entre diferentes especies animales y formar tejidos y órganos quiméricos entre especies evolutivamente distantes, incluyendo humanos, junto al desarrollo de tecnologías para la eficiente edición del genoma en zigotos, puede abrir nuevas fronteras en la medicina regenerativa. Entre ellas, el descubrimiento de nuevos fármacos, una mejor comprensión de la enfermedad y la posibilidad, aunque aún lejana, de generar órganos humanos en animales aptos para su trasplante en humanos.

SESIÓN NECROLÓGICA

El pasado 12 de mayo, se celebró en nuestra Sede una Sesión Necrológica en memoria del Académico Numerario, en la Medalla 35, Excmo. Sr. D. Nicolás Víctor Jiménez Torres, en la que intervinieron los Académicos de Número de la RANF: Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal: "Víctor Jiménez Torres: su labor como Académico"; el Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón: "Víctor Jiménez Torres: compañero, amigo y maestro"; quien inicio su intervención señalando que conoció a Víctor cuando se incorporó a la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia en el año 1979. Sigue su intervención con las palabras: nuestra relación fue intensa sobre todo durante los años 1980 y 1981, dado que coincidieron con mi incorporación a la Facultad y el nombramiento como Decano de la Facultad. Víctor fue un excelente amigo y compañero en buscar soluciones de los múltiples problemas que nos encontramos en una nueva Facultad y en un edificio viejo que sé rehabilitaba como centro docente. A partir del año 1981 y hasta 1989 Víctor se dedicó fundamentalmente a su labor asistencial como jefe del servicio de Farmacia del Hospital Dr. Peset de Valencia. Sin embargo nuestra relación se recuperó plenamente en 1989 cuando obtuvo la plaza de Catedrático de Biofarmacia y Farmacocinética del Departamento de Farmacia Galénica. Yo conocí su buen hacer tanto en la Cátedra como en el Hospital pero me van a permitir que sean sus colaboras más próximas tanto en la Facultad (Dra. Matilde Merino) como en el Hospital (Dra. Mónica Climente) las que me presten sus palabras.

La Dra. Merino, Catedrática del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica escribe: La participación de Víctor en la formación de farmacéuticos fue extremadamente dilatada, generosa, desprendida y altruista, ya que haciendo eco del significado UNIVERSAL de la Universidad difundió y compartió sus conocimientos de forma sistemática a través de distintos foros de debate organizados desde la Universidad. Una de sus mayores preocupaciones como enseñante estuvo centrada en potenciar el binomio UNIVERSIDAD-HOSPITAL.

La Dra. Mónica Climente, Profesora asociada asistencial y Jefe del servicio de Farmacia del Hospital Dr. Peset de Valencia comenta:

Víctor ha sido para muchas generaciones de farmacéuticos un referente, una figura singular que ha contribuido con su visión y logros profesionales a ese cambio de mirada sobre nuestra profesión, orientándola, definitivamente, hacia el paciente. Víctor manifestó siempre su orgullo por lo que es y significa ser farmacéutico y formador de farmacéuticos.

Excmo. Sr. D. Ángel María Villar del Fresno "Víctor Jiménez Torres: profesor universitario". Comentó que: Conocí a Víctor en la Universidad de Valencia en 1976. Era profesor de Química Inorgánica y Secretario de la Facultad. Fui el primer Catedrático de la Facultad y los que hemos vivido esa experiencia no se nos puede olvidar lo que fue una Facultad de Farmacia, de nueva creación. En ese contexto, Víctor Jiménez fue un profesor altamente cualificado con gran tesón, inteligencia y capacidad. Docente que supo en todo momento adaptarse y adoptar las nuevas circunstancias. Aplicó sus conocimientos de Química al desarrollo Clínico en el Hospital y su reciente experiencia hospitalaria, a la adecuación de las enseñanzas en la Facultad. Sus líneas de investigación y de docencia, son un paradigma de interprofesionalidad. La primera de estas líneas lo constituye la nutrición artificial, una actividad de gran prevalencia en el hospital y para lo que le sirvieron de base sus profundos conocimientos de Química, siendo estos de gran utilidad en su ejercicio de Farmacia Hospitalaria. La segunda línea de investigación y de docencia, se ha centrado en el establecimiento de directrices fármaco-terapéuticas a través de la Farmacocinética Clínica y Poblacional, con el objeto de diseñar pautas posológicas individualizadas. Una de sus preocupaciones fue la Seguridad del Paciente desde la perspectiva de la Calidad Farmacoterapéutica que constituye su tercera línea de investigación proyectada también a la docencia La cuarta línea, que mide su calidad profesional y humana se ha ocupado de la Racionalización del Uso de Fármacos Antineoplásicos por la variabilidad de la respuesta del paciente y el estrecho margen terapéutico de estos fármacos. Se ha perdido a un gran hombre, pero sus escritos, enseñanzas, reflexiones y ejemplo perdurarán siempre.

Palabras del Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé "Víctor Jiménez Torres: farmacéutico de hospital". Desde los ya lejanos tiempos de estudiante, mi vida profesional ha estado muy próxima a la del Dr. Jiménez Torres. Le conocí en Octubre de 1962, hace ya más de medio siglo, cuando me incorporé a la Universidad de Santiago de Compostela para iniciar los estudios de Farmacia. Allí, en el claustro del Caserón de Fonseca, donde termina el más largo camino de la vieja Europa cambiamos nuestras primeras impresiones. Víctor formaba parte de un grupo de alumnos destacados que era para

nosotros un referente en la iniciación del estudio de las Ciencias Farmacéuticas. Finalizada la licenciatura y el doctorado nuestras carreras profesionales siguieron caminos paralelos en Valencia y Salamanca. Víctor se entregó, con entusiasmo, a la formación de profesionales y a la investigación en diferentes áreas de la terapéutica farmacológica. Víctor Jiménez Torres es una figura insigne para los farmacéuticos de hospitales españoles por su actividad docente, investigadora y asistencial desarrollada en el Hospital Doctor Peset y en la Universidad de Valencia. Además ha sido uno de los más destacados Presidentes de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria que acaba de cumplir 60 años desde su fundación. Víctor Jiménez Torres fue capaz de crear un grupo de trabajo que abordó la innovación y la interprofesionalidad en la Farmacia Hospitalaria. Así fue reconocido por diferentes instituciones como la International Oncology Pharmacy Practice al concederle el Premio ISOPP 2004 por sus trabajos en el campo de la terapéutica oncológica. En el mismo sentido debe destacarse el reconocimiento del Journal Hospital Pharmacy al citarlo entre los más destacados farmacéuticos de hospital europeos en 2006. El Prof. Jiménez Torres ingresó en 2007 en la Real Academia Nacional de Farmacia. En su discurso de ingreso descubre las principales estrategias dirigidas a mejorar la calidad de la terapéutica farmacológica. Tanto las dirigidas a mejorar la efectividad clínica, como la adherencia o la seguridad del paciente. Para ello recurrió a incorporar herramientas como la farmacocinética poblacional, la farmacogenética o la gestión de riesgos. Apostó decididamente por la práctica de la Medicina traslacional en la mejora de la Salud Pública. En la era de la Medicina de precisión, la figura de Víctor Jiménez Torres se incorpora a la lista de los más destacados profesionales sanitarios en favor de producir mejoras en la seguridad del paciente. No quisiera finalizar mi intervención sin hacer una cariñosa referencia a la familia del Profesor Jiménez Torres que nos acompaña en este acto y especialmente a su esposa Isabel. Debéis sentirnos orgullosos de haber estado al lado de un científico ilustre, profesional comprometido, gran docente, amigo entrañable y ejemplo a seguir para los jóvenes farmacéuticos que inician su vida profesional.

Clausuró el acto el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF.

MESAS REDONDAS

El 21 de abril la Real Academia Nacional de Farmacia en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF celebraron la MESA REDONDA SOBRE EL BALNEARIO DE SAN NICOLÁS (ALMERÍA) con las ponencias de los Dres.: María Roser Botey: "El clima del Balneario de San Nicolás"; Dr. Juan Antonio López Geta, Dr. Antonio Ramírez Ortega, y Dr. Durán "Estudio Hidrogeológico de las aguas del Balneario".

El Balneario de San Nicolás se ubica en la localidad de Alhama de Almería, en la falda norte de la Sierra de Gádor, provincia de Almería, sureste de España. Constituye un Balneario de aguas calientes de larga tradición histórica, como evidencian algunos de los restos árabes hallados en las instalaciones. El suministro de agua a los baños, provenía, originalmente, de un manantial, que, en el año 1552, desapareció como consecuencia de un importante terremoto cuyo epicentro se encontró cercano a la población y que causó importantes efectos en la provincia de Almería. En la actualidad, las aguas proceden de tres captaciones verticales situadas en el interior de una galería horizontal, que perfora las rocas carbonáticas del Trías alpujarride aflorantes en el monte Milano, en cuyas faldas septentrionales y orientales se desarrolla la población de Alhama. Hacia el valle del cercano río Andarax existen una serie de extensas plataformas travertínicas, relacionadas con el paleodrenaje natural de las aguas que alimentan los baños y de otros manantiales cercanos, alineados a lo largo de dos fallas normales de dirección N75°E y N105°E, que limitan el acuífero carbonático de la sierra de Gádor con los sedimentos mio-cuaternarios que rellenan la Depresión del Andarax. Este acuífero es explotado mediante sondeos profundos en diferentes lugares de la sierra, en un entorno relativamente cercano al balneario, con el nivel freático actual a más de cien metros por debajo de la superficie. Las aguas captadas y utilizadas por el balneario, presentan una temperatura que superan los 40° C, con una composición química, según los análisis disponibles, que ponen en evidencia una modesta mineralización, facies bicarbonatada-sulfatada y cierta radioactividad. Estas características han hecho que fueran reconocidas como aguas minero-medicinales por primera vez en la Gaceta de Madrid de 26 de abril de 1928 (Decreto-Ley 743/28). La causa de estas características físico-químicas de las aguas está relacionada, por un lado, con la actividad reciente de la falla distensiva sobre la que se sitúa el lugar original de emergencia, que facilita el ascenso de aguas profundas hacia la superficie, con un gradiente geotérmico superior al normal, evidenciado por el alto contenido en SiO₂, del orden de los 24 mg/l. Por otro lado, la presencia, en la serie estratigráfica alpujarride de intercalaciones yesíferas, permite explicar el contenido en sulfatos, más elevado que el habitual en otros acuíferos carbonáticos.

El Académico y profesor D. Antonio López Lafuente intervino con el título: "Características generales de los suelos circundantes al Balneario"; la Dra. Dña. Carmen de las Heras Iñiguez y Dra. M^a Antonia Simón Arauzo: sobre: "Análisis de la Radiactividad en las aguas del Balneario".

En el estudio de la radiactividad en las aguas del balneario de San Nicolás en Alhama de Almería, se han tomado muestras en los puntos de surgencia de Sillero, San Mateo y Alsina. Se ha analizado la actividad de los isótopos pertenecientes a las series naturales del ²³⁸U, ²³⁵U y ²³²Th, y los de origen cosmogénico ⁴⁰K y tritio. En una primera aproximación se determinaron los índices de actividad alfa total, beta total y la concentración de Rn-222, posteriormente se han analizado los isótopos más característicos de las distintas series. Como puede observarse en la tabla 1, en los tres puntos de surgencia, los índices de actividad alfa y beta total son altos en relación con los que se establecen para las aguas de consumo (1 y 0,1 Bq/L respectivamente). Según el Vademécum de las aguas mineromedicinales españolas, estas se

clasifican como aguas radiactivas cuando contienen más de 67,3 Bq/L de 222Rn, por lo que estas aguas no se considerarían como tales. El análisis de isótopos del radio, uranio y torio, sugieren que los altos niveles de actividad alfa total se deben a la contribución de los isótopos de las tres series naturales, pero sobre todo de la serie del U-238 por los altos niveles detectados de 226Ra y 210Po. Y finalmente, D. José María Morcillo. Propietario del Balneario disertó sobre: "Estudio de la acción terapéutica de las aguas del Balneario".

El día 19 de mayo la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares Gil, de amigos de la RANF tuvieron el honor de celebrar la Mesa Redonda sobre: "Polen y Polinosis: Botánica, Aerobiología, Epidemiología y Relevancia Clínica". El Coordinador fue el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y la Presentación corrió a cargo del Ilmo. Sr. D. Daniel P. de la Cruz Sánchez Mata, Académico Correspondiente de la RANF. Actuaron como ponentes los Dres.: Patricia Cervigón Morales, Coordinadora de la Red Palinológica de la Comunidad de Madrid-RED PALINOCAM y Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid con su conferencia titulada "El polen como diáspora aerovagante: Aerobiología"

Para conocer mejor la variación estacional de las concentraciones polínicas es necesario conocer SUS CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS: origen del grano de polen, formación en las anteras, así como y SU AEROBIOLOGÍA: los procesos de emisión, dispersión y comportamiento en la atmósfera como partícula aerovagante. Las concentraciones de polen dependen fundamentalmente de 2 aspectos: Emisión. El polen en la atmósfera procede de depender las plantas anemófilas, aquellas cuya dispersión del polen se hace a través del aire y que producen gran cantidad de polen. La cantidad de polen dependerá de características botánicas propias de cada especie, de su fenología y la floración anual, lo que está condicionado a su vez por las condiciones meteorológicas de cada estación.

Dispersión. El grano de polen tiene un comportamiento en la atmósfera variable según las condiciones meteorológicas de cada momento; y éste se explicaría con modelos de dispersión y dinámica atmosférica. Una vez conocido los datos de las muestras de las concentraciones de polen es de gran importancia el poder realizar pronósticos y previsiones de las concentraciones diarias esperadas y del inicio de los períodos de polinización por otro. La utilización de predicción de las concentraciones diarias de polen debe ser una herramienta más a la hora de dar información aerobiológica. Se emplean diversos modelos de predicción basados en las propias series de polen, los factores meteorológicos y las predicciones meteorológicas. Los modelos empleados son:

- Modelos estadísticos basados en las series de polen
- Modelos estadísticos complejos basados en las series de polen y en las series meteorológicas.
- Modelos geoestadísticos que utilizan las series de polen y sistemas de información geográfica
- Modelos de dispersión y de dinámica atmosférica

En Madrid la Red PalinoCAM que comenzó a generar datos en 1994, y fue la primera red en España que se desarrolló inserta en una estrategia de Salud Pública. Además de su utilidad en estudios ambientales, fenológicos y aerobiológicos tiene varios fines, uno de los cuales es la difusión de la información. Esta difusión cumple un doble objetivo en el caso de los alérgicos: información y posibilidad de adopción de medidas preventivas, cuando procede. Por tanto, la vocación de la salud pública, en relación a la vigilancia aerobiológica, es poner la información que genera a disposición de dos sectores fundamentales, que son: 1. El Sistema sanitario asistencial para que conozca de primera mano si se está produciendo impacto en la salud poblacional con los valores de polen ambiental existentes en cada momento. 2. La población diana, los pacientes afectados de polinosis, que deben conocer dichas concentraciones polínicas para adoptar las medidas individuales necesarias.

Todo ello a través del establecimiento de niveles de polen en cada época del año y región peninsular: 4 niveles siguiendo las líneas generales de la Red Española de Aerobiología y la Asociación Internacional de Aerobiología, adaptándose en cada lugar a las series de polen locales, establecidas según criterios aerobiológicos. Por lo que es importante: 1). Categorización de tipos polínicos teniendo en cuenta la alergenidad de cada uno de ellos, considerando la mayor o menor incidencia en la población alérgica, y en base a los datos de prevalencia epidemiológica. 2). Identificación de la población de riesgo y colectivos especiales. La población especialmente sensible es aquella: a. Con asma alérgico diagnosticado, b. Con Polinosis Rinitis/riñoconjuntivitis. c. Con patologías respiratorias previas. Las redes aerobiológicas han demostrado ser una herramienta útil en salud pública de incuestionable interés para las administraciones sanitarias y la población general. 3). La información aerobiológica acumulada y generada tiene una utilidad demostrada en campos medioambientales, en estudios fenológicos, agroalimentarios, y debe ser enmarcada en este contexto. 4). Deben aunarse esfuerzos para que ambas, redes e información aerobiológica formen parte de las actuaciones sanitarias, medioambientales y en las futuras estrategias que se lleven a cabo en esta dirección.

El Dr. Ángel Javier Moral de Gregorio, Médico Adjunto del Servicio de Alergología del Hospital Virgen del Valle (Toledo) y Presidente del Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica, con su conferencia titulada: "Polinosis: Epidemiología y Relevancia Clínica"

Las enfermedades alérgicas en España afectan a un 33% de la población, por lo que sobre una población de 48 millones de españoles, estaríamos hablando de una patología que afecta a 16 millones. Entre los alérgicos aproximadamente la mitad van a serlo a los pólenes de plantas, por tanto unos 8 millones de españoles. En España las plantas más alergénicas en orden decreciente son: gramíneas (primavera), olivo (primavera), cupresáceas (invierno), quenopodiáceas (verano), plátano de sombra (primavera temprana) y parietaria (primavera y verano). En determinadas zonas geográficas pueden ser importantes

otros pólenes como la palmera en el levante ibérico o el abedul en Galicia. Existe una relación directa entre las precipitaciones del otoño e invierno y los recuentos de pólenes de gramíneas durante la primavera siguiente. La recopilación de estos datos, junto con otros factores climatológicos como la temperatura y la humedad, permite establecer unos modelos predictivos del nivel de intensidad de la primavera, en diferentes zonas geográficas. Atendiendo al número de gramíneas anuales recogido, podemos clasificar una primavera como: leve (menos de 4.000 granos/m³), moderada (4.000-6.000 granos/m³) o intensa (más de 6.000 granos /m³). Las zonas geográficas con mayores niveles de pólenes de gramíneas son Extremadura y Andalucía. El aumento en las temperaturas y otros efectos del cambio climático, está dando como resultado un adelanto en la floración de las plantas alergénicas y como consecuencia un aumento del periodo de polinización, lo que ocasiona un aumento de la exposición a los pólenes; si a esto se suma el incremento polínico inducido por los gases con efecto invernadero y los efectos de la contaminación sobre la alergenidad de los pólenes, no son buenas noticias para la población implicada en España.

El 9 de junio La Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación José Casares-Gil celebraron la MESA REDONDA titulada: "Educación-Investigación para el futuro : La Academia Joven de España". Presentada por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF y con la presencia de la Secretaria de Estado de I+D+i, Dña. Carmen Vela, la Sesión fue coordinada por la Excma. Sra. Dña. Ana María Pascual-Leone Pascual, Académica de Número de la RANF: "Academia Joven de España :Presente y Futuro".

Actuaron como ponentes: el Excmo. Sr. D. David Ríos Insúa: "El mecanismo de asesoría científica y las Academias Jóvenes", el Prof. Dr. Javier Martínez Moguerza: "Academia Joven: Mundial y Nacional" y el Prof. Dr. Juan Antonio Gabaldón Estevan: "La Academia Joven de Europa". Se trata de exponer y difundir el contenido de la posible Academia Joven de España (AJE) y todas las cuestiones que justifican y avalan su creación. Y también de la Global Academia Joven Mundial (GYA) , ya creada en 2010 en Berlín , que soportaría y englobaría a la AJE. Existen seis jóvenes españoles de excelencia cultural que pertenecen a la GYA, de los cuales se dará conocimiento de su extracto biográfico y curricular. Dos de ellos intervienen como ponentes en la Mesa Redonda. También actúan la coordinadora de la Mesa Dra. Dña. A.M. Pascual-Leone y el Dr. D. David Ríos. Ambos Académicos de Número respectivamente de la RANF y de la Academia de Ciencias. Como todas las sesiones, esta de igual modo fue retransmitida en directo por la web de la RANF.

El 28 de junio la Real Academia Nacional de Farmacia y la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria celebraron la Mesa Redonda: ESTANDARIZACIÓN DE DOSIS DE ANTINEOPLÁSICOS PARENTERALES EN ONCOLOGÍA: MODELOS Y BENEFICIOS. Presidida por el Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez, quien dio la palabra primero al Coordinador Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas, Secretario de la RANF posteriormente al Dr. Miguel Ángel Calleja. Jefe de Servicio de Farmacia Hospitalaria, del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada; y Presidente Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, y posteriormente al Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil, quien pronunció unas palabras en homenaje al Académico fallecido D. Nicolás Víctor Jiménez Torres. Actuó como moderadora la Dra. Mónica Climente Martí, Jefa de Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Dr. Peset.

Palabras de presentación del Coordinador Académico D. Bartolomé Ribas Ozonas, en la Sesión conjunta RANF con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, del martes, 28 junio 2016. Excmo. S. Presidente de la RANF Mariano Esteban Rodríguez. Presidente de la Soc. Esp. de Fa. Hosp. Miguel Ángel Calleja. Excmas. Sras y Sres. Académicos. Moderadora de la Sesión es la Dra. Mónica Climente Martí. Sras y Sres. miembros de la SEFH. Sras y Sres. Agradezco al Presidente y a la Junta de Gobierno haberme elegido como Coordinador de esta Jornada; y mis primeras palabras son para recordar a nuestro entrañable compañero y buen amigo Académico D. Nicolás Víctor Jiménez Torres, quien debiera estar aquí en mi lugar, ausente por su inesperado fallecimiento, "que esté en la paz del Señor". Tenemos el gusto en la Real Academia Nacional de Farmacia de reunir en esta Sesión especialistas de primera fila, que nos hablarán sobre **"Estandarización de dosis de antineoplásicos parenterales en oncología: modelos y beneficios"**.

El buen funcionamiento del Sistema Nacional de Salud en España, ha proporcionado una mayor esperanza de vida, descenso de la mortalidad, disponibilidad de medicamentos, la higiene y la actividad social y sanitaria, nos ha llevado al **envejecimiento de la población**, lo que nos atañe a todos a una *dispensación del medicamento en la Farmacia social y sanitaria. Es esencial un enfoque y programa integral de la Sanidad y no separar lo social de lo sanitario.*

Y por otra parte tendremos que hacer frente a una nueva situación social: (como la de Alemania), causada por la **avalancha de refugiados, 5 millones en la U.E., lo que significa una carga social y sanitaria para Europa**. Lo que incide en los farmacéuticos de Hospital, de Ambulatorio, de Atención primaria y Comunitaria, y también de Oficina de Farmacia, más allá del marco específico de cada uno de nosotros. Puede significar un cambio sanitario radical que se nos avecina. Tenemos que ser realistas: dos palabras clave: "**formación y trabajo**", para dispensar los medicamentos y conocer su uso, y efectos secundarios, con seguridad, responsabilidad y eficacia. Trabajar en colaboración y derribar barreras, según el Documento 2009, sobre el concepto integrador en conjunción y cooperación de todos los eslabones sanitarios, **en beneficio del paciente**, y no en compartimentos estancos.

Futuro del farmacéutico.

Voces predictivas en las Naciones Unidas han manifestado que para el año 2030 se necesitarán 40 millones de nuevos empleos. Según Ban Ki Moon, Secretario General de las N.U. ha señalado que FRANCIA y SUDÁFRICA **como banco de**

prueba, tienen que invertir en recursos humanos. Estas iniciativas sirven como modelos educativos, de cómo debe avanzar la profesión farmacéutica, como nuevo perfil de trabajo del farmacéutico. No quedarse quieto, aplicando el refrán de “**quien se para retrocede**”.

El ámbito farmacéutico constituye una masa crítica de educadores para el objetivo común **formación**, necesaria e imprescindible para el futuro farmacéutico, no podemos perder el tren de la **futura profesión farmacéutica**. El farmacéutico debe estar presente y formar parte del eje de la Investigación traslacional: desde el **científico, el médico** de atención primaria al **paciente**. Un nuevo modelo del farmacéutico asistencial, para cada uno de nosotros y a nivel colectivo.

Se diseña un modelo educativo del farmacéutico de atención domiciliaria para el futuro. Del Hospital al domicilio; y del ambulatorio al domicilio. Ampliar el Sistema Nacional de Salud, uno de los mejores del mundo, y dentro de éste el Sistema de Farmacia, como disertó recientemente en esta Real Academia Nacional de Farmacia, la Académica Dña. Carmen Peña López, Presidenta de la Federación Internacional de Farmacéuticos,

La Farmacia Hospitalaria es una de las salidas más sobresalientes, sino la de mayor prestigio para los farmacéuticos. Co-responsable de que del nacimiento en el día de hoy, de 2 bebés, uno de ellos llegará a los 100 años. El mayor azote, la enfermedad cardiovascular ha disminuido de forma manifiesta. El 55 % de las estancias hospitalarias son de mayores y ancianos, con el 70% del gasto sanitario y prestaciones sociales y sanitarias. España es el 5º país de mayor porcentaje de población anciana, detrás de Japón y otros países orientales.

En España existen 22.000 Oficinas de Farmacia, con 45.000 farmacéuticos con una extraordinaria capacidad de aconsejar y formar a los 3 millones de visitas diarias de la población española. Tarea que esta Real Acad. Nal. de Farmacia realiza de la mano de la Académica Dña. María Cascales Angosto, iniciadora de los cursos de Obesidad (hace tres años); y de Anticonceptivos iniciado este año; y un tercero en cierres por el que les habla sobre Fertilidad y regeneración de tejidos, en conexión con la Cátedra Pedro Guillén de Medicina Regenerativa. Porque ante el inquietante descenso de natalidad y crecimiento de la población anciana pues nuestros mayores viven más, y justificado por los trabajos de nuestra eminente investigadora española María Blasco, reflejadas en su libro “Morir joven, a los 140”, se hace imprescindible aconsejar, formar y promover en el crecimiento de la natalidad en España, para que el relevo generacional se cumpla.

Los tiempos han cambiado siempre, hay que ser valientes y hacerles frente, pero más ahora y debemos estar preparados. Es la *integración de los inmigrantes, el modelo de sociedad en libertad para el “homo sapiens”, lo que está en juego*, y conservar nuestro sistema democrático. Una de las tareas cotidianas es el paciente con cáncer que requiere una colaboración conjunta de profesionales sanitarios, es decir “multidisciplinariedad”, lo que se recoge en la estrategia del cáncer del S:N:S. Y el farmacéutico contribuye en el equipo multidisciplinar en conseguir un tratamiento seguro y eficiente.

Es bien conocido que en la totalidad de los Hospitales con Servicios de Oncología, los farmacéuticos dedicados a esta actividad de forma exclusiva, son ayudados por el Grupo de Farmacia Oncológica de la Soc. Esp. de Farm. Hospitalaria (GEDEFO), constituyen un eslabón indispensable en la atención a los pacientes. Según el BOARD CERTIFIED ONCOLOGY PHARMACIST (BCOP) España tras EE.UU. ocupa el segundo lugar con profesionales con la acreditación de farmacéuticos expertos en oncología.

Finalmente, este admirable afán de superación continua, del farmacéutico de Hospital, va en beneficio del paciente, su curación, eficacia del tratamiento y calidad de vida, ligadas a medicamentos de alto riesgo, como son los fármacos antineoplásicos. La idoneidad de esta mesa redonda, se desarrolló en beneficio del paciente, su seguridad, y eficacia de los tratamientos. Se expresaron las diversas facetas del buen y encomiable trabajo que realizan los farmacéuticos de Hospital en la posología y tratamiento del **paciente oncológico**, y por ello se felicitó al Presidente de la SEFH, a su Junta Directiva y a la moderadora, por la elección de los temas, y se agradeció la presencia de todos.

Palabras del Académico D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, sobre el trabajo de organización y trayectoria del Académico D. Nicolás Víctor Jiménez Torres en la SEFH. Al Aceptar la propuesta de nuestra Corporación para participar en este acto de reconocimiento público a la figura del Excmo. Sr. D. Víctor Jiménez Torres ha sido, para mí, más que un compromiso en mi actividad como Académico, una responsabilidad que acepté con el respeto que merece nuestro compañero Víctor, desaparecido de forma inesperada.

Son varias las razones que justifican mi presencia en este acto. Conocí Víctor Jiménez Torres en Octubre de 1962, hace más de 50 años, cuando coincidimos en el caserón de Fonseca, allí donde termina el más largo de los caminos de la vieja Europa. En la Universidad de Santiago realizamos la Tesis Doctoral e iniciamos unas carreras profesionales paralelas comprometidas con la Farmacia Hospitalaria.

Víctor Jiménez Torres es una figura insigne para los farmacéuticos de hospitales españoles por su actividad docente, investigadora y asistencial desarrollada en el Hospital Doctor Peset y en la Universidad de Valencia. Además ha sido uno de los más destacados Presidentes de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria que acaba de cumplir 60 años desde su fundación. Durante su presidencia (1985-1987) se dio un gran impulso a las actividades de la SEFH destacando la creación de grupos de trabajo en áreas especializadas como nutrición artificial, farmacovigilancia, oncología, etc. y un apoyo decidido por la docencia. En este aspecto Víctor Jiménez Torres quiso fortalecer la relación con los departamentos universitarios para dar un impulso a la actividad asistencial. Me gustaría destacar dos hechos muy relevantes que se producen en este periodo: la concesión de los primeros títulos de especialistas en farmacia hospitalaria y la integración de

nuestra Sociedad en la Asociación Europea de Farmacéuticos de Hospital.

Para Gary Aamel, uno de los grandes expertos en gestión de recursos, "*la tarea más importante para cualquier gestor del conocimiento consiste en crear un ambiente de trabajo que inspire una contribución excepcional que justifique un flujo de pasión, imaginación e iniciativa*". Este es sin duda una de las grandes cualidades de nuestro compañero Víctor que supo transmitir a sus discípulos para crear un grupo de trabajo que abordó la innovación y la interprofesionalidad en la Farmacia Hospitalaria. Así fue reconocido por diferentes instituciones como la *International Oncology Pharmacy Practice* al concederle el Premio ISOPP 2004 por sus trabajos en el campo de la terapéutica oncológica. En el mismo sentido debe destacarse el reconocimiento del *Journal Hospital Pharmacy* al citarle entre los más destacados farmacéuticos de hospital europeos en 2006.

La vinculación de los servicios de farmacia hospitalaria a las universidades llevó un soplo de aire fresco a la formación de los estudiantes de farmacia. Por primera vez los alumnos de los últimos cursos de la licenciatura conocían las actividades clínicas que desarrollaban los farmacéuticos en los hospitales españoles. El Dr. Jiménez Torres les trasmítia los logros alcanzados en nutrición artificial, en la optimización de los regímenes de dosificación de medicamentos, en los programas de farmacovigilancia, etc. En las unidades de pacientes externos se avanzaba en la relación farmacéutico-paciente y se desarrollaban programas para mejorar la adherencia a los tratamientos y reducir su toxicidad en patologías como el cáncer, la infección por el VIH o la hepatitis C.

La enseñanza de estas actividades desarrolladas en los últimos 40 años en los hospitales españoles adquieren ahora gran importancia cuando se trata de potenciar las actividades asistenciales de los farmacéuticos comunitarios. La formación de calidad, es la clave precisa para dar la adecuada respuesta a las demandas que nos exige la sociedad a los farmacéuticos en el cuidado de la salud. El Dr. Jiménez Torres tuvo la habilidad para incorporarse en equipos interprofesionales con médicos y enfermeras. De esta forma el farmacéutico puede aportar sus conocimientos en terapéutica para mejorar la calidad de los tratamientos y adquiere corresponsabilidad en la toma de las decisiones clínicas. Los equipos de fluidoterapia, nutrición artificial y oncología son algunos ejemplos representativos de esta actividad.

En su discurso de ingreso en esta Real Academia Nacional de Farmacia el 21 de noviembre de 2007, el Dr. Jiménez Torres señalaba "*la variabilidad en la práctica asistencial ha sido analizada desde la utilización de los servicios de salud de manera que cualquier actuación que mejore la calidad de los tratamientos farmacológicos debe focalizarse hacia aquellos con mayor umbral de incertidumbre y poner en evidencia el valor añadido a las propuestas disponibles*". Este comentario expresa el interés del Dr. Jiménez Torres al desarrollar estrategias dirigidas a mejorar la calidad de la terapéutica farmacológica. Tanto las dirigidas a mejorar la efectividad clínica, como la adherencia o la seguridad del paciente. Para ello recurrió a incorporar herramientas como la farmacocinética poblacional, la farmacogenética o la gestión de riesgos. Apostó decididamente por la práctica de la Medicina Traslacional a la mejora de la Salud Pública.

En la era de la Medicina de Precisión, la figura de Víctor Jiménez Torres se incorpora a la lista de los más destacados profesionales sanitarios en favor de producir mejoras en la seguridad del paciente. Como señala en el prólogo de su libro Calidad Farmacoterapéutica, publicado en 2006, "*representamos aquí una visión interdisciplinar sobre la mejora continua en el proceso de atención al paciente en el que se incluyen conceptos, métodos y sistemas de identificación de pacientes con morbilidad farmacoterapéutica prevenible*". Los acontecimientos adversos prevenibles comprometen la calidad de la terapéutica farmacológica, aumentan la morbimortalidad y generan costes adicionales para el sistema público de salud. Los errores asistenciales constituyen, después del cáncer y las enfermedades cardiovasculares la tercera causa de muerte prematura en EE.UU. como se recoge en un estudio publicado recientemente en el *British Medical Journal*.

En Noviembre de 2015 la Revista Nutrición Hospitalaria publicó una referencia "*In Memoriam*" del Dr. Jiménez Torres. Permitidme ahora reproducir un párrafo del documento: "*Víctor Jiménez Torres trazó una trayectoria larga e intensa, caracterizada por tres principios: talento, compromiso y generosidad. Talento para facilitar ese cambio en la mirada sobre nuestra profesión en beneficio de los pacientes. Compromiso, pues concibió su profesión como una forma de vida, como una auténtica vocación. Generosidad porque su tendencia innata a la docencia hizo que nos regalara su conocimiento y experiencia para aprender, mejorar y crecer*". No siempre somos plenamente conscientes de que la actividad científica no es únicamente una actividad intelectual personal, sino que tiene una dimensión social muy importante. La trayectoria de Víctor Jiménez Torres en esta Real Academia de Farmacia demostró, no solo sus profundos conocimientos, sino también un compromiso social a través de la docencia universitaria y de la actividad asistencial en la farmacia hospitalaria. Que Dios le bendiga,

Los ponentes de Farmacia Hospitalaria actuaron sucesivamente iniciando el turno la Dra. Angels Royo, Especialista en Oncología Médica del Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Dr. Peset: "Criterios actuales de dosificación y estrategias de estandarización de dosis en Oncología"; La Dra. Begoña Porta, Especialista en Farmacia Hospitalaria del Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario Dr. Peset: "Fuentes de variabilidad en la respuesta terapéutica en Oncología"; La Dra. Azucena Aldaz, Especialista en Farmacia Hospitalaria del Servicio de Farmacia Hospitalaria en la Clínica Universitaria de Navarra: "Individualización posológica en Oncología: modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos"; Y la Dra. Asunción Albert Marí, Especialista en Farmacia Hospitalaria del Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario y Politécnico la Fe, Valencia: "Beneficios de la estandarización de dosis en

Oncología. Experiencias y casos de éxito".

CONFERENCIAS.

Celebradas todas en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF.

El 7 de abril tuvo lugar la conferencia titulada: "La microbiota intestinal. Papel en la Obesidad", como colofón y cierre de la Tercera Edición del Curso Avanzado sobre Obesidad, que fue pronunciada por el Dr. J. Alfredo Martínez Hernández, Académico Correspondiente de la RANF quien fue presentado por el Excmo. Sr. D. Francisco José Sánchez Muñiz, Académico de Número de la RANF.

El 14 de abril se celebró la conferencia titulada "Evaluación de la aterogénesis mediante tecnología de imagen: Nuevas aproximaciones" a cargo del Dr. Lisardo Bosca Gomar, Académico Correspondiente de la RANF, quien fue presentado por la Excm. Sra. Dña. M^a Teresa Miras Portugal, Académica de Número de la RANF. La tomografía por emisión de positrones (PET), en combinación con 18F-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (18F-FDG'; FDG), ha demostrado ser útil para la identificación de los tejidos inflamados. En los últimos años, el uso clínico de FDG PET/CT de imagen (tomografía computarizada) ha estado en continuo aumento en el campo cardiovascular para evaluar síndromes tales como fiebre de origen desconocido, sarcoidosis cardíaca, endocarditis protésica y la infección de dispositivos implantados.

Recientemente, FDG PET/CT ha sido clave en el diagnóstico de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Sin embargo, el uso más generalizado de esta técnica se ha visto limitado debido a la señal relativamente modesta que se obtiene. Enfoques para mejorar su localización en tejidos inflamados podrían mejorar la utilidad clínica de estas imágenes basadas en PET/CT en patología vascular. Así, avances en las imágenes FDG-PET han llevado a su uso para la cuantificación de la actividad inflamatoria de la pared vascular ya que la captación de 18F-FDG se ha demostrado que se correlaciona fuertemente con la infiltración de macrófagos en la pared arterial junto con biomarcadores pro-inflamatorios sistémicos, la expresión génica de células inflamatorias y el aumento del riesgo de eventos aterotrombóticos posteriores.

Por tanto, el estudio del diagnóstico de la aterogénesis exige técnicas de imagen que identifiquen la presencia de placas 'activas', es decir, reclutando macrófagos y otros tipos celulares como consecuencia de un evento aterogénico. En colaboración con el grupo del Dr. J. Narula de la Mount Sinai Med School, NY, probamos diferentes trazadores basados en emisores PET, ya que el clásico FDG ofrece bajos niveles de visualización. Uno de los más prometedores era aprovechar la captación de fluoro-desoximanosa para aumentar la 'carga' intracelular de marca. Nuestro grupo identificó el mecanismo por el que esta marca de manosa supera ampliamente a la de glucosa, permitiendo un aumento significativo en la calidad y especificidad de la imagen PET, sin afectar costes, toxicidad o mecanismo de detección. Además, se puede combinar con otras estrategias destinadas a evaluar la estabilidad de la placa y por tanto identificar la existencia de riesgo de accidente vascular mediante el uso de trazadores complementarios de elementos específicos de la placa. Este trabajo ha permitido abrir nuevas vías para la caracterización de moléculas alternativas a la FDG como trazadores de aterogénesis, con una clara aplicación a la imagen biomédica. Estos estudios se han realizado en roedores, conejos y están en fase de aplicación en humanos con un coste de 5-10 € por administración en humanos y un aumento de hasta 3 veces en la relación señal vs. ruido.

El 5 de mayo tuvo lugar la conferencia titulada "De la formulación magistral a la del medicamento personalizado" a cargo del Dr. Vicente Bauxauli, Ex-Miembro de la Comisión Nacional de la Real Farmacopea Española, Ex-Miembro de la Comisión que redactó el Formulario Nacional de la AEMPS, quien fue presentado por el Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu, Académico de Número de la RANF.

El Dr. Bauxauli es Licenciado en Farmacia por la Universidad de Granada y Doctor en Farmacia por la Universidad de Valencia. Especialista en Análisis Clínicos, en Farmacia Industrial y Galénica y en Análisis y Control de Drogas. Ha sido miembro de la Comisión Nacional de la Real Farmacopea Española y de la Comisión que redactó el Formulario Nacional de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Ha sido director del laboratorio de Sanidad Exterior de Valencia del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Es miembro de la Sociedad Española de Farmacéuticos formulistas y de la Sociedad Española de Farmacéuticos de Atención Comunitaria, siendo además Farmacéutico titular en Mislata (Valencia). Ha publicado varios libros sobre nuevos Medicamentos y la formulación magistral. Miembro de la Asociación Española de Farmacéuticos de Letras y Artes y Académico de número de la Real Academia Hispánica de Filatelia.

Los medicamentos al inicio del siglo XX consistían básicamente en poción y extractos bastante simples. En los años siguientes mediante la investigación desarrollada en las universidades se produjo el descubrimiento de sustancias tan importantes como la insulina, las vitaminas, la penicilina, las sulfamidas. Paralelamente la industria farmacéutica realizó una actividad significativa en la busca de nuevas sustancias de interés farmacológico obteniéndose logros importantes que revolucionaron el ejercicio de la medicina y de la farmacia. Como consecuencia se ha conseguido mejorar la calidad y la expectativa de vida que ha pasado de los 35 a 40 años de principio de siglo XX a más de los 80 actuales.

La farmacia deja de preparar las medicinas "secundum artem" y la industria las convierten en medicamentos de "talla única". Sin embargo con los años se demuestra que los producidos por la industria farmacéutica presentan limitaciones importantes como en el caso de pacientes que requieren dosis diferentes a las estándar. La farmacia industrial funciona perfectamente en porcentajes significativamente altos, pero se producen casos en los que no se obtienen los efectos

deseados. Ello se debe a que necesariamente el medicamento debe ser el adecuado a las características y circunstancias particulares y únicas de cada paciente. Hoy sabemos que el comportamiento aparentemente anómalo de los fármacos de “talla única” se debe a dos razones básicas: la genética y al medio ambiente en que se desarrolla el paciente. En estos casos lo más aconsejable puede ser volver a la fórmula magistral. El medicamento del que nos hemos servido durante los últimos años deja paso a una terapia adaptada a cada paciente.

El 26 de mayo tuvimos el honor de celebrar la Sesión Pública en la que intervino el Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, Académico de Número de la RANF quien pronunció su conferencia titulada: “Funciones biológicas de los ácidos N-acetilneuramínico y N-glicolilneuramínico en procesos fisiológicos, inmunitarios, infecciosos, dietéticos y cancerosos, y sus aplicaciones farmacéuticas”

En 1954, E. Klenk en colaboración con H. Faillard, en Colonia (Alemania), prosiguiendo sus trabajos anteriores, establecieron la estructura correcta del ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). En 1962, H. Faillard y J. A. Cabezas, también en Colonia, separaron y cuantificaron por primera vez los ácidos Neu5Ac y Neu5Gc (ácido N-glicolilneuramínico) de sueros de mamíferos (terneras) y aves (gallinas). En 2011 se habían identificado por varios autores, además de estos dos ácidos siálicos (que son los mayoritarios), otros 53! a partir de diversos materiales biológicos. Esta peculiaridad relativa a la gran diversidad estructural de un mismo compuesto no ocurre con ningún otro monosacárido. Asimismo, otra peculiaridad es la de no haberse encontrado ácidos siálicos en el reino vegetal, como demostró J. A. Cabezas por primera vez en 1964; aunque sí se han hallado en algunos invertebrados y en algunos tipos de bacterias y virus. Entre 1960 y 2004, J. A. Cabezas y colaboradores identificaron y valoraron las concentraciones de dichos dos ácidos y, en ocasiones, las de otros dos ácidos N,O-diacetilneuramínicos, en los siguientes materiales, cuyos resultados han dado origen a 21 publicaciones: En lágrimas humanas ha sido detectado, identificado y cuantificado el Neu5Ac (por primera vez, en 1962, por J. A. Cabezas); y por él y otros en orina, leche, calostro y bilis de esta procedencia; en leche, calostro y plaquetas de ganado vacuno; en suero e hígado de rata; en leche, calostro, hígado, eritrocitos y cerebro de cabras; en eritrocitos, leche y calostro de ovejas; en eritrocitos, leucocitos y bilis de cerdos; en eritrocitos, plaquetas y cerebro de asnos, caballos y mulos; y en huevas e hígado de lamprea. La proporción de Neu5Gc respecto a la de Neu5Ac en estos materiales varía según la especie, el órgano y la edad (aumentando la de NeuGc con ésta). Dos peculiaridades más son: la prácticamente carencia (o insignificante presencia) de Neu5Gc en la especie humana, y también la misma carencia pero sólo en el cerebro de los otros mamíferos antes indicados.

Tanto el Neu5Ac como el Neu5Gc ejercen importantísimas funciones biológicas, cuyo estudio se ha intensificado recientemente, después de conocerse su estructura química, metabolismo y localización. Tales funciones son debidas principalmente a: a) su carga negativa; b) ser antígenos; c) ser sitios de reconocimiento celular o, por el contrario, factores de enmascaramiento; d) modular las interacciones de su entorno celular. Ambos ácidos participan en procesos biológicos como los siguientes: A/ Fisiológicos: El Neu5Ac de la zona pelúcida del óvulo facilita la unión y penetración en él del espermatozoide. B/ Inmunitarios: El Neu5Gc ocasiona la "enfermedad del suero" y el rechazo a los xenotrasplantes o heterotrasplantes. C/ Infecciosos: Ambos ácidos se comportan en relación con la malaria de forma muy diferente, y tienen vinculación con la gripe y otras enfermedades. D/ Dietéticos: El Neu5Ac de la leche humana actúa favorablemente como agente anti infeccioso, mientras que el Neu5Gc se cree es potencialmente tóxico; por lo que el aporte que se recibe de este (principalmente por las carnes rojas u otros alimentos) se elimina en el caso de los seres humanos. E/ Cancerígenos: El Neu5Gc es un "antígeno onco-fetal" que se expresa en tejidos fetales y desaparece en la vida adulta, pero que puede re-expresarse durante la transformación maligna. Entonces, se produce una hipersialilación en la superficie celular, incrementándose la concentración de Neu5Gc que favorece la inflamación.

Por otro lado, varios antígenos sialilados han sido detectados en distintos tipos de cáncer, en los que no es este sino el Neu5Ac el ácido siálico integrante de los mismos. También otras enfermedades como la sialuria, la esquizofrenia, la diabetes tipo II, y la de Alzheimer se hallan relacionadas con este ácido. F/ Aplicaciones farmacéuticas son algunas como las derivadas de la glicosilación de numerosas proteínas terapéuticas obtenidas por glicoeningeniería; ejemplo de las cuales es la eritropoyetina, en la que el aumento de su concentración en Neu5Ac mejora sus propiedades; así como los anticuerpos glicosilados.

El 2 de junio se celebró la Conferencia titulada: “Desarrollo y Fabricación de Medicamentos en el Siglo XXI. Implementando la Calidad por Diseño (QbD)”, a cargo del Ilmo. Sr. D. José Martínez Lanao, Académico Correspondiente de la RANF, quien fue presentado por el Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

El Acad. Prof. Martínez Lanao es Doctor en Farmacia. Premio extraordinario de Doctorado. Catedrático de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Salamanca. Director del Laboratorio de Investigación y Desarrollo (I+D) Farmacéutico de la universidad de Salamanca. Director del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Salamanca (1993-2008). Presidente (2004-2008) y Vicepresidente (1999-2002) de la Sociedad Española de Farmacia Industrial y Galénica (SEFIG). Ha publicado más de 180 trabajos de investigación, capítulos de libros y documentos científicos, la mayoría a nivel internacional y es coeditor de cuatro libros en los campos de la Biofarmacia, Farmacocinética experimental y Farmacocinética clínica. Director y co-director de más de 20 tesis doctorales. Ha presentado más de 200 ponencias y comunicaciones en Congresos científicos Nacionales e Internacionales. Premio de

investigadores jóvenes de la Sociedad Española de Farmacología (1988). Premio María de Maeztu de la Universidad de Salamanca a la Excelencia Científica (2009). Ha sido miembro del Council of the International Pharmaceutical Federation (FIP) y del Committee on Training and Education (CTE) of the European Federation of Pharmaceutical Sciences (EUFEPS). Miembro del comité editorial de diversas revistas científicas internacionales. Académico correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF). Académico de número de la Academia de Farmacia de Castilla y León. Evaluador en el “7th Framework programme of the European Union (UE)”. Miembro de los Comités organizador y científico de numerosos congresos nacionales e internacionales.

Los nuevos avances en medicina como la biotecnología, la farmacogenómica y la medicina personalizada, la nanomedicina o las terapias celulares entre otras, suponen cambios en los sistemas de administración de medicamentos. Actualmente se está produciendo importantes avances en la utilización terapéutica de nanosistemas como las nanopartículas metálicas o nanotubos de carbono, entre otros, con importantes implicaciones a nivel de diagnóstico y tratamiento de diversas patologías. También se están produciendo avances en el desarrollo de medicamentos destinados a la medicina personalizada, utilizando nuevas tecnologías como las basadas en la impresión 3D.

Asimismo se está produciendo una evolución en los métodos tradicionales de fabricación de medicamentos para conseguir una mayor eficacia operacional, desde los métodos convencionales de fabricación por lotes hacia los métodos de fabricación en continuo con monitorización de procesos en tiempo real. También estamos asistiendo a una evolución en los sistemas de calidad farmacéutica buscando la eficacia y seguridad de los medicamentos y de ahí la importancia de la calidad por diseño (QbD) o la tecnología analítica de procesos (PAT). En resumen, la moderna fabricación de medicamentos está evolucionando hacia nuevas tecnologías con gestión de la calidad basada en los principios de la QbD y la PAT que permiten garantizar la calidad desde el inicio del desarrollo del medicamento mediante una adecuada gestión del conocimiento y del análisis del riesgo que contribuye a la calidad del producto final.

El 16 de junio se celebró la Conferencia “Ver para creer: Visualización y tratamiento de nichos pre-metastásicos en el melanoma” a cargo de la Dra. María S. Soengas, Jefa del Grupo de Melanoma del CNIO, Spanish National Cancer Research Centre, quien será presentada por la Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Excmo. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal.

En esta conferencia, María S. Soengas, Jefa del Grupo de Melanoma del CNIO, presentará avances en su laboratorio orientados a visualizar las fases más tempranas en la metástasis de este tipo tumoral, como plataforma para la identificación de marcadores de progresión y validación de nuevos fármacos. El punto de partida de estos estudios es una de las peculiaridades más distintivas de los melanomas: su capacidad intrínseca para diseminarse por el organismo a partir de lesiones de un grosor aparentemente fino (2 mm de profundidad). Por otra parte, los melanomas son los cánceres con el mayor índice mutacional descrito hasta la actualidad. Este hecho, y la falta de modelos experimentales que permitan seguir el desarrollo metastásico *in vivo* han supuesto un gran reto en la oncología cutánea. Para resolver estas cuestiones, el equipo de Soengas integra estudios histopatológicos en muestras clínicas, con modelos animales altamente sofisticados que permiten el seguimiento del tumor mediante técnicas de imagen no invasivas. Esta presentación resumirá cómo estas estrategias les han permitido descubrir rutas de metástasis relacionadas con neo-linfangiogénesis, y desarrollar agentes terapéuticos con nuevos mecanismos de acción en las células tumorales y el sistema inmune.

CURSOS

La Real Academia Nacional de Farmacia celebró entre el 4 y el 7 de abril de 2016 el "III Curso Avanzado sobre Obesidad". Dirigido por el Académico Dr. D. Francisco José Sánchez Muniz, con la Coordinación de los también Académicos Dres. Bartolomé Ribas Ozonas y Antonio L. Doadrio Villarejo.

El primer día comenzó con la INTRODUCCIÓN a cargo del Director del Curso el Académico de la RANF el Dr. D. Francisco José Sánchez Muniz quien dio la bienvenida a los asistentes y disertó sobre los objetivos del curso. A continuación el Dr. Sánchez Muniz impartió la visión de LA OBESIDAD UN GRAVE PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA; le siguió la conferencia sobre UNA VISITA A LA HISTORIA de la Dra. Rosa Basante, la jornada continuó con GENES CLOCK. RITMOS CIRCADIANOS Y PREDISPOSICIÓN A LA OBESIDAD a cargos de la Dra. Marta Garaulet; Tras el descanso el curso prosiguió con la videoconferencia con la Dra. Carolina Palmeros de México quien abordó el tema LA OBESIDAD EN MÉXICO. PROGRAMAS EN MARCHA, el Dr. Manuel R. Benito de las Heras trató el tema sobre le TEJIDO ADIPOSO Y RIESGO CARDIOVASCULAR, concluyendo la primera jornada con la conferencia RESTRICCIÓN CALÓRICA Y LONGEVIDAD a cargo del Dr. Bartolomé Ribas Ozonas.

El día 5 de abril contó con REGULACIÓN NEUROHORMONAL DE LA OBESIDAD a cargo de la Dra. Evangelina Palacios; a continuación el Dr. Francisco José Sánchez Muniz analizó el tema HIDRATACIÓN Y DIETA EN LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD; el primer bloque del día concluyó con GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DE LA OBESIDAD a cargo de la Dra. Dolores Corella. Tras el descanso la Dra. Esperanza Torija disertó sobre ALIMENTOS FUNCIONALES Y OBESIDAD. INTERÉS Y REALIDAD. La jornada acabó con la charla de la Dra. Ascensión Marcos sobre LA OBESIDAD UNA ENFERMEDAD DE LA INFANCIA Y ADOLESCENCIA.

El tercer día de curso los alumnos pudieron asistir a las ponencias de la Dra. Marcela González sobre ACTIVIDAD FÍSICA: ALGO MÁS QUE GASTO ENERGÉTICO; a continuación volvimos a conectar con México, en este caso con el

Dr. Javier Villanueva quien nos acercó ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN TEMPRANA. Tras la discusión y descanso el Dr. José A. Gutiérrez trató la OBESIDAD Y RIESGO CARDIOVASCULAR; OBESIDAD: UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA fue tratada por el Dr. Manuel Serrano Ríos; terminando la jornada con la Dra. Irene Bretón Lesmes, UNA VISIÓN CRÍTICA DE LAS DIESTAS DE MODA.

El día 7 de abril, último día de curso, las conferencias se trasladaron el salón de Sesiones Solemnes donde el Dr. Antonio L. Doadrio disertó sobre OBESÓGENOS: OTRA PIEZA MÁS EN EL ROMPECABEZAS DE LA OBESIDAD; a continuación el Dr. Juan Tamargo trató el tema FARMACOTERAPIA DE LA OBESIDAD y la Dra. Gema Frühbeck. Tras la discusión atendimos a la Conferencia de Clausura a cargo del Dr. J. Alfredo Martínez Hernández quien disertó sobre LA MICROBIOTA INTESTINAL. PAPEL DE LA OBESIDAD.

El curso resultó un éxito abrumador con una demanda de inscripciones que llenó nuestro salón de actos.

TERTULIAS

El 7 de abril la Real Academia Nacional de Farmacia, en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF, celebró la Tertulia Científica "ZIKA, virosis emergente". A cargo del Dr. D. José Manuel Echevarría Mayo, Licenciado en Ciencias Químicas (Bioquímica), Doctor en Farmacia (Microbiología), Químico Especialista en Microbiología y Parasitología. Jefe de Área de Virología (2011), Centro Nacional de Microbiología (CNM), Instituto de Salud Carlos III (ISC-III). Moderada por el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Académico de Número de la RANF.

La virosis zoonótica Zika se llama así por el lugar de su aislamiento. En las cercanías de Entebbe, la capital de Uganda, a orillas del Lago Victoria, en un bosquecillo vecino al laboratorio de vigilancia de Fiebre Amarilla, se colocó dentro de una jaula a un mono Rhesus como control (monitor) de procesos víricos transmitidos por mosquitos (Fiebre amarilla). El mono contrajo un proceso febril, con conjuntivitis y de su sangre, era 1948, se aisló un agente infeccioso filtrable, un virus, que se bautizó Zika, el nombre del bosquecillo donde se aisló. Posteriormente se aisló de un mosquito de tronco de árbol y se comprobó su difusión al hombre en África en dirección occidental desde Uganda, con olas epidémicas de los años 50 a 80 que alcanzaron los países de la costa occidental africana y Golfo de Guinea. Recorrió toda África al Sur del Sahara y Egipto y se detectó en Asia. El 2007 alcanza Yap en la Micronesia; en 2013-2014 el Sudeste asiático y los archipiélagos de Oceanía: Polinesia francesa, Cook, Nueva Caledonia. En el 2015 llega al Caribe y América del Sur, adquiriendo carácter pandémico.

El virus Zika pertenece al grupo Spondwany de los flavivirus (arbovirus, es decir virus transmitidos por artrópodos) como los de la fiebre amarilla, las encefalitis, el dengue, etc. Son virus con genoma formado por una sola hebra de RNA positivo, encerrado en una cápside hexagonal y conformación externa icosaédrica, cada cara formada por tres haces de tres dímeros de proteína. Transmitidos por especies de Aedes, mosquitos diurnos como los tropicales ubicuos Aedes aegypti y A. albopictus. Parece que al menos hay dos variedades de virus, la africana y la asiática, siendo esta última la que alcanzó América. Ocasiona la fiebre Zika caracterizada por dolor de cabeza, erupción maculo-papulosa, fiebre, malestar, artralgias y conjuntivitis que aparece después de un periodo de incubación de 7 a 10 días. En muchas personas la infección pasa desapercibida detectándose sólo los anticuerpos específicos si se analiza su sangre. Parece que puede transmitirse persona a persona a través del semen y de transfusiones. Aunque el virus ha viajado por la amplísima faja intertropical donde progresó Aedes aegypti, su adaptación a A.albopictus y la continua expansión de este mosquito hacia los climas templados, así como su adaptación múltiple a otras especies de culícidos, suscitan una justificada precaución sanitaria. Por otra parte, las posibles implicaciones en la transmisión materno/fetal y su relación con abortos y lesiones del sistema nervioso central del neonato. La frecuencia de trastornos neurológicos post-infección, autoinmunes, en adultos como el síndrome de Guillain-Barré aumentan el interés por esta pandemia, a nuestras puertas ahora ya que también en nuestra costa mediterránea ha llegado para quedarse A. albopictus.

El 16 de junio se celebró la Tertulia Científica coordinada por el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández en la que se tratará el tema: "Nuevos enfoques para retrasar o revertir la vejez. ¿Se puede "curar" la vejez?" a cargo de la Académica de Número, Excmo. Sra. Dña. María Cascales Angosto.

El aumento de la esperanza de vida calcula que en 2050 la población de más de 80 años superará los 400 millones. Esto afectará a la mayoría de los países con enormes problemas económicos y sociales debidos a los achaques propios de esa población. Para paliar estos problemas están surgiendo estudios para retrasar o revertir el fenotipo senescente. Así, el gerontólogo británico Aubrey de Grey, propone para la reducción de la senescencia, siete estrategias que hay que superar si se quiere vencer la vejez. Por otro lado María Blasco, manejando la telomerasa y supresores del cáncer, ha conseguido alargar la vida y la juventud en su super-ratón. También la tan recomendada y discutida restricción calórica da las pautas dietéticas para conseguir una vejez saludable y con la mejor calidad de vida. Por último, estudios en el modelo de parabiosis heterocrónica (la inducción quirúrgica de una circulación sanguínea compartida en ratones de edad diferente, viejo y joven), han conseguido demostrar que la sangre del ratón joven es capaz rejuvenecer al ratón viejo. Ante este hecho los científicos se han preguntado: ¿qué es lo que tiene la sangre del animal joven? o ¿qué es lo que no debe tener la sangre del animal viejo?

OTROS ACTOS EN LA RANF

El Martes 12 de Abril MSD y la RANF celebraron los 30 años la Jornada Científica "LEY GENERAL DE SANIDAD. 30 años de vigencia y retos para el futuro". Actuó como moderador el Dr. Honorio-Carlos Bando, Profesor Honorario en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

La presentación corrió a cargo del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez, Presidente de la RANF. Actuaron como ponentes: la Dra. Regina Revilla, Director Policy & Comm. MSD., D. Julio Sánchez Fierro, Vicepresidente Primero de la Asociación Española de Derecho Sanitario. AEDS, Dr. Pedro Sabando, Ex-Jefe de Servicio de Reumatología Hospital de la Princesa y el Profesor Emérito Dr. Félix Lobo, Catedrático de Economía Universidad Carlos III, Madrid. Clausuró el acto el Presidente RANF.

El 25 de abril la Real Academia Nacional de Farmacia y la Universidad CEU San Pablo tuvieron el honor de celebrar la Sesión Pública titulada: CELEBRANDO EL DÍA DE LA INMUNOLOGÍA: LA IMPORTANCIA DE LAS VACUNAS. La presentación fue realizada por el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban, Presidente de la RANF, y la Dra. Beatriz de Pascual-Teresa, Académica Correspondiente de la RANF y Decana de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo.

Actuaron como ponentes el Dr. Mariano Esteban, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Jefe del Grupo de Poxvirus y Vacunas del Centro Nacional de Biotecnología CNB-CSIC. "La vacuna del SIDA"; Dr. Francisco Javier Moreno, Responsable de la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas del Centro Nacional de Microbiología CNM-ISCIII. "Avances en el desarrollo de una vacuna para la leishmaniasis humana"; Dra. Charo Cambronero, Jefa de Asuntos Médicos, Área de Vacunas, Departamento Médico de Glaxo SmithKline GSK "Los antígenos vacunales pueden necesitar ayuda ¿Cuándo y por qué?" Clausuró el acto el Dr. Mariano Esteban.

NOMBRAMIENTOS Y DISTINCIIONES

El 14 de abril continuando con el esfuerzo del Presidente de la RANF al frente de la Junta de Gobierno, por abrir la Academia e incrementar la actividad en los medios, D. Mariano Esteban concedió una nueva entrevista, en este caso, al diario "El Médico".

El 2 de junio nuestro compañero, el Académico Correspondiente, Ilmo. Sr. D. Enrique Villar Ledesma (Catedrático, sucesor del Prof. José Antonio Cabezas en la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca) fue nombrado "Editor Invitado" para un número especial de la prestigiosa revista "Virus Research", dedicado a la respuesta celular a la infección vírica.

A la Excma. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal, le ha sido concedida la Medalla Castelao; asimismo, ha sido nombrada Vocal del Consejo de Ciencia y Tecnología de la Comunidad de Madrid. Lo que eleva el prestigio de la Real Academia Nacional de Farmacia y de todos los Académicos.

El Académico Correspondiente de la RANF, Ilmo. Sr. D. Alfredo Martínez ha sido galardonado con el premio HIPOCRATES por la Real Academia de Medicina y Cirugía del Principado de Asturias.

En la Junta General Extraordinaria, celebrada el 23 de junio, ha resultado elegida para ocupar la vacante de Académico de Número en la Medalla 3 la Excma. Sra. Dña. Mercedes Salaices.

Bartolomé Ribas Ozonas
Académico Secretario RANF