

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA



Volumen. 83, Número 1 - Enero - Marzo (2017)



International woman's day: what else can we do to endorse gender equality in our society?

Title in Spanish: *El Día Internacional de la Mujer: ¿qué más se puede hacer para conseguir la igualdad de género en nuestra sociedad?*

Ana M.^a Pascual-Leone Pascual¹

¹ Investigadora del CSIC y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid

*Corresponding Author: anamariapascualleone@gmail.com

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 1 (2017), pp. 4-5

Received: Mars 17, 2017 Accepted: Mars 21, 2017

Language of Manuscript: Spanish

El día 8 de marzo se ha celebrado en todo el mundo el Día Internacional de la Mujer, ha habido múltiples debates televisivos o radiofónicos y referencias a ello de políticos y periodistas en nuestra prensa, y parece que la pregunta era esa ¿qué más se puede hacer en nuestra sociedad?

En primer lugar denunciar y exponer que la igualdad de sexos no consiste en pensar, ni pretender, que las mujeres y los hombres son iguales, porque no lo son, son distintos, en muchísimas cosas muy distintos. En carácter, en su manera de enfrentarse a situaciones de emergencia, en su manera de defenderse e, incluso, de abordar problemas y resolverlos. Y la ciencia actual, como veremos, lo está explicando.

Ninguna mujer, medianamente inteligente, pretende eso, ni le apetece, ni lo desea, sencillamente, porque para ella está claro que ello comportaría ser otra persona, y nadie quiere dejar de ser quien es.

Lo que las mujeres reclaman es tener los mismos derechos laborales que los hombres, y, además, ser tratadas como personas iguales a ellos en posibilidades intelectuales, porque lo son.

La sociedad humana está compuesta de hombres y mujeres; altos, bajos, inteligentes o menos inteligentes, y como tales personas tienen que tener los mismos derechos sociales, laborales y personales y ser respetados. Una sociedad matriarcal, donde los hombres fueran sometidos, maltratados, no respetados y asesinados, sería tan injusta como la actual pero al revés. Y no solamente porque estamos en democracia como dicen, sino porque no tiene ningún sentido, del mismo modo que no tiene ningún sentido despreciar y discriminar por el color de la piel, ninguno. Eso no es falta de democracia, es **racismo**. Es un sentimiento absolutamente irracional de pueblo inculto que no piensa ni razona.

Y para estudiar y resolver por qué se produce el problema hay que recurrir a la ciencia y de manera más general a la cultura de un pueblo. Hay, una vez más, que decir que hay que **educar** a la gente, basándose en los

conocimientos que la historia de la humanidad y el actual nivel científico nos dicten. Hay que crear un ambiente educativo que obligue a reflexionar, en donde se valoren y ensalcen los esfuerzos personales y el apoyo material y espiritual que su trabajo aporta a la sociedad, y donde eso se recompense y se premie por encima de cualquier otra consideración.

Si recurrimos a la ciencia experimental hay que decir que durante los diecisiete años que llevamos de este siglo se han amontonado los trabajos científicos sobre la acción de las hormonas esteroides, glucocorticoides y gonadales en el cerebro, con técnicas punteras actuales, y se ha mostrado que las hormonas sexuales, las gonadales, no afectan solamente a aspectos reproductivos, como se creía, sino que existen receptores de dichas hormonas en otros lugares cerebrales. Se comienza a entender que todo el cerebro puede ser, en diferentes grados, modulado por ellas. La diferenciación sexual en humano se produce en periodo gestante por hormonas gonadales, y de forma irreversible. Ello parece explicar los distintos comportamientos de mujeres y hombres, por ejemplo, en situaciones de emergencia. Se está empezando a comprender también por qué en diversas patologías debe tratarse de forma distinta a hombres y mujeres. Pero hay que señalar que uno de los grupos de trabajo más importantes en esta vertiente, el grupo de Bruce S. McEwen¹, neuroendocrinólogo americano, director del Harold and Margaret Milliken Hatch Laboratory of Neuroendocrinology, en Rockefeller University y miembro de la Academia de Ciencias (*United States National Academy of Sciences*), con muchos premios y prestigiosos

¹ Dr. Bruce Sherman McEwen, nacido en 1938. Desde su primera publicación (1959) ha publicado más de 700 trabajos. Su grupo descubrió, por primera vez, receptores cerebrales de hormonas esteroides (glucocorticoides) (1968) *Premios*: Tienen numerosos y prestigiosos premios como Gold Medal Award from the Society for Biological Psychiatry(2009), o IPSEN Foundations Prize in Neuroplasticity (2010) por citar los más recientes.

discípulos, dice que están comenzando a tener conclusiones definitivas sobre el comportamiento humano ligado a muchas funciones cerebrales, pero afirma que la existencia de importantes diferencias sexuales cerebrales no significa que exista, de ninguna manera, atisbo o forma un sexo más eficaz o más inteligente (*Physiology and Behaviour* 97(2009)143-45 "*The end of sex as we knew it*").

Así que la ciencia parece estar estableciendo por qué los comportamientos de mujeres y hombres son distintos, y es porque sus funciones y dinanismos metabólicos en el cerebro lo son, sin que ello suponga un menoscabo intelectual para ninguno de ellos. Razón por la cual la humanidad debería, cada vez más, implicar a las mujeres en puestos directivos, puesto que ello proporcionaría una mayor riqueza de puntos de vista y de matices.

En nuestro país estamos elaborando una nueva ley educativa consensuada "política y territorialmente". Una cosa muy importante a tener en cuenta sería seleccionar intelectualmente al profesorado desde la enseñanza primaria. Para ser enseñante se debe escoger a gente lo más dotada intelectualmente posible, con un nivel alto de calificaciones académicas y con motivación por la cultura y, también, pagar bien su trabajo. Sin hacer eso, los profesores no tendrán el respeto y la consideración que nuestra sociedad necesita tenerles. Esto, sin duda, se hizo, en su día, en la sanidad. Para poder estudiar medicina se seleccionan los mejores expedientes al final de bachillerato, con lo que ha mejorado la sanidad porque, de alguna forma, elegimos los sanitarios.

La educación de un pueblo es en el siglo XXI, una necesidad imperiosa tan importante como comer, estar sanos o tener un puesto de trabajo, porque solamente así se puede constituir una sociedad que se precie y que sea de primera línea mundial. Nuestro pueblo es imaginativo y creativo, como se ha mostrado siempre en vertiente artística y, más recientemente, en la calidad de sus científicos. Parece, pues, que lo conseguiría si hubiera una apuesta decidida por la educación y la investigación, subvencionada y mantenida. Y, de manera general, una apuesta por la cultura. Ello constituiría, por una parte, una nueva vertiente en que basar la economía y, por otra parte, sería una vertiente con prestigio.

El día 10 de marzo en *El País* se publicó un artículo titulado "Derecho a la Cultura" en donde se pide que en la Constitución se debería plasmar *un nuevo derecho fundamental en defensa de la creación, producción y distribución de los bienes culturales*. Lo firma D. Antonio Rovira (UAM/Fundación Santillana), Catedrático de Derecho Constitucional y director del máster en Gobernanza y Derechos Humanos.

Creo, verdaderamente, que la Sanidad, la Educación y la Investigación deberían, por principio, ser mimadas y protegidas en este país de forma profunda y ser intocables en tiempos de crisis. El Estado tendría que, de manera central, mantener y respetar mucho las instituciones culturales que tenemos por todo el territorio, donde se divulga la ciencia como servicio al país de forma gratuita,

y dar, además, facilidades de financiación para la difusión, la ampliación y modernización de ellas. Pero parece que todo eso no ha calado profundamente aún en ninguna tendencia política.

Sin embargo, con dicha convicción en los gobiernos, mejoraría mucho la solución de muchos problemas porque, solamente así, las sociedades consiguen un nivel cultural alto y pueden llegar a resolver problemas ancestrales, como lo es la discriminación y violencia contra las mujeres, difíciles de resolver sí, pero a la vez, completamente impropios de este siglo XXI.



Reflections about the scientific process

Title in Spanish: *Reflexiones sobre el proceso científico*

Carmen Avendaño^{1,*}

¹Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid.

***Corresponding Author:** avendano@farm.ucm.es

Received: February 27, 2017 **Accepted:** February 27, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 1 (2017), pp. 6-9

Language of Manuscript: Spanish

1. METACIENCIA

Recientemente, la política nos ha familiarizado con la *post-truth* (“posverdad” o “metaverdad”), un nuevo concepto que suele referirse a campañas electorales que recurren a las emociones prescindiendo de la verdad de los hechos. El prefijo “meta” tiene en este caso uno de los significados que le da el Diccionario de la Real Academia Española: “después de” o “más allá”, pero este prefijo también se aplica a términos como “metalenguaje”, significando que el concepto que designa el sustantivo recae sobre sí mismo (un lenguaje que reflexiona sobre el lenguaje mismo). Análogamente, la metaciencia puede definirse como el estudio científico de la ciencia.

Esta materia está floreciendo en los últimos años, y sus trabajos han evidenciado que la imagen idealizada del modelo hipotético-deductivo del método científico, cuyo sello de identidad es su capacidad para descubrir a partir de unos datos experimentales patrones nuevos e inesperados, está amenazada por varios factores, lo que afecta a la eficacia del conocimiento que la ciencia proporciona. Uno de estos factores es la falta de reproducibilidad de los resultados científicos que se publican, lo que ocurre con frecuencia en las ciencias de la vida como veremos en algunos ejemplos que hemos seleccionado.

2. LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

En el año 2009, cuatro grupos de analistas liderados por John Ioannidis (un médico e investigador de la Universidad de Stanford que analiza la calidad del trabajo de otros científicos), intentaron reproducir 18 estudios sobre la expresión genética utilizando chips de ADN que se habían publicado en *Nature Genetics* los años 2005 y 2006. Utilizando los datos y los métodos analíticos detallados en dichas publicaciones concluyeron que solo habían sido capaces de reproducir 2 de ellos, otros 6 pudieron reproducirse con algunas discrepancias y 10 no pudieron ser reproducidos. Los autores achacaron este fracaso a la falta de algunos datos y a que no se especificaba cómo se habían procesado y analizado los datos publicados (1). Tres años más tarde, varios

investigadores de la compañía biotecnológica Amgen en Thousand Oaks (California), solo pudieron reproducir 6 de 53 estudios de oncología y hematología que habían sido publicados, concluyendo que el poco éxito logrado en los ensayos clínicos con posibles fármacos antitumorales se debía a deficiencias en el planteamiento de los ensayos preclínicos (uso de líneas celulares y modelos animales inadecuados), además de a las dificultades de esta enfermedad asociadas a la heterogeneidad de los tumores y de los pacientes. Los autores proponían que, para beneficiar a los pacientes de cáncer, deberían cambiarse los métodos, las publicaciones y los incentivos (2). En el año 2016, el 90% de los 1.500 investigadores que respondieron a una encuesta de la revista *Nature*, estuvieron de acuerdo en que existe una crisis de reproducibilidad (3).

Es evidente que la baja reproducibilidad de las investigaciones básicas y preclínicas en el campo de las ciencias de la vida, contribuye a un retraso y a un mayor coste en el desarrollo de fármacos. Los recursos que se emplean en el diseño de los experimentos para minimizar el sesgo de los resultados en los estudios clínicos (como la aleatorización y la evaluación por investigadores “ciegos” que desconocen las condiciones experimentales), no suelen darse en los estudios básicos o preclínicos, lo que conduce a que el evaluador tienda a encontrar los resultados que está buscando e ignore los que le resultan incoherentes. Según algunos analistas, más de un 50% de las investigaciones preclínicas publicadas en EEUU son irreproducibles, lo que significa un coste para este país de 28.000.000.000 dólares/año (4).

Este problema tiene distintas causas, entre las que se encuentran el que se propongan las hipótesis cuando ya se conocen los resultados (5), que se practique el *P-hacking* y se aumente la flexibilidad en el análisis de los datos, y que no se compartan datos que pueden ser relevantes.

Según los analistas, aunque la ciencia no es inmune a las conductas fraudulentas, la falta de reproducibilidad de los resultados que se publican no va ligada necesariamente a que los resultados hayan sido fabricados, ya que puede deberse a la variabilidad biológica, a problemas en el

diseño de los experimentos o a fallos en el análisis de los resultados obtenidos. El comportamiento de los sistemas biológicos es muy complejo y se ve afectado por factores ambientales, especialmente en el campo de las neurociencias (6). Finalmente hay que hablar de la estadística, que es clave en el análisis de los resultados de una investigación pero que se utiliza algunas veces para “descubrir” falsos positivos, correspondientes a hallazgos que aparecen como significativos cuando en realidad no los son (7).

3. LA SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA

En estadística, una hipótesis nula (o hipótesis de partida) es una afirmación que no se rechaza a menos que los datos de la muestra en estudio parezcan evidenciar que es falsa. El valor “P” es una medida de significación estadística que se define como la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el que realmente se ha obtenido suponiendo que la hipótesis nula es cierta. Cuanto menor sea este valor, mayor será la significación estadística de los resultados experimentales. Si el valor P asociado al resultado observado es menor que el nivel de significación establecido convencionalmente (frecuentemente $P < 0,05$ en investigaciones sociológicas y $P < 0,01$ en investigaciones clínicas), lo más verosímil es que la hipótesis de partida sea falsa y que los resultados encontrados experimentalmente sean reales y no debidos al azar, soportando por tanto una hipótesis correcta.

Es posible que si se encuentra una observación atípica se rechace la hipótesis nula aunque ésta sea cierta, pero este error estadístico puede subsanarse rebajando el valor P o aumentando el tamaño de la muestra para reducir la posibilidad de que el dato obtenido sea casualmente raro. Sin embargo, también es posible que se elimine alguna condición experimental a fin de que el valor de P tenga significación estadística, o no se incluyan en la publicación los datos sin procesar. Estas maniobras, realizadas en el análisis de los datos quizás de forma inconsciente, se conocen como “*P-hacking*”, y podrían evitarse si se proponen las comparaciones antes de que se realicen las experiencias y se detallan en las publicaciones los métodos y el análisis de datos, incluyendo los que difieren de lo que se planificó.

Las trabajos relacionados con la credibilidad de los resultados científicos aportan conclusiones demoledoras (8) que, en los estudios biomédicos, afectan tanto a ensayos clínicos y a estudios epidemiológicos (9) como a las investigaciones realizadas a nivel molecular (10). Pero el problema afecta también a otras disciplinas científicas.

La metaciencia demuestra que, además de el *P-hacking*, la publicación de resultados incorrectos puede producirse por otros factores, como son el estudio de muestras de pequeño tamaño, la medición de efectos pequeños, o los conflictos de interés. Estos últimos no tienen que estar necesariamente ligados al problema de la financiación o al rendimiento económico de las investigaciones, sino que pueden deberse al convencimiento de los investigadores de que una teoría

determinada es cierta o a la necesidad de producir resultados para mantener una situación profesional o promocionarse, lo que se da frecuentemente en los centros de investigación financiados públicamente, ya que el entorno académico es hoy más competitivo que nunca (11).

El sesgo de publicación induce a los investigadores a enviar para su publicación aquellas investigaciones que arrojen resultados “positivos” (hallazgos significativos) en lugar de “negativos” (“que apoyen la hipótesis nula”). Sólo si un asunto es de actualidad y otro equipo acaba de publicar un resultado positivo, los resultados negativos acerca de la misma cuestión pueden resultar muy “atractivos”. Este sesgo también podría aplicarse a los editores, que acepten más fácilmente publicaciones con resultados positivos, por considerarlos más interesantes que los negativos.

4. INTENTOS PARA ATAJAR EL PROBLEMA

En los últimos años, la falta de reproducibilidad en los resultados científicos se trata de atajar a través de distintas iniciativas. El *National Institute of Health* (NIH) de los EEUU y los responsables de las revistas *Nature* y *Science* reunieron en Junio de 2014 a varios editores. Éstos representaban a unas 30 revistas de ciencia básica y preclínica en donde se publican la mayor parte de las investigaciones financiadas por el NIH. Tras analizar cómo podía aumentarse el rigor científico y lograr que la ciencia sea reproducible, sólida y transparente, se consensuaron varias recomendaciones que incluían realizar un análisis estadístico riguroso (lo que requiere una gran formación estadística en los investigadores), que la información que se suministre sea transparente, que se compartan el material y los datos, y que se tengan en cuenta los datos en contra (12). Ese mismo año, antes del encuentro anual de la *Society for Neuroscience* de EEUU, el entonces Director del *National Institute of Mental Health* (NIMH) Thomas Insel constató que los estudios sobre la estructura y funciones del cerebro habían experimentado un progreso extraordinario, pero advirtió que no podía olvidarse que hasta un 80% de los datos que dichos estudios habían proporcionado no habían podido reproducirse. En palabras de T. Insel “*Great science requires great attention to the details of experimental design and data analysis*”.

Recientemente, el 10 de enero de 2017, un grupo de investigadores liderado por John Ioannidis ha publicado un manifiesto para que la ciencia recupere la credibilidad y fiabilidad y se aceleren los descubrimientos (13). Según este manifiesto, el 85% de los esfuerzos dedicados a investigaciones biomédicas se abandonan en etapas muy tempranas o no llegan a aplicarse en clínica, y señala que tanto los investigadores jóvenes como los *senior* requieren una educación metodológica continuada, especialmente en el uso del análisis estadístico. Sin embargo, a muchos científicos les intimida esta herramienta, y proponen que se desmitifique y se señale un marco alternativo para utilizar los modelos matemáticos que se requieran (14).

5. ALMACENAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS MASIVOS (*BIG DATA* O MACRODATOS)

El término *big data* (macrodatos, datos masivos o datos a gran escala), hace referencia al almacenamiento de grandes cantidades de datos y a los procedimientos usados para encontrar patrones repetitivos dentro de ellos. Estas técnicas, que surgieron de la necesidad de confeccionar informes estadísticos y modelos predictivos, representan una revolución en las tecnologías de la información y la comunicación, y están cambiando la forma de hacer negocios, la política, la educación, la sanidad, y la innovación (15), constituyendo una oportunidad para la investigación. Los científicos necesitan hoy día complementar la ciencia con las búsquedas inteligentes de datos, cuyo volumen crece constantemente, y adaptar sus prácticas a esta nueva herramienta. Su utilización es también un reto, ya que estos datos han de procesarse inteligentemente (16). No puede perderse de vista la enorme diferencia que existe entre los *big data* científicos, que se extraen de muchos trabajos experimentales, y los *big data* extraídos de conductas humanas, ya que estos últimos son muchas veces contradictorios.

Entre las muchísimas herramientas para analizar los *big data*, se encuentra su agrupación (*clustering*), en la que grandes grupos de datos dan lugar a grupos más pequeños en función de su semejanza, desconocida antes de realizar este tipo de análisis. Esta técnica, referida a individuos, se está aplicando en el campo de la salud. Por ejemplo, utilizando los datos de búsquedas que contenían los términos *Influenza-Like Illness Symptoms*, agregados según ubicación y fecha, *Google Flu Trends*, predijo hacia mediados de 2009 una pandemia de gripe A, con dos semanas de antelación a los sistemas de detección tradicionales. El análisis de datos masivos ha comenzado ya a aplicarse en el tratamiento del cáncer y en el diagnóstico de enfermedades, campos en los que la inteligencia artificial es capaz de realizar análisis con una gran precisión (17).

6. CONCLUSIÓN

La metaciencia está demostrando que es posible hacer una investigación más exigente y reproducible (18), y descubrir que lo que considerábamos como verdadero puede que no lo sea. En palabras de Regina Nuzzo: *Humans are remarkably good at self-deception, but growing concern about reproducibility is driving many researchers to seek ways to fight their own worst instincts* (20). Fomentar la autocorrección del propio proceso científico puede ser de gran utilidad en medicina, tanto en lo que se refiere a métodos diagnósticos (19) como a tratamientos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ioannidis JPA, Allison DB, Ball CA, *et al.* Repeatability of published microarray gene expression analyses. *Nature Genet* 2009; 41: 149-55.
- Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 2012; 483: 531-3.
- Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature* 2016; 533: 452-4.
- Freedman L, Cockburn IM, Simcoe TS. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLoS Biology* 2015; 13: e1002165.
- Kerr NL. HARKing: hypothesizing after the results are known. *Pers Soc Psychol Rev* 1998; 2: 196-217.
- Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 1999; 284: 1670-2.
- Simmons JP, Nelson LD, Simonshohn U. False-positive psychology: undisclosed flexibility in data collection and analysis allows presenting anything as significant. *Psychol Sci* 2011; 22: 1359-66.
- a) Ioannidis JPA. Why most published research findings are false. *PLoS Med* 2005; 2, e124. b) Fanelli D. "Positive" results increase down the Hierarchy of the Sciences. *PloS ONE* 2010; 5: e10068. c) Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, *et al.* Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 365-76.
- a) Ioannidis JP, Haidich AB, Lau J. Any casualties in the clash of randomised and observational evidence? *BMJ* 2001; 322: 879-80. b) Lawlor DA, Smith GD, Kundu D, *et al.* Those confounded vitamins: What can we learn from the differences between observational versus randomised trial evidence? *The Lancet* 2004; 363: 1724-7. c) Vandembroucke JP. When are observational studies as credible as randomised trials? *The Lancet* 2004; 363: 1728-31.
- a) Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: A multiple random validation strategy. *The Lancet* 2005; 365: 488-92. b) Ioannidis JPA, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001; 29: 306-9.
- Papanikolaou GN, Baltogianni MS, Contopoulos-Ioannidis DG, *et al.* Reporting of conflicts of interest in guidelines of preventive and therapeutic interventions. *BMC Med Res Methodol* 2001; DOI: 10.1186/1471-2288-1-3.
- a) Collins FS, Tabak LA. Policy: NIH plans to enhance reproducibility. *Nature* 2014; 505: 612-3. b) Motulsky HJ. Common misconceptions about data analysis and statistics. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 351: 200-5.
- Munafò MR, Nosek BA, Bishop DVM, Button KS, *et al.* A manifesto for reproducible science. *Nature Human Behaviour* 2017, doi:10.1038/s41562-016-0021. 14. Miller MJ, van den Heuvel ER, Roesti D. The role of statistical analysis in validating rapid microbiological methods. *European Pharmaceutical Review RMMs Supplement*, 2016; issue 6.
- Mayer-Schönberger V, Cukier K. *Big Data: A Revolution That Will Transform How We Live*,

Reflections about the scientific process

Work, and Think. Eamon Dolan/Houghton Mifflin Harcourt 2013.

16. Editorial. Community cleverness required. *Nature* 2008; 455: doi:10.1038/455001a.
17. Souillard-Manda W, Davis R, Rudin C, *et al.* Interpretable Machine Learning Models for the Digital Clock Drawing Test. International Conference of Machine Learning (ICML), New York, USA 2016.
18. Ioannidis JP. How to make more published research true. *PLoS Med.* 2014; 11: e1001747.
19. Eklund A, Nichols TE, Knutsson H. Cluster failure: why fMRI inferences for spatial extent have inflated false-positive rates. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 2016; 113: 7900-5.
20. Nuzzo R. Fooling ourselves. *Nature* 2015, 526: 182-5.



Trichomonas vaginalis: The versatility of a tenacious parasite

Title in Spanish: *Trichomonas vaginalis*: la versatilidad de un parásito tenaz

Alexandra Ibáñez-Escribano^{1,*}, Alicia Gómez-Barrio¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Campus de Excelencia Internacional Campus Moncloa. Plaza Ramón y Cajal s/n-28040. Madrid, España.

ABSTRACT: Trichomonosis is one of the most prevalent nonviral sexually transmitted infection (S.T.I.) worldwide, with an estimated 276 million cases per year according to WHO overview. Little attention is paid to this disease, although more than 50% of S.T.I. curable are caused by this protozoon. Clinically, *Trichomonas vaginalis* infection can produce a wide range of pathological manifestations, from asymptomatic presentation to severe inflammatory and invasive lesions in the genitourinary tract of both men and women. The possible role displayed by *T. vaginalis* as a viral vector might also explain its role as a risk factor in the development of cervical and prostate neoplasia. In addition, trichomonosis is strongly associated with transmission and acquisition of other bacterial and viral pathogens like HIV. *T. vaginalis* is a very complex organism and has developed diverse mechanisms for the colonization of the genitourinary tract probably due to its extensive genome. This parasite must survive in a hostile environment exposed to continue fluctuations. Surprisingly, *T. vaginalis* possesses one of the largest and most repetitive genomes, with a core set of 60,000 protein-coding genes. According to all these features, *T. vaginalis* could be considered an excellent model of parasite to be studied in order to better understand the dynamics and immune evasion mechanisms of such versatile parasite.

RESUMEN: La tricomonosis urogenital humana, causada por el parásito *Trichomonas vaginalis*, es una de las infecciones de transmisión sexual (I.T.S.) de mayor prevalencia en el mundo, con un total de 276 millones de casos cada año, según la OMS. Algunos autores la han calificado como una enfermedad desatendida u olvidada ligada a la pobreza, a pesar de que más del 50% de las I.T.S. curables se deben a este agente etiológico. La tricomonosis cursa con un rango amplio de manifestaciones clínicas, que van desde casos asintomáticos hasta cuadros más graves e invasivos de los conductos genitourinarios. Se ha relacionado la infección con el riesgo de adquisición y transmisión del VIH y de lesiones preneoplásicas de cérvix y próstata. Este protozoo parásito presenta una gran variabilidad intraespecífica en su comportamiento patogénico, probablemente por el tamaño y complejidad de su genoma, con más de 60.000 genes codificantes. Es capaz de sobrevivir y colonizar un nicho complejo sometido a constantes fluctuaciones, el aparato genitourinario, pasando desapercibido en muchos casos. El tamaño y complejidad de su genoma convierten a *T. vaginalis* en un parásito de gran interés científico para el estudio de los mecanismos de patogenia y evasión de la respuesta inmune.

*Corresponding Author: alexandraibanez@ucm.es

Received: Mars 21, 2017 Accepted: Mars 22, 2017

Premio del Colegio Oficial de Farmacéuticos del Concurso científico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 1 (2017), pp. 10-47

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Las I.T.S. son una de las principales causas de morbilidad e infertilidad con graves consecuencias médicas y psicológicas para hombres, mujeres y niños. Se han descrito hasta 30 patógenos transmisibles por contacto sexual entre los que se encuentra un único parásito: *Trichomonas vaginalis* (1). La tricomonosis urogenital humana es una enfermedad olvidada (2, 3) responsable de más de 276 millones de infecciones anuales según el último informe de la OMS (4). Sin embargo, estos datos epidemiológicos podrían estar subestimados debido a la alta tasa de casos asintomáticos, especialmente en el hombre (5) y al no ser una enfermedad de declaración

obligatoria fuertemente asociada a la pobreza (2, 3). Este parásito presenta uno de los genomas de mayor tamaño y complejidad jamás secuenciados en un organismo unicelular. Se encuentra constituido por más de un 60% de secuencias repetitivas y en torno a 60.000 genes codificantes, muchos de ellos homólogos a los de otros organismos con los que puede co-habitar en el nicho genitourinario: VIH o *Treponema* entre otros (6). La presencia de un genoma tan grande podría explicar cómo un organismo unicelular como *Trichomonas* es capaz de colonizar y sobrevivir pasando desapercibido en numerosos casos en un ambiente tan hostil como el nicho genitourinario sometido a constantes fluctuaciones

ecológicas y fisiológicas. *T. vaginalis* muestra una elevada variabilidad intraespecífica habiendo desarrollado numerosos mecanismos patogénicos dependientes e independientes de contacto que influyen decisivamente en la variabilidad clínica de la infección.

Con el objetivo de entender en mayor profundidad el comportamiento patogénico de un parásito cuyo genoma, recientemente secuenciado por el equipo de Carlton en 2006, ha revolucionado la idea preconcebida de este protozoo, se realiza una revisión sobre su morfología y ciclo biológico, así como de la patogenia descrita hasta el momento (6). Aunque se ha intentado buscar marcadores moleculares capaces de discernir entre aislados en base a su patogenia y consecuencias clínicas, la complejidad que muestra *T. vaginalis* hace que esta búsqueda siga vigente. Asimismo, se hace una amplia descripción de los métodos de diagnóstico desarrollados hasta el momento y el tratamiento farmacológico que existe para tratar una de las I.T.S. más importantes de nuestro siglo.

2. MORFOLOGÍA

La morfología de *T. vaginalis* es muy variable. Desde aspectos piriformes, semilunares, esferoidales en medios líquidos, con una actividad locomotriz muy intensa, hasta formas ameboides en medios sólidos (agar), que

disminuyen su movilidad. Los agentes que operan tal polimorfismo son múltiples: la flora bacteriana concomitante, pH y presión osmótica del entorno, así como la riqueza de nutrientes del medio. El tamaño de la especie en preparaciones fijadas y teñidas es de $9,70 \pm 0,07 \times 7,00 \pm 0,04 \mu\text{m}$, produciéndose un incremento de un tercio en los trofozoitos vivos (7).

El movimiento vibratorio y adireccional característico de *T. vaginalis* se debe a la presencia de cinco flagelos, uno de los cuales es recurrente y constituyente fundamental de un orgánulo motor complejo: la membrana ondulante. Esta alcanza la mitad del cuerpo, presentando una laminilla marginal periódica conectada al primer cinetosoma por una estructura filamentosa. La Figura 1 muestra de forma esquemática la morfología del protozoo. El complejo cinetosomal está compuesto por unas estructuras cilíndricas llamadas cinetosomas, a las que se encuentra anclado cada flagelo en su extremo anterior. Los cuatro cinetosomas de los flagelos anteriores se disponen rodeando a un quinto que da origen al flagelo posterior o recurrente (FR). El número de flagelos presentes en el trofozoito, así como la longitud de la membrana ondulante (Mo), son características morfológicas con valor taxonómico.

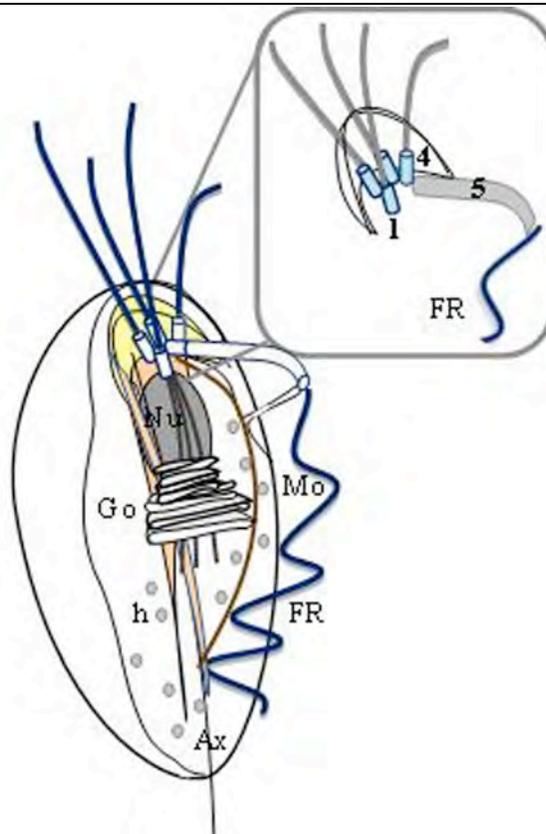


Figura 1. Morfología piriforme de *Trichomonas vaginalis*. Esquema morfológico de un tricomonádido en el que se observa: *Complejo cinetosomal*, compuesto por los cuatro cinetosomas de los flagelos anteriores y el quinto del flagelo recurrente (FR). La *costa* (coloreada de marrón), cuyo origen comienza en los cinetosomas 2 y 5, y ejerce de soporte de la membrana ondulante (Mo). El *aparato parabasal*, formado por los filamentos parabasales que conectan el complejo cinetosomal con el complejo de Golgi (Go). *Complejo pelta-axostilar* (de color amarillo), constituido por la pelta que soporta el canal periflagelar de donde emergen los flagelos y el axostilo (Ax). En color gris se representan los hidrogenosomas (h), con localización fundamentalmente paraxostilar y paracostal.

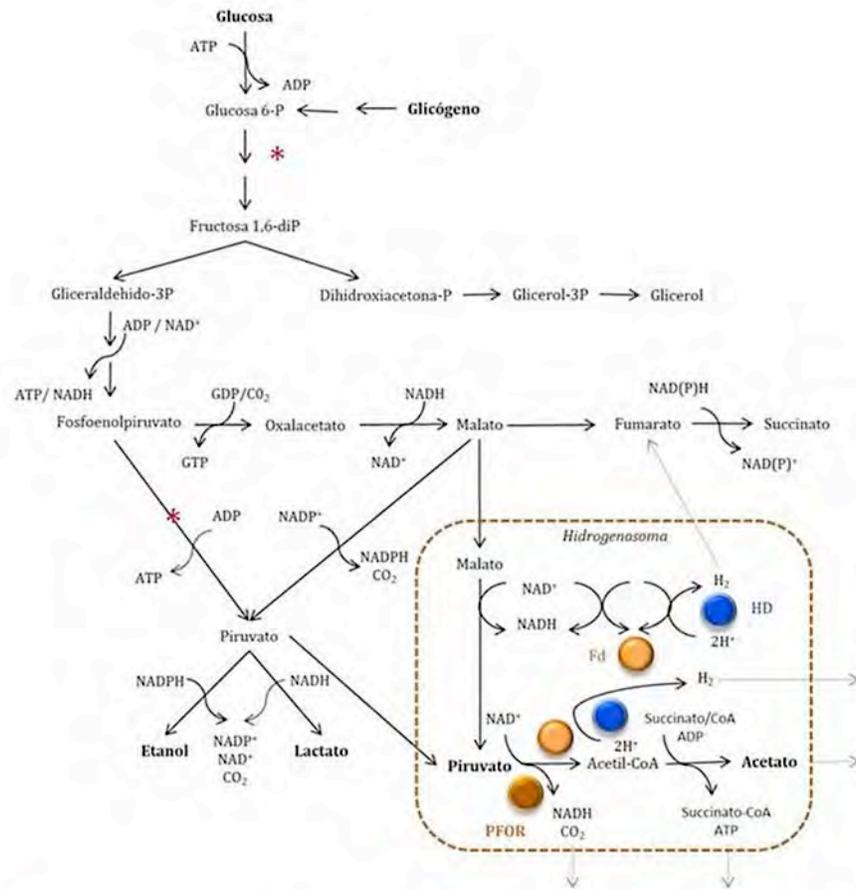
El citoesqueleto, con funciones motoras y reproductoras, está formado por microtúbulos que dan lugar a la formación de diversas estructuras como el complejo pelta-axostilar, la costa y los filamentos parabasales. El axostilo (Ax) constituye el eje de la célula sobresaliendo en la parte posterior del protozoo en forma de punta de flecha y uniéndose en la región anterior a la pelta, estructura citoesquelética con forma de media luna que rodea el área de donde emergen los flagelos anteriores. El complejo pelta-axostilar engloba el núcleo (Nu) y al aparato parabasal, formado por fibras estriadas que conectan las vesículas de Golgi (Go) o dictiosomas al aparato flagelar. La costa, formada por un haz de fibras estriadas, se encuentra asociada al cinetosoma del flagelo recurrente ejerciendo una función de soporte mecánico a la membrana ondulante (Mo).

El núcleo (Nu) se localiza en la porción anterior del trofozoíto, rodeado por una membrana nuclear porosa. Los tricomonádidos poseen un genoma de gran tamaño, organizado en 4 a 6 cromosomas según el género, con un tamaño variable, siendo mayor en los géneros *Trichomonas* y *Tritrichomonas* (133-177 Mb) mientras que *Tetratrichomonas gallinarum* presenta el más pequeño (86 Mb), dentro de las especies estudiadas (8). *T. vaginalis* se considera, hasta la fecha, el organismo unicelular con el genoma más grande secuenciado (*Giardia duodenalis*: 12 Mb, *Plasmodium falciparum*: 23 Mb).

El citoplasma presenta numerosas vacuolas y vesículas relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte, así como ribosomas e hidrogenosomas (h) estrechamente unidos a gránulos de glucógeno y al retículo endoplasmático rugoso (9). Los tricomonádidos son protozoos microaerófilos, carentes de mitocondrias y peroxisomas. Se alimentan mediante procesos de pinocitosis y fagocitosis, que tienen lugar preferentemente en la región posterior de la célula, formando vacuolas de

distintos tamaños. Los orgánulos implicados en el metabolismo energético son los hidrogenosomas (h), descubiertos por Lindmark y Müller en 1973. Estos orgánulos, presentes en protozoos de la superclase Parabasalia, están evolutivamente relacionados con las mitocondrias. Se localizan en su mayoría en las regiones paraxostilar y paracostal, tienen una forma esférica o ligeramente alargada, con un tamaño que oscila entre 0,2 a 1 μm de diámetro, aunque en condiciones de estrés como un tratamiento farmacológico, pueden llegar a duplicar su tamaño (9). El hidrogenosoma es el responsable de la formación de ATP mediante la oxidación del piruvato y el malato en condiciones anaeróbicas. Los hidratos de carbono son la principal fuente de ATP del tricomonádido, comenzando su metabolismo en el citosol, donde se lleva a cabo la glicolisis. Algunos intermediarios de esta ruta metabólica, como el piruvato o el malato, continúan su catabolismo en los hidrogenosomas. El piruvato sufre una descarboxilación oxidativa por acción de la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) formando acetato, H_2 y CO_2 . La ferredoxina (Fd), actúa como proteína transportadora de electrones en el hidrogenosoma y una vez reducida por la acción de la oxidoreductasa, vuelve a ser oxidada mediante la acción de la hidrogenasa (HD) produciendo hidrógeno molecular. Este orgánulo recibe su nombre por el hidrógeno molecular que generan durante el metabolismo energético en condiciones anaeróbicas.

Como muestra la Figura 2, el metabolismo de los hidratos de carbono se lleva a cabo parcialmente en el hidrogenosoma y no finaliza con la oxidación completa de la glucosa. Los productos que se generan tras el metabolismo son acetato, lactato, malato, glicerol, CO_2 e H_2 . Este metabolismo energético comienza en el citoplasma a través de la vía clásica Embden-Meyerhoff-Parnas con la obtención de ATP (9).



* Reacciones metabólicas en las que las enzimas que intervienen son distintas en el hombre y en *T. vaginalis*.

PFOR: Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa; Fd: Ferredoxina; HD: Hidrogenasa

Figura 2. Ruta de la glicolisis y la descarboxilación oxidativa en *T. vaginalis*.

3. CICLO BIOLÓGICO

T. vaginalis es un parásito de transmisión sexual de ciclo biológico directo. Sólo presenta formas flagelares o trofozoítos, no existiendo ninguna forma de resistencia o quiste en su ciclo vital. Aunque se han descrito formas redondeadas en ambientes desfavorables o cultivos agotados, este estado es reversible en cuanto el parásito vuelve a encontrarse en un medio adecuado y rico en nutrientes. Estas formas polimastigotes o pseudoquisticas son organismos esféricos e inmóviles caracterizados por la internalización de los flagelos y de la membrana ondulante (10).

El único hospedador natural de *T. vaginalis* es el ser humano. Su multiplicación se produce en la mucosa genitourinaria del hombre y la mujer mediante criptopleuromitosis. Este tipo de fisión binaria se caracteriza por la formación de un huso microtubular o *spindle* de localización externa al núcleo. La membrana nuclear se mantiene y los microtúbulos se polarizan en dos orgánulos llamados atratóforos, que realizan el papel de los centrosomas. La división comienza con la duplicación

de las estructuras cinetosomales, seguida de la división del núcleo mediante mitosis. La Figura 3 muestra un trofozoíto durante el proceso de división en dos células hijas.

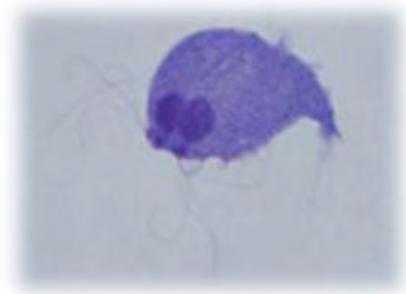


Figura 3. Trofozoíto en criptopleuromitosis. En la región anterior se observan los dos penachos flagelares, los complejos cinetosomales duplicados y los núcleos.

Algunos autores han estudiado la viabilidad de *T. vaginalis* en otras localizaciones anatómicas distintas al tracto genitourinario. Ryu *et al.* (11) determinaron la

supervivencia de los trofozoítos en distintas condiciones, estimando una supervivencia inferior al 10% tras exponer la muestra a 4 °C durante 30 minutos. *T. vaginalis* es muy sensible al aumento de temperatura, no pudiendo sobrevivir a más de 45 °C. Al no presentar formas de resistencia es susceptible a los detergentes y aguas cloradas, recuperándose menos de un 10% de parásitos viables tras 24 h en muestras de orina.

Se han descrito casos de transmisión vertical de madre a neonato a través del canal del parto. La mayoría de las tricomonosis neonatales son asintomáticas o se logra la curación espontánea de las mismas tras la disminución de los niveles de estrógenos maternos en el recién nacido a partir de la sexta semana (12) o tras el tratamiento con metronidazol (MTZ) (13).

Duboucher *et al.* (14) diagnosticaron la coinfección por *T. vaginalis* y *Pneumocystis* en un varón VIH⁺ con problemas respiratorios. Aunque la presencia de tricomonádidos en pulmón se asociaba a *T. tenax* (13, 15, 16), un comensal humano de localización oral, los estudios genómicos han permitido identificar otros tricomonádidos (*T. vaginalis*, *Pentatrichomonas hominis* y *Tetratrichomonas* spp.) en pacientes con afecciones pulmonares (14, 17-19)..

4. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

El genoma de *T. vaginalis* es uno de los de mayor tamaño secuenciado en un organismo vivo, incluido el hombre. Está constituido por aproximadamente 160 Mb organizados en 6 cromosomas y en torno a 46.000 genes codificantes (6, 20). Más del 65% del genoma está compuesto por familias génicas repetidas entre las que se encuentran un elevado porcentaje de elementos transponibles y secuencias codificantes para proteínas homólogas presentes en bacterias (*Treponema pallidum* y *Chlamydia poxvirus*), virus (VIH) y otros protozoos parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Leishmania major* o *Giardia duodenalis* (6). Algunos estudios mencionan la posible incorporación de ciertos genes bacterianos por *T. vaginalis* mediante un proceso de transferencia genética lateral (21, 22). Strese *et al.* (22) definen este fenómeno como la adquisición e incorporación de material genético de un organismo donador, sin que exista un proceso de transferencia sexual o vertical, en al menos un 0,25% de los genes de este protozoo. La transmisión potencial se habría producido mediante un proceso de fagocitosis, seguido de una fisión binaria, que habría incorporado en su genoma y en el de sus células hijas dichos genes, sin la necesidad de estar presentes en un gameto para poder ser transmitido a la progenie, como ocurriría en un organismo de reproducción sexual. Esto explicaría cómo *T. vaginalis* puede tener tantos genes homólogos al de otros organismos eucariotas y procariotas (6). Este fenómeno ya se ha descrito en otros protozoos parásitos como *Giardia* o *Entamoeba* (23). Sin embargo, la ausencia de genes procariotas en *Tritrichomonas tenax* y *Trichomonas gallinae* parece indicar que este fenómeno de transferencia debió suceder tras la divergencia de ambos géneros (22). La presencia de, al menos, un 5% de familias génicas inestables o pseudogenes, que han sufrido eventos de

duplicación reciente, también podría haber contribuido al aumento del genoma de este parásito (24). En lo que respecta al genoma de *T. vaginalis*, algunos autores atribuyen su tamaño a uno o varios procesos de expansión y duplicación de las familias génicas completas durante la evolución de los parabasalidos, especialmente durante la transición de *T. vaginalis* de una localización intestinal al tracto genitourinario (8). Existen numerosas incógnitas en cuanto al por qué de un genoma tan grande y repetido así como a la posible relación que pueda existir con su patogenia. Algunos autores han postulado que la duplicación de genes y, por consiguiente, la aparición de genes redundantes, podrían estar asociados a la supervivencia del parásito ante los cambios drásticos de su ecosistema natural. Este hecho explicaría cómo cientos de genes pueden aumentar o disminuir su expresión hasta 100 veces ante un estímulo como la presencia de oxígeno (25). Esta adaptación justifica la existencia de procesos de co-regulación entre familias génicas. Sin embargo todavía sólo se ha podido especular de forma teórica con hipótesis que intentan explicar este fenómeno.

Los estudios genómicos en *T. vaginalis* se han dirigido al conocimiento de regiones génicas, el diagnóstico y la caracterización de los aislados en función de propiedades fenotípicas como la resistencia a los 5-nitroimidazoles (5-NI), la presencia o no de virus de *T. vaginalis* (TVV), el origen geográfico, la correlación con la patogenia clínica, etc., mediante técnicas diversas. Se describen a continuación los estudios más relevantes:

4.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Este método de análisis de ADN mediante la amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos se emplea en estudios filogenéticos y de caracterización de aislados. Se utilizan varios cebadores diseñados al azar que permiten la comparación de polimorfismos en numerosos loci. A pesar de tratarse de una de las técnicas más empleadas para este tipo de estudios, su principal inconveniente es la baja reproducibilidad. Snipes *et al.* (26) publicaron en el año 2000 un estudio de epidemiología molecular basado en la caracterización de 109 aislados clínicos mediante tres métodos distintos: análisis comparativo de las secuencias mediante RAPD, estudio de mutaciones por medio de la secuenciación de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y la determinación de RNA de doble cadena. Los resultados mostraron una correlación significativa entre los patrones de RAPD y la presencia de TVV en los aislados de *T. vaginalis*. Los análisis de comparación de secuencias diferenciaron los aislados de tipo I de los de tipo II de forma estadísticamente significativa. Asimismo, Vanacova *et al.* (27) también lograron diferenciar los aislados en función de su susceptibilidad a metronidazol (MTZ) y la clínica de las pacientes. Estos resultados coinciden con los de Rojas *et al.* (28). No obstante, y en contraposición a los estudios de Snipes (26) los resultados de Vanacova no mostraron ninguna concordancia con la presencia de TVV (27). En 2001, Hampl *et al.* realizaron un estudio de RAPD empleando 27 cebadores con el fin de buscar correlaciones

entre los patrones genómicos de los aislados y la presencia de TVV, presencia de *Mycoplasma*, el origen geográfico o el desarrollo de resistencias. Sin embargo, los dendrogramas no mostraron asociaciones entre los resultados genómicos y los fenotípicos (29). En este sentido, Kaul *et al.* (30) en 2004 analizaron 15 aislados frescos de mujeres asintomáticas y otros 15 de pacientes con síntomas procedentes de India. Los resultados agruparon todas las muestras asintomáticas. No obstante, los valores de *bootstrap* en los aislados estudiados fue muy bajo entre los agrupamientos y la sensibilidad a MTZ.

4.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Los resultados obtenidos en la aplicación de esta técnica a la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína de choque térmico (HSP70) y la resistencia a MTZ no mostraron ninguna correlación entre los fragmentos de 36 aislados (31). En cambio, Meade *et al.* (32) obtuvieron dos agrupaciones claramente diferenciadas

tras el análisis de 129 aislados de *T. vaginalis* empleando la misma diana EcoRI-HSP70. En ambos estudios se corrobora la heterogeneidad genómica que muestra este parásito, en función del número elevado de patrones de RFLP obtenidos por ambos grupos.

4.3. Genes Ribosomales

El análisis de los genes ribosomales, en particular, el que codifica para la subunidad pequeña (ARNr 18S) continúa siendo una de las herramientas principales para el análisis filogenético de especies debido a su naturaleza conservada y evolución lenta (33). En el campo de la tricomonosis, la secuenciación del ARNr 18S ha sido una herramienta empleada en estudios de diagnóstico rápido de esta enfermedad mediante PCR, mejorando la sensibilidad del diagnóstico de referencia (34, 35). La región genómica codificante de los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S se esquematiza en la Figura 4.

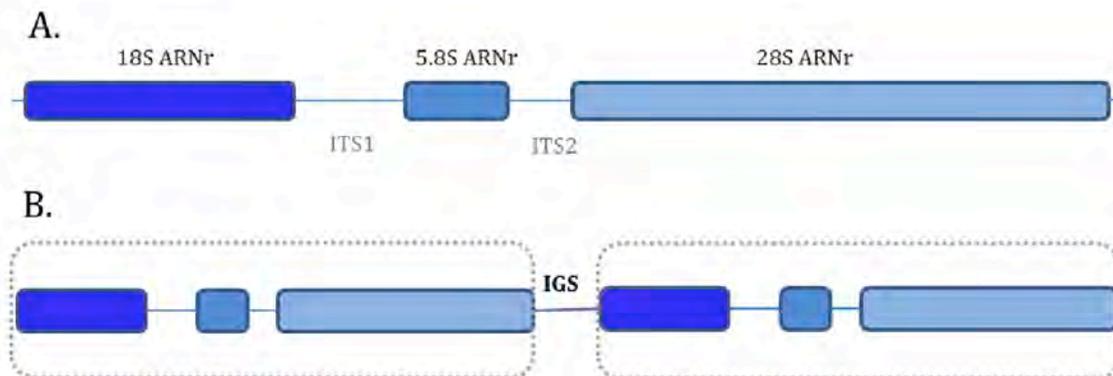


Figura 4. Esquema de la región genómica codificante de los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S. A. Esquema de una unidad transcripcional en la que cada ARNr se separa por un espaciador interno no codificante (ITS). **B.** Representación de dos unidades transcripcionales separadas por el espaciador intergénico (IGS).

4.4. Espaciadores Internos (ITS)

Los genes que codifican a los ARNr están mucho más conservados que los espaciadores internos (ITS), convirtiéndose estos últimos en marcadores adecuados para la diferenciación inter e intra-específica de organismos (39). Este hecho explica el alto número de estudios en otros parásitos en los que se ha realizado la diferenciación inter e intra-específica con éxito empleando esta región como marcador molecular (40-44).

Los tricomonádidos se caracterizan por presentar un *locus* ITS2 pequeño que presenta una estructura secundaria formada por una rama en lugar de tres (45). La secuencia genética compuesta por las regiones 18S ARNr - ITS1 - 5.8S ARNr - ITS2 - 28S ARNr se encuentra codificada en una única unidad transcripcional formada por varias copias en tándem y de número variable en función del organismo (Figura 4.A). El análisis del genoma de *T. vaginalis* reveló la existencia de 254 copias de la subunidad ribosomal pequeña y 251 copias del 5.8S ARNr (6). Cada una de estas unidades transcripcionales se separan mediante otra secuencia no codificante denominada espaciador intergénico (IGS) (Figura 4.B). Simoes-Barbosa *et al.* (46) emplearon este *locus* para el estudio de la variabilidad

entre aislados obtenidos de pacientes con y sin sintomatología. Sin embargo no lograron detectar una asociación clara entre la clínica y los perfiles de IGS-RFLP, considerando este marcador inadecuado para los estudios de caracterización intraespecífica en *T. vaginalis*.

Todos los estudios han confirmado la idoneidad del *locus* ITS1 - 5.8S ARNr - ITS2 como herramienta para estudios filogenéticos en tricomonádidos (47-50). Otros grupos se han centrado en la caracterización de aislados, habiendo obtenido variabilidades de entre el 15% y el 4% en la región ITS de los aislados secuenciados. Algunos autores han asociado mutaciones de nucleótidos específicos, especialmente en el ITS1, con fenómenos de resistencia al metronidazol (26, 51) y con el desarrollo de tricomonosis asintomáticas en las pacientes (52).

Este *locus* también ha sido empleado para el diagnóstico de casos de sospecha de tricomonosis pulmonar. En los estudios desarrollados por Mallat, Bellanger y Leterrier se amplificaron muestras pulmonares de pacientes afectados por un neumotórax post-trasplante cardíaco, un glioblastoma y un adenocarcinoma esofágico, respectivamente, identificando la presencia de *T. tenax* en los lavados broncopulmonares mediante la secuenciación

de este *locus* (13, 15, 16). Jongwutiwes *et al.* (17) emplearon esta región e identificaron *Pentatrachomonas hominis* en una mujer de 28 años afectada por un lupus

eritematoso y coinfectada al mismo tiempo por *Strongyloides* y *Opistorchis*.



Figura 5. Disposición nucleotídica en tándem de los genes que codifican el ARNr 5S en *T. vaginalis*, separados por una secuencia intergénica (IGS) no codificante.

La subunidad 5S del ARNr de *T. vaginalis* se encuentra codificada en otra región del genoma, organizada en tándem de más de 200 copias (Figura 5). No existen estudios que empleen este *locus* como marcador para la caracterización molecular de este parásito, tan sólo el trabajo de Torres-Machorro *et al.* (53) publicado en 2009, en el que se compara la secuencia de este gen en tres tricomonádidos distintos (*T. vaginalis*, *T. tenax* y *Tritrichomonas foetus*), confirmando una divergencia de entre un 94-98%, así como una localización cromosómica variable entre los organismos.

Independientemente del *locus* que se emplee (ribosomal o espaciador no codificante), en todos los casos

se amplifica la región y se secuencia el producto de PCR para su análisis comparativo. Los nuevos secuenciadores siguen basándose en el método de Sanger. Sin embargo las nuevas tecnologías permiten llevar a cabo de forma automatizada la secuenciación de varias muestras a la vez mediante cromatografía capilar.

La Figura 6 compara la metodología de secuenciación antigua empleando el método de Sanger en geles de poliacrilamida y revelados con radiactividad, y el que se lleva a cabo actualmente con secuenciadores automáticos capaces de generar un cromatograma en función de las señales obtenidas por los fluorocromos con los que se marcan los nucleótidos del ADN amplificado (54).

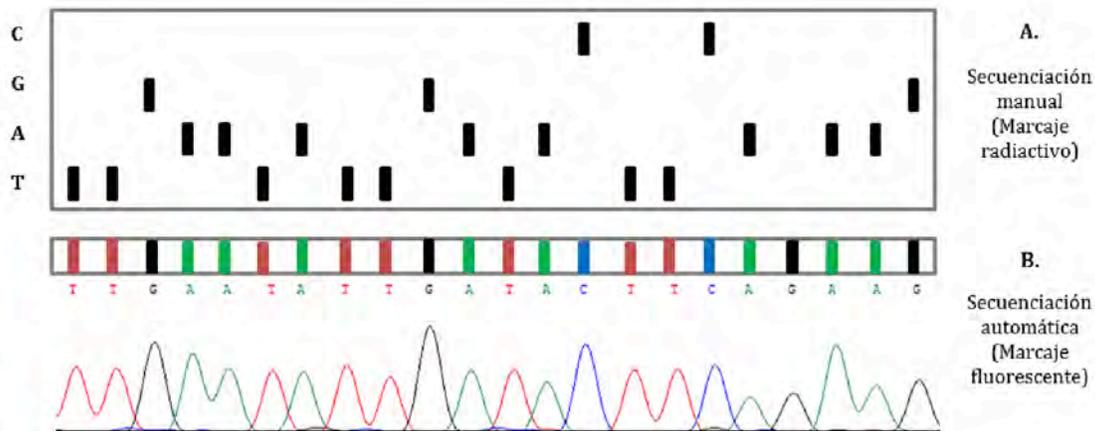


Figura 6. Comparación de la secuenciación de Sanger mediante el método enzimático empleando geles de poliacrilamida y revelando mediante marcaje radiactivo (A) y la secuenciación automática empleando fluorocromos (B).

4.5. Microsatélites (*MS* o *SSR*)

Las regiones microsatélites son secuencias cortas de dos a seis nucleótidos repetidas en tándem formando fragmentos de 100 nucleótidos aproximadamente (Figura 7) y distribuidas ampliamente de forma multialélica y ubicua en eucariotas y procariotas en numerosas copias (55-57). Ramel sostiene la hipótesis de que se trata de ADN basura (58). Sin embargo, cada vez son más los estudios que confirman que estas regiones repetidas están implicadas en procesos de organización de la cromatina, regulación génica, replicación del ADN, activación de la transcripción y en los procesos de reparación mediante *mismatch*, entre otros (59). Los microsatélites pueden ubicarse en distintas regiones genómicas, como las regiones no codificantes, los marcos abiertos de lectura o

regiones UTR, con implicaciones en el desarrollo de patologías como la enfermedad de Huntington, algunos tipos de cáncer, ataxia cerebrosespinal, etc. (59).

La región que se encuentra flanqueada por dos MS se denomina intermicrosatélite (ISSR o Inter-SSR) (Figura 7). Este fragmento génico puede ser codificante y también ha sido objeto de estudio. Con el fin de investigar el polimorfismo genético de cepas y clones de organismos vivos, Zietkiewicz *et al.* (60) diseñaron en 1994 cebadores para la caracterización molecular de distintos organismos por medio de la huella genómica o *fingerprinting* a través de la comparación de patrones de bandas entre muestras. Para ello, diseñaron cebadores formados por uno de los dímeros más comunes en los genomas eucariotas (CA_n) en cuyos extremos 5' y 3' ancló una región de dos

nucleótidos distintos con el fin de aumentar la especificidad de unión y la reproducibilidad de la técnica (Figura 7). El polimorfismo que se detecta con esta metodología no se debe a la variación del tamaño de los MS de destino sino a las mutaciones (inserciones o deleciones) que se han producido durante la evolución del

organismo. Las principales ventajas de este marcador molecular son: la reproducibilidad, la rapidez y sencillez de la técnica. Asimismo, es recalable el polimorfismo elevado asociado a la tasa de mutación espontánea que le convierte en un marcador excelente para estudios intraespecíficos (60, 61).

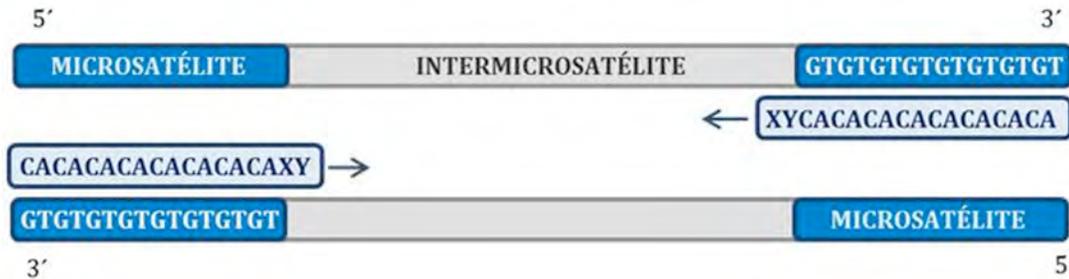


Figura 7. Representación de una región microsatélite (SSR) de 2 nucleótidos repetidos en tándem flanqueando a un intermicrosatélite (ISSR). Los cebadores siguen el modelo diseñado por Zietkiewicz *et al.* (60).

Estos marcadores se consideran buenas herramientas en la identificación de infecciones mixtas así como en el estudio de genética poblacional de distintos parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* o *Plasmodium* spp. (57,61-67).

Aunque no existen trabajos de ISSR en *T. vaginalis*, en 2011 el grupo de Conrad *et al.* (68) llevó a cabo los primeros estudios de MS en *T. vaginalis*. Para ello analizaron el genoma en busca de regiones de menos de 400 bp formadas por repeticiones de 2-6 nucleótidos. Los estudios bioinformáticos generaron 86 MS, de los cuales se seleccionaron un panel de 21 marcadores MS capaces de diferenciar entre aislados. Un año más tarde, este mismo grupo corroboró la utilidad de este panel de marcadores de MS para la caracterización de 235 muestras de *T. vaginalis* procedentes de todos los continentes (68).

4.6. Polimorfismo de Nucleótido Simple (SNP)

Se trata de alteraciones en la secuencia que afectan a un único nucleótido (Figura 8). Se encuentran distribuidos

por todo el genoma, produciéndose en 1 de cada 1000 bases (69). Su localización es relevante en el resultado fenotípico que puede ocasionar dicha mutación. Muchos SNP se producen en regiones no codificantes por lo que son empleados como marcadores evolutivos. No obstante, también se encuentran en regiones codificantes, incluyendo genes de copia única (SCG: *Single-Copy Gene*). Conrad *et al.* (57) estudiaron este tipo de genes en busca de los marcadores óptimos para la caracterización de aislados en el laboratorio e identificaron un número elevado de SCG. Seleccionaron sólo aquellos que presentasen un tamaño no muy elevado (<400 pb), no mostrasen similitud con secuencias de otros organismos y representasen a genes constitutivos o *housekeeping*, factores de virulencia potenciales o de interés como dianas farmacológicas. El estudio de los SNP requiere no sólo la amplificación del fragmento sino su posterior secuenciación para la comparación entre aislados, al igual que los ARNr y los ITS.

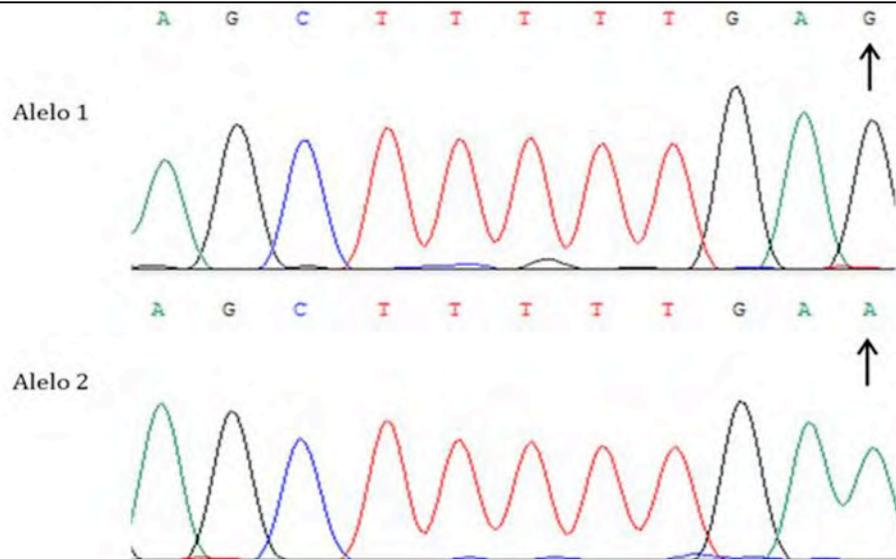


Figura 8. Ejemplo de polimorfismo de nucleótido simple o SNP.

En los estudios de Conrad *et al.* (57), de los 21 SCG iniciales, se seleccionaron seis como los más adecuados para la caracterización genética de este parásito, junto con los 21 MS seleccionados. La combinación de los MS y SNP permitió un año más tarde diferenciar dos tipos de poblaciones asociadas con la presencia de TVV y la sensibilidad a MTZ tras genotipar 235 muestras positivas (68). A diferencia de los SSR, estos marcadores presentan una menor tendencia a fenómenos de homoplasia al mostrar un ratio de mutación menor (57, 70). Cornelius *et al.* (70) seleccionaron siete genes constitutivos de copia única con el fin de caracterizar 68 aislados que agruparon en dos poblaciones diferentes. Esta tipificación multilocus de secuencias, también conocida como *Multilocus Sequence Typing* (MLST), se emplea para los estudios poblacionales de patógenos mediante la secuenciación de fragmentos internos de los genes seleccionados. Las diferencias o SNP con respecto al gen de referencia permiten conocer la evolución del aislado e identificar el

número de alelos en las secuencias estudiadas.

5. PATOGENIA

La distinta sintomatología provocada por el parásito sienta sus bases en los mecanismos de patogenia, los cuales, aún hoy en día, no han podido ser explicados de forma clara. En las últimas décadas se han realizado estudios que han permitido revelar de forma parcial el comportamiento y evolución de este parásito. *Trichomonas* se encuentra en un ambiente complejo, que sufre cambios bruscos, en el que influyen el pH, la microflora, la respuesta inmune del hospedador, los niveles de hierro y zinc, poliaminas y calcio, etc.

En este sentido, el parásito ha tenido que ser capaz de desarrollar mecanismos de adaptación al hospedador para colonizar y mantener la infección en este ambiente tan hostil. La interacción parásito-hospedador es un proceso multifactorial dependiente de mecanismos inherentes al paciente (hospedador) y al parásito (Figura 9).

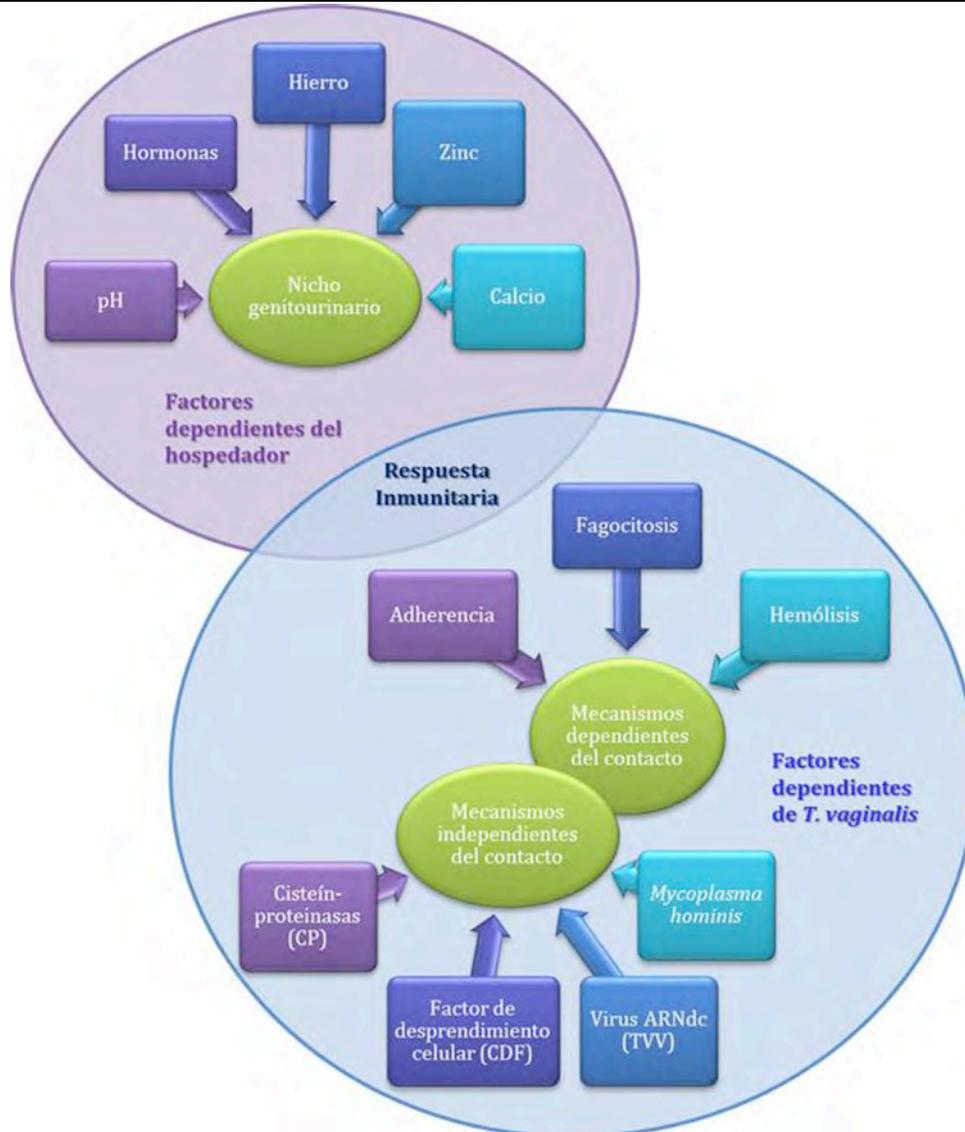


Figura 9. Esquema representativo de los factores principales que influyen en la patogenia y colonización por *T. vaginalis*.

5.1. Factores asociados al hospedador

Los factores más relevantes asociados al hospedador son:

5.1.1. pH vaginal y microflora: *T. vaginalis* crece en un pH próximo a 5,0. El pH vaginal de una mujer sana es ácido, por debajo de 4,5. La existencia de enfermedades genitourinarias concomitantes o una alteración de la flora (especialmente la disminución de la población de *Lactobacillus acidophilus* y/o un incremento de las bacterias anaerobias), están asociadas a un aumento del pH. Esta circunstancia facilita el asentamiento del parásito en caso de un contacto de riesgo. Existen muchos factores asociados al parásito cuya expresión y funcionalidad van a estar determinados por el pH del medio (71). Asimismo, el propio parásito a través de la fagocitosis de las bacterias de la microflora, reduce la población de *Lactobacillus*, principal responsable del ambiente ácido en la vagina (72).

Esta alteración de la flora y la secreción de determinados factores favorece un ambiente menos ácido y con ello el asentamiento parasitario.

5.1.2. Ciclo menstrual y niveles hormonales: el papel que juegan estos dos elementos en la presentación clínica de la tricomonosis es de gran relevancia. La exacerbación de los síntomas en la mujer está asociada a las fluctuaciones hormonales durante el transcurso del ciclo menstrual. El nivel de estrógenos alcanza dos picos máximos durante el ciclo: el primero durante la ovulación y el segundo en la mitad de la fase lútea (periodo previo a la menstruación). En cambio la progesterona comienza a secretarse durante la segunda parte del ciclo, es decir, tras la ovulación, disminuyendo drásticamente con el comienzo de la menstruación (Figura 10). Durante el embarazo, la mujer presenta niveles de estrógenos y progesterona elevados.

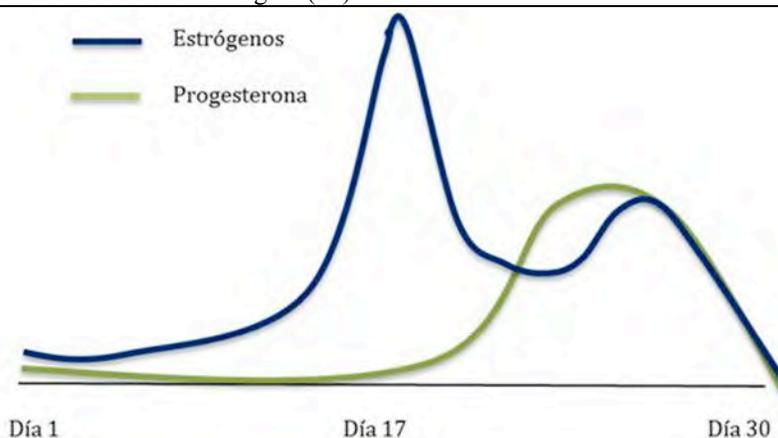


Figura 10. Niveles de estrógenos y progesterona durante el ciclo de una mujer fértil no embarazada.

La presencia de receptores específicos para estrógenos y andrógenos en la superficie de *T. vaginalis* refleja la importancia de las hormonas en el desarrollo de esta parasitosis (73).. Hay estudios que parecen indicar que tanto un ambiente hipo como hiper-estrogénico podrían favorecer distintos mecanismos relacionados con el asentamiento del parásito. En la literatura científica se pueden encontrar dos hipótesis contrapuestas que no se han logrado confirmar.

La primera teoría explicaría por qué algunas pacientes experimentan una exacerbación de los síntomas durante la menstruación. Este periodo se caracteriza por presentar niveles bajos de estrógenos y un incremento en la disponibilidad de hierro a través de los glóbulos rojos en el aparato genitourinario. Asimismo, durante la menstruación la flora vaginal sufre una disminución de la población de lactobacilos (74), convirtiéndose en otro factor que también influye en el asentamiento parasitario. La situación hormonal contraria se produce durante el embarazo, periodo en el que la mujer presenta una mayor concentración de estrógenos y progestágenos. Según esta hipótesis el desarrollo de síntomas se vería disminuido tal y como han llegado a relatar algunas pacientes. Los estudios de Garber *et al.* (75) demostraron que la presencia

de estrógenos en la cavidad genitourinaria induce una disminución en la secreción de factores de virulencia asociados al parásito como el factor de desprendimiento celular (CDF). Por otro lado, el nivel de estrógenos en sangre condiciona la producción de glucógeno en las células del epitelio vaginal. Una deficiencia estrogénica induce una disminución de la flora normal, que emplea y transforma el glucógeno en ácido láctico como sustrato energético. En estas condiciones, el pH vaginal aumentaría, favoreciendo el asentamiento de *T. vaginalis* (Figura 11, teoría A).

Sin embargo, y en contra de lo defendido por la teoría A, este ambiente (bajos niveles de estrógenos, un menor glucógeno disponible y un pH alto) es el que presentan las adolescentes pre-menárquicas y las mujeres postmenopáusicas, poblaciones en las que el asentamiento es poco frecuente. Asimismo, Sharma *et al.* (76) describieron la curación de un caso de tricomonosis recurrente en una mujer menopáusica tras retirarle la terapia de reemplazo hormonal. Este grupo defiende la idea de que los estrógenos pueden favorecer el asentamiento del parásito (Figura 11, teoría B). En relación a esta segunda teoría, se podría asociar este factor biológico (niveles hormonales altos) con un incremento

del crecimiento de *T. vaginalis* en animales ovariectomizados y estrogenizados tras la infección experimental. El incremento de glucógeno, observado en la mucosa vaginal de ratas ovariectomizadas tras el

tratamiento con estradiol, sugiere una posible asociación entre la susceptibilidad a la infección y la acumulación de este sustrato (glucógeno) empleado como nutriente por el parásito.

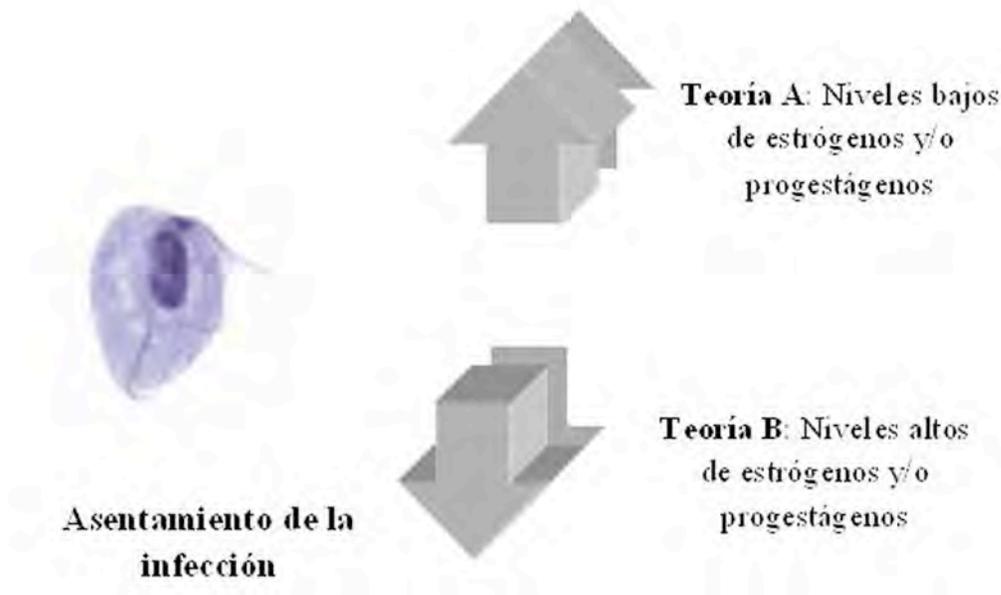


Figura 11. Resumen gráfico de las dos teorías que reflejan la influencia de los niveles de hormonas sexuales femeninas en el asentamiento de *T. vaginalis* a nivel genitourinario.

La existencia de trabajos que muestran resultados contrapuestos refuerza la idea de que la patogenicidad de este parásito se debe a la correlación entre los distintos factores de virulencia y el microambiente genitourinario. Un único factor no puede explicar la pato-biología de esta I.T.S., aunque, tal y como se ha demostrado, parece que la influencia del factor hormonal en el establecimiento de esta parasitosis es de gran importancia.

De forma concomitante a las fluctuaciones de hormonas, se va a producir la renovación periódica de la mucosa junto con la descamación fisiológica durante el ciclo menstrual del epitelio cervical y vaginal, que van a permitir que el parásito acceda a capas más profundas.

5.1.3. Presencia de hierro: el hierro es uno de los factores que más se han estudiado en la patogenicidad de *T. vaginalis*. Su papel como inductor de numerosos genes

asociados al asentamiento y colonización del parásito (77), así como a la exacerbación de su patogenicidad, son indiscutibles. También es esencial para el desarrollo adecuado del metabolismo del parásito y su multiplicación. *T. vaginalis* presenta un metabolismo fermentativo en el que participan proteínas citoplasmáticas e hidrogenosomales con núcleos Fe-S (78). Hay estudios que corroboran el papel regulador del hierro en determinadas proteínas parasitarias como las cisteín-proteasas (CP) o las adhesinas (AP), así como en otras enzimas (tabla 1). Sin embargo, en muchos de los genes que codifican para estas proteínas no se han logrado identificar elementos reguladores de hierro (IRE) ni promotores génicos dependientes de hierro (IRP) (79), como se observa en el gen que codifica a la adhesina AP65 (80).

Tabla 1. Proteínas reguladas por la acción del hierro (78, 81).

Proteína	Tipo de proteína	Función	Regulación por Fe
AP23	Adhesina	Citoadherencia	+
AP33	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad succinil CoA sintetasa	+
AP51	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad succinil CoA sintetasa	+
AP65	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad málica	+
AP120	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad PFOR	+
TvCP4	CP de superficie	Hemólisis	+
TvCP12	CP de superficie	Citotoxicidad	-
TvCP30	CP de superficie	Citoadherencia, desorganización del citoesqueleto y degradación de proteínas	-
TvCP39	CP de superficie	Citotoxicidad y degradación de inmunoglobulinas	-
TvCP62	CP	Citoadherencia	+
TvCP65	CP de superficie	Citotoxicidad	-
TvCP2, CP3, CP4 y CPT	CP de secreción	Inducción de la apoptosis en células del hospedador	-
TvLEGU-1	CP de superficie	Citoadherencia	+
TvLIP	Triacilglicerol lipasa	Hemólisis	+
TvGAPDH	Proteína de unión a fibronectina (Fn) y deshidrogenasa	Citoadherencia	+
P270	Proteína de superficie	Variación fenotípica	-

Los niveles de hierro altos condicionan procesos metabólicos asociados al hidrogenosoma, regulando el potencial de membrana del orgánulo, así como la expresión de enzimas hidrogenosomales entre las que se encuentran las AP (82). También se ha confirmado que este elemento induce modificaciones en los componentes de la matriz extracelular del hospedador, como el incremento de moléculas de fibronectina (Fn) que favorece la adhesión de los trofozoítos (77, 83). Asimismo, este

ambiente rico en Fe se correlaciona con procesos de evasión del sistema inmune del hospedador. El hierro induce la expresión de determinadas cisteín-proteinasas implicadas en la degradación del componente C3b del complemento (84) o la fosforilación de la proteína inmunógena de superficie P270 (85).

Aunque en condiciones de bajo hierro la capacidad de adhesión se encuentra mermada debido a la disminución en la expresión de las adhesinas (AP), el parásito va a inducir otras proteínas que permiten la colonización. En

este ambiente, el parásito aumenta hasta tres veces su unión a mucina y posteriormente va a causar la degradación proteolítica de la mucosa a través de la secreción de CP con actividad mucinasa (86). En otras palabras, en condiciones de hierro bajo, el parásito estimula su actividad citotóxica mediada por algunas CP (CP30 o CP65) (79, 87), lo que va a permitir una mayor motilidad y con ello una penetración mejor a capas más profundas del epitelio, logrando de esta forma colonizar y sobrevivir en el ambiente vaginal.

Debido a que no existe hierro libre en el tracto genitourinario, *T. vaginalis* lo adquiere mayoritariamente a través de la lactoferrina presente en las secreciones cervicales, a través de receptores específicos, que se incrementan en número y afinidad mediante procesos de retroalimentación negativos. La concentración de lactoferrina es elevada en la mucosa vaginal tras la fase post-menstrual (88). Como fuentes alternativas de hierro, el parásito es capaz de tomar Fe^{2+} a partir del grupo hemo y la hemoglobina por medio de la hemólisis y la fagocitosis de los glóbulos rojos. Durante el periodo menstrual los eritrocitos están presentes en el medio vaginal, periodo que coincide con una disminución de los niveles de lactoferrina (89). *T. vaginalis* también es capaz de internalizar ferritina aunque no es capaz de emplear la transferrina (81).

5.1.4. Presencia de zinc: este elemento presente en el fluido prostático del hombre, dificulta el crecimiento del parásito. Los niveles normales de Zn^{2+} en el fluido prostático de un individuo sano son de $590 \pm 45 \mu\text{g/mL}$ ($\sim 9 \text{ mM}$) (90). El carácter citotóxico del Zn^{2+} explica por qué esta I.T.S. cursa de forma asintomática en la mayoría de los varones (91). Por el contrario, si las secreciones prostáticas de zinc disminuyen ($< 1,6 \text{ mM}$) existe un riesgo mayor de desarrollar prostatitis crónica en caso de tricomonosis (91). Estudios moleculares y proteómicos confirman la regulación negativa de algunas CP (CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20) por este elemento. Entre las CP caracterizadas, se encuentran dos proteasas que se han correlacionado de forma directa con el efecto citotóxico de *T. vaginalis* en células (78, 92, 93).

De igual forma, este elemento también regula positivamente la expresión de dos fimbrinas, esenciales junto con la actina en la modificación estructural que sufre el parásito durante el contacto con las células del tracto genitourinario, adquiriendo una forma ameboidea (78).

5.1.5. Niveles de poliaminas: las poliaminas son moléculas presentes en todos los organismos y que, gracias a su naturaleza catiónica, interactúan con los ácidos nucleicos. Se encuentran implicadas en procesos de proliferación celular como división celular, diferenciación, estabilización del ARN y ADN, crecimiento celular y apoptosis. Garcia *et al.* (94) observaron que la inhibición de la síntesis de putrescina en *T. vaginalis* provocaba una inhibición reversible del crecimiento normal del trofozoito. No obstante, *T. vaginalis* no tiene la capacidad de sintetizar *ex novo* algunas de estas moléculas, como la espermina, debiéndola adquirir del hospedador. El

metabolismo parasitario de estos compuestos comienza con la síntesis de putrescina a partir de ornitina. Los niveles de poliaminas en la mujer también sufren fluctuaciones en función del momento del ciclo en el que se encuentre. Sin embargo, las secreciones vaginales de mujeres infectadas presentan un nivel elevado de putrescina ($> 2 \text{ mM}$) sintetizada y secretada por el propio parásito (78) y responsable del olor característico de la leucorrea en esta infección. En los últimos años, se ha estudiado el papel que juegan las poliaminas como reguladores de determinados factores asociados al parásito. El metabolismo de estas moléculas, y concretamente el de la putrescina, está implicado en procesos de citoadherencia y citotoxicidad. Los estudios realizados por Garcia *et al.* (94) revelaron que la inhibición del metabolismo de las poliaminas ocasionaba un aumento en la capacidad de adhesión a células del epitelio vaginal inmortalizadas de entre 4 a 20 veces. En este mismo estudio observaron que en esas mismas condiciones, *T. vaginalis* inhibía la citotoxicidad mediada por contacto. Posteriormente, Álvarez-Sánchez *et al.* (95) estudiaron la influencia de la putrescina en la expresión de CP65. Este equipo, siguiendo el método de Garcia *et al.* (94), inhibió la síntesis de putrescina y confirmó una disminución de los niveles de transcripción de la proteasa y por ende, de la cantidad de proteína sintetizada implicada en la acción citotóxica del parásito. Figueroa-Angulo *et al.* (78) también han confirmado el papel regulatorio de las poliaminas en la expresión a nivel post-transcripcional de CP39. Esta proteasa, al igual que CP65, también está implicada en la citotoxicidad parasitaria.

5.2. Factores asociados al Parásito

Los factores asociados al parásito se agrupan en dos tipos:

5.2.1. Mecanismos dependientes de contacto

La pared vaginal está formada por un epitelio escamoso estratificado externo sustentado por un tejido conjuntivo. El soporte y mantenimiento de las células del epitelio vaginal (CEV) se basa en la red de macromoléculas que conforman la matriz extracelular. El parásito requiere la interacción con la superficie de la célula del hospedador, en la que tanto proteínas como azúcares van a ser esenciales para la interacción entre ambas células.

La Figura 12 muestra de forma esquemática el control de los microambientes generados en los huecos que se establecen entre las dos membranas. La representación esquemática es una modificación de la publicada por Fiori *et al.* (96) a partir de una fotografía de los estudios de citoadherencia entre una célula HeLa y un trofozoito de *T. vaginalis*. Durante este contacto se generan pequeños huecos entre ambas membranas que permiten al parásito controlar distintos factores como el pH o la concentración de iones.

Entre los factores contacto-dependientes asociados a *T. vaginalis* destacan:

a) Adhesión: el fenómeno de adhesión es uno de los procesos iniciales requeridos para el establecimiento de la infección a través de la interacción parásito-hospedador. La adhesión es un proceso multifactorial dependiente de pH, temperatura, hierro y tiempo de contacto, en el que intervienen numerosas proteínas. El parásito sufre un cambio morfológico rápido tras el contacto con la célula del epitelio vaginal, pasando de una forma elipsoidal a una ameboide, incrementando el área de adhesión. Esta transformación induce la síntesis de diversos factores entre las que destacan las adhesinas (AP). El contacto se establece entre estas proteínas parasitarias (AP120, AP65,

AP51, AP33 y AP23) y un receptor de la célula hospedadora (101).

Estas AP destacan por su diversidad funcional y el mimetismo molecular que presentan, co-localizándose en el hidrogenosoma donde desarrollan diversos papeles enzimáticos (tabla 2) o pudiéndose expresar en la superficie del parásito donde intervienen en el proceso de interacción con el hospedador. La presencia o no de determinados estímulos condiciona su localización en el parásito y con ello la función que finalmente desarrollarán estas proteínas (78).

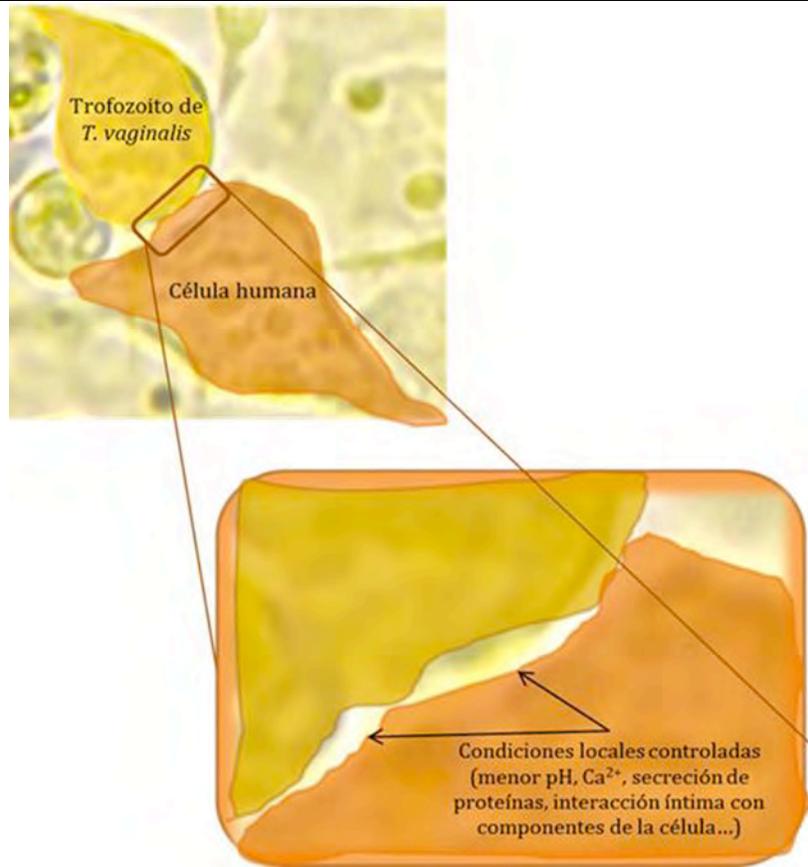


Figura 12. Esquema representativo de la interacción entre *T. vaginalis* y la célula diana del hospedador. Durante este contacto se generan pequeños huecos entre ambas membranas que permiten al parásito controlar distintos factores como el pH o la concentración de iones. Esquema modificado a partir del publicado por Fiori *et al.* (95).

Tabla 2. Actividad enzimática de cuatro de las cinco adhesinas descritas hasta el momento en *T. vaginalis*.

Proteína	Función enzimática	Referencia bibliográfica
AP120	PFOR	(97)
AP65	Enzima málica	(98)
AP51	Subunidad β de la SCS	(99)
AP33	Subunidad α de la SCS	(100)

SCS: Succinil coenzima A sintetasa; PFOR: Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa

Algunos investigadores asocian la multifuncionalidad de estas AP, denominadas *moonlighting proteins*, al hecho de que estén codificadas por familias multigénicas (98-100). Según estos autores, a causa de un fenómeno de duplicación génica durante el proceso de divergencia evolutiva, una de las copias podría haber adquirido funciones nuevas (78). Sin embargo esta teoría requiere estudios más detallados, ya que se contradice con los resultados descritos por García *et al.* (101), quienes confirmaron que todas las adhesinas codificadas por los distintos genes podían localizarse en la superficie del protozoo. La multifuncionalidad de estas adhesinas ha suscitado el interés de distintos grupos de investigación.

Según los resultados publicados, la secuencia de sucesos sería la siguiente:

1.- En primer lugar, determinados estímulos, como el contacto celular o el hierro van a favorecer la expresión y secreción de estas AP al medio extracelular.

2.- A continuación, dichas proteínas pueden asociarse de forma no específica a distintas células epiteliales del hospedador así como a eritrocitos (102).

3.- Algunas adhesinas como la AP65, una vez secretada, se re-asocia por un lado a la superficie de *T. vaginalis* y al mismo tiempo a la célula hospedadora a través de receptores específicos en ambas membranas, actuando de puente entre ambas células gracias a una conformación dimérica por medio del dominio N-terminal de las dos moléculas de AP65 (103) (Figura 13).

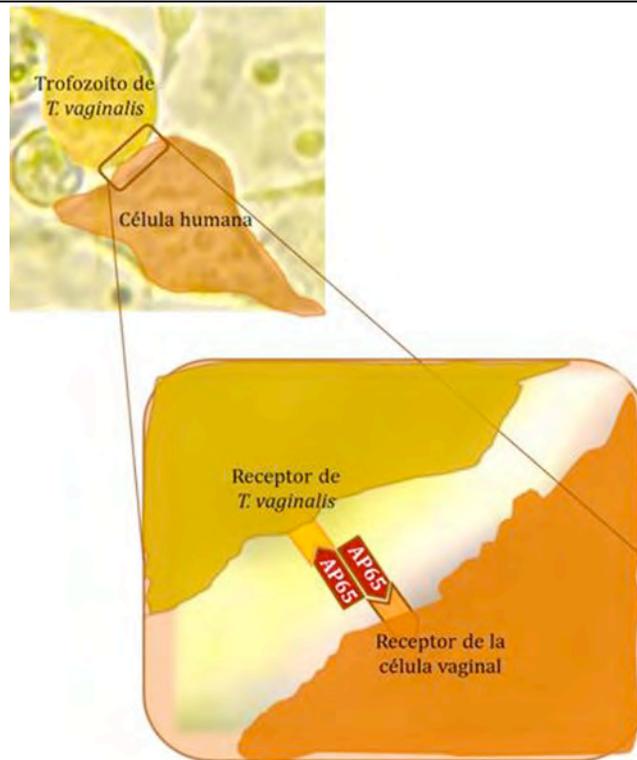


Figura 13. Representación gráfica del mecanismo de interacción entre *T. vaginalis* y la célula del hospedador. Interacción mediada a través de AP y propuesta por García y Alderete (103).

Es importante resaltar el carácter complejo del proceso de adhesión. En él intervienen otras biomoléculas, como el lipofosfoglicano (LPG), el polisacárido de superficie más abundante de *T. vaginalis*, con más de 2,3 millones de copias por célula (104). El parásito se encuentra cubierto de un glicocálix denso cuyo LPG se ancla a la membrana plasmática a través de uniones inositolfosfoceramida y no

a través de puentes glucosilfosfatidilinositol (GPI) como cabría esperar de un eucariota. Este LPG revela una composición glicolipídica altamente específica y rica en galactosa, glucosamina y ramnosa, más parecida a la de los procariotas (105, 106), y sin manosa, monosacárido abundante en el LPG de eucariotas (106) (Figura 14).

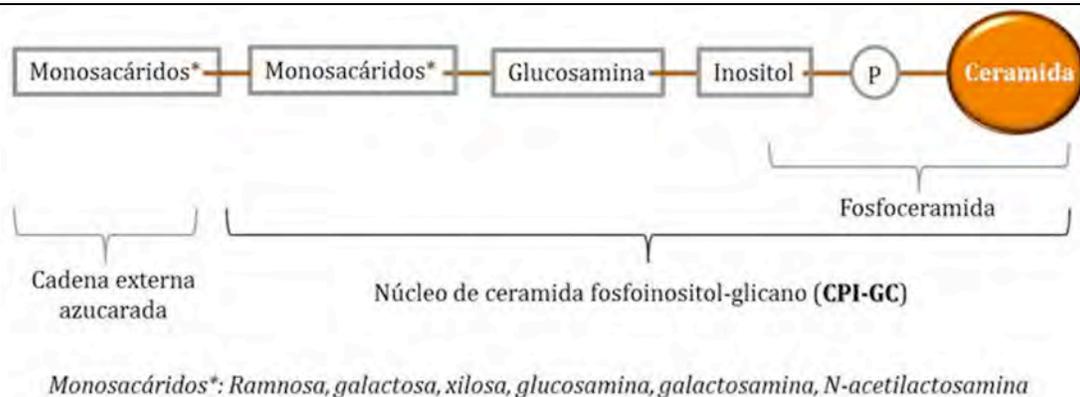


Figura 14. Esquema de la estructura del LPG de *T. vaginalis* (106).

Entre las funciones del LPG, destaca el papel clave en la interacción con las células del hospedador a través de lectinas (86, 106), como las galectinas, localizadas en la superficie de células epiteliales vaginales, ectocervicales y endocervicales (107). Asimismo, se ha confirmado que el LPG de *T. vaginalis* también interviene en el desarrollo de la respuesta inmunitaria mediada por células epiteliales a través de la inducción de algunas citoquinas (IL-6) y quimiocinas como MIP-3 α y especialmente IL-8 (104,106).

Del mismo modo, el parásito es capaz de reconocer y unirse de forma específica a otros componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal del hospedador como la mucina, la fibronectina (Fn), la laminina o el colágeno de la mucosa vaginal (83, 86). La asociación a la mucina se encuentra mediada por lectinas (86), mientras que la unión a las otras dos glicoproteínas requiere la interacción con proteínas receptoras y carbohidratos presentes en la superficie del parásito (83). Estos procesos también están regulados por la concentración de Fe, incrementándose la unión a Fn y mucina en condiciones de niveles bajos de Fe (77, 86). El calcio también parece estar implicado en la inducción de la expresión de receptores para Fn (77). Además de todas estas proteínas, hay que tener en cuenta algunas enzimas que son secretadas por *T. vaginalis* y que intervienen en el proceso de adhesión. Recientemente, se ha descrito la importancia de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que al igual que las AP puede adquirir una función no enzimática y localizarse en la superficie del parásito, actuando como receptor de Fn, plasminógeno y colágeno (108).

Existe otra familia multigénica que codifica para numerosas proteínas de tipo BspA, conocidas por el papel como mediadoras de la unión entre células del hospedador y bacterias. Se piensa que *T. vaginalis* podría haber adquirido estos genes a partir de procariotas mediante una transferencia genética lateral. Noël *et al.* (109) estudiaron el papel de estas proteínas como mediadoras en la interacción con el mucus, la matriz extracelular y células del hospedador. También parecen jugar un papel importante en la endocitosis de virus y en la evasión a la respuesta inmunitaria del hospedador.

b) Fagocitosis: este proceso se encuentra estrechamente relacionado con la obtención de nutrientes y con la evasión del sistema inmune. Estudios de microscopía han mostrado la secuencia de acontecimientos en el proceso de fagocitosis de *T. vaginalis*: (a) Adhesión parásito-célula diana (110, 111). Algunos autores sugieren la posible implicación de los receptores de manosa presentes en la superficie del parásito como responsables de este primer evento (111). (b) Fagocitosis de la célula diana gracias a una reorganización citoplasmática de la actina que permite al parásito fagocitar a través de cualquier parte de su cuerpo celular (110). Este proceso puede producirse mediante dos mecanismos distintos: a través de la generación de pseudópodos que rodean e internalizan a la célula diana o bien mediante procesos de succión causando la elongación de la membrana plasmática de la célula diana y su posterior internalización a través de un canal endocítico estrecho (110-112). (c) Digestión de la célula fagocitada en el interior de vacuolas a través de enzimas lisosomales (111, 112).

Mediante microscopía electrónica se ha podido confirmar la capacidad de *T. vaginalis* para fagocitar células del epitelio, lactobacilos, leucocitos, eritrocitos y levaduras. La ingestión de levaduras y bacterias ocasiona un aumento del pH vaginal generando un microambiente favorable para el crecimiento y multiplicación de este parásito y, al mismo tiempo, una disminución de la flora endógena, que actúa como mecanismo de protección de la mujer frente a la colonización de patógenos. Este mecanismo de evasión del sistema inmune también se ve favorecido por la fagocitosis de los leucocitos (112). La actividad β -hemolítica de *T. vaginalis*, publicada en los años 80 por Krieger *et al.* (113), está descrita como un factor de virulencia del parásito. Al mismo tiempo, los eritrocitos son fuente de ácidos grasos y hierro para el parásito (114), permitiendo la regulación de numerosos genes (88) y factores ligados a la patogenia. Estudios posteriores también han identificado la presencia de fosfolipasas A1 y A2 con actividad lítica, que contribuyen al desarrollo del proceso inflamatorio (115) y a la actividad hemolítica (116).

Por otro lado y desde un punto de vista evolutivo, la fagocitosis de bacterias de la microbiota podría explicar la

adquisición de genes bacterianos a través de una transferencia lateral (*Lateral Gene Transfer* o LGT). Esto justificaría la presencia de enzimas en este parásito con funciones esenciales en la colonización de la mucosa que presentan origen bacteriano (117); como las familia de las BspA (109), entre otras.

5.2.2. Mecanismos independientes de contacto

El parásito puede secretar sustancias tóxicas que van a intervenir en numerosos procesos vitales.

a) Cisteín-proteasas (CP): son factores líticos esenciales en los procesos de adherencia y colonización del tracto genitourinario, aunque también intervienen en otros procesos relacionados con la evasión inmunitaria o la adquisición de nutrientes. Se han descrito hasta la fecha 23 CP con tamaños entre 23 y 110 kDa, cuya expresión y funcionalidad varía según las características de los aislados (78, 118) y la presencia de algunos factores en el medio (Tabla 3).

Tabla 3. Función y regulación de las CP descritas.

CP	Función	Regulación por Fe	Regulación por otros factores
CP (30 kDa)	Desorganización del citoesqueleto	ND	
TvCP4	Hemólisis	+	
TvCP12	Citotoxicidad	-	
TvCP30	Citoadherencia y degradación de proteínas	-	
TvCP39	Citotoxicidad. Degradación de proteínas de la matriz extracelular, Hb e Ig	-	Zn (-) y poliaminas (+)
TvCP62	Citoadherencia	+	
TvCP65	Citotoxicidad. Degrada colágeno y Fn	-	Zn (-) y poliaminas (+)
CP2, CP3, CP4 y CPT	Inducción de la apoptosis de células del hospedador	-	
TvLEGU-1	Citoadherencia	+	
TvLEGU-2	Transportador de precursores de proteínas en retículo endoplásmico	No lo regula	

Las funciones en las que participan estas CP son:

a.1) La degradación de componentes de la mucosa y células del tracto genitourinario, que permiten la penetración del parásito a capas más profundas. Está ampliamente aceptada la relación entre la secreción de estas proteasas parasitarias y los mecanismos de adherencia y colonización del tracto genitourinario. Algunos estudios han revelado la importancia de la función mucinasa de las CP en las primeras fases de colonización de la mucosa vaginal (86). Otros trabajos también han mostrado su implicación en la degradación de componentes estructurales de la superficie de mucosas como la Fn o el colágeno (85, 92, 119, 120). Hernández-Gutiérrez *et al.* estudiaron el papel de la CP39 (92). Esta CP presenta funciones diversas entre las que destaca su capacidad para degradar distintos tipos de colágeno, pudiendo ser una de las moléculas implicadas en los nacimientos prematuros en mujeres embarazadas infectadas o intervenir en el estrechamiento observado previo al parto de la pared cervical.

a.2) La citotoxicidad celular: la CP65 o la CP30 se encuentran estrechamente relacionadas con estos procesos de citotoxicidad celular (119).

a.3) La inducción de la apoptosis en CEV por la acción conjunta de varias proteasas (CP2, CP3, CP4 y CPTotal) (121).

a.4) La mediación en la citoadherencia a las células del hospedador: Arroyo y Alderete demostraron que las CP juegan un papel esencial en la adhesión a las células del hospedador y no únicamente en fenómenos de citotoxicidad (122). Estas CP podrían mediar en la activación de precursores inactivos de AP presentes en la superficie, que pasarían a conformaciones activas tras la digestión específica, o bien podrían intervenir en la modificación de los receptores de las células diana. En un primer momento, estas AP van a encontrarse enmascaradas en la superficie parasitaria por proteínas específicas. Las CP eliminan de forma específica proteínas inmunogénicas de enmascaramiento, permitiendo a las AP realizar su función en el reconocimiento y unión al hospedador (122). Las CPs que cumplen esta función serían CP30 y CP62 (120).

a.5) La evasión de la respuesta inmunitaria a través de la degradación de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG humanas identificadas en los lavados vaginales de mujeres infectadas (123), así como por medio de la lisis del factor C3b (84) o del inhibidor de proteasas secretado por los leucocitos (124).

a.6) Otras funciones son los procesos relacionados con la adquisición de nutrientes, como la degradación de la hemoglobina para la adquisición de hierro (120). Algunas CP como la CP39 se unen a receptores específicos de eritrocitos y células humanas vaginales y prostáticas corroborando el papel de estas CP en la obtención de

nutrientes en ambos microambientes (92).

b) Factor de desprendimiento celular (*cell-detaching factor*, CDF): es una glicoproteína de unos 200 kDa secretada por el parásito, que se inactiva a un pH inferior a 5 o por efecto de la temperatura (125). La producción de este factor se ve regulada por la presencia de estrógenos (75), pudiendo estar implicada en la exacerbación de los síntomas durante la menstruación por la disminución de los niveles de estas hormonas. Esta proteína inmunogénica soluble tiene como función producir un desprendimiento del epitelio genitourinario (125, 126), favoreciendo la penetración del parásito a capas más profundas. Se ha descrito una correlación entre el desarrollo de síntomas graves y la mayor actividad de la CDF en comparación con aislados procedentes de pacientes asintomáticas o con una presentación clínica leve (75).

c) Presencia de virus de doble cadena: se han descrito tres tipos de virus de ARN de doble cadena (ARNdc) denominados de forma genérica como virus de *T. vaginalis* (TVV) (127), clasificados dentro de la familia Totiviridae, a la que pertenecen virus ARNdc no fragmentados capaces de infectar protozoos parásitos y hongos (128, 129). Las distintas poblaciones víricas pueden presentar tamaños (33 a 200 nm) y formas variables (icosaédrico, filamentoso, cilíndrico o esférico), identificándose en la membrana plasmática, asociados al complejo de Golgi, en el interior de vacuolas y citoplasma y, en menor proporción, en el núcleo de *T. vaginalis* (130, 131). Este parásito puede estar infectado por más de una especie de TVV, sin embargo las implicaciones que puedan derivarse de esta coinfección no se han dilucidado (127, 129). Los virus TVV penetran por endocitosis (131). Son capaces de regular la transcripción de genes de *T. vaginalis* y variar la expresión de determinados antígenos de superficie, como la proteína P270, así como otras proteínas entre las que destacan algunas CP. En este sentido, los estudios parecen indicar que la presencia de TVV influye en la patogenia del parásito (123, 127-129, 132-134). En virtud de la expresión en la superficie de la proteína inmunogénica P270, se han clasificado los aislados de *T. vaginalis* en dos grupos: *T. vaginalis* tipo I y tipo II. Los aislados tipo I sintetizan P270 de forma basal, no pudiéndose localizar en la superficie del parásito. Estos aislados no se encuentran infectados por TVV, siendo por tanto, V⁻ (virus negativo), mientras que los aislados de *T. vaginalis* Tipo II son poblaciones heterogéneas en las que algunos trofozoítos expresan en su superficie P270, siendo V⁺ (infectados por TVV) (133, 135). A pesar de lo que se podría esperar, estos virus no se detectan en los sobrenadantes de cultivos infectados. De igual forma, los intentos de infectar aislados TVV⁻ con partículas virales no han tenido éxito (133). Con el fin de investigar el papel de los TVV en la virulencia del parásito, algunos grupos han tratado de correlacionar aislados Tipo II con el desarrollo de una clínica concreta (136), o el desarrollo de resistencia a los 5-NI (132). Sin embargo, se requieren más estudios que confirmen los resultados aportados.

En función de estos hallazgos, algunos autores han

descrito el papel potencial de este parásito como transmisor de virus humanos. Pindak *et al.* en 1989 (137) y Sayed el-Ahl *et al.* (138) una década más tarde corroboraron la capacidad de *T. vaginalis* para fagocitar células infectadas por reovirus y por herpes simplex tipo II, confirmando la presencia de partículas víricas en el interior de las vacuolas y en el citoplasma del parásito. Los virus pudieron ser recuperados tras varios días en el interior del protozoo. El herpes simplex tipo II se mantuvo viable en el interior de los tricomonádidos hasta seis días. Ante este posible papel como transmisor de virus, se investigó *in vitro* si partículas víricas o bien linfocitos infectados por distintos subtipos de VIH-1 podrían ser incorporados y transmitidos por *T. vaginalis* (139). Los resultados de este equipo confirmaron que el parásito incorpora partículas víricas capaces de mantenerse en el citoplasma durante 48 horas, pero no se han detectado evidencias de replicación o liberación del virus como puede ocurrir con TVV. En cuanto a las células infectadas por VIH, el protozoo tiene la capacidad de fagocitar linfocitos. No obstante, la digestión por acción del fagolisosoma de dicha célula y del virus parece llevarse a cabo antes de que el propio virus pueda evadir la acción lítica de las enzimas, a diferencias del virus del herpes que sí es capaz de escapar de la degradación digestiva. Ningún estudio ha demostrado que estos virus humanos tengan capacidad replicativa en el interior del trofozoíto, aunque su supervivencia durante un cierto periodo sí que podría conllevar graves consecuencias en aquellos casos en los que exista co-infección por ambos patógenos, convirtiéndose el parásito en un transportador pasivo.

d) Presencia de *Mycoplasma hominis*: *T. vaginalis* es un parásito que puede encontrarse asociado con *Mycoplasma hominis*. Esta bacteria, al igual que el protozoo, reside únicamente en el tracto genitourinario humano, y se caracteriza por una dependencia metabólica alta del hospedador que parasita a causa de su pequeño tamaño génico (0,7-0,83 Mb) (140). Esta curiosa asociación es estrictamente especie-específica, no habiéndose descrito otras simbiosis similares con otras bacterias. Los estudios de Rappelli *et al.* (141) detectaron una coinfección en el 90% de los aislados estudiados. Los resultados revelaron que *M. hominis* presente en los aislados de *T. vaginalis* eran capaces de transmitirse a células de cérvix humano, así como a otros aislados no infectados. Otros trabajos han confirmado la capacidad de esta bacteria para sintetizar ADN y replicarse en el interior del parásito. Esta simbiosis permitiría a la bacteria protegerse de la respuesta inmune del hospedador y de la presión antibiótica. Sin embargo, los beneficios, así como los cambios fisiológicos y nutricionales que podrían derivarse de esta asociación parásito-bacteria, aún no están del todo claros (142). Algunos investigadores han sugerido un posible efecto beneficioso en cuanto a la patogenia y la resistencia a fármacos (140, 143). En este sentido, los estudios genómicos han llegado a correlacionar dichos patrones con la resistencia al MTZ. Sin embargo, si se analizan los resultados de este grupo, tan sólo el 50% de

las muestras *Mycoplasma*+ mostraron resistencia reducida (concentración mínima letal por encima de 13 µg/mL) o moderada (CML > 50 µg/mL) (140). El trabajo publicado por Morada *et al.* (144) sugiere que las poblaciones de trofozoítos coinfectados consumen una mayor cantidad de arginina que los cultivos de *T. vaginalis* axénicos. La depleción de arginina en la vagina podría contribuir a una producción menor de óxido nítrico y por tanto una disminución de la eficacia de la *explosión respiratoria* de los macrófagos y con ello una alteración en la respuesta inmune del hospedador. Sin embargo, la variabilidad entre aislados de *T. vaginalis*, los cuales no resultan ser en todos los casos igual de susceptibles a una infección bacteriana, así como una heterogeneidad en el propio aislado al no encontrarse todos los trofozoítos infectados (141) y la posible co-infección por más de una cepa bacteriana, dificulta en gran medida la interpretación de resultados debido a la variabilidad que se obtiene en los patrones de ADN (140, 143), asemejándose a lo observado en las infecciones por TVV (26, 135).

5.3. Respuesta Inmunitaria

Aunque se ha ido comentando a lo largo de este punto, es importante mencionar la evasión del parásito a la respuesta inmunitaria del hospedador:

T. vaginalis ha desarrollado numerosos mecanismos implicados en la supervivencia y colonización del tracto genitourinario, y en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador. El tracto genital femenino está protegido por una microflora bacteriana, responsable de su pH ácido, que junto con otros mecanismos del sistema inmunitario, protegen de la invasión de patógenos. Los mecanismos más relevantes son: a) las enzimas, b) la secreción del inhibidor de la proteasa de leucocitos producido por CEV, c) las IgG e IgA (145) o d) las proteínas surfactantes (146).

A continuación se recogen los factores que se han citado a lo largo de esta revisión y que intervienen en la supervivencia de *T. vaginalis* a la respuesta inmunitaria del hospedador:

5.3.1. La fagocitosis de lactobacilos de la microflora vaginal, levaduras o incluso células del sistema inmunitario (112).

5.3.2. La inducción de la apoptosis de neutrófilos por medio de la activación de la vía de las caspasas (147).

5.3.3. La capacidad de enmascaramiento del parásito con componentes localizados en la matriz extracelular vaginal como la Fn (77) o de proteínas séricas del hospedador (148), que le permiten la evasión del sistema inmunitario y de la acción degradativa de determinadas sustancias proteolíticas del fluido vaginal o plasmático (149).

5.3.4. La degradación de Ig por parte de cisteín-proteinasas de *T. vaginalis* (145).

5.3.5. La evasión al sistema del complemento a través de la lisis de la C3b (84). En relación con la protección frente a la acción del complejo de ataque a la membrana (CAM), es importante mencionar que este parásito secreta al medio externo enzimas capaces de lisar ácido siálico

como la neuraminidasa (150) o Neu5Ac liasa (151). El ácido siálico protege a las células autólogas de la acción lítica del complemento, impidiendo la unión de C3b en la superficie de las mismas. Algunos investigadores sugieren que el ácido siálico podría ser una fuente de nutrientes para el parásito, lo que explica la secreción de estas enzimas y la presencia en la superficie parasitaria de sitios de unión al ácido siálico (151, 152). Sin embargo, no se ha estudiado el posible papel de estas enzimas en la captación de ácido siálico del hospedador con el fin de emplearlo como factor de evasión del complemento. Asimismo, recientes estudios parecen mostrar que el parásito es capaz de secuestrar CD59 de la superficie del hospedador que parasita para incorporarlo en su superficie y de esta manera protegerse de la acción del complemento evitando la formación del CAM (153).

6. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

T. vaginalis fue considerado como comensal, desde su descubrimiento hasta que Hühne, en 1916, aisló el parásito en el flujo de una mujer que padecía colpitis aguda. Los efectos patológicos asociados con la infección son el resultado de una compleja interacción entre el parásito y el hospedador.

La tricomonosis se manifiesta como una enfermedad del tracto urogenital humano de transmisión venérea, que si bien no es grave, produce un cuadro clínico muy variado (114). Los signos y síntomas de la tricomonosis son inespecíficos, por lo que se requiere la toma de muestras y su examen en el laboratorio para el diagnóstico.

En las mujeres, la muestra vaginal se toma con hisopo estéril, recomendándose la observación inmediata al microscopio. Si es necesario se procede a la siembra en medio de cultivo. El diagnóstico en muestras de orina presenta una sensibilidad menor, independientemente de la técnica empleada (154, 155). Lawing *et al.* (154) demostraron que no todas las mujeres diagnosticadas mediante muestras vaginales de tricomonosis presentaban trofozoítos en las muestras de orina, corroborándose el diagnóstico en un 75% de los casos. En el hombre, las muestras que se emplean para el diagnóstico son uretrales o de orina fundamentalmente, aunque también se han descrito estudios con muestras de semen (156).

En la tabla 4 se esquematizan los métodos de diagnóstico más relevantes. La técnica más utilizada en clínicas y hospitales es el examen directo al microscopio de la muestra (157). El parásito se identifica por su morfología y movimiento característico. Sin embargo la sensibilidad de esta técnica no es muy elevada.

El cultivo de la muestra en medio líquido o semisólido es la técnica de referencia o *gold standard*. Existen diversos medios para el cultivo de *T. vaginalis*, como el medio Kupferberg, Kupferberg STS, Hirsch, Trichosel, Diamond modificado, suero Lash, o el más reciente, denominado InPouch TV (158). Sin embargo, el más utilizado es el Diamond (TYM) o Diamond modificado (159). Este diagnóstico requiere de 2 a 7 días de observación diaria. Es una técnica económica y sencilla,

pero requiere un tiempo de espera y la necesidad de que los organismos se encuentren vivos (**tabla 4**). Ya se han comercializado dispositivos que contienen un medio de cultivo similar al Diamond y que permiten introducir la muestra del paciente para su incubación. El sistema InPouch TV permite emplear no sólo muestras vaginales y uretrales sino también de orina. Una de las grandes ventajas de estos sistemas es que permiten la observación directa de la muestra al microscopio en el propio dispositivo y su transporte y no requiere refrigeración para su conservación (160).

En los últimos años se han descrito métodos de diagnóstico molecular, basados en la amplificación de ácidos nucleicos (NAATs) mediante PCR para aumentar la sensibilidad del diagnóstico respecto al cultivo. Algunos proceden de adaptaciones de técnicas aprobadas por la agencia *Food and Drug Administration* (FDA) para el diagnóstico de clamidiasis y gonorrea (Amplicor[®] *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* assay-Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN). Esta técnica permite la detección de ADN de *T. vaginalis* a partir de muestras vaginales, endocervicales y de orina con rangos de sensibilidad superiores al 90% (161). Otra técnica molecular aprobada en 2011 por la FDA es la APTIMA TV (Gen-Probe) vinculada a la detección del ARN ribosomal 18S de *T. vaginalis*. Este método comercial emplea muestras endocervicales, vaginales o de orina de pacientes tanto asintomáticas como sintomáticas, y cuenta con el distintivo CE para su uso en la UE (159). Aunque puede emplearse con muestras uretrales y de orina, la FDA no ha aprobado esta técnica para el diagnóstico en varones (162).

Existen escasos datos sobre las manifestaciones clínicas de la tricomonosis en el varón, que ha sido considerado como un simple portador asintomático del parásito, debido en parte a métodos de diagnóstico poco apropiados, siendo responsable de casos de uretritis no gonocócicas. Las consecuencias de la infección en el hombre pueden variar, desde prurito en el pene en los casos crónicos, hasta la descarga uretral purulenta e inflamación del meato externo (uretritis y prostatitis) en procesos agudos, actuando la glándula prostática como reservorio de los tricomádidos (114). En algunos casos se ha descrito irritación, dolor uretral, dolor abdominal, disuria, epididimitis y casos de infertilidad transitoria. La influencia sobre la fertilidad se debe al probable efecto citotóxico de las sustancias secretadas por *T. vaginalis* sobre los espermatozoides (163) así como su capacidad para fagocitarlos (78, 163).

Por consiguiente, la técnica más efectiva para el diagnóstico de la tricomonosis en el varón es la PCR. La amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR permite detectar hasta un tricomonádido (164). Este límite es significativamente inferior al de detección del cultivo (300 trofozoitos/mL) (157) o la observación al microscopio (10.000 parásitos/mL) (160). El inconveniente principal del diagnóstico mediante PCR es el riesgo de inhibidores en la muestra que podrían invalidar el resultado (154, 156).

Asimismo cabe destacar el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la hibridación de ácidos nucleicos. BD Affirm[™] VP III (Becton-Dickinson) está diseñado para el diagnóstico de *T. vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*.

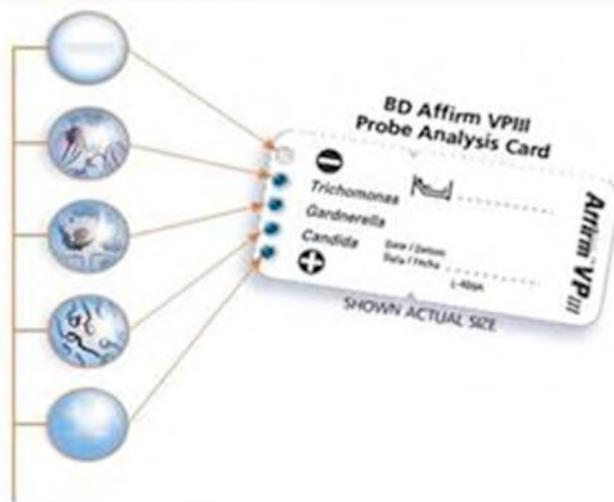


Figura 15. Test de hibridación de ADN BD Affirm[™] VP III. Las imágenes han sido tomadas de www.moleculardiagnosis.bd.com.

Este test incorpora sondas de captura que se encuentran integradas en una tarjeta para la lectura automatizada de la misma. Su ventaja principal es que permite diagnosticar tres de las patologías ginecológicas más frecuentes en la mujer mediante una reacción de hibridación en un pequeño dispositivo que cambia de color (azul) cuando la muestra es positiva, permitiendo detectar co-infecciones en menos de 1 hora (Figura 15) (Tutorial BD Affirm[™] VP III

Microbial Identification System).

Posee una sensibilidad superior a la observación en fresco y en menor tiempo (165, 166), aunque se han descrito casos de falsos positivos, no resultando eficaz en muestras uretrales. Este test se encuentra aprobado por la FDA y la Unión Europea (marca CE) (159).

En la última década, la FDA ha aprobado dos técnicas

diagnósticas nuevas definidas como *point-of-care diagnostics* en muestras vaginales (167). Ambas técnicas han demostrado ser más sensibles que el diagnóstico en fresco, aunque pueden producirse falsos positivos en poblaciones con una baja prevalencia de esta I.T.S. El método OSOM[®] *Trichomonas Rapid Test* (Genzyme Diagnostics, Cambridge, Massachusetts), anteriormente comercializado con el nombre de XenoStrip *T. vaginalis* test (Xenotope Diagnostics) se fundamenta en la detección cualitativa antigénica del parásito mediante inmunocromatografía capilar. El fundamento del método OSOM[®] es similar a los test de embarazo, obteniéndose el resultado en unos 10 minutos. Está indicado para la

detección de antígenos de muestras vaginales y emplea dos anticuerpos monoclonales murinos, uno de los cuales se encuentra inmovilizado en la superficie de la tira reactiva de nitrocelulosa y conjugado a las partículas rojas. En caso de que la muestra sea positiva, generará un complejo con los antígenos específicos de la muestra. El anticuerpo de captura secundario anti-ratón se une al complejo antigénico, apareciendo la línea azul indicativa de que la muestra es positiva (165, 168). Todas las tiras contienen un control interno de color rojo que debe aparecer en todos los casos para validar la prueba. En caso de que la muestra sea positiva y existan antígenos de *T. vaginalis*, aparecerá una línea azul (Figura 16).

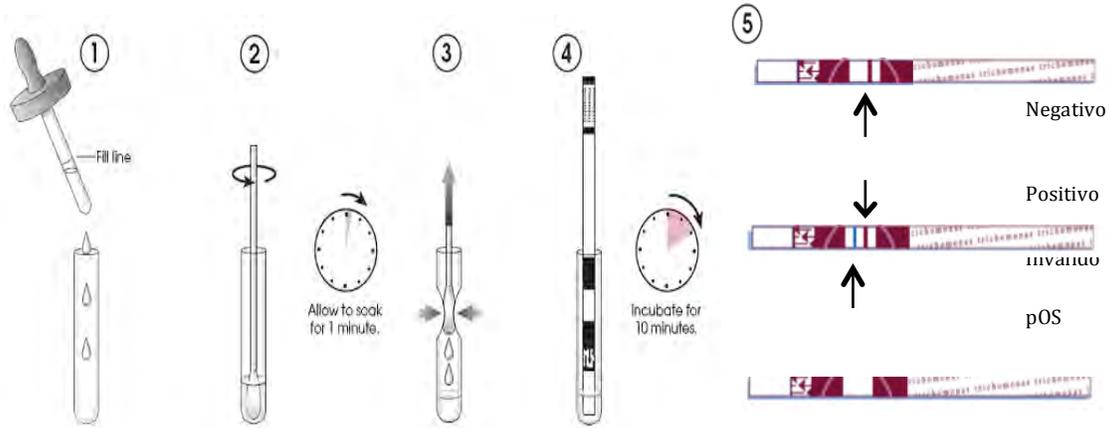


Figura 16. Procedimiento para el diagnóstico de *T. vaginalis* mediante el test rápido OSOM[®] *Trichomonas Rapid Test* (Genzyme Diagnostics). Imagen tomada del Testing Handbook provisto con el test.

Recientemente se ha comercializado un test de aglutinación en látex en el Reino Unido para el diagnóstico rápido de la tricomonosis en muestras vaginales denominado *Tv latex agglutination test* (Kalon Biological, Surrey, UK). Emplea partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos (IgG) anti-*T. vaginalis* de conejo. En caso de que la muestra sea positiva, se produce la aglutinación de las mismas con los antígenos parasitarios. El resultado de la prueba se obtiene en tres minutos. Las principales ventajas de este método son la rapidez, sencillez y economía, ya que no requiere ningún tipo de instrumentación. Sin embargo, el laboratorio recomienda que los reactivos del *kit* se almacenen entre 4 y 8 °C, dificultando su posible uso como método de diagnóstico de campo. Esta técnica no está aprobada aún, ni en EEUU ni en la UE (159) y se fundamenta en el trabajo publicado a finales de la década de los ochenta por Carney *et al.* (169).

Las últimas investigaciones en este campo se encaminan a la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico rápido que puedan ser empleadas con muestras de ambos sexos. Alderete y Neace han identificado anticuerpos en el suero de pacientes infectados frente a proteínas de *T. vaginalis* altamente inmunogénicas [α -actinina (ACT), aldolasa (ALD), α -enolasa (ENO) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP)]. Sus últimos estudios se han centrado en la generación de una proteína recombinante compuesta por la combinación de epítomos de ALD, ENO y GAP previamente seleccionados en función de su reactividad con sueros de pacientes de ambos sexos (170). Los resultados, hasta el momento, son satisfactorios; no obstante, el equipo continúa buscando nuevos antígenos con el fin de desarrollar y comercializar un sistema rápido de diagnóstico en muestras séricas.

Tabla 4. Porcentajes de sensibilidad (Sens.) y especificidad (Esp.) de las distintas técnicas diagnósticas descritas para identificar *T. vaginalis*.

Diagnóstico	Test	Muestra	Cebadores	Sens. (%)	Esp. (%)	Ref.	Ventajas	Limitaciones	
Observación al microscopio	Muestra en fresco	MV / O(M)		58,5	100	(154)	Fácil, rápido (resultado en el mismo día de la toma), sencillo y de bajo coste.	Requiere un microscopio y un especialista. La sensibilidad y especificidad dependen de las aptitudes del microscopista. No aplicable en muestras de varón.	
		MV		71,4	100	(171)			
		MV		61,5	100	(161)			
		MV		71,7		(166)			
		MV		66,7	100	(157)			
		MV		48,2	100	(168)			
		MV		55,0	100	(160)			
		MV		64,9	100	(172)			
		MV		64,4		(171)			
		MV		68,5		(160)			
MV		73,8	100	(169)					
Tinción	Giemsa Naranja de Acridina Papanicolaou	MV		71,4	99,4	(157)	Rápido y de bajo coste. Papanicolaou útil en citologías.	Requiere tiempo, microscopio. Método subjetivo.	
				52,0		(173)			
		MV		94,3	100	(154)			
Cultivo	Medio Diamond	O(M)		60,4	100	(154)	Mejora la sensibilidad con respecto a la observación en fresco.	Requiere equipación y un especialista. Periodo de incubación largo. Riesgo de falsos negativos.	
		O(H)		56,0	100	(160)			
		MV		95,8		(171)			
		MV		76,2	100	(169)			
		MV		89,2	100	(172)			
	MU//O(H)		48,0	100	(172)				
	InPouch™		MV		90,0				(171)
Prueba de hibridación de ácidos nucleicos	Affirm VP III	MV		92,0	99,7	(174)	Resultados en 45 min. Detección de coinfecciones con <i>Gardnerella</i> y <i>Candida</i> .	Complejidad moderada. Requiere un especialista e instrumental. No aplicable en asintomáticos, ni muestras de varón.	
		MV		63,4	99,9				
		MV		98,7	94,6	(172)			
		ME		98,7	97,3				
NAAT (Test de amplificación de ácidos nucleicos)	APTIMA TV	O(M)		98,7	98,2	(172)	Alta sensibilidad y especificidad.	Caro, requiere equipo cualificado e instrumental de laboratorio.	
		MU		96,0	90,5				
		O(H)		96,0	96,3				
		MV		97,9	95,3				
		MV		98,0	95,6				
		O(H)		90,1	98,9				
		MV		100	100				
	PCR casera		MV	TV3 y TV7	88,7	97,1	(154)	Detectan <i>T. vaginalis</i> a concentraciones menores que en cultivo. Altamente sensible y específico. Se puede emplear con muestras de varón.	Riesgo de presencia de agentes inhibidores de PCR en las muestras. Caro. Requiere equipo cualificado e instrumental de laboratorio.
			O(M)		64,2	100			
			MV	TVA	48,7	100			
			MV	TVK	79,5	97,8			
			O(H)	TVK	96,0	99,2			
			O(H)	β-tubulina BTUB9 y 2	92,0	99,4			
			MV	TVK3 y TVK7	100	99,2			
			MV	β-tubulina	98,7	100			
			ME	β-tubulina	96,0	100			
			O(M)	β-tubulina	90,6	100			
MU	β-tubulina	92,0	100						
O(H)	β-tubulina	80,0	100						
MU	TVK3 y TVK7	82,0	95,0	(177)					
MV		98,0	99,4	(166)					
Test rápidos	Tv latex agglutination test OSOM rapid antigen test/Xeno-Strip	MV		83,3	98,8	(171)	Sensible. Resultados en 10 minutos.		
		MV		66,6	100	(176)			
		MV		76,7	99,1	(178)			
		MV		79-90		(171)			
		MV		89,6	97,5				

MV, Muestra vaginal; ME, Muestra endocervical; O(M), Orina de mujer; MU, Muestra uretral; O(H) Orina de varón

7. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

7.1. 5-Nitroimidazoles

El metronidazol [1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol; Figura 17] (MTZ) es el fármaco de referencia empleado para el tratamiento de la tricomonosis. La alternativa farmacológica es el tinidazol [1-[2-(etilsulfonil)etil]-2-metil-5-nitroimidazol; Figura 18] (TDZ). Estos dos 5-nitroimidazoles (5-NI) son los únicos medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la tricomonosis.

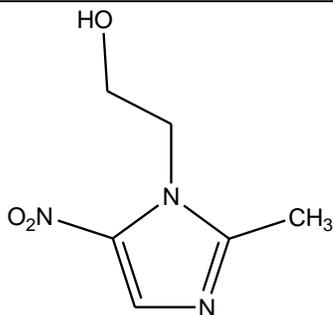


Figura 17. Estructura química del metronidazol.

El MTZ fue descubierto por Cosar y Jolou en 1959, a partir de la azomicina, un antibiótico obtenido a partir de *Streptomyces* y descrito por Nakamura a mediados de los años 50, con estructura de 2-nitroimidazol (179, 180). En tan solo un año se autorizó su uso en el tratamiento clínico de la tricomonosis humana en Europa y cuatro años después en EEUU (181). Este fármaco es activo frente a otros protozoos como *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica* y su espectro de actividad incluye bacterias anaerobias Gram positivas y negativas de los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Clostridium* entre otros (181). Es uno de los 100 fármacos más prescritos en EEUU (182), y pertenece a la lista de fármacos esenciales definidos por la OMS (183).

El régimen posológico recomendado es una única dosis de 2 g de MTZ por vía oral. No obstante, la guía de tratamiento de I.T.S. editada por la OMS recomienda el uso de MTZ durante 5 días en infecciones uretrales y neonatales (tabla 5). En caso de fallo en el tratamiento, los clínicos habitualmente recomiendan repetir el mismo esquema. Si no se logra la eliminación del parásito, algunos médicos prescriben TDZ o bien alargan la duración del tratamiento (167).

Tabla 5. Régimen posológico recomendado por la OMS (184).

Tratamiento	Fármaco	Dosis	Duración
Infecciones vaginales	Metronidazol	2 g	Dosis única
	Tinidazol	2 g	Dosis única
Alternativa en infecciones vaginales	Metronidazol	400 mg o 500 mg	2 veces/día; 7 días
	Tinidazol	500mg	2 veces/día; 5 días
Infecciones uretrales	Metronidazol	400 mg o 500 mg	2 veces/día; 7 días
	Tinidazol	500 mg	2 veces/día; 5 días
Infecciones neonatales	Metronidazol	5 mg/kg	3 veces/día; 5 días

La vía de administración en todos los casos es oral.

Como se ha descrito anteriormente, la tricomonosis es un factor de riesgo en la transmisión y adquisición del SIDA. La tasa de infecciones persistentes (185) y de reinfecciones por *T. vaginalis* en pacientes con VIH puede triplicarse, destacando un porcentaje de resistencia al tratamiento de hasta un 10% en pacientes VIH+ (186). Asimismo, en personas coinfectadas con el virus, se ha observado que el tratamiento con MTZ es más eficaz si se administra en varias tomas, en lugar del régimen de dosis única de 2 g (186). Estos datos parecen sugerir que el tratamiento antirretroviral o los mecanismos desencadenados por la infección vírica podrían interaccionar con el MTZ, recomendándose a pacientes seropositivos la terapia con MTZ multidosis (187).

Aunque existen formulaciones de MTZ para la administración intravaginal, su eficacia es menor en comparación con el tratamiento oral, ya que no se alcanzan los niveles terapéuticos adecuados en uretra y glándulas

anejas (167).

El tinidazol (TDZ), es la alternativa terapéutica al MTZ. Pertenece a la misma familia química de los 5-nitroimidazoles con un sustituyente sulfona (Figura 18).

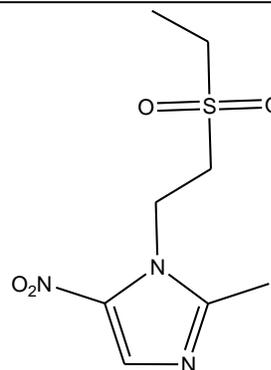


Figura 18. Estructura química del tinidazol.

Fue sintetizado en 1969 y aprobado en 2004 para su uso en EEUU por la FDA con el nombre comercial de Tindamax® (162). En comparación con el MTZ, este fármaco muestra una actividad *in vitro* superior, una mejor distribución tisular y una mayor capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), debido a su carácter lipofílico. Llega a alcanzar niveles de hasta un 80% en líquido cefalorraquídeo (LCR) frente al 42% detectado con MTZ. Su semivida es de 13 h uniéndose a proteínas plasmáticas en un 12% (180). Estas propiedades farmacocinéticas explican la capacidad del TDZ para alcanzar entre 1,4 y 2 veces más concentración en suero y tracto genitourinario que la que se alcanza con el MTZ en pacientes tratados con 500 mg, 2 a 3 veces al día (162).

El tratamiento de la/s pareja/s sexual/es resulta de gran importancia, aunque no se hayan manifestado síntomas, para reducir los casos de reinfección (184). Está demostrada la existencia de un porcentaje elevado de varones infectados que no son diagnosticados debido al carácter asintomático de la infección (156, 188). Por esta razón, es recomendable evitar cualquier contacto sexual hasta no haber confirmado la curación total del paciente y su/s pareja/s (156).

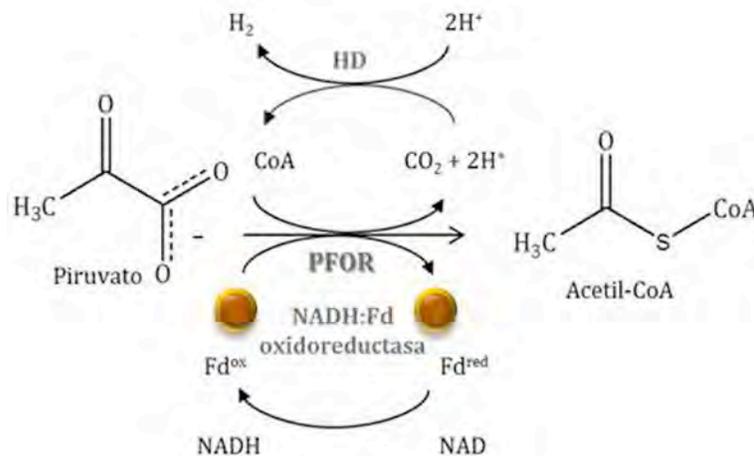
Se han descrito efectos secundarios asociados al consumo de estos fármacos, entre los que destaca la hipersensibilidad a los 5-NI. De todos los efectos adversos descritos en la ficha técnica de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), los más comunes son las alteraciones gastrointestinales y el desarrollo de sabor metálico (189). El consumo de alcohol está contraindicado durante el tratamiento con ambos 5-NI, al ocasionar “efecto antabus” por su metabolismo hepático (182).

El tratamiento con MTZ se encuentra contraindicado durante el primer trimestre de embarazo. Aunque existen

estudios contradictorios sobre el efecto mutagénico y teratogénico de estos 5-NI, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) determina que existen evidencias suficientes como para considerar al MTZ agente carcinogénico en animales, pero insuficientes en humanos (182). Es por ello por lo que este medicamento está catalogado como un fármaco de Categoría B (12). Su excelente absorción y paso a través de membranas provoca que ambos 5-NI alcancen tejido placentario, fetal y líquido amniótico (190). El fármaco se secreta por el leche materna habiéndose detectado tanto en suero materno como en lactantes (191). Con el fin de reducir la exposición del neonato al fármaco, se recomienda en mujeres en periodo de lactancia la interrupción de la misma desde el inicio del tratamiento con MTZ hasta 12-24 h tras la última dosis o de 3 días en caso de que el fármaco empleado sea el TDZ (167).

El mecanismo de acción de esta familia de fármacos se ha estudiado ampliamente. Los 5-NI son pro-fármacos, que se metabolizan en el interior del parásito para transformarse en agentes activos. El compuesto penetra en el protozoo mediante difusión pasiva, acumulándose en el interior del trofozoíto. La enzima responsable de la activación del fármaco es la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR), situada en el hidrogenosoma y responsable de la conversión del piruvato en acetil-CoA con la liberación de CO₂ y protones.

Esta descarboxilación oxidativa está asociada a un proceso de fosforilación a nivel de sustrato que lleva consigo la consecuente producción de ATP. Tal y como muestra la Figura 19, los electrones, que se liberan de esta reacción, son captados por una proteína aceptora denominada ferredoxina (Fd). Esta reacción se completa por la acción de la hidrogenasa que produce hidrógeno molecular (H₂).



CoA: Coenzima A; PFOR: Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa; Fd: Ferredoxina; HD: Hidrogenasa.

Figura 19. Proceso de descarboxilación oxidativa llevada a cabo en el hidrogenosoma de *T. vaginalis*.

Cuando el MTZ se encuentra en el interior del hidrogenosoma compete con la Fd por los electrones. Al presentar un potencial redox superior se produce la

activación del fármaco a causa de la transferencia de los electrones de la Fd al grupo NO₂ del MTZ como se observa en el panel A de la Figura 20, causando la

reducción y activación del fármaco con la consecuente disminución de la producción de hidrógeno. El panel B refleja los pasos necesarios para lograr la reducción total de un grupo NO_2 en NH_2 , requiriéndose $6 e^-$ /molécula. Durante este proceso se van a generar los distintos intermediarios tóxicos (181). Los radicales formados (2, 4

y 6 de la Figura 20.B) actúan sobre los residuos de adenina y timina del ADN del parásito originando la ruptura de cadenas sencillas y dobles de ADN y con ello la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas que derivan en la muerte del organismo (181, 192).

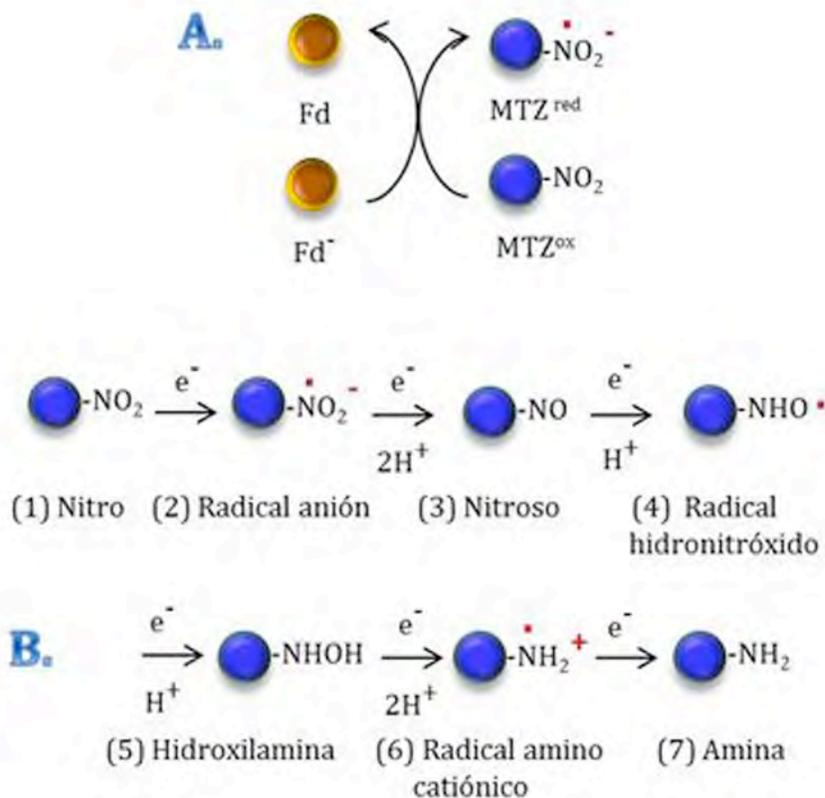


Figura 20. Proceso secuencial de activación del profármaco MTZ. A. Activación del MTZ por transferencia electrónica de la Fd al grupo nitro. **B.** Reducción secuencial del radical nitro mediante transferencia electrónica.

T. vaginalis se caracteriza por presentar un genoma con porcentaje de A+T del 68% (6), lo que explica la alta toxicidad selectiva de este grupo de fármacos como tricomonocidas (12). Asimismo, en los últimos años se ha observado que estos intermediarios citotóxicos también forman aductos con las proteínas del parásito que llevan a la apoptosis del mismo (192, 193). Los estudios proteómicos de Leitsch *et al.* (193) identificaron seis proteínas citosólicas que formaban aductos covalentes con MTZ y TDZ. Todas ellas se encuentran implicadas en procesos redox mediados por la tioredoxina, responsable de la eficiente depleción de las reservas de tior en el parásito y la alteración del equilibrio redox celular.

El potencial redox necesario para la activación del MTZ es de -486 mV (192). Este potencial no puede ser alcanzado en las condiciones aeróbicas en las que se encuentran las células eucarióticas de los mamíferos (-430 mV) (194), resultando difícil la reducción total del grupo nitro a las dosis terapéuticas a las que se administran estos fármacos. Asimismo, al tratarse de células aeróbicas, el

oxígeno provoca la reoxidación de los radicales aniónicos, generando de nuevo el compuesto inicial inactivo (Figura 21), sin llegar a causar grandes lesiones (181). Este ciclo fútil y el bajo potencial redox explican la toxicidad selectiva de este grupo de fármacos en organismos anaerobios, así como la resistencia aeróbica observada a los 5-NI. Ya en los años 80, Moreno y Docampo indicaron que la activación del MTZ no debía ser sólo a causa de la ruta metabólica de la PFOR (181).

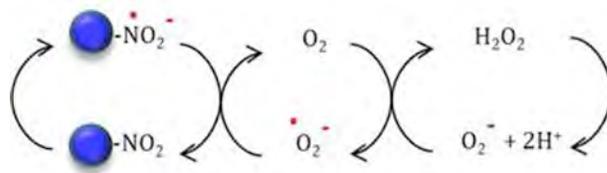


Figura 21. Ciclo fútil de reoxidación del radical aniónico en presencia de oxígeno.

Estudios recientes confirmaron esta hipótesis, describiéndose otras rutas de activación de los 5-NI en la

que estarían implicadas enzimas redox, como la tiorredoxín-reductasa, capaz de reducir el grupo nitro del fármaco y generar radicales tóxicos como los producidos por la PFOR (193). O bien, a través de la ruta metabólica

del malato en la que los electrones generados durante la descarboxilación oxidativa del malato para generar piruvato, son transferidos a la Fd a través de la NADH:ferredoxin oxidoreductasa (Figura 22).



EM: Enzima málica o malato deshidrogenasa

Figura 22. Activación alternativa del MTZ a través de la ruta de la descarboxilación oxidativa del malato.

Asimismo se han identificado distintos genes en *T. vaginalis* que codifican para nitrorreductasas, cuyas construcciones recombinantes en modelos de *E. coli* han demostrado la capacidad de reducir MTZ, sugiriéndose otras vías de activación de este grupo de fármacos en el protozoo (195).

Aunque el éxito en el tratamiento de la tricomonosis con MTZ se sitúa por encima del 90%, el primer caso de resistencia clínica se publicó a los dos años de su comercialización (196). Hasta la fecha, no se ha aprobado un tratamiento alternativo con fármacos de otras familias químicas. Desde 1962 se han publicado fenómenos de resistencia al tratamiento en todos los continentes (197-199). Algunos estudios han registrado datos de fallo en el tratamiento con 2 g de MTZ en al menos el 7% de las mujeres (188), habiéndose estimado que de todos los casos clínicos que se diagnostican, entre el 2-10% son casos de resistencia (200).

Este parásito puede desarrollar dos tipos de resistencia:

Resistencia aeróbica basada en la reoxidación de los aniones tóxicos del MTZ por la presencia de oxígeno (Figura 22). Este tipo de resistencia es la que sucede de forma común en los aislados clínicos de pacientes refractarios al tratamiento con MTZ. En la vagina existen niveles de oxígeno que oscilan entre 15-56 μM (201). Las concentraciones de O_2^- y de H_2O_2 que se generan son fácilmente detoxificadas por acción de catalasas y superóxido dismutasas presentes en este parásito (202). Asimismo, la conversión del fármaco de nuevo a la forma oxidada causa la disminución de la entrada de más profármaco por difusión pasiva al interior del hidrogenosoma (181).

La resistencia aeróbica está catalogada en baja, moderada o alta por el CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) (tabla 6), en función de la respuesta al

fármaco que presente el aislado tras someterle a un test de susceptibilidad en el que se estudia la concentración mínima letal (CML) del MTZ o del TDZ mediante observación al microscopio (203).

Tabla 6. Catalogación de la resistencia aeróbica de aislados en función de la concentración mínima letal detectada en presencia de MTZ o TDZ.

Rango de CML ($\mu\text{g/mL}$)	Nivel de resistencia
< 50	Sensible a MTZ o TDZ
50-100	Baja
100-200	Moderada
200-400	Alta

La resistencia anaeróbica, en cambio, está mediada por modificaciones en el parásito que conllevan la reducción en más de un 50% de la expresión de enzimas claves para la activación del fármaco en el hidrogenosoma de determinados aislados que han desarrollado una resistencia elevada como la PFOR o la ferredoxina (193, 202), así como otras enzimas presentes en este orgánulo como la malato deshidrogenasa (193) o la NADH oxidasa (202). Estos aislados resistentes han sido generados *in vitro* mediante la exposición de los flagelados a concentraciones crecientes del fármaco, forzando al parásito a sobrevivir ante una presión creciente del compuesto (204). Se considera que poseen resistencia anaeróbica todos aquellos aislados que presenten una CML por encima de 3 $\mu\text{g/mL}$ (203).

Aunque el MTZ y el TDZ son los dos únicos fármacos aprobados para el tratamiento de la tricomonosis, existen otros compuestos de la misma familia, a excepción del clotrimazol, cuyo uso en clínica no se ha aprobado. Las

moléculas más conocidas son (Figura 23):

Secnidazol: presenta una absorción rápida por vía oral. Su semivida plasmática es mayor a la del MTZ y el TDZ (entre 17-29 h). Se han descrito efectos secundarios similares a los del MTZ, resultando las alteraciones gastrointestinales las más frecuentes. Cudmore *et al.* lo describen como una alternativa terapéutica adecuada para el tratamiento de esta I.T.S. (12).

Satranidazol: muestra una semivida igual a la descrita en el secnidazol aunque presenta una actividad *in vitro* inferior a la del fármaco de referencia.

Ornidazol: con una actividad similar a la del MTZ, muestra una semivida plasmática de 12-14 h. Sköld *et al.* publicaron la curación del 100% de un grupo de veinte pacientes tratadas con una única dosis de 2 g del compuesto. Sin embargo, ocho de ellas mostraron efectos secundarios describiendo principalmente estados de fatiga y mareos (205). Los estudios séricos revelaron niveles de

ornidazol en sangre entre 5 y 8 veces superiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI) registrada para este compuesto, manteniéndose hasta 36 h tras la ingestión. Su potencial redox es -467 mV, inferior al del MTZ (193).

Clotrimazol: imidazol de baja absorción sistémica que se emplea en formulaciones tópicas para el tratamiento de la tricomonosis, con una actividad inferior que los 5-NI. El equipo de duBouchet registraron sólo un 11,1% de curación en un grupo de 45 mujeres tratadas con este fármaco, aunque ninguna desarrolló efectos adversos (189). Es el tratamiento prescrito en mujeres embarazadas más común (206), siendo la alternativa terapéutica recomendada por el CDC durante el primer trimestre de embarazo para aliviar los síntomas (100 mg clotrimazol intravaginal/día durante 6 días) seguido de un tratamiento de 2 g de MTZ durante el segundo trimestre (12).

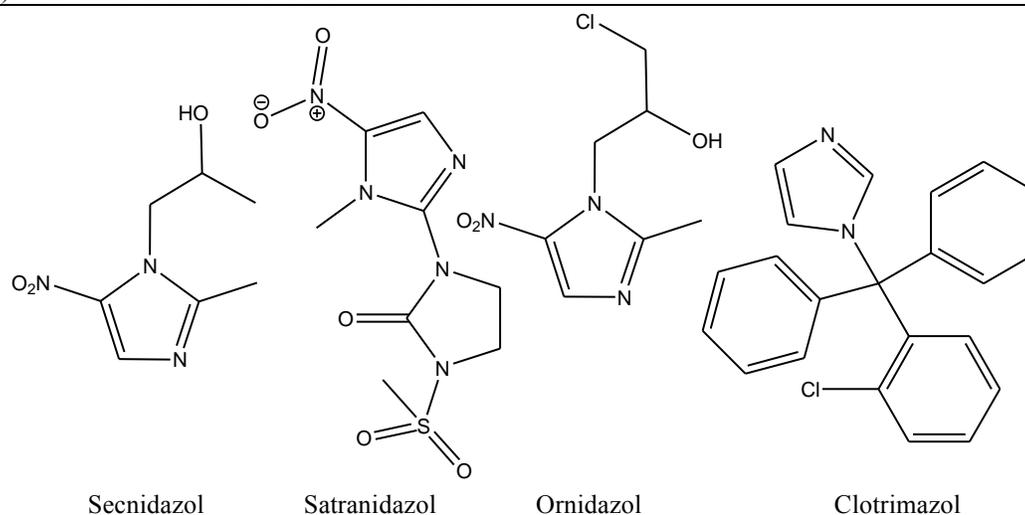


Figura 23. Estructura química de otros fármacos tricomonocidas.

7.2. Otras alternativas terapéuticas

La búsqueda de alternativas farmacológicas eficaces para el tratamiento de esta parasitosis continúa siendo de gran importancia hoy en día. La literatura contiene un gran número de artículos que describen la actividad tricomonocida de extractos de plantas de distintas regiones geográficas como Oceanía (207), África (208, 209), Yemen (208), México (210), Panamá (211, 212), Guatemala (211), Ecuador (211), Argentina (211), Brasil

(213, 214, 215), Filipinas (216), Turquía (217), España (218, 219) o Irán (220, 221), entre otros.

A continuación, se recogen los compuestos de origen natural ensayados *in vitro* y que podrían ser fuente de nuevas alternativas terapéuticas (**tabla 7**). Tan solo se citan aquellos estudios que han presentado una actividad antiparasitaria relevante con valores de $CI_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ y/o CMI en torno a 1 mg/mL.

Tabla 7. Actividad tricomonocida de las especies naturales más relevantes obtenidas de la literatura científica. En la tabla se especifica la especie, denominación común, actividad tricomonocida, uso tradicional de los extractos de la planta y la composición mayoritaria del extracto estudiado.

Especie	Nombre común	Parte de la planta	Actividad ($\mu\text{g/mL}$)	Uso tradicional	Compuestos aislados	Referencia
<i>Aframomum sceptrum</i>		Rizoma	$CI_{50} = 0,1$; $CMI_{100} = 1,7$	Antimicrobiano	β -pineno, óxido de cariofileno y cipereno	(209)
<i>Allium hirtifolium</i>	Chalote persa	Granos	$CMI_{100} = 10-5$	Tratamiento de los síntomas asociados a los resfriados y gripes, frente al asma, antiinflamatorio (artritis y arteroesclerosis), antineoplásico	Sulfuros orgánicos (alicina)	(222)
<i>Arbutus unedo</i>	Madroño	Hojas	$CMI_{100} = 500$	Tratamiento de las hemorroides, hipertensión, diarrea y ansiedad	Glicósidos y taninos	(217)
<i>Artemisia absinthium</i>	Ajenjo, hierba santa	Aérea	$CI_{50} = 87,2$	Antihelmíntico, antiséptico, febrífugo, repelente de insectos y en el tratamiento de alteraciones hepatobiliares, dispepsia y fiebre crónica	Lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, polifenoles	(219, 223)
<i>Bocconia frutescens</i>		Aéreas	$CI_{50} = 30,9$	Antipruriginoso, tratamiento de alteraciones en la piel (dermatitis, úlceras, tiña, verrugas, etc), disentería e infecciones respiratorias (tos ferina, tuberculosis)	Alcaloides	(210, 224)
<i>Carica papaya</i>	Papaya	Semilla	$CI_{50} = 5,6$	Antibacteriano, antipuriginoso, vermífugo y antiamebiano	Isotiocianato de bencilo y glucosinolatos	(210)
<i>Cocos nucifera</i>	Coco	Fibra de la cáscara	$CI_{50} = 5,8$	Tratamiento de la artritis y la diarrea	Polifenoles	(210, 225)
<i>Cussonia spp.</i>		Hojas	$CMI_{100} = 300-1000$	Analgésico, antimalárico, antiinflamatorio, antidiarreico y contra las enfermedades mentales y la I.T.S.		(208)
<i>Geranium mexicanum</i>	Geranio de olor, pata de león	Corteza	$CI_{50} = 56$	Antipruriginoso, antidiarreico	Flavonoides	(210, 226)
<i>Hypericum polyanthemum</i>		Aéreas	$CMI_{100} = 325$	Antimalárico	Floroglucinol y benzopiranos	(215)
<i>Lygodium venustum</i>	Culebrina	Aéreas	$CI_{50} = 60,9$	Antidiarreico, antídoto contra la mordedura de víbora		(210)
<i>Myristica fatua</i>		Fruto	$CI_{50} = 35,2$	Antirreumático		(207)
<i>Neurolaena lobata</i>		Hojas	$CMI_{100} = 1000$; $CI_{90} = 500$	Antimalárico	Lactonas sesquiterpénicas	(211)
<i>Sapindus saponaria</i>	Boliche, amole, jaboncillo	Fruto	$CMI_{100} = 156$	Limpieza de la ropa, curación de úlceras, inflamación y heridas externas	Saponinas	(227)
<i>Scaevola balansae</i>		Hojas, corteza	$CI_{50} = 29,3$	Reconstituyente		(207)
<i>Tarchonanthus camphoratus</i>	Arbusto de alcanfor	Hojas	$CMI_{100} = 500$	Enfermedades respiratorias y para perfumar las casas		(228)
<i>Voacanga globosa</i>	bayag-usa	Hojas	$CMI_{100} = 1000$	Antibacteriano	Alcaloides, saponinas y taninos	(216)

En lo que respecta a los compuestos de síntesis, en las últimas décadas se han descrito numerosas moléculas con estructura no imidazólica y actividad tricomonocida *in vitro* e *in vivo* que han llegado a ser empleadas como tratamiento alternativo a los 5-NI en ciertas regiones. Algunas de ellas se utilizaron tópicamente antes de la aparición del MTZ. Sin embargo, sólo lograban una

mejora de los síntomas, no pudiéndose alcanzar en muchos casos la cura total debido a la dificultad del fármaco para alcanzar órganos anejos profundos, que *T. vaginalis* puede colonizar. De igual forma, otros tratamientos se han empleado en casos clínicos de resistencia a los fármacos de referencia. En la siguiente tabla se muestran los compuestos más relevantes.

Tabla 8. Fármacos empleados como alternativa terapéutica para el tratamiento de la tricomonosis.

Fármaco	Estructura	Mecanismo de acción	Observaciones	Ref.
Hanamicina	Polieno aromático	Similar al de la anfotericina B. Se asocia al ergosterol de la membrana del parásito causando la formación de poros.	Empleado en India a nivel tópico. Toxicidad elevada, desarrollando ulceraciones en la mucosa genitourinaria. Baja absorción intestinal, formulaciones tópicas.	(12)
Paromomicina	Aminoglicósido	También empleado en el tratamiento de la amebosis, criptosporidiosis y giardiosis. Se une al ARNr 16S inhibiendo la síntesis de proteínas.	Empleado en pacientes alérgicos al MTZ o en tratamientos conjuntos con 5-NI. Estudios con resultados de efectividad contradictorios. Casos de ulceraciones vaginales dolorosas.	(229-232)
Ácido bórico	Ácido trioxobórico	Antiséptico debido a su carácter ácido.	En supositorios y duchas vaginales en casos de hipersensibilidad al MTZ. Estudios con resultados contradictorios en cuanto a su eficacia.	(231, 233)
Furazolidona	Nitrofurano	Tratamiento frente a bacterias entéricas y <i>Giardia</i> . Interfiere en rutas metabólicas al interaccionar con distintos sistemas enzimáticos. Se une al ADN.	Escasa absorción intestinal aunque eficaz tras su administración intravaginal.	(232, 234)
Nitazoxanida	Derivado sintético de la salicilamida	Aprobado como agente frente a la giardiosis y la criptosporidiosis, actuando de forma similar a los 5-NI a través del grupo nitro. También activo frente a algunos helmintos mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina.	Altamente activo <i>in vitro</i> frente a <i>T. vaginalis</i> . Absorción intestinal limitada, limitando su uso a nivel intravaginal.	(232, 235, 236)
Miltefosina	Fosforil-colina	Leishmanicida. Inhibe la síntesis de fosfolípidos gracias a su estructura.	Altamente activo <i>in vitro</i> frente a aislados sensibles y resistentes de <i>T. vaginalis</i> . Algunos estudios alertan sobre posibles efectos teratogénicos.	(237-239)
Nonoxinol-9	Hexacosanol	Contraceptivo espermicida empleado en formulaciones tópicas durante más de 50 años. Detergente no iónico con actividad microbicida.	En desuso debido al riesgo de ulceraciones genitales, erosiones en el epitelio y alteración de la flora aumentando el riesgo de adquirir VIH. No protege frente a otras I.T.S.	(240)

8. CONCLUSIONES

La secuenciación del genoma de *T. vaginalis* y los últimos estudios que han demostrado el papel relevante que muestra este parásito, favoreciendo la implantación de otros patógenos en la cavidad genitourinaria, así como su intervención como factor de riesgo en el desarrollo de neoplasias, ha revolucionado el idea preconcebida que se tenía de la tricomonosis. Hasta finales del siglo XX, la tricomonosis urogenital humana era una enfermedad venérea molesta pero con poca relevancia. Sin embargo los estudios de los últimos años parecen mostrar lo contrario. Un parásito capaz de desarrollar un amplio cuadro clínico y poco específico, pudiendo llegar a pasar desapercibido en parte de los pacientes. Esta versatilidad parece tener relación con el genoma tan complejo y repetido, formado por genes que podría haber adquirido durante su evolución tras estar en contacto con otros organismos mediante transferencia lateral de genes. Asimismo, esta capacidad genómica también podría explicar cómo un parásito unicelular sin formas de resistencia es capaz de colonizar y asentarse en un ambiente tan hostil como el nicho genitourinario, sometido a cambios de pH, iones, hormonas, el sistema inmune del hospedador, la flora vaginal, etc. En virtud de todo lo descrito en esta revisión, *T. vaginalis* se postula como un excelente modelo parasitológico para el estudio de los mecanismos de adaptación, interacción parásito-hospedador y patogenia, de fácil manejo en el laboratorio y versátil en términos de patogenia, genómica y clínica.

9. AGRADECIMIENTOS

Los autores de esta revisión quieren agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad (proyecto SAF2015-66690-R) por la ayuda recibida

10. REFERENCIAS

1. WHO, Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015: breaking the chain of transmission. WHO Press, 2011.
2. Hotez PJ. Neglected infections of poverty in the United States of America. Plos Neglect Trop D 2008; 2: doi: 10.1371/journal.pntd.0000256.
3. Hotez PJ, Gurwith M. Europe's neglected infections of poverty. Int J Infect Dis 2011; 15: e611-9.
4. WHO, Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted diseases - 2008. WHO Press, 2012.
5. Harp DF, Chowdhury I. Trichomoniasis: evaluation to execution. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011; 157: 3-9.
6. Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, et al.. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. Science 2007; 315: 207-12.
7. Honigberg BM, Brugerolle G. Structure. In: Honigberg BM, Ed. Trichomonads Parasitics in Humans. New York: Springer-Verlag 1990; pp. 5-35.
8. Zubáčová Z, Cimbůrek Z, Tachezy J. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes.

- Mol Biochem Parasitol 2008; 161: 49-54.
9. Benchimol M. Hydrogenosomes under microscopy. Tissue Cell 2009; 41: 151-168.
10. Pereira-Neves A, Ribeiro KC, Benchimol M. Pseudocysts in Trichomonads – New insights. Protist 2003; 154: 313-29.
11. Ryu JS, Lee MH, Park H, Kang JH, Min DY. Survival of *Trichomonas vaginalis* exposed on various environmental conditions. Korean J Infect Dis 2002; 34: 373-9.
12. Cudmore SL, Delgaty KL, Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 783-93.
13. Bellanger AP, Cabaret O, Costa JM, Foulet F, Bretagne S, Botterel F. Two unusual occurrences of trichomoniasis: rapid species identification by PCR. J Clin Microbiol 2008; 46: 3159-61.
14. Duboucher C, Noël C, Durand-Joly I, et al. Pulmonary coinfection by *Trichomonas vaginalis* and *Pneumocystis* sp. as a novel manifestation of AIDS. Hum Pathol 2003 ; 34: 508-11.
15. Mallat H, Podglajen I, Lavarde V, Mainardi J-L, Frappier J, Cornet M. Molecular characterization of *Trichomonas tenax* causing pulmonary infection. J Clin Microbiol 2004; 42: 3886-7.
16. Leterrier M, Morio F, Renard B, Poirier AS, Miegerville M, Chambréuil G. Trichomonads in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification. New Microbiol 2012; 35: 83-7.
17. Jongwutiwes S, Silachamroon U, Putaporntip C. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94: 185-6.
18. Mantini C, Souppart L, Noël C, et al. Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema. J Clin Microbiol 2009; 47: 2336-9.
19. López-Escamilla E, Sanchez-Aguillon F., Alatorre-Fernandez CP, et al. New *Tetratrichomonas* species in two patients with pleural empyema. J Clin Microbiol 2013; 51: 3143-6.
20. Smith A, Johnson P. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. Res Microbiol 2011; 162: 646-54.
21. de Koning AP, Brinkman FS, Jones SJ, Keeling PJ. Lateral gene transfer and metabolic adaptation in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. Mol Biol Evol 2000; 17: 1769-73.
22. Strese, A., Backlund, A., Alsmark, C., 2014. A recently transferred cluster of bacterial genes in *Trichomonas vaginalis* – lateral gene transfer and the fate of acquired genes. BMC Evol Biol 14, 119-132.
23. Nixon JE, Field J, McArthur AG, et al. Iron-dependent hydrogenases of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: activity of the recombinant entamoebic

- enzyme and evidence for lateral gene transfer. *Biol Bull* 2003; 204: 1-9.
24. Woehle C, Kusdian G, Radine C, Graur D, Landan G, Gould SB. The parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-coding RNAs independently from functional neighbouring genes. *BMC Genomics* 2014; 15: 906-18.
 25. Gould SB, Woehle C, Kusdian G, *et al.* Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 2013; 43: 707-19
 26. Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard CB, Lehmann T, Secor WE. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3004-9.
 27. Vanacova S, Tachezy J, Kulda J, Flegr J. Characterization of trichomonad species and strains by PCR fingerprinting. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44: 545-52.
 28. Rojas L, Fraga J, Sariago I. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 53-8.
 29. Hampl V, Vaňáčová Š, Kulda J, Flegr J. Concordance between genetic relatedness and phenotypic similarities of *Trichomonas vaginalis* strains. *BMC Evol Biol* 2001; 1: 1-11.
 30. Kaul P, Gupta I, Sehgal R, Malla N. *Trichomonas vaginalis*: random amplified polymorphic DNA analysis of isolates from symptomatic and asymptomatic women in India. *Parasitol Int* 2004; 53: 255-62.
 31. Stiles JK, Shah PH, Xue L, *et al.* Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by HSP70 restriction fragment length polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62: 441-5.
 32. Meade JC, de Mestral J, Stiles JK, *et al.* Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates determined by EcoRI restriction fragment length polymorphism of heat-shock protein 70 genes. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80: 245-251.
 33. Cepicka I, Hampl V, Kulda J, Flegr J. New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 39: 542-51.
 34. Mayta H, Gilman RH, Calderon M, *et al.* 18S ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2683-7.
 35. Dwivedi SP, Husain N, Singh RB, Malla N. 18S ribosomal DNA based PCR diagnostic assay for *Trichomonas vaginalis* infection in symptomatic and asymptomatic women in India. *Asian Pac J Trop Dis* 2012; 2: 133-8.
 36. Gunderson J, Hinkle G, Leipe D, *et al.* Phylogeny of trichomonads inferred from small-subunit rRNA sequences. *J Eukaryot Microbiol* 1995; 42: 411-5.
 37. Embley TM, Hirt RP. Early branching eukaryotes?. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 624-9.
 38. Viscogliosi E, Edgcomb VP, Gerbod D, Noël C, Delgado-Viscogliosi P. Molecular evolution inferred from small subunit rRNA sequences: what does it tell us about phylogenetic relationships and taxonomy of the parabasalids?. *Parasite* 1999; 6: 279-91.
 39. Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol* 1991; 411-53.
 40. Dávila AMR, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 651-4.
 41. Som I, Azam A, Bhattacharya A, Bhattacharya S. Inter- and intra-strain variation in the 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer sequences of *Entamoeba histolytica* and comparison with *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* and *Entamoeba invadens*. *Int J Parasitol* 2000; 30: 723-8.
 42. Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, *et al.* The genetic diversity of brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 755-64.
 43. Beltrame-Botelho IT, Gaspar-Silva D, Steindel M, Dávila AMR, Grisard EC. Internal transcribed spacers (ITS) of *Trypanosoma rangeli* ribosomal DNA (rDNA): a useful marker for inter-specific differentiation. *Infect Gen Evol* 2005; 5: 17-28.
 44. Bostrom B, Wolf C, Greene C, Peterson DS. Sequence conservation in the rRNA first internal transcribed spacer region of *Babesia gibsoni* genotype Asia isolates. *Vet Parasitol* 2008; 152: 152-7.
 45. Katiyar SK, Visvesvara GS, Edlind TD. Comparisons of ribosomal-RNA sequences from amitochondrial protozoa - Implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene* 1995; 152: 27-33.
 46. Simoes-Barbosa A, Lobo TT, Xavier J, Carvalho SE, Leornadecz E. *Trichomonas vaginalis*: intrastrain polymorphisms within the ribosomal intergenic spacer do not correlate with clinical presentation. *Exp Parasitol* 2005; 110: 108-13.
 47. Felleisen RSJ. Comparative sequence analysis of 5- 8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol* 1997; 115: 111-9.
 48. Walker RL, Hayes DC, Sawyer SJ, Nordhausen RW, Van Hoosear KA, BonDurant, RH. Comparison of the 5.8 S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15: 14-20.
 49. Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto SL, Benchimol

- M, Bogo MR. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8 S rRNA and ITS-2 sequences. *Int J Parasitol* 2004; 34: 963-70.
50. Ibañez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ, Delclaux M, Martínez-Nevado E, Ponce-Gordo F. Morphological and molecular identification of *Tetratrichomonas* flagellates from the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Res Vet Sci* 2013; 95: 176-81.
 51. Kazemi F, Hooshyar H, Zareikar B, Bandehpour M, Arbabi M, Talari S, Alizadeh R, Kazemi B. Study on ITS1 gene of Iranian *Trichomonas vaginalis* by molecular methods. *Iranian J Parasitol* 2010; 5: 9-14.
 52. Rivera WL, Ong VA, Masalunga MC. Molecular characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates from the Philippines. *Parasitol Res* 2009; 106: 105-10.
 53. Torres-Gómez H, Hernández-Núñez E, León-Rivera I, *et al.* Design, synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 3147-51.
 54. Applied Biosystems Chemistry Guide: DNA sequencing by capillary electrophoresis 2009. Second Edition.
 55. Chambers GK, MacAvoy ES. Microsatellites: consensus and controversy. *Comp Biochem Physiol B Blochem Mol Biol* 2000; 126: 455-76.
 56. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 435-45.
 57. Conrad MD, Zubacova Z, Dunn LA, *et al.* Microsatellite polymorphism in the sexually transmitted human pathogen *Trichomonas vaginalis* indicates a genetically diverse parasite. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 175: 30-8.
 58. Ramel C. Mini-and microsatellites. *Env Health Perspect* 1997; 105: 781-89.
 59. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 2004; 21: 991-1007.
 60. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 2004; 20: 176-83.
 61. Oliveira RP, Macedo AM, Chiari E, Pena SDJ. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol Today* 1997; 13: 196-200.
 62. Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pagés M, Bastien P. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65: 271-82.
 63. Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, *et al.* Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol* 2000; 17: 1467-82.
 64. Ajzenberg D, Banuls AL, Tibayrenc M, Dardé ML. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int J Parasitol* 2002; 32: 27-38.
 65. Bulle B, Millon L, Bart JM, *et al.* Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3391-7.
 66. Gomez JC, McNamara DT, Bockarie MJ, Baird JK, Carlton JM, Zimmerman PA. Identification of a polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellite marker. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 377-9.
 67. Ford AF, Vardo-Zalik AM, Schall JJ. Relative clonal density of malaria parasites in mixed-genotype infections: validation of a technique using microsatellite markers for *Plasmodium falciparum* and *P. mexicanum*. *J Parasitol* 2010; 96: 908-13.
 68. Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, *et al.* Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1573.
 69. Syvänen A-C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Rev* 2001; 2: 930-42.
 70. Cornelius DC, Ashley Robinson D, Mziny CA, *et al.* Genetic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates by use of multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2012; 50 : 3293-300.
 71. Fiori PL, Rappelli P, Addis MF, Sechi A, Cappuccinelli P. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb Pathog* 1996; 20: 109-18.
 72. Sood S, Kapil A. An update on *Trichomonas vaginalis*. *Indian J Sex Transm Dis* 2008; 29: 7-14.
 73. Ford LC, Hammill HA, DeLange RJ *et al.* Determination of estrogen and androgen receptors in *Trichomonas vaginalis* and the effects of antihormones. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 1119-21.
 74. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, *et al.* Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 901-7.
 75. Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Rousseau G. Effect of beta-estradiol on production of the cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1847-9.
 76. Sharma R, Pickering J, McCormack WM. Trichomoniasis in a postmenopausal woman cured after discontinuation of estrogen replacement therapy. *Sex Transm Dis* 1997; 24: 543-5.
 77. Crouch ML, Benchimol M, Alderete JF. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microb Pathogenesis* 2001; 31: 131-44.

78. Figueroa-Angulo EE, Rendon-Gandarilla FJ, Puente-Rivera J, *et al.* The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 2012; 14: 1411-27.
79. Kummer S, Hayes GR, Gilbert RO, Beach DH, Lucas JJ, Singh BN. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb Pathog* 2008; 44: 197-203.
80. Tsai CD, Liu HW, Tai JH. Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* 2002; 277: 5153-62.
81. Arroyo R, Cárdenas-Guerra RE, Figueroa-Angulo EE, Puente-Rivera J, Zamudio-Prieto O, Ortega-López J. *Trichomonas vaginalis* cysteine proteinases: Iron response in gene expression and proteolytic activity. *BioMed Res Int*. 2015; doi:10.1155/2015/946787
82. Kim YS, Song HO, Choi IH, Park SJ, Ryu JS. Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions. *Korean J Parasitol* 2006; 44: 373-8.
83. Crouch MV, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* has two fibronectin-like iron-regulated genes. *Arch Med Res* 2001; 32: 102-7.
84. Alderete JF, Provenzano D, Lehker MW. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathogenesis* 1995; 19: 93-103.
85. Alderete JF. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1999; 67: 4298-302.
86. Lehker MW, Sweeney D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex Transm Infect* 1999; 75: 231-8.
87. Alvarez-Sánchez ME, Solano-González E, Yáñez-Gómez C, Arroyo R. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 2007; 9: 1597-605.
88. Lehker MW, Alderete JF. Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol Microbiol* 1992; 6: 123-32.
89. Ardalan S, Lee BC, Garber GE. *Trichomonas vaginalis*: The adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Exp Parasitol* 2009; 121: 300-6.
90. Zaichick VY, Sviridova TV, Zaichick SV. Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *J Urol Nephrol* 1997; 29: 565-74.
91. Krieger JN, Rein MF. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis* - *In vitro* studies and clinical implications. *J Infect Dis* 1982; 146: 341-5.
92. Hernández-Gutiérrez R, Avila-González L, Ortega-López J, Cruz-Talonia F, Gómez-Gutierrez G, Arroyo R. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol* 2004; 107: 125-35.
93. Solano-González E, Alvarez-Sánchez ME, Avila-González L, Rodriguez-Vargas VH, Arroyo R, Ortega-López J. Location of the cell-binding domain of CP65, a 65 kDa cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 2114-27.
94. Garcia AF, Benchimol M, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infect Immun* 2005; 73: 2602-10.
95. Alvarez-Sánchez ME, Carvajal-Gomez BI, Solano-González E, *et al.* Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* CP65. A 65-KDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2442-51.
96. Fiori PL, Rappelli P, Addis MF. The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes Infect* 1999; 1: 149-56.
97. Moreno-Brito V, Yáñez-Gómez C, Meza-Cervantez P, *et al.* A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate : ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol* 2005; 7: 245-58.
98. O'Brien JL, Lauriano CM, Alderete JF. Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathogenesis* 1996; 20: 335-349.
99. Alderete JF, Engbring J, Lauriano CM, O'Brien JL. Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb Pathogenesis* 1998; 24: 1-16.
100. Engbring JA, Alderete JF. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol* 1998; 28: 305-13.
101. Garcia AF, Chang TH, Benchimol M, Klumpp DJ, Lehker MW, Alderete JF. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 2003 ; 47 : 1207-24.
102. Addis MF, Rappelli P, Cappuccinelli P, Fiori PL. Extracellular release by *Trichomonas vaginalis* of a NADP(+) dependent malic enzyme involved in pathogenicity. *Microb Pathogenesis* 1997; 23: 55-61.
103. Garcia AF, Alderete JF. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiol* 2007; 7: 116.
104. Fichorova RN, Trifonova RT, Gilbert RO, *et al.* *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect Immun* 2006; 74: 5773-9.

105. Bastida-Corcuera FD, Okumura CY, Colocoussi A, Johnson PJ. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot Cell* 2005; 4: 1951-8.
106. Singh, B.N., Hayes, G.R., Lucas, J.J., *et al.* Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. *Glycoconj J* 2009; 26: 3-17.
107. Okumura CY, Baum LG, Johnson PJ. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol* 2008; 10: 2078-90.
108. Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 2009; 77: 2703-11.
109. Noël JC, Fayt I, Romero Munoz MR, Simon P, Engohan-Aloghe C. High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with *Trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 282: 503-5.
110. Pereira-Neves A, Benchimol M. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell* 2007; 99: 87-101.
111. Midlej V, Benchimol M. *Trichomonas vaginalis* kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitol* 2010; 137: 65-76.
112. Rendón-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Martínez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: *In vitro* phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* 1998; 89: 241-50.
113. Krieger JN, Poisson MA, Rein MF. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect Immun* 1983; 41: 1291-5.
114. Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 300-17.
115. Lubick KJ, Burgess DE. Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 2004; 72: 1284-90.
116. Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Palacios-Corona R, *et al.* *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A1 and A2 activities with direct and indirect hemolytic effects. *J Parasitol* 2005; 91: 5-11.
117. Hirt RP. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect* 2013; 89: 439-43.
118. Neale KA, Alderete JF. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect Immun* 1990; 58: 157-62.
119. Alvarez-Sánchez ME, Avila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, Ortega-López J, Arroyo R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathogenesis* 2000; 28: 193-202.
120. Mendoza-López MR, Becerril-García C, Fattel-Facenda LV, *et al.* CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 2000; 68: 4907-12.
121. Sommer U, Costello CE, Hayes GR, *et al.* Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 23853-60.
122. Arroyo R, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 1989; 57: 2991-7.
123. Provenzano D, Alderete JF. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 1995; 63: 3388-95.
124. Draper D, Donohoe W, Mortimer L, Heine RP. Cysteine proteases of *Trichomonas vaginalis* degrade secretory leukocyte protease inhibitor. *J Infect Dis* 1998; 178: 815-9.
125. Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Bowie WR. Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1548-53.
126. Escario A, Barrio AG, Diez BS, Escario JA. Immunohistochemical study of the vaginal inflammatory response in experimental trichomoniasis. *Acta Trop* 2010; 114: 22-30.
127. Tai JH, Ip CF. The cDNA sequence of *Trichomonas vaginalis* Virus-T1 double-stranded RNA. *Virology* 1995; 206: 773-6.
128. Liu HW, Chu YD, Tai JH. Characterization of *Trichomonas vaginalis* virus proteins in the pathogenic protozoan *T. vaginalis*. *Arch Virol* 1998; 143: 963-70.
129. Bessarab IN, Liu HW, Ip CF, Tai JH. The complete cDNA sequence of a type II *Trichomonas vaginalis* virus. *Virology* 2000; 267: 350-9.
130. Benchimol M, Chang TH, Alderete JF. Visualization of new virus-like-particles in *Trichomonas vaginalis*. *Tissue Cell* 2002; 34: 406-15.
131. Benchimol M, Monteiro SP, Chang TH, Alderete JF. Virus in *Trichomonas* - an ultrastructural study. *Parasitol Int* 2002; 51: 293-8.
132. Wang A, Wang CC, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads infected with the double-stranded-RNA virus. *J Exp Med* 1987; 166: 142-50.
133. Khoshnan A, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded-RNA virus has up-regulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J Virol* 1994; 68: 4035-8.
134. Bessarab IN, Nakajima R, Liu HW, Tai JH. Identification and characterization of a type III

- Trichomonas vaginalis* virus in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. Arch Virol 2011; 156: 285-94.
135. Fraga J, Rojas L, Sariago I, Fernandez-Calienes A. Double-stranded RNA viral infection in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates. Braz J Infect Dis 2005; 9: 521-4.
 136. Fraga J, Rojas L, Sariago I, Fernandez-Calienes A, Nunez FA. Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* and association with clinical presentation. Acta Protozool 2007; 46: 93-8.
 137. Pindak FF, Depindak MM, Hyde BM, Gardner WA. Acquisition and retention of viruses by *Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 1989; 65: 366-71.
 138. Sayed el-Ahl SA, Maklad KM, Gamil MA, Hammouda MH, Abdel Naby SB. A study on the potential role of *Trichomonas vaginalis* in transmission of *Herpes simplex* virus type II. J Egypt Soc Parasitol 1999; 29: 561-73.
 139. Rendon-Maldonado J, Espinosa-Cantellano M, Soler C, Torres JV, Martinez-Palomo A. *Trichomonas vaginalis*: *in vitro* attachment and internalization of HIV-1 and HIV-1-infected lymphocytes. J Eukaryot Microbiol 2003; 50: 43-8.
 140. Xiao JC, Xie LF, Fang SL, *et al.* Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance *in vitro*. Parasitol Res 2006 ; 100: 123-30.
 141. Rappelli P, Carta F, Delogu G, *et al.* *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. Arch Microbiol 2001; 175: 70-4.
 142. Dessi D, Rappelli P, Diaz N, Cappuccinelli P, Fiori PL. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis*: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites. Front Biosci 2006; 11: 2028-34.
 143. Xiao JC, Xie LF, Zhao L, Fang SL, Lun ZR. The presence of *Mycoplasma hominis* in isolates of *Trichomonas vaginalis* impacts significantly on DNA fingerprinting results. Parasitol Res 2008; 102: 613-9.
 144. Morada M, Manzur M, Lam B, *et al.* Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. Microbiol 2010; 156: 3734-43.
 145. Mestecky J, Fultz PN. Mucosal immune system of the human genital tract. J Infect Dis 1999; 179: S470-4.
 146. MacNeill C, Umstead TM, Phelps DS, *et al.* Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavage fluid. Immunol 2004; 111: 91-9.
 147. Kang JH, Song HO, Ryu JS, *et al.* *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. Parasite Immunol 2006; 28: 439-46.
 148. Peterson KM, Alderete JF. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 1982; 37: 755-62.
 149. Peterson KM, Alderete JF. Acquisition of alpha 1-antitrypsin by a pathogenic strain of *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun 1983; 40: 640-6.
 150. Padilla-Vaca F, Anaya-Velázquez F. Biochemical properties of a neuraminidase of *Trichomonas vaginalis*. J Parasitol 1997; 83: 1001-6.
 151. Meysick KC, Dimock K, Garber GE. Molecular characterization and expression of a N-acetylneuraminase lyase gene from *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol 1996; 76: 289-92.
 152. Bonilha VL, Ciavaglia MD, de Souza W, Silva FCE. The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian-cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. Parasitol Res 1995; 81: 121-6.
 153. Ibáñez-Escribano A, Nogal-Ruiz JJ, Pérez-Serrano J, Gómez-Barrio A, Escario JA, Alderete JF. Sequestration of host-CD59 as potential immune evasion strategy of *Trichomonas vaginalis*. Acta Trop 2015; 149: 1-7.
 154. Lawing LF, Hedges SR, Schwebke JR. Detection of trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 3585-8.
 155. Sherrard, J., Ison, C., Moody, J., Wainwright, E., Wilson, J., Sullivan, A., 2014. United Kingdom National Guideline on the Management of *Trichomonas vaginalis*. Int J STD AIDS 25, 541-549.
 156. Hobbs MM, Lapple DM, Lawing LF, *et al.* Methods for detection of *Trichomonas vaginalis* in the male partners of infected women: Implications for control of trichomoniasis. J Clin Microbiol 2006; 44: 3994-9.
 157. Radonjic IV, Dzamic AM, Mitrovic SM, Arsic Arsenijevic VS, Popadic DM, Kranjic Zec IF. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: The sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006; 126: 116-20.
 158. Borchardt KA, Zhang MZ, Shing H, Flink K. A comparison of the sensitivity of the InPouch TV, Diamond's, and Trichosel media for detection of *Trichomonas vaginalis*. Genitourin Med 1997; 73: 297-8.
 159. Hobbs MM, Sena AC. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. Sex Transm Infect 2013; 89: 434-8.
 160. Sood S, Mohanty S, Kapil A, Tolosa J, Mittal S. InPouch TV culture for detection of *Trichomonas vaginalis*. Indian J Med Res 2007; 125: 567-71.
 161. Van Der Pol B, Kraft CS, Williams JA. Use of an adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of chlamydia and gonorrhea to detect *Trichomonas vaginalis* in urogenital specimens. J Clin Microbiol 2006; 44: 366-73.
 162. Bachmann LH, Hobbs MM, Sena AC, *et al.*

- Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. Clin Infect Dis 2011; 53: S160-72.
163. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, *et al.* Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. Nat Rev Urol 2014; 11; 672-687.
164. Lee JJ, Moon HS, Lee TC, Hwang HS, Ahn M-H, Ryu J-S. PCR for diagnosis of male *Trichomonas vaginalis* infection with chronic prostatitis and urethritis. Korean J Parasitol 2012; 50: 157-9.
164. Pillay DG, Hoosen AA, Vezi B, Moodley C. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in male urethritis. Trop Geogr Med 1994; 46: 44-5.
165. Huppert JS, Batteiger BE, Braslins P, *et al.* Use of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. J Clin Microbiol 2005; 43: 684-7.
166. Hegazy MM, El-Tantawy NL, Soliman MM, El-Sadeek ES, El-Nagar HS. Performance of rapid immunochromatographic assay in the diagnosis of *Trichomoniasis vaginalis*. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 74: 49-53.
167. Workowski KA, Berman S. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. MMWR Recomm Rep 2010; 59: 1-110.
169. Carney JA, Unadkat P, Yule A, Rajakumar R, Lacey CJ, Ackers JP. New rapid latex agglutination test for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. J Clin Pathol 1988; 41: 806-8.
170. Alderete JF, Neace CJ. Identification, characterization, and synthesis of peptide epitopes and a recombinant six-epitope protein for *Trichomonas vaginalis* serodiagnosis. J Immuno Targets Ther 2013; 2: 91-103.
171. Huppert JS, Mortensen JE, Reed JL, *et al.* Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. Clin Infect Dis 2007; 45: 194-8.
172. Nye MB, Schwabke JR, Body BA. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. Am J Obstet Gynecol 2009; 200: 188-195.
173. Soper D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? Am J Obstet Gynecol 2004; 190: 281-290.
174. Andrea SB, Chapin KC. Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification assay and BD affirm VPIII for detection of *T. vaginalis* in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications. J Clin Microbiol 2011; 49: 866-9.
175. Hardick J, Yang S, Lin S, Duncan D, Gaydos C. Use of the Roche LightCycler instrument in a real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* in urine samples from females and males. J Clin Microbiol 2003; 41: 5619-22.
176. Pillay A, Lewis J, Ballard RC. Evaluation of Xenostrip-Tv, a rapid diagnostic test for *Trichomonas vaginalis* infection. J Clin Microbiol 2004; 42: 3853-6.
177. Hobbs MM, Kazembe P, Reed AW, *et al.* *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. Sex Transm Dis 1999; 26: 381-7.
178. Jones HE, Lippman SA, Caiiffa-Filho HH, Young T, van de Wijgert JH. Performance of a rapid self-test for detection of *Trichomonas vaginalis* in South Africa and Brazil. J Clin Microbiol 2013 ; 51: 1037-9.
179. Durel P, Roiron V, Siboulet A, Borel LJ. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. Br J Venereal Dis 1960; 36: 21-6.
180. Vázquez F, García MJ, Pérez F, Palacio V. *Trichomonas vaginalis*: treatment and resistance to nitroimidazoles. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 114-24.
181. Moreno SN, Docampo R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. Environ Health Persp 1985; 64: 199-208.
182. Bendesky A, Menendez D, Ostrosky-Wegman P. Is metronidazole carcinogenic? Mutat Res 2002; 511: 133-44.
183. WHO. The selection and use of essential medicines Report of the WHO Expert Committee, 2006; pp. 933.
184. OMS. Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. 2005; Organización Mundial de la Salud.
185. Gatski M, Kissinger P. Observation of probable persistent, undetected *Trichomonas vaginalis* infection among HIV-positive women. Clin Infect Dis 2010; 51: 114-5.
186. Kissinger P, Secor WE, Leichter JS, *et al.* Early repeated infections with *Trichomonas vaginalis* among HIV-positive and HIV-negative women. Clin Infect Dis 2008; 46: 994-9.
187. Kissinger P, Adamski A. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. Sex Transm Infect 2013; 89: 426-33.
188. Van Der Pol B, Williams JA, Orr DP, Batteiger BE, Fortenberry JD. Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of *Trichomonas vaginalis* infection among adolescent women. J Infect Dis 2006; 192: 2039-44.
190. Karhunen M. Placental transfer of metronidazole and tinidazole in early human pregnancy after a single infusion. Br J Clin Pharmacol 1984; 18: 254-7.
191. Erickson SH, Oppenheim GL, Smith GH. Metronidazole in breast milk. Obstet Gynecol 1981; 57: 48-50.
192. Knox RJ, Knight RC, Edwards DI. Interaction of

- nitroimidazole drugs with DNA *in vitro*: structure-activity relationships. *Br J Cancer* 1981; 44: 741-5.
193. Leitsch D, Kolarich D, Binder M, Stadlmann J, Altmann F, Duchene M. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Mol Microbiol* 2009; 72: 518-36.
 194. Land KM, Delgadillo-Correa MG, Tachezy J, *et al*. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol Microbiol* 2004; 51: 115-22.
 195. Pal D, Banerjee S, Cui J, Schwartz A, Ghosh SK, Samuelson J. *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 458-64.
 196. Robinson SC. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. *Can Med Assoc J* 1962; 86: 665.
 197. Meri T, Jokiranta TS, Suhonen L, Meri S. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: Report of the first three cases from Finland and optimization of *in vitro* susceptibility testing under various oxygen concentrations. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 763-7.
 198. Pérez S, Fernández-Verdugo A, Pérez F, Vázquez F. Prevalence of 5-nitroimidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in Oviedo, Spain. *Sex Transm Dis* 2001; 28: 115-6.
 199. Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 2003; 13: 239-49.
 200. Smith J, Garber GE. Current status and prospects for development of a vaccine against *Trichomonas vaginalis* infections. *Vaccine* 2014; 32: 1588-94.
 201. Kulda J, Hrdy I. Hydrogenosome: The site of 5-nitroimidazole activation and resistance. In: Tachezy H, Ed. *Hydrogenosomes and mitochondria: Mitochondria of anaerobic eukaryotes*. Microbiology Monographs. Springer 2008; pp. 179-200.
 202. Rasolomon D, Tomkova E, Cammack R, Kulda J, Tachezy J. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasito* 2001; 123: 45-56.
 203. Schwebke JR, Barrientes FJ. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 4209-10.
 204. Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A. *In vitro* induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* 1993; 40: 262-9.
 205. Sköld M, Gnarpe H, Hillstrom L. Ornidazole: a new antiprotozoal compound for treatment of *Trichomonas vaginalis* infection. *Brit J Vener Dis* 1977; 53: 44-8.
 206. Singh PP, Jain A. Trichomoniasis: chemotherapy, drug-resistance and new targets. *J Parasit Dis* 2007; 31: 79-91.
 207. Desrivot J, Waikedre J, Cabalion P, *et al*. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 7-12.
 208. de Villiers BJ, van Vuuren SF, van Zyl RL, van Wyk BE. Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia* species (Araliaceae). *J Ethnopharm* 2010; 129: 189-96.
 209. Cheikh-Ali Z, Adiko M, Bouttier S, *et al*. Composition, and antimicrobial and remarkable antiprotozoal activities of the essential oil of rhizomes of *Aframomum sceptrum* K. Schum.(Zingiberaceae). *Chem Biodivers* 2011; 8: 658-67.
 210. Calzada F, Yépez-Mulia L, Tapia-Contreras A. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 248-51.
 211. Muelas-Serrano S, Nogal JJ, Martínez-Díaz RA, Escario JA, Martínez-Fernández AR, Gómez-Barrio A. *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharm* 2000; 71, 101-7.
 212. Gómez-Barrio A, Martínez-Grueiro MM, Montero D, *et al*. *In vitro* antiparasitic activity of plant extracts from Panama. *Pharm Biol* 2004; 42: 332-7.
 213. Frasson AP, dos Santos O, Duarte M, *et al*. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitol Res* 2012; 110: 2581-7.
 214. Brandelli, C.L.C., Vieira, P.D.B., Macedo, A.J., Tasca, T., 2013. Remarkable anti-*Trichomonas vaginalis* activity of plants traditionally used by the Mbya-Guarani indigenous group in Brazil. *Biomed Res Int* 2013: 1-7.
 215. Tasca Cargnin S, de Brum Vieira P, Cibulski S, *et al*. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. *Parasitol Int* 2013; 62: 112-7.
 216. Vital PG, Rivera WL. Antimicrobial activity, cytotoxicity, and phytochemical screening of *Voacanga globosa* (Blanco) Merr. leaf extract (Apocynaceae). *Asian Pacific J Trop Med* 2011; 4: 824-8.
 217. Ertabaklar H, Kivcak B, Mert T, TÖZ SÖ. *In vitro* activity of *Arbutus unedo* leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Türkiye Parazitolo Derg* 2009; 33: 263-4.
 218. Martin T, Villaescusa L, Gasquet M, *et al*. Screening for protozoocidal activity of Spanish plants. *Pharm Biol* 1998; 36: 56-62.
 219. Martínez-Díaz RA, Ibáñez-Escribano A, Burillo J, *et al*. Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium*

- Linnaeus (Asteraceae) essential oil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015; 110: 693-9.
220. Youse HA, Kazemian A, Sereshti M, *et al*. Effect of *Echinophora platyloba*, *Stachys lavandulifolia*, and *Eucalyptus camaldulensis* plants on *Trichomonas vaginalis* growth *in vitro*. Adv Biomed Res 2012; 1: 1-3.
221. Hassani S, Asghari G, Yousefi H, Kazemian A, Rafeiean M, Darani HY. Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. Adv Biomed Res 2013; 2: 1-11.
222. Taran M, Rezaeian M, Izaddoost M. *In vitro* antitrichomonas activity of *Allium hirtifolium* (Persian Shallot) in comparison with metronidazole. Irian J Public Health 2006; 35: 92-4.
224. Sánchez-Arreola E, Hernández-Molina LR, Sánchez-Salas JL, Martínez-Espino G. Alkaloids from *Bocconia frutescens*. and biological activity of their extracts. Pharm Biol 2006; 44: 540-3.
225. Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MM, *et al*. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn.(Palmae) husk fiber extract. Res Microbiol 2002; 153: 647-52.
226. Barbosa E, Calzada F, Campos R. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. J Ethnopharmacol 2007; 109: 552-4.
227. Damke E, Tsuzuki JK, Chassot F, *et al*. Spermicidal and anti-*Trichomonas vaginalis* activity of Brazilian *Sapindus saponaria*. BMC Complement Altern Med 2013; 13: 196-204.
228. de Brum Vieira P, Giordani RB, Macedo AJ, Tasca T. Natural and synthetic compound anti-*Trichomonas vaginalis*: an update review. Parasitol Res 2015; 114: 1249-61.
229. Helms DJ, Mosure DJ, Secor WE, Workowski KA. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. Am J Obstet Gynecol 2008; 198: 370-2.
230. Nyirjesy P, Gilbert J, Mulcahy LJ. Resistant trichomoniasis: successful treatment with combination therapy. Sex Transm Dis 2011; 38: 962-3.
231. Schwebke JR, Lensing SY, Sobel J. Intravaginal metronidazole/tinidazole for the treatment of vaginal trichomoniasis. Sex Transm Dis 2013; 40: 710-4.
232. Secor WE. *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges. Expert Rev Anti Infect Ther 2012; 10: 107-9.
233. Aggarwal A, Shier RM. Recalcitrant *Trichomonas vaginalis* infections successfully treated with vaginal acidification. J Obstet Gynaecol Can 2008; 30: 55-8.
234. Narcisi EM, Secor WE. *In vitro* effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1121-5.
235. Adagu IS, Nolder D, Warhurst DC, Rossignol JF. *In vitro* activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 103-11.
236. Wright JM, Dunn LA, Kazimierczuk Z, *et al*. Susceptibility *in vitro* of clinically metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* to nitazoxanide, toyocamycin, and 2-fluoro-2'-deoxyadenosine. Parasitol Res 2010; 107: 847-53.
237. Blaha C, Duchêne M, Aspöck H, Walochnik J. *In vitro* activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and-susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. J Antimicrob Chem 2006; 57: 273-8.
238. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. J Antimicrob Chem 2012; 67: 2576-97.
239. Rocha DAS, de Andrade Rosa I, de Souza W, Benchimol M. Evaluation of the effect of miltefosine on *Trichomonas vaginalis*. Par Res 2014; 113: 1041-7.
240. Wilkinson D, Ramjee G, Tholandi M, Rutherford G. Nonoxynol-9 for preventing vaginal acquisition of sexually transmitted infections by women from men. Cochrane Database Syst Rev 2002; 4: CD003939.



Mitochondrial ROS and mtDNA fragments inside nuclear DNA as a main effector of ageing: the “cell aging regulation system”

Title in Spanish: *Fragmentos de mitocondria ROS y mtDNA dentro del ADN nuclear como principal efector del envejecimiento: el sistema de regulación celular de envejecimiento*

Gustavo Barja de Quiroga^{1,*}

¹Departamento de Fisiología Animal-II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid

ABSTRACT: The updated mitochondrial free radical theory of aging (MFRTA) is reviewed as part of the cell aging regulatory system (CARS). Any valid theory of aging should explain why different animal species age at so different rates. Only two known parameters correlate with species longevity in the right sense: the mitochondrial rate of reactive oxygen species production (*mitROSp*) and the degree of fatty acid unsaturation of tissue membranes calculated as the double bond index (*DBI*). Both are *low* in long-lived animals. *Dietary restriction* (DR), which increases longevity, *also decreases mitROSp* and % free radical leak (FRL) at complex I and *oxidative damage to mtDNA*. This can increase longevity by decreasing mtDNA fragments accumulation inside nuclear DNA which revitalizes MFRTA. Lowered *mitROSp* and FRL at complex I also occurs during protein or methionine restriction, and rapamycin treatment (which also increases longevity). The decrease in *mitROSp* during DR (dietary restriction) is due to restriction of a single substance, methionine, and occurs at the matrix domain of complex I. This updated MFRTA focuses on low *mitROSp* and low sensitivity of membranes to oxidation in long-lived animals. The three best known aging effectors of the genetic *Aging Program* of aerobic tissues are *mitROSp*, *membrane fatty acid unsaturation*, and *autophagy*. This program reacts to cytoplasmic signaling proteins, influenced by nutrients, drugs and hormones, varying the activity of the *mitROSp* and macroautophagy aging effectors. An analogous program, although with additional gene clusters of aging involved, and different output activity, can determine longevity in different animal species.

RESUMEN: Se revisa la teoría del envejecimiento por radicales libres de origen mitocondrial (MFRTA) como parte del Sistema de Regulación Celular del Envejecimiento (CARS). Cualquier teoría del envejecimiento debe explicar porqué las especies animales envejecen a velocidades tan diferentes. Solo dos parámetros conocidos correlacionan con la longevidad de las especies en el sentido correcto: la producción mitocondrial de radicales de oxígeno (*mitROSp*) y el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares. Ambos están disminuidos en las especies longevas. La restricción calórica, de proteínas, o de metionina, y la rapamicina, que aumentan la longevidad, también disminuyen la *mitROSp* y la fuga % de radicales libres en el complejo I y el daño oxidativo al ADNmt. Esto puede aumentar la longevidad disminuyendo la acumulación de fragmentos del ADNmt dentro del ADN nuclear con la edad, lo cual revitaliza la MFRTA. El descenso en *mitROSp* durante la restricción calórica se debe sólo a la restricción de metionina, y ocurre en el dominio de membrana del complejo I. *La mitROSp*, *el grado de insaturación de los ácidos grasos*, y *la autofagocitosis* son los tres efectores de envejecimiento conocidos dependientes del programa genético pro-envejecimiento (PAP, que es parte del CARS). El PAP responde a proteínas de señalización celular en función de la disponibilidad de nutrientes y hormonas en los medios ambiente e interno. Este programa, aunque con más clusters génicos del envejecimiento implicados, y con diferente intensidad efectora, podría ser responsable de la regulación de la longevidad de las distintas especies animales.

*Corresponding Author: gbarja@bio.ucm.es

Received: October 15, 2016 Accepted: December 15, 2016

Premio Juan Abelló del Concurso científico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 1 (2017), pp. 48-80

Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

Aging causes 100.000 people deaths per day and 40 million per year worldwide. It is responsible for 70 % of all human deaths (90 % in developed countries like Spain). The terrible degenerative diseases most cancers and

cardiovascular diseases, senile dementias including Alzheimer disease, Parkinson's disease, osteoporosis, or type-2 diabetes have a common root: aging. Even if some can survive one of these illnesses, another one will come rather soon because the body is old and thus heavily damaged. The large majority of human cancers will never

be eliminated unless aging is defeated. Treating all the degenerative diseases one by one will never eliminate them. However, *defeating aging, all of them will be eliminated with a single manipulation*. This will restart evolution of increasing longevity, which has been among the main causes of the great success of our species in the planet, from our last common primate ancestors, the early small Plesiadapiformes-like Purgatorius which lived only around 10 years, to the 122 years that we can live now at best, a 10 fold (1.000 %) life extension. In order to accomplish this major goal, that will free us from most of those terrible illnesses and restart our evolutionary path towards an even higher complexity, we must first understand what are the fundamental basic mechanisms of aging down to the cell level. Once we know these, the large capacity of modern molecular biology and pharmacological techniques *will finally allow accomplishing the old dream of decreasing, for the first time in history, human aging rate*.

After truly decreasing aging rate, it will be possible in the future for human beings to reach e.g. 100 years with a *biological age* equivalent to that of a young person of today of 30 years of age ("only" around 3 fold lifespan extension). That would be properly called "healthy aging", which is clearly not the case for most human centenarians nowadays. The previous approach implemented in the past century, merely to *protect many people from death but not from aging*, increased the percentage of people that reached old age, so that they are alive but they are *biologically old* and therefore weak and with a ever increasing exponential chance of suffer sooner or later degenerative diseases and death. The result is the ever increasing percentage of aged people in our societies, generating an enormous load for social security and health care systems, and strongly increasing the proportion of fragile, disabled, and long time suffering old individuals in the population. Our aged societies and their high economic burden constitute the frequently called huge socioeconomic "aging problem". All this can be solved by progressively attaining negligible senescence with the help of gerontological science. Biogerontology has the key to this solution that will help to propel humanity to a brighter future on its committed evolutionary path from simplicity to complexity, from dust to bacteria, to eukaryotic cells, to multicellular life, to better society, and then to new achievements that few can nowadays even wonder.

Therefore, what causes aging? While many different theories of aging have been proposed, the mitochondrial free radical theory of aging (MFRTA) is one of the few current main explanations of aging and longevity in mammals, birds and multicellular animals in general. Any aging theory must explain *why maximum longevity* (referred here throughout as “longevity”) *varies so widely* in animals: 30 fold from mice to men, 200 fold from shrews to the longest-living whales, or more than 5,000 fold from perhaps a few days of life in some invertebrates to *Arctica islandica* mussels (longevity around 500 years). Such huge differences indicate that *longevity is markedly*

regulated and flexible during species evolution. Copying only a small fraction of this natural capacity would make possible in the future to reach *negligible senescence* in humans. Animals closely related by phylogeny, like *Mus musculus* (longevity 4 years) and *Peromyscus leucopus* (longevity 8 years) mice have very different maximum lifespans, indicating that evolution of longevity is also a relatively easy and quick process. Therefore, *substantially decreasing the aging rate in mammals including humans* will be relatively easy once the underlying basic mechanisms controlling longevity at physiological, cellular and molecular levels are elucidated.

Mean lifespan and the life expectancy at birth of the individuals of a population depends more on the environment than on the genes. On the contrary (*maximum*) *longevity*, and its inverse -the species aging rate -, *depends more than 90 % on the genotype*, as it is also the case for any other species-specific trait. Longevity and aging rate are the parameters that matter concerning the *endogenous* process of aging.

Up to now, only two known factors have demonstrated to correlate in the right sense with animal longevity in vertebrates including mammals and birds: a) the rate of mitROSp (mitochondrial reactive oxygen species production, Refs. 1-4); and b) the degree of fatty acid unsaturation (calculated as the double bond index, DBI) of tissue cellular membranes including the mitochondrial ones (5, 6). The longer the longevity of a species, the smaller the value corresponding to these two parameters. The low mitROSp of long-lived animal species decreases their generation of endogenous (free radical) damage at mitochondria. The low fatty acid DBI and peroxidizability index (PI) decrease the sensitivity of the cellular and mitochondrial membranes to free radical attack and lipid peroxidation. *No other theory of aging* focuses on parameters like these two, that *correlate in the right sense with longevity* across animal species (and also within single species), and offers plausible mechanistic explanations for the final accumulation of damage from *endogenous* origin leading to aging. This is relevant, since the most important fact that any theory of aging *must explain is why longevity and aging rate vary so widely* among different animals.

2. ANTIOXIDANTS AND LONGEVITY

Studies about MFRTA first focused in antioxidants, mainly because they could be measured with rather simple methods. In 1993 it was found at my laboratory that both enzymatic and non-enzymatic endogenous tissue antioxidants, including superoxide dismutase, catalase, GSH-peroxidases, GSH-reductases, GSH, or ascorbate, strongly correlated with longevity across vertebrates. However, and *rather surprisingly, such correlation was negative, instead of positive* as it was until that time widely believed. Our review on the relationship between endogenous antioxidants and vertebrate longevity (7) included all the available published data on the subject obtained in vertebrates including mammals by my as well as other laboratories.

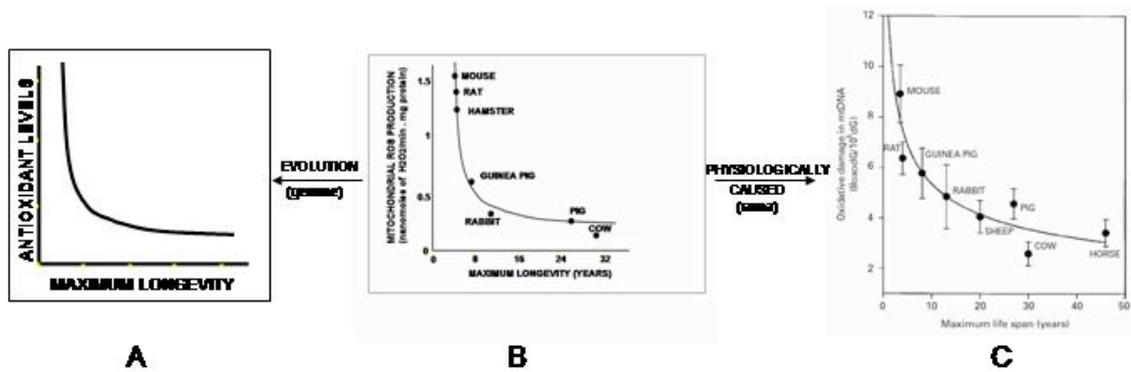


Figure 1. Production of ROS at mitochondria (A) negatively correlates with longevity across animal species. Evolutionarily, this is the cause of the very low *endogenous antioxidant* (including antioxidant enzymes) levels of long-lived animal species (B). In addition, it nowadays mechanistically causes the low level of *mtDNA oxidative damage of long-lived animals* (C). (Refs. 7,20,23,29).

All those data, coming from various different sources consistently agreed: *the longer the longevity, the lower were the levels of most endogenous tissue antioxidants and antioxidant enzymes*. A later reappraisal of the subject (8) confirmed the existence of a generally negative correlation between tissue antioxidants and longevity in all kinds of vertebrate animals (Figure 1A). It was most interesting that long-lived animals had lower instead of higher antioxidant levels. Among 27 studied correlations, 21 negatively correlated with longevity, six did not show significant differences, and not a single positive correlation with longevity was found (7). Superoxide dismutase was among the antioxidants tending to show no association with longevity. Previous believe that this enzymatic activity was positively associated with longevity was due to referring the SOD activity values (total SOD, CuZn plus Mn) to the oxygen consumption (VO_2) of the whole animal (to the weight-specific metabolic rate). Since weight-specific metabolic rate strongly decreases as body size increases, the larger SOD/ VO_2 of humans compared to rats was due to the lower value of the denominator in the humans (lower weight-specific metabolic rate than rats) instead of to a higher value of the numerator (SOD). In fact when the tissue SOD values (total SOD, CuZn plus Mn, *without dividing by VO_2*) were plotted against longevity across species they showed no significant correlation with mammalian longevity in mammals in the original publication (9). In the brain and lung of vertebrate species –but not in liver– the correlation between SOD (total SOD, CuZn plus Mn) and longevity was again negative like for the other antioxidants. Further studies in different mammals including long-lived naked mole-rats, as well as ants, honey bees and marine bivalves also found a negative correlation with longevity for this antioxidant enzyme –SOD (8). In this more recent and comprehensive review of the subject, among a total of 78 correlations between endogenous tissue antioxidants and longevity, 72 were negative, six did not show significant differences, and only a single one was positive (8), corroborating global studies performed almost two decades ago (7). Therefore *endogenous antioxidant levels are clearly not the cause of the high longevity* of long-lived animal

species.

3. MITOCHONDRIAL ROS GENERATION, mtDNA OXIDATIVE DAMAGE, AND LONGEVITY

3.1. Comparative studies of mitROSp

Why long-lived animals need less antioxidant levels in their vital organs? We proposed (10) that the rate of mitROSp could be negatively correlated with longevity and that this would be the critical factor for aging, instead of the antioxidants. Long-lived animals would not need to maintain high antioxidant enzyme levels, which is energetically expensive, because they would produce mtROS at a low pace, and they could transitorily induce them if needed. This was indeed experimentally corroborated comparing mammalian species with different longevities (3) (Figure 1B) as well as comparing short-lived rodents (rats and mice) with 8 fold longer lived birds (pigeons, parakeets and canaries) of similar body size and weight-specific metabolic rate (11, 12). A posterior investigation studying up to 12 different mammalian species confirmed these findings *even after correcting for body size* (4).

The studies in birds are especially important because the studies performed in mammals used species following the Pearl rate of living law of aging: “the lower the weight-specific metabolic rate the longer the longevity”. Thus, one could not discard, in principle, the possibility that the species with longer longevity included in the comparisons between different mammals could show low rates of mitROSp simply because their rates of oxygen consumption were also lower than those of the short-lived ones. In fact mitROSp was positively correlated with mitochondrial O_2 consumption and with global metabolic rate in those studies (3). It was then important to study the problem in some of the many species that deviate from the Pearl’s rate of living law (an old theory of aging ruled out long ago). Three groups of warm-blooded vertebrates have much higher longevity than expected for their body size or weight-specific metabolic rate compared to most mammals: *birds, bats and primates*. Birds have both a high rate of oxygen consumption per gram of tissue and a

high longevity. This makes them ideal to solve the problem mentioned above. The lower mitROSp of pigeons, canaries and parakeets, when compared to rats in the first case and to mice in the second and third case, strongly reinforces the MFRTA since it indicates that the low mitROSp of long-lived animals occurs both in comparisons between animals following Pearl's law as well as in those not following it. *A high longevity is not a simple consequence of a slow rate of living.* It can be obtained –as the bird case shows– together with high rates of oxygen consumption and animal aerobic activity. High longevity in the studied birds is associated with a low rate of mitROSp both in absolute terms, and also as *percentage* of mitochondrial oxygen consumption and thus of electron flow at the electron transport chain (birds have a low percent free radical leak, FRL).

3.2. The mitROSp site at the ETC important for longevity

It was been widely believed for decades that complex III of the respiratory chain was the respiratory complex responsible for ROS production in the ETC (the mitochondrial electron transport chain) (13). Later it was found, already *working with freshly isolated and well coupled functional mitochondria*, that complex I also produces ROS in heart or brain mitochondria isolated from rats, mice, pigeons, canaries and parakeets (12, 14), which was soon confirmed in rats by other laboratories (15, 16) and soon became established knowledge in biochemistry books.

A key experiment to detect complex I ROS production was to measure mitROSp with succinate alone as well as with succinate+rotenone. In the second situation the rate of mitROSp acutely decreases because rotenone does not allow the electrons to flow back to complex I from succinate-complex II through reverse electron flow (17). But the habitual procedure of adding succinate alone, followed or not by antimycin A, and rarely using complex I-linked substrates, led to the general but erroneous believe during decades that mitROS came mainly from complex III-semiquinone.

In addition, we also found that *the lower mtROS generation rate observed in birds* compared to mammals of similar body size and weight-specific metabolic rate *occurred only at complex I* (12, 14, 17), not at complex III. This is most interesting since we found the same afterwards in dietary restriction (DR) rat models (see section 5). Concerning the precise site within complex I where ROS are produced three generators have been suggested, the flavin at the beginning of the electron path within the complex, the FeS clusters of the hydrophilic *matrix domain*, and the ubiquinone located in the membrane domain. Various investigators have supported the role of the flavin based on experiments with the inhibitor diphenyliodonium, which strongly decreases mitROSp. However, the site of action of diphenyliodonium, at the beginning of the electron path, also avoids electrons to reach the other two possible generators, the various FeS clusters and the ubiquinone, which therefore can not be discarded in those experiments.

In other investigations, it was concluded that electron leak to oxygen occurred between the ferricyanide reduction site and the rotenone binding site of Complex I both in intact mitochondria (12, 14, 17) as well as in submitochondrial particles (18). Iron-sulphur clusters with a higher midpoint potential than FeSN1a, which could be situated in the electron path after the ferricyanide reduction site (15,18), or the unstable semiquinone known to be present in the membrane domain of Complex I and possibly functioning in H⁺ pumping coupled to electron transport (19), could be the complex I oxygen radical generators. However, many different Complex I FeS clusters could be responsible for complex I mitROSp because, under physiological conditions: (a) their reduced and oxidized states will not be present in equal concentrations; (b) interactions with many different factors and surrounding macromolecules could modify the final redox potential of the carriers *in vivo*; and (c) the exact position of many FeS clusters in the Complex I electron path is still unknown. Thus, the important aging-related question whether flavin, FeS clusters or ubisemiquinone, or a combination of these, are responsible for the complex I ROS generation relevant for aging was still unanswered (but see the proteomics ETC study described at section 5, Ref. 53).

3.3. Oxidative damage to mtDNA and longevity

The location where mitochondrial DNA (*mtDNA*) is situated is very close to the site of mtROS generation, the ETC at the inner mitochondrial membrane. ROS production also occurs at other cellular sites like microsomes, peroxisomes or membrane-bound NADPH-oxidases, and the rate of ROS generation at those sites can substantially exceed in various situations that coming from mitochondria. However, the ROS produced at mitochondria can be still the most important ones for longevity *due to the presence of mtDNA within the mitochondria* but not at those other organelles or parts of the cell. Since long-lived animal species have low rates of mtROS generation, it was logical to expect that this should have an effect on the steady-state level of oxidative damage in their mtDNA. Therefore we decided to measure the level of 8-oxodG (8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine) in the heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of eight different mammalian species differing by up to 13-fold in longevity. The results showed that the level of 8-oxodG in the mtDNA of both organs is *negatively correlated with longevity* (20). The longer the longevity of a species, the smaller is its mtDNA oxidative damage degree (Figure 1C). In contrast, the 8-oxodG level in nuclear DNA (nDNA) did not correlate with longevity in any organ even though mitochondrial and nuclear DNA was measured in the same samples taken from the same individual animals (20). Therefore, the different mitROSp rates of the different species seem to have a direct impact on mtDNA, and not on nDNA, concerning oxidative damage. This makes sense since the site of ROS generation at mitochondria is very close to mtDNA whereas nDNA is situated far away from it inside the nuclear compartment.

The rate of mitROSp is measured in isolated mitochondria *in vitro* due to the lack of reliable methods for direct *in vivo* mitochondrial H₂O₂ production determination. However, since the variations in the *steady-state* levels of 8-oxodG in mtDNA closely reflect the variations in the *rate* of mitROSp, both in comparative (Figure 1B,C) and in dietary restriction (DR; section 5) studies, suggests that the mitROSp *in vitro* measurements were closely indicative of the situation *in vivo*. In addition, the level of 8-oxodG in mtDNA was generally lower in the heart and brain of three long-lived birds when compared to two short-lived mammals of similar body size and specific metabolic rate, in agreement with the superior longevity of the birds, whereas again this was not the case for nDNA (21). These investigations also showed that the intensity of oxidative damage is several fold higher in mtDNA than in nDNA in the heart and brain of all the 11 different species of mammals and birds studied (20, 21), which is again consistent with the *close proximity between mtDNA and the sites of mtROS generation*. Studies on the longest-lived metazoan, the bivalve *A. islandica* have also shown increases with age in DNA oxidation and lower DNA oxidative damage than in other bivalve populations with much shorter (6 fold lower) longevities (22).

3.4. Increasing antioxidants does not change longevity

Initial studies about MFRTA were mainly focused on antioxidants because they were easier to measure, and because sensitive enough techniques to assay mitROSp in different species were generally not available at that time mainly due to the *generalized* use of spectrophotometry instead of fluorometry. Most of the investigations on the effect of *adding dietary antioxidants to the diet* were performed during the 1970's and 80's. The general result was that *antioxidants did not increase (maximum) longevity* (23, 24). In some experiments they increased only mean longevity (23-25). Interestingly, this tended to occur when the (maximum) *longevity of the control* rodents was short, usually less than 3 years. This suggests that antioxidants, when the husbandry conditions are suboptimal, could protect from causes of early death, and thus they can make more rectangular the survival curve. This is what happened in humans during the XXth century in many developing western countries when mean life expectancy increased from around 40 to 80 years without decreasing in aging rate. That is why now the old are so abundant in western populations. Antioxidants, in such cases above, were bringing back towards optimum the diminished survival of the controls reared under suboptimum environmental conditions, which is interesting but *not the goal of gerontology*. Ironically, *the poorer the survival curve of the controls, the largest is the chance of obtaining a positive result in terms of mean longevity*. A most inappropriate stimulus to not well done research indeed. Whereas, the better one performs the experiment, the less chances one has of obtaining an increase in *mean* longevity. In summary, like in the comparative inter-specific studies described above, *antioxidants clearly can not be among the factors*

responsible for low aging rates and high (maximum) longevities.

When the techniques to obtain transgenic or knockout mice with *increased or lack of expression of genes codifying for antioxidant enzymes* like SODs, catalase, or GSH-peroxidases, were applied to this problem, the results were (obviously) similarly disappointing (26, 27). The *antioxidant enzyme activities increased* through modification of gene expression, like the non enzymatic dietary antioxidants added to the diet, *did not slow aging*. Independently of the way in which the antioxidants were manipulated, dietary or genetic, the result was the same: *a lack of effect of antioxidants on mammalian longevity*. This has been interpreted by some (27) but not other (28) authors as the "death" of the MFRTA (27), but such conclusion (27) did not take into account that what correlates with longevity in the right sense is not the level of the antioxidants, but the mitROSp rate and the fatty acid unsaturation degree of the cellular membranes (23, 29).

Studies in simpler organisms like the fungus *Podospora anserina* have provided strong evidence for a role of mitROSp in senescence including DR-effects, and strains of this fungus deprived of mitROSp are converted to "eternal" non aging organisms (30). Recent experiments in 29 different longevity mutants, and 26 different environmental situations and drugs that increase (DR, PR, MetR, rapamycin, starvation, and others) or decrease (including 10 or 20 mg/l glucose medium, the 10 μ M amyloid-binding compound ThT, 1mM 4,4'-diaminodiphenylsulphone DDS, 10 mM N-acetyl cysteine) longevity used a new fluorescent probe claimed to estimate mitROSp ("free radical production and metabolic activity at the single-mitochondrion level", Ref. 31) for the first time *in vivo*. The results of these studies, performed in the nematode worm *C. elegans*, were extremely interesting. *In all the 55 cases lower "mitROSp" (mitoflash) was always observed in long-lived animals* (31). These results were quickly and heavily criticized in the same journal (Nature) by 27 other researchers from different fields related or not gerontology. The critics claimed that what the mitoflash technique estimated was not mitROSp (superoxide radical) because changes in fluorescence of the cpYFP used (the sensor circularly permuted yellow fluorescent protein in the matrix) "are due to alterations in pH, not superoxide". Thus, the critic was *exclusively methodological*, and did not consider what could be the biological significance of Shen et al. results (31). The reply of the authors of the *C. elegans* mitoflash study was also published in Nature together with the critic. The authors of the mitoflash study have continued publishing further investigations since 2014 using the same technique, leading to around a dozen further publications, some in mouse muscle, and in some studies they tried to ascertain if H⁺ indeed interfered or not with their mitoflashes. The issue does not seem still resolved today. But if the critics are correct, why then low mitoflash (as claimed partial estimator of "mROSp") was always observed in long-lived animals, in full agreement with hundreds of published mitROSp-longevity studies

summarized in the present review? How a probe reacting *only* to pH could consistently vary with longevity *always in the right sense* in 55 mutant or environmental longevity models? And most importantly, what is the hypothesis relating H^+ to longevity? To the best of my knowledge none has been proposed. Perhaps proton gradient and mitochondrial membrane potential are indirectly related to longevity through changes in mitROSp, and this relationship would add to a possible reaction of some ROS with cpYFP. If this were true, both the critics and the authors of the study (31) would be right, and the impressive results would have a strong value for biogerontology. In any case, these important physiological questions have not been resolved and still wait for adequate answers. I consider most important to fully clarify this issue. The availability of a technique (mitoflash or any other better one?) that could reliably estimate how much mitochondrial ROS are produced in a mouse *in vivo* would be, no doubt, of paramount value for researchers and a most fundamental advance for gerontology.

3.5. The Contact Hypothesis of Aging. mitROSp instead of defences or repair control aging

Studies in mammals and other vertebrates clearly indicate beyond reasonable doubt that the *rate of mitROS generation importantly contributes to determine longevity, whereas antioxidants do not* (23, 24, 29, 32). This is counterintuitive only if we erroneously consider the cell as a homogeneous system without compartmentation. But cells are not like that. The *global* cellular level of oxidative stress should depend both on the rates of ROS production and ROS elimination. Both contribute to determine cell survival or cell death according to the general “balance” between them, and likely affect *mean* lifespan. However, the ROS concentration in particular compartments like mitochondria, and most especially very near to the places of mitROS generation like complex I, should be much more dependent on mitROSp than on antioxidants as the *free radical generation site* relevant for aging is approached at *micro level*. At such places, it is mitROSp what would mainly determine the local ROS concentration (Figure 2). This is especially important because the main target for aging, mtDNA, is located very close in the vicinity, perhaps even *in contact with the free radical generation source*.

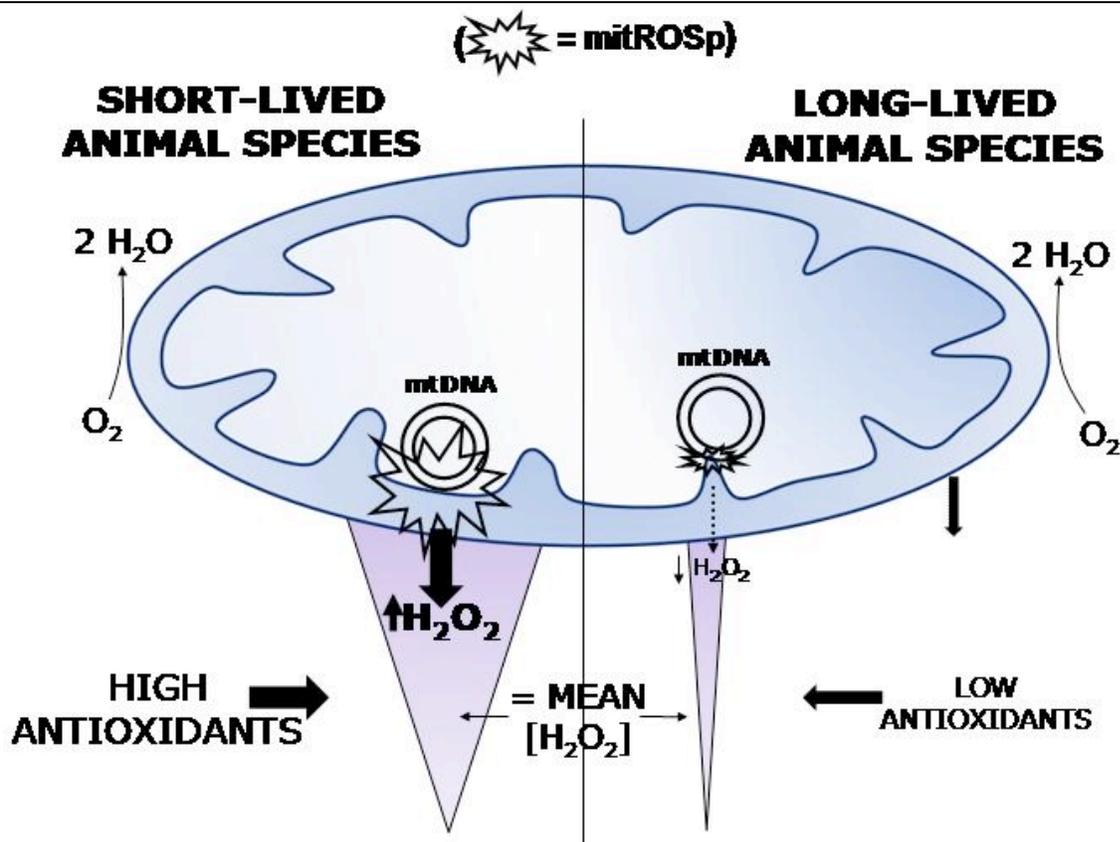


Figure 2. Low ROS local concentration near mtDNA in long-lived species. Long-lived animals show both low rates of mitROS production (Figure 1B) and low antioxidant levels (Figure 1A), and the reverse is true in short-lived-lived ones (7,10). Therefore, both kinds of animals have a *similar* and moderate level of *mean* oxidative stress (and H₂O₂ concentration) at most cellular sites. This is necessary for general cell homeostasis and survival both in animal species with high and low longevities. But the *local* concentration of ROS *at the site of ROS production* is much lower in long-lived than in short-lived species due to their low rates of mitROS production. This causes the lower oxidative damage to mtDNA (Figure 1C and Ref. 20) of long-lived species because mtDNA is situated nearby or even *in contact* with the site of ROS production at complex I relevant for aging. The model predicts the existence of a gradient of H₂O₂ concentration from mitochondria to the surrounding cytoplasm. The size of the stars, lower in long-lived species, represents the local ROS concentration at the sites of mitROSp at complex I, which is lower in long-lived species.

This would explain why lowering the rate of mitROSp instead of increasing antioxidants *was selected for* during the evolution of longevity in mammals, birds, and other species. And it would be consistent with the view that mitochondria are causal players in the aging process. *Contact* between mtDNA and specific mitochondrial proteins agrees with classic electron microscopic studies (33). Mitochondrial nucleoid structure has been long debated, with an estimation of about 2-10 mtDNA molecules coated by an unspecified number of proteins (34). However, using high-resolution microscopy, the structure of the nucleoids has been further clarified as single mtDNA circular molecules compacted by mitochondrial transcription factor A (TFAM, 35), which forces mtDNA to undergo a U-turn, thus collapsing the mtDNA molecule.

3.6. Low mitROSp, and then low endogenous antioxidant defences and DNA repair, in long-lived animals

In order to decrease damage to mtDNA it is much *more efficient* to lower the rate of generation of damage than to have a higher rate of generation of damage and, afterwards, try to intercept the generated ROS using antioxidants, or try to repair the damaged already inflicted on mtDNA. This last approach would not make sense if generation of damage can be controlled on the first place. This is why long-lived species have not used high (antioxidant) defence (7,8,10,11,23,24,29,32) or high repair of *endogenous* DNA damage (reviewed in 29) to increase longevity. In addition, it would be *very costly* to *continuously* maintain *high levels of antioxidant or repair enzymes* in long-lived mammals to counteract a high rate of damage generation. Instead, lowering mitROSp: i) is much *easier*; ii) is *100 % efficient*; and iii) avoids much damage at around *zero cost*. This view is fully consistent with the idea that aging is generated (evolutionarily speaking) "on purpose" by the organism itself, that aging has an *adaptive value*, likely *for the group* (2), and possibly to speed up evolutionary pace because it increases diversity and thus evolvability (2). This is why it has been *selected for* during evolution and *programmed in the genotype* to be expressed at widely different rates in agreement with the fecundity, population size, and many other traits of each particular species on its ecological niche (see section 9.2). The *association between fecundity and longevity* is not physiological, as the *Disposable Soma Theory* of aging assumes without evidence and lacking any physiologically plausible mechanism that could support it, but *genetic*. Because fecundity must be necessarily linked to longevity in the cell Aging Program (see section 9), otherwise population size would oscillate too much endangering the survival of the group.

3.7. FRL is not a constant percent, and mitROS are not simple "by-products", of the ETC

The fact that mitROSp is low in long-lived species *irrespective of the value of their specific metabolic rate* is clearly against the common belief that mitROS production is an unavoidable "*by-product*" of the respiratory chain.

Mitochondria can *vary* the percentage free radical leak (FRL = % mitROSp/mitO₂ consumption) in the respiratory chain. They decrease such percentage (the FRL) in *especially long-lived* animals, like birds or dietary restricted rats. They lower the FRL to decrease mitROSp (to age slowly), while their mitochondrial oxygen consumption is not depressed to be able to continue mitochondrial ATP generation at the rates needed for the normal activity level of the animal. If ROS leakage were an "unavoidable by-product" of the mitochondrial electron transport chain, the FRL would be a rather constant % of electron flux at the ETC. Instead, the FRL is decreased especially long-lived animals like birds, that live 2-3 fold longer than mammals of the same body size and specific metabolic rate. Contrarily to the "by-product" unproven heavily repeated assumption, mitROSp is finely tuned (*regulated*) in each animal, and if necessary, it varies *independently of the rate of mitochondrial oxygen consumption and the total rate of electron flow at the ETC*. Thus, the FRL varies in many cases to contribute to determine the aging rate and the longevity of the species (birds), or the individual (during the DRs). The lazy assumption currently present in too many scientific articles that mitROS are "*unavoidable by-products of the ETC*" should be avoided because the measurements on *functional* isolated mitochondria data have demonstrated it to be false on too many occasions. The use of this "by-product" concept should be exclusively limited to particular situations on which it is known to be correct, but not as a generalization for every situation. This is important because this *wrong concept* is making *enormous damage to the scientific gerontological advance* concerning MFRTA, and therefore towards solving the aging problem.

4. LONGEVITY AND MEMBRANE FATTY ACID UNSATURATION

In addition to mitROSp, there is a second known parameter that also correlates with longevity in the right sense, the fatty acid unsaturation degree of tissue cellular (including mitochondrial) membranes. This is also well known since it has been studied many times in more than 20 well controlled different investigations and concordant results were *always* obtained. The degree of fatty acid unsaturation can be summarized as the double bond index (DBI), or alternatively, as the peroxidizability index (PI). *The longer the longevity of the species, the smaller the total number of tissue fatty acid double bonds (the smaller the DBI, Figure 3A, and PI)*. A constitutively low DBI strongly decreases the sensitivity of the cellular and mitochondrial membranes to lipid peroxidation, a highly destructive process. Lipid peroxidation, in addition to membrane damage, produces mutagenic and toxic metabolites. Peroxidation of lipids quantitatively is the most intense destructive process produced in cells by ROS. Fatty acids containing a high number of double bonds (like 20:4n-6 and *especially* 22:6n3) are the cellular molecules most sensitive to lipid peroxidation, and their sensitivity to lipid peroxidation increases *exponentially* as the number of double bonds per fatty acid molecule increases. The low

DBI and PI of long-lived animals was first described in 1996 in rat compared to pigeon and human mitochondria (36) followed by many studies in mammals and birds (see 5,6 for review). A total of 23 studies extended the seminal first observation (36) to many different mammals, various bird species, and some invertebrates, without finding a single exception: low tissue DBI in long-lived animals (6). The low degree of fatty acid unsaturation occurs both in

mitochondrial as well as in total cellular membranes in tissues of long-lived animals. It can therefore strongly diminish lipoxidation-derived damage in various cellular compartments, and especially in the mitochondrial one. At those organelles there is strong abundance of membranes together with a nearby and rather constant source of ROS during mitochondria respiration throughout the whole life span.

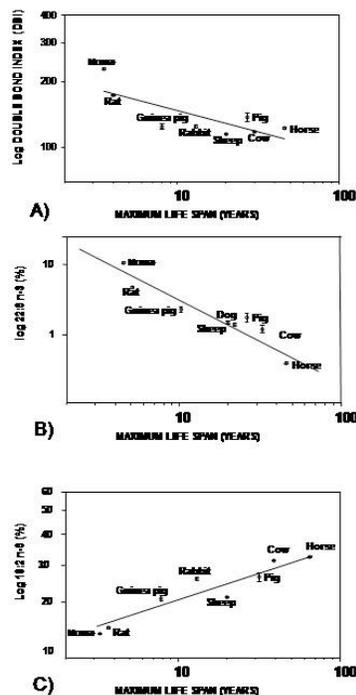


Figure 3. Low degree of membrane fatty acid unsaturation in tissues of long-lived animal species. A) Double bond index (DBI) in the heart of 8 mammals with widely different longevities; B) Levels of the highly unsaturated docosahexaenoic acid (22:6n-3) in liver of 8 mammals; C) Levels of the much less unsaturated linoleic acid (18:2n-6) in liver of 8 mammals. DBI (and PI) (part A) and 22:6n-3 (part B) are low in long-lived animals, whereas 18:2n-6 is higher in long-lived ones (part C). In studies in some tissues or species low 20:4n-6 and high 18:1n-9 are also typical of long-lived animals. Similar results were obtained in skeletal muscle, and in mitochondria from the three mammalian tissues. Three birds also showed lower DBI than mammals of similar body size. Reviewed in Refs. 5,6, and *Physiol. Reviews* 87:1175-213, 2007.

Among the different fatty acids composing the different cellular membranes many are responsible for the strong decrease in DBI (and PI) as longevity increases among species. But the most important ones, both due to their content in double bonds (low or high) as well as for their larger quantitative presence and variation among species, are 18:2n-6, 18:3n-3 and 22:6n-3 in mammals (Figure 3B,C), and in some phylogenetic groups also 18:1n-9 (at least in the studied birds) and 20:4n-6. As longevity increases across mammalian species tissue 18:1n-9, 18:2n-6 (Figure 3C) and 18:3n-3 significantly increase, and 20:4n-6 and especially 22:6n-3 (Figure 3B) significantly decrease in skeletal muscle, liver, and heart cellular membranes. Among them, the decrease in 22:6n-3 in long-lived animals usually is the most important to quantitatively explain their low DBI and PI values (Figure 3A,B). Interestingly, the final result is that the *total percentage of unsaturated* and saturated fatty acids *does*

not change among species with different longevities. Instead *it is the unsaturation degree* of the polyunsaturated fatty acids present what decreases from short- to long-lived animals. *Long-lived animals* have fatty acids with a lower degree of unsaturation, *with less double bonds* per fatty acid molecule. With this kind of fatty acid redistribution long-lived animals obtain a strong decrease in the sensitivity of their cellular membranes to the destructive and mutagenic process of lipid peroxidation, while likely avoiding strong changes in the fluidity of their membranes, the so called homeoviscous-longevity adaptation (5). In addition, it has been recently shown that feeding 18:1n-9 reverses the increases in 20:4n-6 and 22:6n-3 and the decreases in 18:1n-9 and 18:2n-6 and complexes I and IV activities observed in the skeletal muscle of old rats (37). Recent confirmation of the low tissue fatty acid unsaturation of long-lived animals has been obtained through shotgun lipidomic analysis of mitochondrial

phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in skeletal muscle, liver and brain of mammals with widely different longevities (38).

The low DBI of long-lived animals likely protects not only the lipids but also other kinds of cellular components. Since lipid peroxidation is a relatively massive process compared to oxidative damage to other kinds of macromolecules, long-lived animals, due to their low DBI, will produce far smaller amounts per unit time of highly toxic and mutagenic lipid peroxidation products like hydroxynonenal, malondialdehyde, and many others. These, having carbonyl groups, can modify free amino groups in proteins and DNA. Lipid peroxidation-derived protein modification seems to be involved also in aging, since comparisons among different mammalian species have found that the amount of malondialdehyde-lysine adducts in heart proteins negatively correlates with longevity (39).

What is the metabolic mechanism responsible for the negative correlation between the fatty acid unsaturation degree and species longevity? A role for acylation/deacylation of the constitutive membrane fatty acids can not be discarded. However, since the more unsaturated 20:4n-6 and 22:6n-3 are essential fatty acids synthesized from their dietary precursors 18:2n-6 and 18:3n-3 respectively, the enzymatic processes that control the n-3 and n-6 biosynthetic pathways seem to be involved. In this respect, in various comparative studies relating the degree of fatty acid unsaturation to longevity the results suggest that *desaturase and elongase enzymatic activities* in the n-3 and n-6 series (which are rate limiting for those biosynthetic pathways) *are constitutively low in long-lived animals*. In some cases decreases in peroxisomal beta-oxidation could also be involved. It is now considered that this last process is responsible for the last steps in the synthesis of the highly unsaturated 22:6n-3 in the n-3 pathway. The low delta-5 and delta-6 desaturase activities (which are rate limiting enzymes in the n-3 and n-6 fatty acid synthesis pathways) of long-lived animals will decrease the conversion of the less unsaturated 18:2n-6 and 18:3n-3 diet-derived precursors to the highly unsaturated 20:4n-6 and 22:6n-3 products. Thus, 18:2n-6 and 18:3n-3 would accumulate and 20:4n-6 and 22:6n-3 will diminish, which is just the general kind of fatty acid profile observed in long-lived animals.

In summary, the membrane fatty acid unsaturation degree is low in tissues of long-lived animals. *This is the only other known factor, in addition to mitROSp, which correlates with longevity in the right sense*. Importantly, this is true concerning the MFRTA as well as any other theory of aging. And the degree of fatty acid unsaturation suggests a plausible mechanism to contribute to the widely different aging rates of the different animal species. And what is the situation concerning experiments inducing increases in longevity in single mammalian species?

5. DIETARY RESTRICTION

It is well established that standard (40 %) dietary

calorie restriction (DR) *increases not only mean but also maximum longevity* (up to 40 %) and *decreases and delays the incidence of degenerative diseases* in most animal species including rotifers, flies, spiders, worms, fish, laboratory rodents and many other mammals (40; Table 1). In a 20 years-long adult-onset study in rhesus monkeys 30 % DR strongly decreased age-related mortality (from 37 % to 13 %), the incidence of many age-related diseases including diabetes, cancer, cardiovascular disease, and brain atrophy (41). Many effects of DR have been discovered involving lowered GH and insulin/IGF-1-like signalling, modifications in nutrition and amino acid-sensing pathways, changes in sirtuins (42), apoptosis, and signalling proteins and transcription factors like mTOR, S6K, AKT, PKA, or FOXO and tissue-specific changes in gene expression profiles. Many of these changes and others are interrelated and seem to be part of an integrated cellular aging regulation system (see section 9) which includes mitochondria oxidative stress-related damage, and sensitivity to lipid peroxidation, as two of its main aging effectors (42).

In the previous sections it was described that long-lived animals have lower rates of mitROSp and lower mtDNA oxidative damage than short-lived ones (29). But what occurs in DR? If the MFRTA is correct also inside species, those two parameters should also decrease during DR. Initial studies, like in the case of the comparison between different species, focused mainly on antioxidants. They showed that DR in rodents does not lead to a generalized increase in antioxidants. Instead increases, decreases or lack of changes, depending on the particular antioxidant measured, have been reported even within the same study (43). Therefore, similarly to what happens in the inter-species comparative case, *the key to longevity again is not based on the antioxidants* levels during DR.

A different situation concerns mitochondrial ROS generation. The effect of DR on the rate of mitROSp was repeatedly investigated in mice, and especially in rats, by many different laboratories. The results of these investigations consistently agreed that long-term standard (40 %) DR, as well as short-term (e.g.: 7 weeks) DR, *significantly decrease the rate of mtROS generation* in rat organs including skeletal muscle, kidney, liver, heart and brain (44, Table 1). This agrees again with the concept that lowering mitROSp contributes to increase longevity. The decrease in mitROSp during DR was found in *freshly isolated functional mitochondria* exposed to similar incubation conditions, including the substrate concentration used to feed electrons to the ETC, in the *ad libitum* fed and DR groups. Thus, *DR mitochondria are different* from those obtained from *ad libitum* fed animals, and this difference (due to DR) is responsible for the lowered mitROSp detected *in vitro*. In addition, classic data suggest that complex I substrates like pyruvate decrease during DR in tissues (45), which has been recently confirmed by full metabolome analysis (46). The decrease in pyruvate and other mitochondrial substrates would decrease the *in vivo* matrix NADH level in DR thus

lowering electron feeding of complex I by NADH. This would in turn decrease the degree of electronic reduction of the complex I ROS generator, and then its rate of oxygen radical production. Indeed, DR also decreases the NADH concentration (45, 46), a change that is known to strongly decrease the rate of mitROSp (16). This will lead to a *further decrease* in the rate of mitROSp *in vivo* which would add to that due to the lowered capacity of DR mitochondria to generate ROS detected *in vitro*.

Interestingly, *the decrease in mitROSp in DR rats specifically occurred at complex I* in all the organs studied (47-49). Thus, *a low rate of mitROSp at complex I is a trait both of long-lived species and of DR mammals*. A recent study showed that a single nucleotide mutation in complex I suppresses mouse fibroblast aging (50), and inhibition of this complex by the antihyperglycemic and proposed antiaging modulators biguanides lowers its rate of mitROSp (51). Many studies have shown that mitochondrial functionality and even morphology is detrimentally altered in tissues of old animals (52). Recently, proteomic analysis of 57 out of the 96 known mouse ETC proteins (and 67 % of complex I proteins), showed that *low abundance of the "matrix domain-only" of complex I*, independent from the rest of the complex, *lowers mitROSp* and is related to increased longevity both in DR and in longer-lived mouse strains, while it increases during mouse aging (53). That is highly interesting since we and others have located the ROS generator relevant for aging precisely inside that *matrix domain of complex I*, and likely corresponds to one of the *FeS clusters* of that domain (15,18,47).

Dietary restriction, in addition to lowering mitROSp, also decreases the FRL (Table 1). This indicates that the efficiency of the mitochondrial respiratory chain in avoiding ROS generation increases in DR animals. Birds (pigeons, canaries and parakeets, Refs. 12,17), which are especially long-lived homeothermic animals for their body size and metabolic rate, also show lower FRL values than the much shorter-lived rats or mice. This suggests that *a low FRL* can be a conserved mechanism of life span extension both *between and within species* that can be obtained without the need to decrease mitochondrial oxygen consumption. That is relevant when it is necessary to increase longevity without decreasing the general level of animal activity and thus competitiveness in the ecological niche. A decrease in FRL can be obtained through qualitative changes in the *redox mid point potential* of the complex I ROS generator related to aging. This would lead to a decrease in the degree of electronic reduction of that generator and thus in complex I mitROSp without decreasing electron flow in the ETC and thus mitochondrial oxygen consumption. *Both a low mitROSp and a low FRL at complex I* have been reported repeatedly at my laboratory in many different investigations in long-lived animals (11,12,14,17,18,29,47; Table 1). Interestingly, a recent extensive proteomic analysis of the full ETC in mice showed that partial assembly of the *"matrix domain-only" of complex I* also occurs during *ad*

libitum (in addition to the whole complex I protein), but to a much lower extent during DR (53). That can help to explain both the decrease in mitROSp and the decrease in FRL at complex I in DR. Moreover *rapamycin*, the only drug known that consistently increases mouse longevity (see section 7), *also lowers mitROSp and FRL at complex I and decreases the amount of its "matrix domain-only"* in the mitochondria of mouse liver (53; Table 1). It is that matrix domain which seems to contain the subunits responsible for the decrease in mitROSp at complex I related to species longevity (15,16,18,29) and decreased both by DR (44,47) and rapamycin treatment (see below).

During *ad libitum* feeding the *extra copies* of the "matrix domain-only" complex I would take electrons from NADH but could not pass them to ubiquinone and the following complexes of the ETC. This would strongly fill up that domain with electrons and would thus strongly reduce with electrons the complex I ROS generator/s. This would increase mitROSp at this "matrix domain-only" complex. The result would be a strong increase in mitROSp without any ATP generation, because electrons in matrix domain only complex I can not reach the other separated complexes. In this way the AL animal would have a high FRL because it has both complete complex I copies, plus "matrix domain-only" complex I copies that *increase mitROSp but not oxygen consumption or ETC electron flow*. In contrast, the DR and the rapamycin-treated animals have complete fully assembled complex I copies and reduced abundance (20-50 % decrease) of "matrix domain-only" complex I copies. The DR mice would thus exhibit decreases in mitROSp *without decreases in mitochondrial oxygen consumption (lower FRL)* with a normal ATP production. Therefore, a *quantitative* decrease in the amount of the "matrix domain-only" of Complex I can lead to a *qualitative* change (decreased FRL) in DR and rapamycin-treated rodents. Lowering of the mid point redox potential of the complex I ROS generator would be another (*qualitative* in this case) mechanism than can also contribute to decrease mitROSp in long-lived animals (14,17,18,29,47).

In contrast to mitROSp, which is low both in long-lived species and in DR rodents, a low DBI occurs in long-lived species (see the previous section) and in 80 % methionine restricted (MetR) rats, but not in 40 % MetR (see section 6) or 40 % DR rats. Therefore a low DBI, like a low mitROSp, can contribute to decrease aging rate during evolution of long-lived animal species. But, in a single species, the membrane needs to decrease its sensitivity to oxidative damage by lowering fatty acid unsaturation only when the level of protein restriction in the available food is very strong, whereas the decrease in mitROSp is a response already recruited at milder (40 %) levels of DR. This makes sense, in principle, since dietary protein availability is essential for growing of the offspring. At 80 % MetR there is not enough protein for adequate growing, and the competitiveness of the offspring in the wild would be very low. Therefore it is even more important than in 40 % DR to post-pone aging to

reproduce only afterwards, when the levels of protein availability increase again in the ecological niche. That is why, at 80 % protein (methionine) restriction both a low mitROSp and a low DBI response are recruited. In relation to this, recent comparison among DR diets containing fish oil, soybean oil or lard as lipid source, showed that the lard containing diet (with less unsaturated fatty acids) was the one maximizing the beneficial effects of DR on mitROSp, proton leak, ETC, lipid peroxidation, mitochondrial structure or mitochondrial apoptotic signaling, likely due in part to increases in *monounsaturated fatty acid* content in the tissues (54). This improvement in mitochondrial functionality of diets promoting some decrease in tissue

DBI is consistent again with a *healthy and pro-longevity effect of membranes containing a low number of fatty acid double bonds*.

Finally, since mitROSp is lower in DR than in the *ad libitum*-fed control animals, oxidative damage should also be lower in the nearby, or even in *contact* situated, mtDNA of the restricted animals. In agreement with this, it was found that the level of *8-oxodG in mtDNA was significantly lower* in the liver, heart and brain of the *long-term DR* rats in which mitochondrial ROS production was also diminished (reviewed in 55). Depending on the organ studied, such decrease in 8-oxodG occurred only in mtDNA, or both in mtDNA and nDNA (Table 1).

TABLE 1. Summary of changes on free radical related parameters induced by all manipulations known that consistently increase or not longevity in mammals laboratory rodents

Experimental manipulation Longevity (MLSP)	mtROSp	mtVO ₂	FRL	8oxodG	8oxodG	mtDNAFragments	
	(at CxI)			(at CxI)	in mtDNA	in nDNA	inside nDNA
DR	↓	↔	↓	↓	↔	nd	↑
PR	↓	↔	↓	↓	↔	nd	↑
LR	↔	↔	↔	↔	↔	nd	↔
CHR	↔	↔	↔	↔	↔	nd	↔
MetR	↓	↔	↓	↓	↔	nd	↑
Rapamycin	↓	↔	↓	↓(ns)	nd	↓	↑

DR= dietary restriction; PR = Protein restriction; LR = lipid restriction; CHR = Carbohydrate restriction; MetR = methioninerestriction; Rapamycin (14mg/kg diet). The effects of DR,PR, and MetR on oxidative stress related parameters were obtained at a level of 40% restriction, and also at 80% MetR. The effect of MetR on longevity has been studied always restricting methionine by 80% in the diet (56,57,59). The rapamycin effect of mitochondrial oxidative stress was studied on B6D2F1 mice (139); the rest of the experiments were performed on Wistar rats. While DR, PR and MetR decreased mitROSp and 8-oxodG in mtDNA in all the vital organs studied (liver, heart and brain), rapamycin (at 14mg/Kg diet) did it in liver but not in heart of mice; mtDNA fragments inside nDNA were studied in the liver. For other Refs. see text. mtVO₂ = mitochondrial oxygen consumption; FRL = % free radical leak from CxI of functional mitochondria; nDNA = nuclear DNA; MLSP = maximum life span potential. DR, PR, MetR and rapamycin all increase *both* mean lifespan, and *maximum* longevity (up to 40% in DR, by 20% in PR and DR, and by 11% with rapamycin) in rats and mice.

6. PROTEIN AND METHIONINE RESTRICTION

6.1. Effect on longevity

It has been generally agreed for a long time that calorie intake *per se* would be exclusively responsible for the increase in lifespan induced by DR in rodents. However, now many studies question this classical consensus. The results of many investigations indicate that *part* of the life-extending effects on DR are due to the decreased intake of particular components of the diet, such as *proteins*, and more specifically the amino acid *methionine* (56-60). The few available studies do not support the possibility that either life-long isocaloric carbohydrate or lipid restriction increase rodent life span. Two investigations of carbohydrate restriction or supplementation reported opposite and minor changes in rat longevity (61, 62), and it was found that the longevity of Fisher 344 rats does not change after life-long lipid restriction (63). In contrast, the large majority of the investigations on the effects of *isocaloric protein restriction* (PR) in rats and mice found

increases in longevity (Table 1). Ten out of eleven protein restriction (PR) investigations in rats or mice (16 out of 18 different life-long survival experiments) reported increases in longevity (58), although the mean magnitude of this increase (around 19 %) was lower than that usually found in 40 % DR (up to 40 % increase). Thus, PR would be responsible for around *half* of the life-extension effect of dietary restriction.

Among the different dietary amino acids, which is the one/s responsible for the increase in longevity induced by PR? It is consistently known that isocaloric 80 % methionine restriction (MetR) increases longevity in F344 rats (56) and mice (57-59; Table 1) to a similar extent than PR. The mean increase in (maximum) longevity in the three available MetR life-long experiments taken together was around 18 % increase. This occurred even when MetR was started as late as at 12 months of age in C6BF1 mice (59). Studies performed in *D. melanogaster* have also shown that casein restriction (64) and methionine restriction (65) extend longevity independently of the

caloric intake. Moreover, other recent studies link essential amino acids, and again especially methionine, with the positive effect of DR on longevity in yeast (66) and *D. melanogaster* (67). Interestingly, PR results in profound changes in methionine and serine metabolism (including lowering cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase activities) and increases the oxidation of fatty acids in rat liver (68).

In addition to extending lifespan, 80 % MetR also decreases disease-associated markers and the incidence of age-related degenerative diseases (69, 70). The beneficial effects of this intervention in rodents include decreases in serum glucose, insulin, IGF-1, cholesterol, triglycerides and leptin. Besides, MetR protects against age-related changes in immunity, slows cataract development (57), improves colon tight junction barrier function (71) and improves metabolic flexibility, increasing respiratory uncoupling (72). MetR may be also used in the future to inhibit tumor growth, particularly in many cancers that exhibit the known phenomenon of “*methionine dependence*”. These include bladder, breast, colon, glioma, kidney, melanoma, prostate and other cancers in which tumor cells have a much greater reliance on methionine than normal cells do (73). They need this amino acid for survival and proliferation and their growth seems seriously limited or inhibited in the absence of methionine (74, 75).

MetR (80 %) also decreases total adipose tissue mass and lowers visceral fat by 70 % (by more than 40 % after correcting for the decrease in body mass) in association with an improvement in insulin sensitivity (76). In addition, MetR decreases leptin and increases adiponectin in rodents in agreement with the decrease in visceral adiposity and the size of white adipose tissue depots. These beneficial effects seem to be mediated by tissue-specific responses that favor increased mitochondrial function and biogenesis, fatty acid oxidation and total energy expenditure possibly mediated by β -adrenergic receptor signaling and changes in lipid homeostasis (77). Metabolomics and genomic MetR studies found changes in the expression of a large number of genes and proteins that led the authors to conclude that MetR increases lipid metabolism in adipose tissue and muscle whereas it decreases lipid synthesis in the liver (78). These changes in lipid metabolism seem to be involved in the strong decrease in adiposity and increased insulin sensitivity observed in *isocaloric* restriction of dietary methionine.

Altered levels of sulfur-containing amino acids have been also described in MetR: serum levels of methionine, cysteine, cystathionine, and taurine decrease in MetR rats, whereas homocysteine levels (79) and glutathione (56) increase. Interestingly, adding cysteine to the MetR diet reverses most of the studied beneficial changes on adiposity and insulin resistance (79) and increases the transcription of various genes associated with inflammation and carcinogenesis (78). Therefore, the beneficial changes of the MetR diet have been attributed to the *decrease of cysteine* in serum (80) or liver (78) observed in animals subjected to MetR.

On the other hand, excessive intake of dietary methionine is toxic. This toxicity far exceeds that produced by any other amino acid (81), leading to damage in some vital organs and increases in tissue oxidative stress (81, 82) with similar negative effects to those observed in rats fed diets with a high protein content. Chronic and excessive methionine supplementation increases plasma hydroperoxides and LDL-cholesterol (83), induces vascular (84) and kidney damage with tubular hypertrophy (85), raises iron accumulation and lipid peroxidation, and leads to liver dysfunction (86), besides other alterations in other organs. In addition, methionine supplementation increases methionine and its two more nearly derived methionine cycle metabolites, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat liver and kidney (87). Some of the harmful effects of methionine supplementation have been attributed to methionine-related metabolites like *S-adenosylmethionine*, *S-adenosylhomocysteine*, or *homocysteine*, rather than to methionine itself, although in other investigations a direct *methionine toxic effect* has been suggested (80, 84). This last case fits well with the observation that *direct addition of methionine to isolated mitochondria in vitro increases their rate of mitROSp* in liver and kidney mitochondria (87).

Oxidation of methionine residues in proteins generates *methionine sulfoxide*, depriving them of their function as methyl donors and may lead to loss of their biological activity (88). This modification can be repaired by methionine sulfoxide reductase in a thioredoxin-dependent reaction. In this context it is interesting that over-expression of *methionine sulfoxide reductase* increases lifespan in *D. melanogaster* (89) and the opposite manipulation, knocking out the same enzyme, increases protein carbonyls and decreases longevity (90). There is evidence that this enzyme plays an important role in protection against oxidative, cold, and heat stress and seems to be involved in the regulation of aging in *D. melanogaster* (91). Also in agreement with a methionine role in aging, it has been reported that *long-lived Ames dwarf mice have an altered methionine metabolism* showing a marked increase in the transsulfuration pathway compared to their wild-type siblings (92). All the above results point to *methionine as the single dietary factor* responsible for part of the *longevity extension* effect of dietary restriction.

6.2. Role of mtROS generation and oxidative damage

DR decreases oxidative stress in mitochondria. But, what is the specific dietary component responsible for the decreases in mtROS production and oxidative damage to mtDNA during DR? In agreement with their lack of effect on longevity (61-63), neither *isocaloric* 40 % lipid restriction (93) nor *isocaloric* 40 % carbohydrate restriction (94) change mitROSp or 8-oxodG in mtDNA (Table 1). However, *isocaloric* 40 % PR during 7 weeks *decreases mitROSp and oxidative damage to mtDNA* in rat liver (95) in a strikingly similar way, quantitatively and qualitatively to 40 % DR (Table 1). The effect of PR was

studied in rat liver without changing the amount eaten per day of the other dietary components and it was found, like in 40 % DR, that 40 % PR decreases liver mitROSp and FRL specifically at complex I, lowers 8-oxodG in mtDNA (95, Table 1), and decreases five specific markers of protein oxidative, glycoxidative and lipoxidative modification as well as the amount of complex I protein in rat liver mitochondria and tissue (96). Strikingly, the direction of change, the magnitude, mechanisms, and site of action exerted by PR on mitROSp and 8-oxodG in mtDNA are almost identical to those found in 40 % DR (58). Taken together, those studies suggest that proteins are the dietary components responsible for most or all the decrease in mitROSp and oxidative damage to mtDNA that takes place in DR, as well as for part of the increase in longevity induced by this dietary intervention.

It was logical to suspect that dietary methionine could be involved in those PR and DR effects since it was already known that MetR, independently of energy restriction, increases rat (maximum) longevity (56) while such effect had not been described for any of the other dietary amino acids. This is why the effects of MetR on mitROSp and oxidative stress were studied at my laboratory (Table 1). The results showed that isocaloric MetR (40 % and 80 %), applied to young rats during 7 weeks, lowers mitROSp (mainly at complex I), the FRL, the complex I content, 8-oxodG in mtDNA (Table 1), and specific markers of protein oxidative, glycoxidative and lipoxidative modification in rat heart (at 40 % and 80 %MetR; 97, 98) or liver (at 40 % MetR; 99, 100) mitochondria, similarly to what occurs after 7 weeks of 40 % MetR in rat kidney and brain mitochondria (101, 102). In order to obtain these decreases it was enough to restrict methionine by 40 % (Table 1). Those decreases in mitochondrial ROSp (at complex I) and oxidative stress have recently been reproduced in liver mitochondria of pigs subjected to MetR (103). 80 % MetR led to similar decreases in 8-oxodG than in 40 % MetR, while the decrease in mitROSp from controls to 40 % MetR rats was more pronounced than that occurring from 40 % MetR to 80 %MetR.

Most importantly, and consistently with an important role of methionine in the DR beneficial effects, when all the dietary amino acids -except methionine- were restricted (also by 40 %) during 7 weeks, neither the rate of mitROSp nor the level of 8-oxodG in mtDNA were modified (104). In addition, it was found that 40 %MetR also decreases mitROSp, FRL and 8-oxodG in mtDNA and reverses aging-related increases in protein modification when implemented during only 7 weeks in 24 months old rats (99). All those results, taken together, indicate that the lowered ingestion of methionine during MetR (and PR and DR) is responsible for all or most of the decreases in mitROSp and oxidative stress observed during these three longevity extending manipulations. Such lowered methionine ingestion is most likely also responsible for all (during PR and MetR) or part (during DR) of the life-extension effects observed during these

dietary manipulations. This extraordinary capacity of a single dietary molecule to induce the decrease in mitROSp is still present when the animals reach old age.

Various mechanisms can be responsible for the decrease in mtROSp during MetR. A most simple one would be based on a decrease in the content of the complex I protein in MetR that would directly lead to a decreased rate of mitROSp. This has been reported under 40 % MetR in the majority of tissues studied (Table 1), and also during DR and PR, as well as in long-lived birds (pigeons, canaries and parakeets) compared to the much short-lived mammals (rats and mice) of similar body size and weight-specific metabolic rate (105, 106). But, in principle, this would not be the full explanation because MetR also induces qualitative changes in mitochondria because it also decreases FRL. Such decrease could be due to a decrease in the mid point potential -and thus the degree of electronic reduction- of the complex I ROS generator, because the decrease in mitROSp during MetR is observed, like in DR, with partial complex I electronic reduction (with complex I-linked substrates alone) but not with full reduction (complex I-linked substrates plus rotenone). The result is that MetR mitochondria (from both young and old animals) are more efficient in avoiding mtROS generation that those of ad libitum fed rats. MetR mitochondria leak less radicals per unit of electron flow in the respiratory chain, similarly to what has been found in especially long-lived compared to short-lived animal species (birds), as well as in DR and PR rats compared to ad libitum fed ones (55). These quantitative and qualitative changes could be due to: i) direct interaction of methionine, or more likely, of a more chemically reactive methionine metabolite, with the matrix domain complex I polypeptide/s involved in ROS generation; ii) changes in cellular signaling molecules and the ensuing modification of specific gene expression of mitochondrial proteins; iii) decreases in the concentration of mitochondrial complex I substrates like pyruvate which would decrease matrix NADH and are known to occur at least during DR (see section 5).

Concerning the possible direct interaction of methionine or its metabolites with mitochondria without the information passing through the nucleus (mechanism "i"), it is known that direct in vitro addition of methionine to isolated functional rat mitochondria increases their rates of mitROSp (87). Therefore a rather direct and rapid effect of methionine on complex I seems to occur. A methionine metabolite could be responsible for this effect because in methionine, differing from homocysteine or cysteine, the potentially reactive sulfur is located inside the molecule and is therefore not available for direct covalent chemical reaction with protein thiols. Interestingly, the reaction of methionine with hydroxyl radicals generates methionine radical carbon-, nitrogen- and sulfur-centered radicals as intermediates in the formation of the methanethiol product, as detected by EPR spin trap techniques and GC-FID and GC-MS techniques (107). These radicals or methanethiol (CH₃SH) itself could react with complex I or some of its

subunits leading to increases in mtROS generation. Since it is known that GSSG thiolization of isolated complex I increases its rate of ROS production (108) a similar reaction of methanethiol, or cysteine (which also has a free thiol group available for direct reaction) with complex I thiol groups could be involved in the decrease in mitROSp in MetR. Methionine restriction decreases hepatic methionine and cysteine (78) and likely methanethiol levels, which can decrease thiolization of complex I subunits and then their rates of mitROSp. Alternatively, *cysteine could also interact with the protein cysteines of some of the FeS clusters of the hydrophilic matrix domain of complex I*. Interestingly, those FeS clusters have been pointed out as the ROS generator relevant for aging (15,18,47). Their reaction with cysteine would lead to iron release or availability for reaction and then to ROS generation. Therefore, the lowered cysteine levels in MetR could also decrease mitROSp through this kind of mechanism.

Changes in gene expression can be also involved in the MetR effects (mechanism “ii”). MetR studies found

changes in the expression of a large number of genes and proteins involved in lipid metabolism (78). In addition, modifications of DNA methylation could be also involved (109, 110). Methionine is an essential amino acid with many key roles in mammalian metabolism including protein synthesis and function, as well as protein and DNA methylation (111). Since ageing seems to be associated with site-specific changes in DNA methylation (112-116), MetR diets could also extend longevity in rodents through modulation of DNA methylation patterns, specific changes in gene expression, and changes in translation rates, whose final effects could include decreases in mtROS generation and oxidative damage and increases in autophagy (see section 9). In agreement with that, we have recently detected that *MetR* induces a small but statistically significant decrease in global genomic DNA methylation in the heart of young immature rats (98), whereas when this manipulation was performed in old rats the decrease in this parameter was not statistically significant in the liver (99).

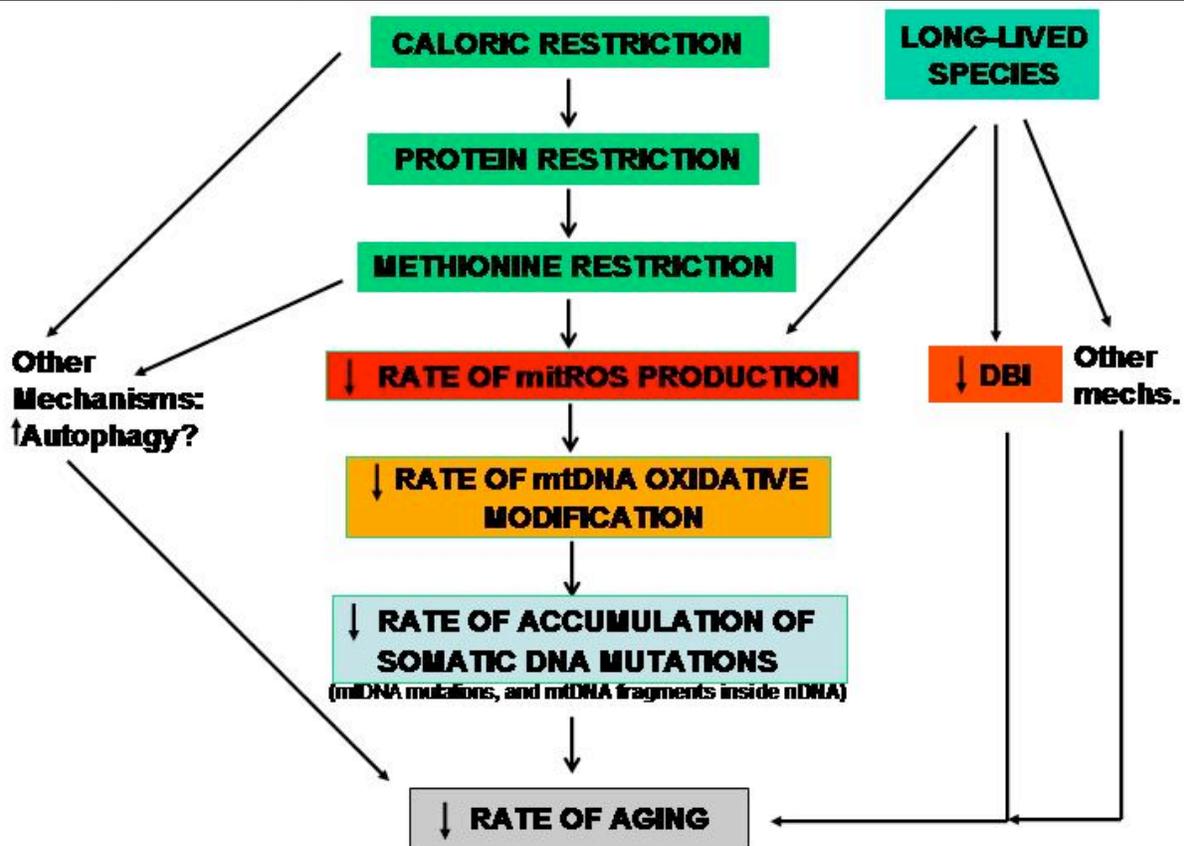


Figure 4. Low mitROSp in both long-lived species and in calorie dietary restriction (DR) as a contributor to a low aging rate. This low mitROSp decreases oxidative damage to mtDNA (see Figure 2). Oxidation of DNA bases like 8-oxodG are repaired also in mitochondria, 8-oxodG being useful as steady-state marker of rate of mtDNA oxidative modification (which is also lower in long-lived animals, see Figure 1C and Ref. 20). The final forms of damage responsible for aging (here represented as "somatic DNA mutations" should be due to mitROSp also causing DNA strand breaks leading to large *mtDNA deletions* plus the remaining *mtDNA fragments* which insert into *nuclear DNA* and accumulate during aging (139; 147-149). The low mitROSp of long-lived animals during DR is due to restriction of a single amino acid, *methionine*, and not to the other amino acids or carbohydrates or fats present in the diet (29,93-95,97,104). Low fatty acid unsaturation (low double bond index= DBI) also occurs in long-lived animals but not in 40 % DR or 40 % MetR (methionine restriction). A decrease in DBI has been observed only at 80 % MetR (which also increases rodent longevity). Since the effect of protein restriction or MetR on longevity (ca. 20 %) is around half that of DR (up to 40 %), other mechanisms, in addition to a low mitROSp, must be involved in the decrease in aging rate induced by DR. A strong candidate is an increased autophagy (Figures 6 and

8, sections 7-9).

Concerning mechanism “iii”), decreased NADH, it is more likely in DR than in MetR, due to the decreased ingestion of a large number of metabolites in DR than in (isocaloric) MetR. Substrates like pyruvate, malate, and succinate, as well as NADH and the NADH/NAD⁺ ratio are indeed decreased in the tissues of rodents subjected to DR (45, 46). This will decrease matrix NADH and NADH/NAD⁺ ratio, and therefore the degree of electronic reduction of the complex I ROS generator and its rate of mitROSp (see section 5). Treatment with a precursor of the oxidized form of the coenzyme, NAD⁺, also rejuvenates the skeletal muscle, improves mitochondrial and stem cell function in aged mice, and increases their lifespan (117). This could be due to a decrease in complex I electronic reduction, or to a sirtuin-dependent effect.

In summary, *DR*, *PR* and *MetR* are nutritional interventions that *increase longevity* in rodents, although the magnitude of the longevity extension of MetR and PR is around 50 % that of DR. This lower -but significant- life extension effect in MetR than in DR would agree with the notion that various different *environmental signals target the cell* to modify its aging rate. Restriction of methionine intake can be responsible for part of the aging-delaying effects of DR by *decreasing mitROSp at complex I and oxidative damage to mtDNA* and macromolecules acting, at least in this sense, as a “DR-mimic”. The information available strongly indicates that *methionine is the single dietary substance responsible for the beneficial changes of DR on mitochondrial oxidative stress*. The remaining effects of DR on aging rate could be due to decreases in other dietary components, or in the calories themselves, acting through different additional signaling mechanisms (Figure 4) that could recruit different gene clusters of the aging program in the cell nucleus (see section 9), changing their gene expression levels with different intensities (see section 9). Among those additional longevity-extending mechanisms during DR, *increased autophagy* is emerging as most important. In any case, it is interesting that not only 80 % MetR, but also 40 % MetR and 40 % PR decrease mitochondrial oxidative stress, because PR does not involve the stronger behavioral and nutritional stress of caloric restriction and therefore seems a much more feasible option for wide application to human populations. *Negative effects* such as delays in puberty and *decreases in growth rate* and final body size are shared by (40 %) DR and 80 % MetR but *do not occur at 40 % MetR*. 40 % methionine restriction (implemented through PR) could be the best kind of dietary restriction for humans because it lowers mitROSp and 8-oxodG in mtDNA to a similar extent than 80 % MetR, *without decreasing at all* body and organ weight, growth rate, maturation, and likely final body size, at variance with what occurs in 80 % MetR and 40 % DR.

Humans can obtain health benefits consuming “prudent” diets based on the intake of vegetables containing proteins rich in essential amino acids but low in the sulphur-containing amino acids methionine and

cysteine (like pulses), or almost totally lacking methionine and cysteine (like many fruits and other vegetables), and avoiding the presently excessive intake of animal proteins and fats typical of western diets. The results already available after many years of PR intervention in humans seem to be positive for human health and of similar character than those found in MetR and DR rats (118). These studies also suggest that DR and PR can protect from obesity, mortality, and degenerative diseases including at least cardiovascular ones, diabetes and cancer, and can increase the human healthspan.

7. RAPAMYCIN, MITOCHONDRIAL OXIDATIVE STRESS, AND LONGEVITY

Although it is well known that DR increases longevity in many different animals including mammals, and seemingly also in monkeys (41), it is difficult to apply to large human populations due to subnutrition risks especially in children, very old people, individuals with limited cultural knowledge and education, and those with some chronic pathologies. Due to this, there is strong interest in developing *drugs than can increase longevity without the need to restrict the human diet* (119, 120). The USA National Institute of Aging Interventions Testing Program (ITP) evaluates the effects of different candidate molecules to be candidate antiaging drugs in mice (<http://www.nia.nih.gov/research/dab/interventions-testing-program-itp/compounds-testing>). These include known drugs, antidiabetics, antibiotics and others, like aspirin, resveratrol, simvastatin or metformin. While the rest of studied compounds have not shown reproducible positive effects on longevity (119), *rapamycin significantly increased both mean lifespan, as well as maximum lifespan* (at age of 90 % mortality, mean of the three sites) by 9 % in males and by 14 % in females in heterogeneous strains of mice (121). That experiment was reproduced under the NIA ITP at three different sites. Posterior studies have *confirmed those results* and have shown that dietary rapamycin extends lifespan when initiated in young (119) or middle aged mice (122), or in mixed age mice (123). Therefore, rapamycin is widely recognized as ***the first drug known that consistently increases longevity in mammals***. Rapamycin also increase longevity in yeast (124), *C. elegans* (125) and *Drosophila* (126) through *inhibition of the TOR protein complex*, equivalent to mTOR (mammalian target of rapamycin). This indicates that this longevity pathway is highly conserved in evolution. The mTOR complex also shows signs of rapid evolution in amniotes and signs of *positive selection* (127).

Although it is clear that rapamycin increases mammalian longevity, the final effector mechanisms involved were unknown, although decreases in mitochondrial damage, increases in autophagy, or modifications in cell growth/proliferation could be implicated. Rapamycin also inhibits the mTOR signaling pathway in mammals (128). Interestingly, the longevity extending nutritional intervention *DR also decreases*

mTOR function (129). This indicates the existence of overlapping mechanisms of action for rapamycin and DR. Rapamycin treatment decreases body weight and food intake in mice (130) but the increase in longevity induced by the drug is independent of the decrease in food intake *per se*. However, since the longevity extension effect of DR (up to 40 %) is much larger than that of rapamycin (around 11 %), *rapamycin controls only part of the final aging effector mechanisms increasing longevity during DR* or affects them with smaller intensity than DR, or does not affect similarly all mammalian organs. Most likely DR targets also other cytosolic pre-nuclear longevity signaling molecules (see section 9) different from *mTOR* that are not targeted by rapamycin. Alternatively, there is evidence that DR directly modifies some of the most likely effectors of aging like *mitROSp*, by-passing the nuclear aging program (section 9), e.g. by decreasing mitochondrial matrix NADH due to lower concentrations of complex I-linked substrates like pyruvate (see sections 5 and 6).

In addition to increasing longevity, there is a general consensus that rapamycin *attenuates age-associated declines* in some measures of cardiac, immune, muscular, and cognitive function (122, 131). The increase in longevity induced by rapamycin was initially unexpected, because rapamycin was used, together with other drugs, in post-transplant therapy (132). Strikingly, increases (instead of decreases) in various immune activities have been also observed at low rapamycin doses (129, 133). It is now known that *mTOR* inhibition in mammals has positive functional effects in the majority of the physiological systems (129, 131), and protection from degenerative

diseases, solid tumors, cardiovascular metabolic diseases and obesity have been observed even in humans. Rapamycin also prevented from degenerative brain changes in an Alzheimer disease mouse model and improved anxiety and depression in normal mice (134). Although some detrimental effects of the drug have been described, the positive effects are much more diverse and extensive. In any case *the global effect of rapamycin is positive since both mean and maximum longevity are increased*.

DR increases longevity and lowers *mitROSp*, FRL, and oxidative stress (29), as well as *mTOR* function (59). And *intermittent rapamycin administration*, like intermittent DR, also extends lifespan of female mice (135). Decreased *mTOR* downstream activity could constitute one of the various signaling mechanisms through which DR decreases aging rate (129, 136, 137). In agreement with this, knocking out the gene coding the ribosome protein kinase S6K (a main target of *mTOR* signaling) slowed aging of bone, immune, and motor functions, and led to a larger than normal longevity (138). In many cases the nuclear gene response to these signals (see section 9) slows the aging rate. Among them, the decrease in *mitROSp* produced by both DR and rapamycin can be important. In agreement with this concept, *rapamycin* dietary treatment, at the same dose that increased longevity (121), *decreased hepatic mitROSp (Figure 5A) and FRL at complex I* both in mice subjected to a diet that induced fatty liver (53) as well as in middle aged mice receiving standard (LabDiet 5LG6 w) diets (139; Table 1).

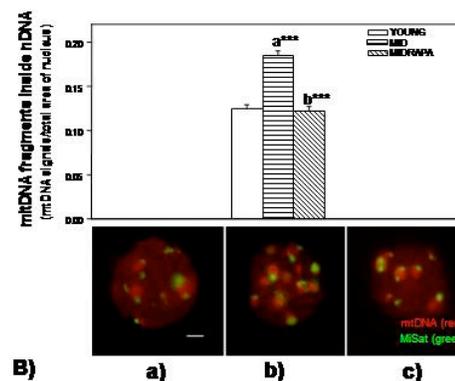
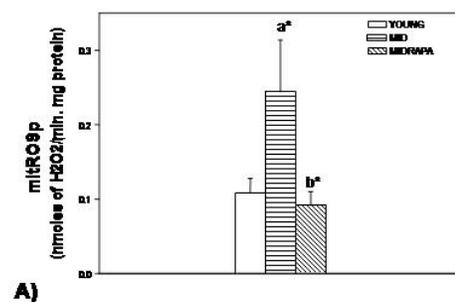


Figure 5. Rapamycin fully reverses the age-related increases in mitROSp and mtDNA fragments inside nuclear DNA. Rapamycin dietary treatment, at the same dose that increases mouse longevity (14 mg/Kg diet, Ref. 121), totally abolished the A) age-related increase in mitROSp, and B) the accumulation of mtDNA fragments inside nDNA in the liver of middle-aged mice (16 months of age). In part B the pictures show single representative hepatocyte nuclei corresponding to: a) YOUNG; b) MID; c) MIDRAPA; red signals come from mtDNA; green signals from minor satellite mouse centromeric sequence (MiSat) were used as controls; white bar is equal to 2 μ m. MID = Middle aged mice. MIDRAPA = middle aged mice treated with rapamycin during 7 weeks. a: significantly different from Young group; b: significantly different from Middle group; * P<0.05, *** P<0.001. The qualitative and quantitative similarity of the changes induced by rapamycin in both parameters suggest a cause-effect relationship between them. Modified from ref. 139.

Moreover, this drug *completely reversed age-related increases in mitROSp* (Figure 5A), and the age-related increase in the *insertion of mtDNA fragments inside nDNA*, in the liver of middle aged mice (139; Figure 5B; see also section 8). In the same investigation, it also *completely reversed age-related decreases in the autophagocytosis* marker ATG13 (Figure 6A), and *partially reversed* the accumulation of the best tissue marker of aging, *lipofuscin*, in the liver (Figure 6B). Rapamycin also increases mouse longevity when the treatment is started at middle age, with an effect similar to that observed starting at 9 months (119, 121), agreeing again with the decreases observed in mitROSp also in *middle aged* mice (139). All those results, taken together, are most remarkable since there is currently strong interest in finding drugs with positive effects on longevity in

middle aged humans.

In summary, it is most interesting that *all the (four) experimental manipulations* which consistently and reproducibly increase both mean and *maximum longevity* in mammals, **DR, PR, MetR and rapamycin, decrease mitROSp and FRL at complex I and mtDNA damage** (Table 1). This strongly supports the *antioxidant-independent version of MFRTA* exposed in this review that focuses on: *i) the rates of ROS production* (initiation) at mitochondria; and *ii) cellular components highly resistant* to (oxidative) modifications like less unsaturated membrane fatty acids (low DBI). These two traits of the updated MFRTA could be accompanied by a third related factor in long-lived animals, *iii) increased autophagy* (see section 9).

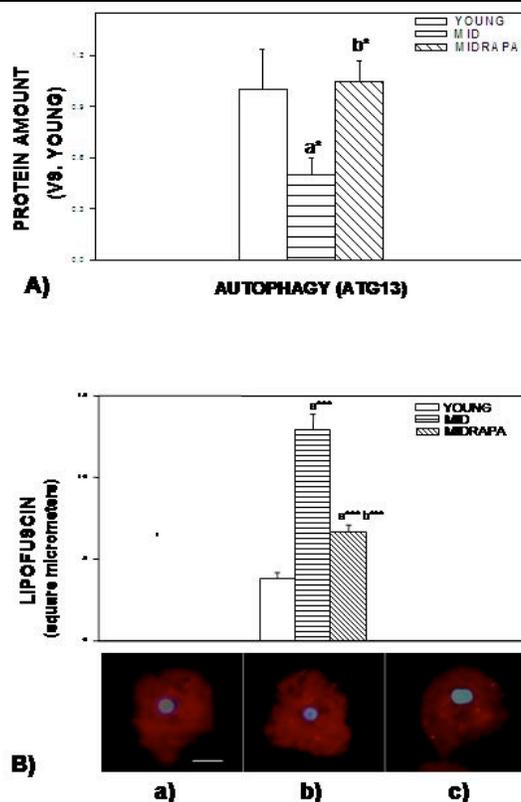


Figure 6. Rapamycin totally reverses the age-related decrease in autophagy and partially reverses the increase in lipofuscin accumulation. Rapamycin dietary treatment of middle aged mice (16 months of age), at the same dose that increases mouse longevity (14 mg/Kg diet, Ref. 121) totally abolished A) the age-related decrease in the autophagocytosis marker protein ATG13, and B) partially reversed the age-related accumulation of lipofuscin (B) in the liver of middle-aged mice (16 months of age). In part B the pictures show single representative hepatocytes corresponding to: a) YOUNG; b) MID; c) MIDRAPA; bright red signals come from lipofuscin; the nucleus is seen in blue colour; white bar is equal to 10 μ m. MID = Middle aged mice. MIDRAPA = middle aged mice treated with rapamycin during 7 weeks. a: significantly different from Young group; b: significantly different from Middle group; * P<0.05; *** P<0.001.

The inverse nature of the changes induced by rapamycin in both parameters suggest a cause-effect relationship between the increase in autophagy and the partial reversal of lipofuscin accumulation. Modified from ref. 139.

8. mtDNA FRAGMENTS INSIDE NUCLEAR DNA AND AGING

A further complication is the possibility that mitochondrial ROS-derived damage affects aging genes back in the nucleus through the *insertion of mtDNA fragments inside nDNA* (Figures 5B and 7).

Oxidative damage to mtDNA bases, like 8-oxodG, is also repaired in the mitochondria. But mitROS, in addition to DNA base and sugar oxidative modifications, have the capacity to produce double *strand breaks* in DNA in general, and with more reason in the very *nearby situated mtDNA*. Fragmentation of mtDNA through double strand breaks by the nearby generated mitROS can be one cause of the well known accumulation of mtDNA mutations, including large mtDNA deletions, with age (140). Recently, it has been proposed that mtDNA mutations can also be due to errors during DNA replication and repair, rather than to mitROS. However, while those random errors can contribute to accumulated damage during the

lifespan of a single individual, they can not be responsible for the strongly different longevity of the different species nor for the change in longevity induced by the different kinds of DRs, since these longevities are *genetically, instead of randomly*, controlled. In other words, *there is no plausible mechanisms that would lead rats to commit 30 fold more errors than humans during mtDNA replication or repair*. Replication and repair as source of mtDNA mutations suffers the same limitation that many other wrong proposals based on random processes (e.g. wear and tear theories of aging). Instead, the longevity of a species, or fine tuning of longevity to a new level in DR, is *determined by the genotype*. Then, it must necessarily be due to the existence of *genetically programmed processes* residing in the cell nucleus which can respond to environmental nutrient availability (during DRs) with appropriate changes in longevity (see section 9).

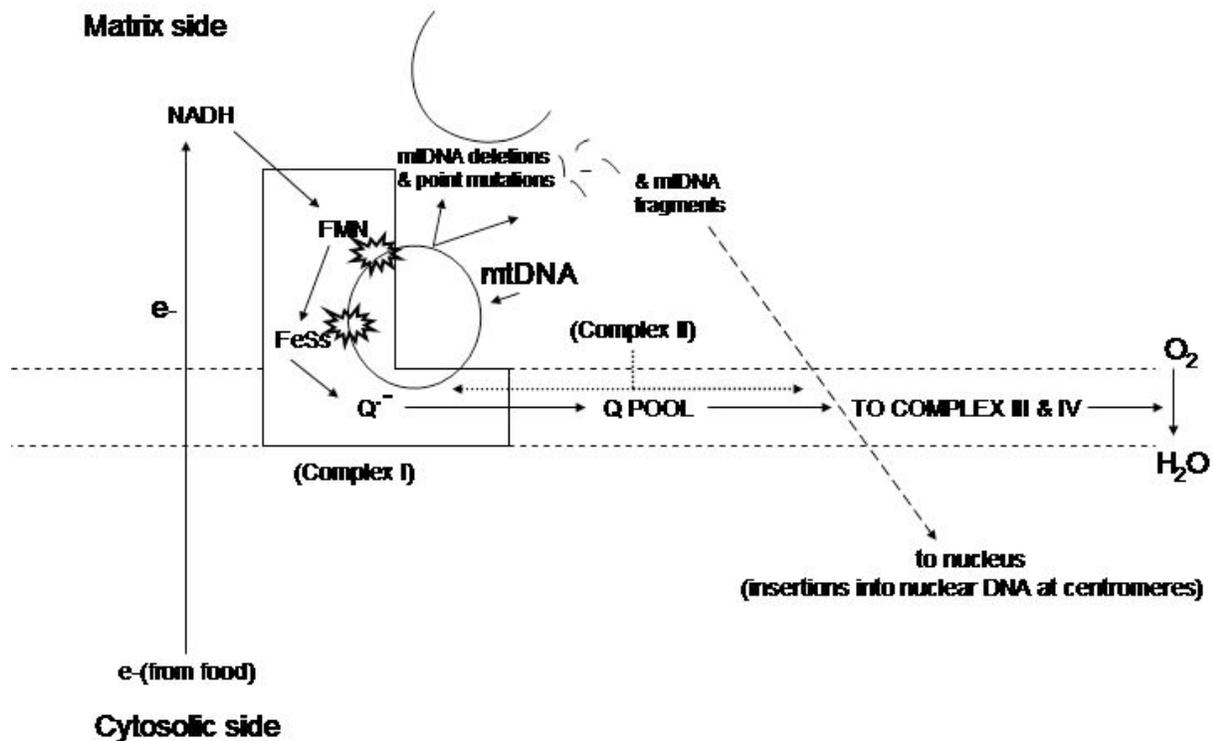


Figure 7 mtROS and mtDNA fragments inside nuclear DNA. mtROS produced at Cx I generators (stars) cause damage in the mtDNA situated nearby or even *in contact* with the complex I site of ROS production. This causes, in addition to oxidized bases, double strand breaks leading to large deletions and, most importantly, also mtDNA fragments. These exit the mitochondria and insert into nuclear DNA at the centromeres during aging in yeast, rats and mice, and contribute to aging. This is reminiscent of what happened during evolution after the symbiogenesis of the eukaryotic cell from α -proteobacteria and *Archea* around 2.000 million years ago. Rapamycin treatment decreases such mtDNA fragment accumulation in the liver of middle aged mice (Figure 5B; Refs. 139,143-149).

The occurrence of large mtDNA deletions, which increase with age in mammalian tissues, has been proposed as one final detrimental effect causing aging. Since mtDNA is highly compacted, without introns, the large deletions detected in old tissues would lead to the

lack of many genes coding for electron transport chain or mitochondrial ribosome subunits in a single mtDNA circle molecule. However it is now clear that, with the exception of a few tissues, the level of these deletions does not reach the threshold needed, in homoplasia, to be of negative

functional consequences in most tissues of old animals. The high level of heteroplasma of mtDNA, due to the presence of thousands of mitochondria per cell, and various mtDNA copies per mitochondrion, strongly protects against direct functional effects of mtDNA mutations. Many copies of mtDNA are present in each cell. Only if a large majority of these mtDNA copies are mutated, mitochondrial ATP production would be compromised. Cells essentially homoplasmic for deleted mtDNA are abundant (between 43 and 60 %) in a few areas like *substantia nigra* in humans (141, 142), but in the brain in general and in other vital tissues of old individuals their percentage is too low (0.5-2 %) to cause damage during aging.

However, *double strand breaks in mtDNA not only can generate mtDNA deletions. At the same time than they generate deletions, they produce mtDNA fragments*, the segments of deleted mtDNA. In agreement with earlier proposals (143,144) those fragments can escape from mitochondria (145, 146) and *are also present inside the nucleus* (Figures 5B and 7). It was proposed that this could randomly change nuclear gene information and thereby contribute to cause cancer and aging (143). It has been simultaneously demonstrated that these mtDNA fragments *accumulate inside nDNA with age both in yeast (147) and in rat liver and brain (148)*, and that such accumulation causes damage and *contributes to aging in yeast* (149). Mouse liver also accumulates mtDNA fragments inserted inside nDNA with age (139). And the dietary treatment with *rapamycin*, in addition to decreasing mitROSp, *totally reversed mtDNA fragments accumulation in nDNA (139; Figure 5A,B) and decreased lipofuscin* (materials non-autophagocytosed; Figure 6B) in middle-aged mice. This last change can be due to a decrease in the presence of damaged mitochondria, and/or to the *increase in autophagy* induced by the drug (139, Figure 6A). The changes observed for mitROSp and for mtDNA fragments inserted in nDNA are strikingly similar since *full(100 %) reversion of age related increases* occurred in both cases (Figure 5A,B). This could be due to a *cause-effect* relationship between these two parameters, since ROS have strong capacity to produce double strand breaks and then DNA fragmentation. The increase in autophagy and the decrease in lipofuscin could also represent a *cause-effect* relationship (Figure 6A,B) although in the case of lipofuscin reversion to young levels was only partial.

In summary, part of the *increase in longevity of rapamycin treated mice can be due to: (i) a decrease in mitROSp; (ii) a decrease in the insertion of mtDNA fragments inside nDNA; and (iii) an increase in autophagy*. Interestingly, in a parallel experiment we did not detect significant changes in mitROSp in the heart after the rapamycin treatment. Therefore, the reason why rapamycin increases life span to a much lower extent (11 % increase in maximum lifespan) than DR (up to 40 % increase) can be due to the impact of DR on more longevity signaling pathways than those involving mTOR (Figure 8). But it can also be due to the possibility that

rapamycin decreases mitROSp, or increases autophagy, in some but not in all organs at least at the dose used of 14 mg of rapamycin/Kg of diet (121, 139).

The decrease in mitROSp and FRL induced by rapamycin treatment in mouse liver occurred together with *decreases in the amount of complex I*, which contains the ROS generator relevant for aging (see previous sections). That was associated with an *increase* (instead of decrease) in *mitochondrial biogenesis* (139; PGC1 α). A possible explanation of this apparently paradoxical result is that *rapamycin could selectively induce mitochondrial biogenesis from the more youthful pool of liver mitochondria*. These are expected to show lowered FRL than the more damaged ones. That selection could be another reason why rapamycin decreased mitROSp. It has been observed that *rapamycin increases autophagy and mitochondrial biogenesis* in mouse heart suggesting that damaged mitochondria are replaced by newly synthesized ones to *rejuvenate mitochondrial homeostasis*. Likely related to this possibility, it has been observed that DR (which also inhibits mTOR) and *rapamycin* both lower mitROSp and FRL and *decrease the amount of the "matrix domain-only" of complex I* in the mitochondria of mouse liver (53). That matrix domain contains the mitROS generator responsible for the decrease in mitROSp during DR (15-18,47,53) and during rapamycin treatment (139).

The mtDNA fragments exit from the mitochondria towards the nucleus during the lifetime of the individual and they insert into nDNA. *They are visualized heavily concentrated at the centromeres* (Figure 5B, a-c 139). Thus, the *centromeres seem to be the "entry doors"* for the access of mtDNA fragments *into chromosomes*, perhaps to be distributed afterwards to other specific chromosome locations at regulatory regions of the master genes controlling the "Gene Clusters of Aging" (constituting the pro-aging program) likely lying in the cell nucleus (see section 9). The final result would be to promote aging and degenerative diseases including cancer. If that phenomenon finally were a regulated one, the initial proposal (143) would only be wrong concerning the suggested *randomness* of the process. Random insertion of mtDNA fragments inside nDNA, even if it were restricted to the structural genes (around 1 % of total nDNA) could cause cancer (e.g., inserting in, and randomly inactivating tumour suppressor genes) but not aging, because species longevity is a tightly regulated species-specific property. Further studies are needed to ascertain the random or regulated character of mtDNA fragments insertion into nDNA starting at the centromeres.

Migration of mtDNA fragments from mitochondria to nucleus is strongly reminiscent of what happened during millions of years of evolution after the symbiogenesis event that created the Eukaryotic cell around 2.000 million years ago. During such evolution most genes of the initially free living Rickettsia-like α -proteobacteria were transferred to what is now the nuclear genome of the eukaryotic cell. This would constitute a further example of the old observation that in various cases "ontogeny

recapitulates phylogeny” (e.g. presence of gills or tail in human embryo or foetus), in this case applied to programmed aging as a continuation of development.

The lack of increase to phenotypic threshold (minimum of around 60 %-80 % deleted) of mtDNA deletions due to the very high copy number of mtDNA in heteroplasma per cell was a strong problem for the validity of MFRTA, similarly to the main origin of mtDNA point mutations from replication/repair instead of from mitROS_p as deduced from the relative frequency of base transversions vs. transitions. However, now there is evidence that mtDNA fragments accumulate inside nDNA with age in yeast and mammals, and that this promotes aging (147). Furthermore, the longevity increasing drug rapamycin reverses such age-related accumulation in mouse liver strongly paralleling what happens for complex I mitROS_p (Figure 5A,B; Ref.139). All that means that **MFRTA can not be considered “dead” any more** except by those not aware of the recent breakthrough discoveries of mtDNA transfer from mitochondria to the nucleus during the lifetime of the individual. On the contrary MFRTA, like the *bird phoenix*, emerges again well alive and all pristine from its ashes. Perhaps the failure to detect mtDNA mutations relevant for aging has been due to looking at the wrong place. The ROS related to aging should be looked at mitochondria. However, what could be more important for aging would not be the (*remaining*) deleted mtDNA, but *what is lacking* at mtDNA after the deletion: *the mtDNA fragments*. The consequences likely relevant for aging, the

mtDNA fragments, have been found inserted into nDNA inside the nucleus. Therefore, **we should look both at the mitochondria and to the nucleus to understand aging**, as much as we should look at the mitochondria and at the nucleus to understand *the creation and further evolution of the eukaryotic cell*.

9. THE CELLULAR AGING REGULATION SYSTEM (CARS)

9.1. Signaling, the nuclear Aging Program, and aging Effectors

The integrated *Cellular Aging Regulation System*, for convenience called *CARS* here for the first time, is composed of three main parts (Figure 8):

- A) Cytoplasmic Pre-nuclear **Signaling** (mostly signaling proteins)
- B) The nuclear genetic Pro Aging Program (**PAP**) including the Gene Clusters of Aging (153); and
- C) Post-nuclear **Effectors** (executors) of Aging.

This CARS occurs *both in post-mitotic and in mitotic* tissue cells. Mitotic cells could harbour, in addition, other additional hypothetical aging effectors specific for such kinds of tissues, like *telomere shortening* or perhaps *apoptosis*, but these are not expected to be relevant in cells that do not divide. Especially, *if the cell does not divide, the telomeres would not shorten*. And the most important tissues for mammalian aging are those mainly composed of post-mitotic cells, skeletal muscle, heart and brain.

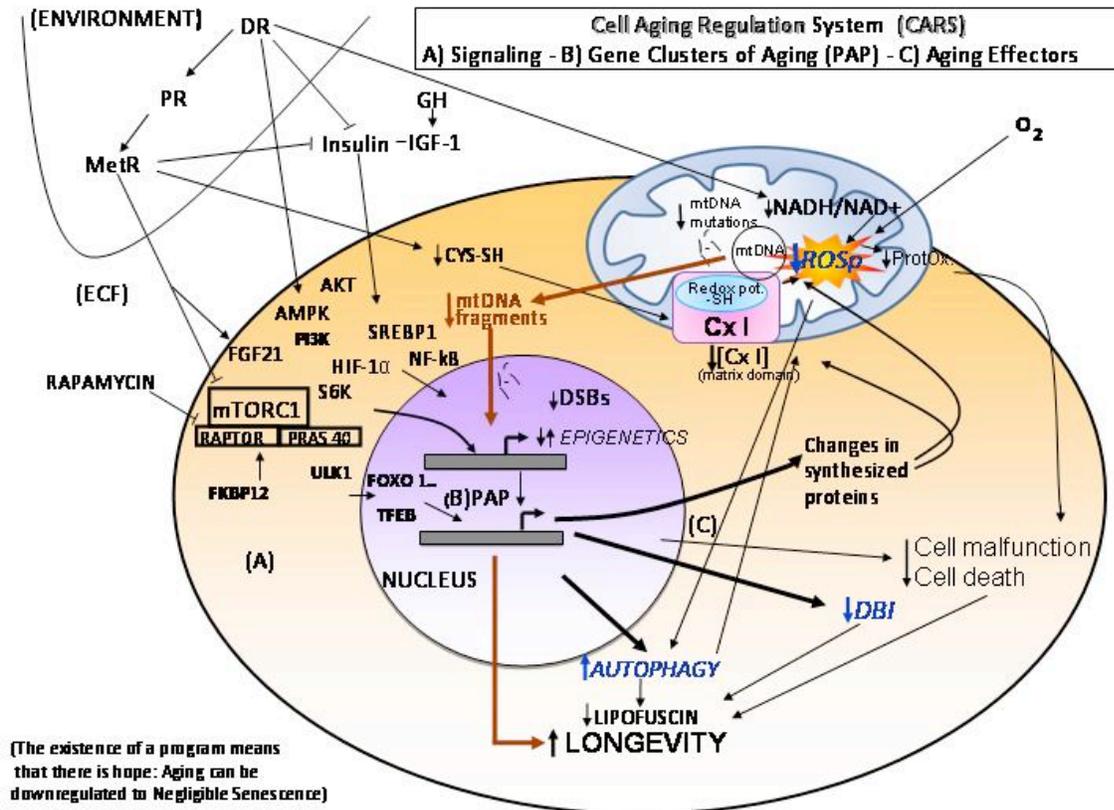


Figure 8. Cell Aging Regulation System (CARS). The working model of the CARS (including the *Pro Aging Program*-PAP lying inside the

nucleus) broadly depicts known mechanisms of control of longevity at cell level. Different kinds of dietary restrictions (DR, PR, MetR) and rapamycin (signals coming from the environment) alter humoral, endocrine, and finally cytosolic pre-PAP signaling proteins like mTOR, AMPK, and many others (part A, left of figure). In many cases this modifies the expression (through transcription factors like FOXOs, TEFB and others) of nuclear genes likely organized as Gene Clusters of Aging (153) of the PAP (part B center). PAP output (solid arrows leaving the nucleus on the right of the figure), in turn, modifies the activity of at least three *Aging Effectors* (shown in italics, Part C, right): a) *Mitochondria* (including mitROSp), b) fatty acid double bond index (*DBI*), and c) and likely *Autophagy*. The integrated responses of the aging effectors to the DRs and rapamycin, or to knocking out GH or IGF-1/insulin-like signaling genes increases longevity. *Across species* the same (plus additional) genes forming the PAP are constitutively active at different levels in species with different longevities. In some cases the signals can reach the mitochondria directly by-passing the nuclear PAP, as it is the case for MetR possibly lowering cysteine thiol groups at complex I (Ref. 159). The action of other possible effectors of aging like *telomere shortening* or *apoptosis* is likely limited to mitotic tissue cells and evidences for their validity are still lacking. mtDNA deletions, and mtDNA fragments inserted in the nucleus increase with age (139,147-49) and can contribute to aging (139,149). *Mitochondrial ROsp* (and updated MFRTA) are not alternative to the humoral (e.g. *insulin-IGF-1* like) or cytosolic proteins (e.g. mTOR or S6K) part of CARS and signaling to PAP. Instead, the three main kinds of cellular processes (A, B and C) work together integrated into a single CARS to control longevity in each species and to finely adjust changes in longevity in response to DRs or pro-longevity drugs like rapamycin. During 40% DR *lowered mitROSp and increased autophagy* execute the PAP response. At 80% (but not 40%) MetR, *decreasing the DBI* is also a recruited response. These *three aging effectors* can be involved in the change in longevity between species. Epigenetics can be also involved in changing the PAP gene expression level. DBI (double bond index) indicates the number of double bonds of membrane fatty acids (DBI). ECF = extracellular fluids; MFRTA= mitochondrial free radical theory of aging.

Intensive aging research during the present century, including studies with gene knockout and transgenic animals, has clarified a series of important facts concerning the CARS:

a) Inactivation of many single genes leads to an increase in mouse longevity (up to, ca., 40%). Most importantly, those genes are *highly conserved* in evolution which agrees with the concept that aging is an adaptation that increases biological fitness at group or higher level. Thus, aging constitutes a good example of an adaptation covered under the umbrella of the modern concept of Multilevel Selection. Many of those genes are the homologous in organisms so different as yeast, nematodes like *C. elegans*, insects like *Drosophila*, and many vertebrates including mammals and humans. Therefore, *aging is a very old adaptation* of most multicellular and even at least the unicellular eukaryotic life.

b) Although DR (and MetR) can control aging in part by *directly modifying* the aging effectors, they also bring about *changes in expression of a large number of nuclear genes* (78,150,151). The modified expression of those genes, in turn, modifies the *activity of the three known aging effectors* too.

c) The different kinds of DRs increase mouse longevity by modifying the *expression levels of hundreds of genes*, as shown by many microarray-based studies. Those changes are *species- and tissue-specific*. This, together with the increase in longevity after *inactivation of single genes* codifying for pre-nuclear hormones, their receptors, cytoplasmic signaling proteins or transcription factors (part A of the CARS), constitutes *robust evidence* that a *Pro-Aging Program (PAP)* exists in the cell nucleus.

d) DR and MetR *signal* the abundance of food or proteins available for feeding in the external world to the cell inside the body using humoral factors like insulin, GH/IGF-1, or blood amino acids like methionine. These in turn modify the activity of many cytoplasmic signaling proteins like mTOR, S6K, AMPK, AKT, PI3K, FGF21, ULK1, NFkB, HIF and many others. Many of those signals enter the nucleus, where, through the action of transcription factors like FOXOs or TFEB (152), modify

the expression of PAP genes involved in the control of longevity. These have been proposed to be organized in different but interrelated *Gene Clusters of Aging*, analogously to the Hox genes located in four clusters and involved in the control of development from embryo to adult (153).

e) Most long-lived *mouse mutants live up to 40% longer* than the wild type animals. This, most interestingly, *coincides with the amount of longevity extension elicited by DR* (also up to 40%). Many of those known genes mainly codify for proteins involved in GH/ or insulin/IGF-1-like Pre-nuclear Signaling, or cytoplasmic pre-PAP cytosolic signaling proteins, or nuclear transcription factors like FOXOs or TFEB.

f) The cytosolic signaling proteins work in many cases by modification of nuclear PAP activity. The induced changes in gene expression modify the levels of *specific proteins* corresponding to PAP output. The final result is the variation in activity level of the systems finally controlling the rate of aging, the cellular Post-nuclear *Aging Effectors*. Three of them have been already identified:

(i) The *Mitochondria*, and their rate of *mitROSp* at complex I

(ii) The degree of *Unsaturation of Cell Membrane Fatty Acids* (DBI); and

(iii) Likely, the *Macro-Autophagocytosis* (Autophagy) system.

These three main effectors are operative in aerobic vital tissues, both mitotic and post-mitotic. The action of other possible effectors like *telomere shortening* or *apoptosis* would be *restricted to mitotic cells*, of smaller relevance for aging. Therefore increased longevity, both during DRs and between different animal species, is obtained through *decreased mitROSp at complex I, and increased autophagy*. A *decrease in cell membrane DBI* is involved also in increasing longevity *across species*.

The first two aging effectors (mitROSp and DBI) were identified in the 1990's. With these two the key to long life is to *decrease the rate of generation of (oxidative) damage at mitochondria; and to have cellular membranes,*

including those of mitochondria, composed of fatty acid constituents *more resistant* (with less double bonds) to ROS induced damage. Now *autophagy is emerging* as a third possible aging effector. Macro-autophagy (154) can eliminate *heavily cross-linked, oxidized*, and aggregated mixtures of peroxidized lipids and proteins (155) and even sometimes whole heavily damaged mitochondria (156). Thus animals like us seem to age slowly at least because they "purposely" (in evolutionary sense) *produce less toxic substances (ROS)* per unit time, their *membrane fatty acids are more resistant* to them, and most of the *still remaining molecular damage is eliminated* by the macro-autophagocytosis machinery. This shows the strong interrelationship between the three aging effectors. The materials that can not be digested and eliminated by autophagy accumulate in the cytosol as *lipofuscin granules*, the *best known marker of aging* at tissue level.

Many different mutant mice with single autophagy genes knocked out have a decreased life span (reviewed in 154). However, we still *lack rigorous evidence that over-expression of macro-autophagy genes increases longevity*. The same problem affects DBI except for successful knocking out of desaturase/elongase genes that increased longevity in *C. elegans* nematodes. It is known, however, that *mitROSp* at complex I, consistently *decreases in all the four* known experimental manipulations that increase mammalian longevity: **DR, PR, MetR, and rapamycin feeding**. Some positive evidence suggesting that increasing autophagy increases longevity has been published, although it was limited to a *short-lived* mice strain in which overexpression of the essential autophagosomal protein ATG5 increased maximum lifespan from *only 781 to 900 days* (157). In contrast, in the first three experiments taken together in which rapamycin increased longevity the *control* mice of both sexes reached 1,086 days and the *rapamycin* treated ones reached *1,212 days of age at 90 % mortality* (121), a capacity surpassed by MetR and DR.

The husbandry conditions and the strain used clearly affect the longevity attained by the animals in aging experiments. Further aging experiments using longer lived control mice, approaching *1,000-1,200 days at least*, are needed to identify other drugs that could increase longevity. *It is necessary to use long-lived instead of short-lived strains as controls, and to implement husbandry conditions that maximize longevity* and produce more rectangular and smooth survival curves.

Another key requisite for acceptance of any theory of aging is that it must be able to explain why different animals age at so different rates. It is still *unknown whether autophagy is higher or not* in tissues of *long-lived* animals compared to those of short-lived ones. However, *telomere length is higher in mice than in men, the opposite of what is expected* if telomere shortening were another causal factor involved in aging. Consistent and reproducible evidence concerning these aspects is urgently needed before definitively considering macro-autophagy a third aging effector. In addition, when those comparative

studies are performed, care must be taken *not to correct the real values by body size* because this will erase most of the real causes of aging responsible for the correlations between the studied hypothetical mechanism of aging and longevity. If the authors of a study still doubt whether to correct or not correct for body size, the best option would be to *show* in the publications the correlations with longevity for *both the corrected and the non corrected values*. That is most important. Otherwise, the high potential of comparative gerontology to facilitate the cheap and fast possible identification or elimination of hypothetical causes of aging will be almost fully erased, which will be a too great loss for gerontology.

Although correlation does not imply causality, *the central parameters of any valid theory of aging must correlate with the longevity of different species in the right sense*. Thus, *mitROSp* is low in tissues of long-lived mammals and birds, which fully fits with the modern version of MFRTA. On the contrary, antioxidant enzymes also correlate with longevity but in the *wrong sense*: they are up to more than one order of magnitude lower (instead of higher) in long-lived than in short-lived mammals or vertebrates (7). The same is true for the repair of DNA damage of *endogenous* origin (reviewed in 29, section 3E1). Therefore, both defence (antioxidants) and DNA repair are discarded as causes of aging. *High "maintenance"* of the animal (leading to high longevity) is *not due to defence plus repair* contrarily to what the three mainstream evolutionary theories of aging (mutation accumulation, antagonist pleiotropy, and disposable soma theory) wrongly predicted. On the contrary *high maintenance is due to a low rate of generation of endogenous damage* (low *mitROSp* and low DBI) and, likely, also to a *high rate of elimination of damaged components* (high autophagy). *MitROSp* and autophagy are strongly complementary mechanisms, helped also by a third factor: *high resistance* of tissue cellular membranes to lipid peroxidation obtained through a low DBI and PI. In short, longevity is obtained through *a low rate of production of "damage" (mitROS), a high rate of cleaning their consequences (high autophagy), and a high constitutive resistance to oxidative modification (e.g., low DBI)*. The identification of the rate of *mitROSp* with the concept of "rate of generation of endogenous damage" comes from the fact that, *after more than one century* of intensive gerontological research, *ROS continue to be the only know highly damaging substances endogenously produced by the healthy animal organism throughout their lives that have the capacity to break covalent bonds*. If any other different family of substances having that property is discovered in the future, it could be tested to be added or not to the list of aging effectors. Meanwhile *mitROS* continue to be the only toxic highly damaging substances that the body "purposely" produces to cause and increase its aging rate.

The Pre-nuclear Signals, the PAP, and the Aging Effectors, are *integrated working together* to constitute the CARS. Therefore, *it is illogic to consider MFRTA*

incorrect while believing at the same time that proteins like mTOR, AMPK or S6K, et cetera, control longevity. Looking at Figure 8 it is evident that the *three parts of the CARS work together in a highly integrated manner to determine species longevity.*

On the other hand, it is logical to suspect that the same gene clusters of aging central to the PAP and reacting to the DRs or rapamycin, plus others additional ones, are also involved in the control of longevity *between different species*. It is already known that different genes can change their expression at different tissues in response to the different kinds of dietary restrictions (DR, PR, MetR, or IF-intermittent feeding) or pro-longevity drugs. These responses include both *quantitative and qualitative* changes concerning the genes involved in each case as well as their levels of gene expression. The same is expected between species with much bigger differences in longevity than in the DRs. *Between species, the same genes* involved in response to the DRs would be involved, plus *additional inter-species genes*. The degree of expression of the longevity genes involved is expected to vary more intensely in different species than in the DRs. Since the number of genes involved in the response to DR is already large (up to 1.000) in relation to the total structural genes (around 20.000 genes), it would be a prohibited luxury for evolution to use totally different genes to control aging rate in the case of the different species than in the DRs. Instead, the same genes would be used, plus additional inter-specific ones. One well known example is the case of oxidative stress. While both mitROSp and cell membrane DBI (global fatty acid unsaturation) varies between species, in the case of (40 %) DR and (40 %) MetR mitROSp at complex I is decreased while the DBI does not change (see section 5). However, at 80 % MetR, the DBI is also lowered (97). Thus, the implication of a given effector in a response depends on whether: a) the longevity difference occurs at the individual or at the species level; and b) the intensity of the signal reaching the PAP. In addition, there can be also inter-individual differences involved. Transcriptions factors like FOXO1 reacting to DR show polymorphisms in relation to differences in longevity in human populations (158).

Although a large part of the change in aging rate is controlled by the flow of information through the PAP in the nucleus, at least in the case of mitochondria part of the control can directly flow from the dietary substances and derived substrates to modify mitROSp bypassing the PAP. This occurs in DR, that decreases metabolites like pyruvate and others, which in turn lower matrix NADH and then mitROSp at complex I (Figure 8 top). Or the case of MetR, in which direct control of mitROSp by post-translational modification of complex I could occur. Reaction with complex I thiol cysteine groups could decrease the degree of electronic reduction of the complex I ROS generator - like the lowered NADH in DR- and then its rate of mitROSp (159). On the other hand, components of CARS are interrelated in more complex ways than

delineated in Figure 8. Thus, the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol lowers mitROSp, which is expected since it accelerates electron flow at ETC, like during the state 4 (without ADP) to state 3 (with ADP) energy transition. However, it also lowers mTOR activity and insulin-PI3K-MAPK signaling, and increases autophagy (160).

Another example is the recent description that lowering mitROSp decreases the amount of damaged mitochondria and the cellular level of lipofuscin (161), again relating two main cellular effectors of longevity of post-mitotic cells, mitochondria and autophagy. Mitochondria have been repeatedly observed half digested inside secondary lysosomes under the electron microscope, these vesicles contributing afterwards to form lipofuscin granules. Strikingly, many genes controlling autophagy are the same involved in the increase in longevity induced by lowering mitochondrial respiration (154).

9.2. Intermittent food restriction (IF): is the Aging Program functioning gradual or not?

It would be most interesting to know whether the PAP works in a *graded form* in response to DR or like an *ON-OFF switch*. The last possibility is supported by the fact that DR can also be performed by *intermittent fasting* (IF) instead of decreasing the calories or methionine eaten per day by the DR animals. It is known that IF rodents increase longevity even in strains that gorge the days that they receive food. In this last case, even though the total number of calories eaten is roughly the same in the IF animals and the controls, longevity still increases in IF. This apparently paradoxical result would be explained if the PAP genes react to DR (Figure 8), at least to a certain extent, in an ON-OFF fashion, instead of responding in strict proportion to the amount of calories eaten. If this were the case, when the animal eats a certain amount of food and a threshold of calories is reached, the PAP would increase its activity output (increase its aging effectors) from a low (called "OFF" for simplicity) to a higher ("ON") level, irrespective of the amount of calories eaten above the threshold. *The PAP will never be at zero activity* in mammals because a minimum activity (here called "OFF") is needed to give a PAP output that generates the mean rate of aging of each species. This "OFF" aging rate would be maintained when there is no food available. Shortly after eating, food is digested and absorbed and tissue PAP activity would jump in a *qualitative leap* to the "ON" higher output level. When the animal reaches the postprandial state and the substrates ingested have been fully metabolized, PAP activity will go back to the lower "OFF" resting level of aging effector (PAP output) activity.

Further research is sorely needed to clarify whether the PAP output is graded or "all-or-none", because this could have important implications concerning which is the *healthiest way of eating* to be recommended for human beings. If PAP works qualitatively (ON/OFF) rather than gradually, the classical recommendation of the last decade, eating 5 times per day, would not be the best. On the

contrary, putting all the food in a single early meal, or perhaps, in two big meals one at around 15:00 and the other at around 20:30, together with a very frugal breakfast -as it is typical in Mediterranean countries which are among the most long-lived worldwide- would be an adequate option. In this way, people would expend most of the day (19 hours) fasting (the PAP working in OFF position), and their PAP will be turned ON for a few hours only once or twice per day. If this were correct, the habitude of eating small amounts of food, so typical of some western countries, but with high frequency at almost every time during the day should be avoided. Food that strongly signals to PAP, like *simple carbohydrates* (sugar) or sweetened beverages generating high insulin peaks should be specially avoided, while *complex carbohydrates* that are slowly absorbed would lead to much lower insulin peaks. High amounts of *methionine*, an amino acid that specifically signals the PAP, could be prevented avoiding excessive consumption of meat and restricting the intake of total protein to around 0.6 g of protein/Kg of body weight per day (0.8 is the current RDA at USA and many other countries).

9.3. Epigenetics, aging and PAP

A further complication involves interactions within the cell nucleus functionally affecting the nuclear gene clusters of aging PAP genes. In addition to varying their expression in response to cytoplasmic, hormonal, and environmental signals, there can be nuclear feed-back among these genes due to epigenetic modifications (Figure 8). Epigenetic changes like DNA methylation, acetylation or phosphorylation and histone modifications seem to be important factors in aging. Epigenetic marks establish changes in gene expression in response to environmental stimuli (like the different DRs) and drugs (like rapamycin) and can be even part of the PAP itself (162). Some authors even support the existence of an "epigenetic clock" (163, 164). This would be essentially different from the "epigenetic drift" during aging which would correspond to stochastic changes that will be of small or not interest for the control of longevity (164). There is a decrease in global DNA methylation during aging, whereas there is an increase with aging in local methylation at CpG islands and specific promoters (164-166).

A recent analysis of human body epigenome has found widespread tissue-specific differential CG methylation, allele-specific methylation and transcription, and the unexpected presence of non-CG methylation in almost all human tissues which correlates with tissue-specific functions (167). Changes in specific histones have been also described during aging, including global increases in H4K20 trimethylation and H3S10 phosphorylation, and decreases in H3K9 and H3K27 trimethylation and H3K9 acetylation (168), which would contribute to modulate aging rate. Such DNA modifications modulate gene expression through *regulation of chromatin structure*, which is known to change during aging. Many age-dependent histone methylations are reversed by both DR and rapamycin treatments in mouse brain (169). Histone

deacetylases like SIRT1, and the mitochondria-specific SIRT3 are involved in the decrease in oxidative damage and antiaging effects induced by DR in mice (170). Interestingly, SIRT3 deacetylates various Complex I subunits (171) which could modulate the nearby placed sites of mitROSp. It is also of interest that epigenetics seems to influence two main effectors of PAP, the mitochondria (172-174) and the autophagy system (154).

10. CONCLUSIONS

1. Long-lived mammals and birds have species-specific low mitochondrial ROS generation rates at complex I, low levels of mtDNA oxidative damage, and low fatty acid unsaturation degrees in their cellular and mitochondrial membranes. After almost two decades of research, ***the rate of mitROSp and the fatty acid unsaturation*** of cellular membranes continue to be ***the only two known traits correlating with animal longevity in the right sense*** and offering a *plausible mechanism* to cause aging. This is true not only concerning MFRTA but also *all theories* of aging in general so far proposed. The close vicinity or even ***contact*** between the site of ROS generation and mtDNA avoids antioxidants to interfere with the ROS produced at the mitROS generator relevant for aging, which is *situated at complex I*. This is likely why antioxidants do not modify longevity. The ROS-dependent final forms of mtDNA damage most relevant for aging -mtDNA deletions, and mtDNA fragments inside nDNA- seem finely tuned and controlled by the rate of mitROS production of each animal species. This significantly contributes to determine the species-specific aging rate and longevity.

2. It is well known that *DR also decreases mitROSp and FRL at complex I and oxidative damage to mtDNA*. This is exclusively *due to the lower methionine intake (MetR)* of the animals subjected to DR. Around 50 % of the longevity extension effect of DR and PR is due to MetR, and seems to increase longevity in part through decreases in mitROSp at complex I; the other 50 % effect of DR on longevity would act through other mechanisms like, perhaps, increased macro-autophagy. *Rapamycin, the only known drug that consistently increases longevity in mammals also decreases mitROSp at complex I and FRL*, like all the different types of DRs. Interestingly, *all the four known experimental manipulations that have proven to increase mammalian longevity decrease mitROSp at complex I, FRL, and mtDNA damage* (either 8-oxodG in mtDNA, or mtDNA fragments insertion inside nDNA).

3. *The constantly produced mtROS throughout life at a different rate in each species* leads to the generation of oxidative damage in mtDNA (e.g. 8-oxodG) which is repaired and can lead to point mutations in the process. But *mitROS*, substances produced by the organism that have capacity to break covalent bonds, *also generate single and double strand breaks in mtDNA*. This leads to *irreversible forms of damage* (mutations) like mtDNA deletions, and *mtDNA fragments which enter the chromosomes through the centromeres and accumulate in nDNA during aging*. The steady-state level of 8-oxodG in mtDNA is a marker of the *flow* of ROS-dependent damage

generation and repair through mtDNA. Its measurement is a useful *marker* of the rate of generation of mtDNA deletions and mtDNA fragments. Mutations can also arise due to processes unrelated to oxidative stress like mtDNA replication and repair. However, it is highly unlikely that these last mechanisms of damage generation are related to longevity, because their random nature can not explain the determination of longevity during DRs and in different animal species. It has been argued that the types of base mutations (transitions or transversions) mainly present in mtDNA indicate that they mainly come from mtDNA replication and repair. This has been taken as evidence against MFRTA. But this applies only to base substitutions and does not concern to mitROS-induced DNA strand breaks leading to mtDNA large deletions, and to mtDNA fragments insertion inside nDNA. When irreversibly damaged mtDNA reaches a high threshold level in a cell, approaching homoplasmy of mutated mtDNA, mitochondrial ATP generation through oxidative phosphorylation is decreased to levels great enough to contribute to aging. There is no consensus if this classical concept of MFRTA (176) can contribute to explain aging and longevity.

It is now known beyond reasonable doubt that mtDNA fragments accumulate during aging inside nDNA in yeast, rat liver and brain, and mouse liver (139,147-149), causing an increase in chronological aging at least in yeast (147). Recent investigations show that *such accumulation, as well as the increase in complex I mitROSp and FRL with age, are fully (100 %) reversed by rapamycin* dietary treatment in the liver of middle age mice (139). This is accompanied by rapamycin-induced strong *increases in autophagy* fully reverting to young levels, and by *partial reversion of lipofuscin* accumulation with age (139). Interestingly, recent studies indicate that the mtDNA fragments do not enter nDNA randomly. Instead they are directed to the centromeres as a main “*entry door*” to the nucleus. From there, they can potentially disseminate to other chromosome regions, perhaps being specifically directed to nDNA regulatory regions controlling the gene clusters of aging (PAP) residing in the cell nucleus (153), thus contributing to aging and to accelerate the mortality rate at old age. Further research is urgently needed to clarify this possibility. Alternatively, and more simply, the mtDNA fragments can potentially alter the information coded in nDNA. They could be directed specifically to structural genes, thus promoting cell malfunction, cell death, or cellular malignant transformation, and thus aging and cancer.

4. The *low fatty acid unsaturation degree* of cellular and mitochondrial membranes of *long-lived animals* leads to relatively *low rates of endogenous lipid peroxidation in vivo*, which is, quantitatively, *the most destructive oxidative stress process* to the main different types of cellular macromolecules. A low rate of membrane lipid peroxidation in long-lived animals also leads to decreases in the generation of highly toxic and mutagenic lipid peroxidation products like malondialdehyde,

hydroxynonenal and many others, which can diffuse from membrane peroxidized lipids to the cell nucleus. Some of these products have the potential to modify DNA, e.g., through direct interaction of the carbonyl group of the aldehydes with free amino groups in mtDNA or nDNA. This would add secondary DNA damage to that primarily coming from the complex I mtROS generator relevant for aging. There is a paucity of studies concerning lipid peroxidation-dependent damage to mtDNA and nDNA (175), especially due to technical limitations. They are however potentially interesting and should be studied.

5. DR and MetR also decrease protein oxidation, glycooxidation and lipoxidation, perhaps due to the decrease in mitROSp at complex I or to an increase in protein catabolism during the DRs. Mitochondrial protein oxidation-derived modification can also contribute to the accumulation of mtDNA mutations, although this possibility has also been poorly investigated.

6. Many different kinds of evidence converge in the concept that aerobic tissue cells (both the post-mitotic and the mitotic ones) have a *Pro-Aging Program (PAP)* lying inside the cell nucleus, likely composed of *hierarquically interrelated gene clusters of aging* analogously to the Hox genes controlling development (153). The PAP is a main central part of the *Cellular Aging Regulatory System (CARS)*. The large amount of *pro-aging genes* already discovered during the last two decades *are highly conserved* during evolution from yeast and nematodes to *Drosophila*, and mammals, like in the case of the Hox genes. The PAP reacts to GH/ insulin/IGF-1 like signaling and to *cytoplasmic signals* like those from AMPK, mTOR, and many others, in response to the different *environmental* types of dietary restrictions or drugs like rapamycin. The signals entering the *nucleus* would modify different PAP *master genes* through *transcription factors* like FOXO, TFEB and many others. These master genes would then modify the expression of different *gene clusters of aging* mainly constituting the PAP. These clusters must be organized in a *hierarchical cascade* of genes interrelated through transcription factors, enhancers, promoters, et cetera. The *target genes* situated at the lower level in such hierarchy would modify the synthesis of *specific proteins* which change the *activity level of the aging effectors* (executors of aging).

Among PAP target genes some have been already identified. These are the ones controlling: i) the synthesis of matrix-only complex I domain; ii) delta 5 and 6 desaturases and elongases in the n-6 and n-3 pathways of fatty acid synthesis; iii) many autophagy genes. Some signals coming from the environment (the DRs) can bypass the nuclear PAP and *directly modify the mitochondria* (or likely other aging effectors) changing their rate of mitROSp at complex I.

7. Among candidate aging effectors in aerobic tissues (both mitotic and post-mitotic), three emerge at present: 1) *Mitochondria* (including *mitROSp*); 2) The *degree of fatty acid unsaturation (DBI)* of cellular membranes; and 3) *Autophagy*. Decreases in the first two effectors slow aging

and increase longevity. Clarifying if over-expression of autophagy genes increases or not mean and maximum longevity over that of normal controls in mice, and if long-lived animals have higher autophagy activity than short-lived ones is urgently needed. The rate of *mitROSp at complex I and the DBI are low in long-lived animals*, thus correlating with longevity in the right sense. In addition, *mitROSp at complex I and autophagy* respond to the environmental pro-longevity signals of the different kinds of DRs or rapamycin: *mitROSp at complex I is decreased and, autophagy is increased*, both collaborating in an integrated manner to *increase longevity*.

8. With so few aging effectors reasonably well known up to now (only three) it seems strongly inappropriate the pretension of some authors that "MFRTA is dead". Such conclusion, heavily repeated by some authors through titles of recent articles is largely based either on: a) *low quality measurements* like the use in of *unspecific kits* to estimate oxidative stress in naked mole rats (177,178), and lack of stating if the naked mole rats used for the measurements were *queens* (30 years of longevity) or *soldiers* (few years of longevity) (177,178); in the second case a high oxidative stress in naked mole rats would confirm MFRTA instead of being contradictory with it; or b) technically well done experiments but based on hypothesis impossible to be correct, especially those testing whether over expression of antioxidant enzymes could increase longevity (for a, and b see more detailed comments on ref. 29). It was well known from the decade of 1990 on that antioxidants, for various different reasons described in sections 2 and 3.4, do not control longevity (2,7,10-12,14,17,23,24,29,32,55). The wrong hypothesis that "antioxidant enzyme overexpression could increase longevity" was necessarily destined to falsification, because it was wrongly formulated from the beginning, ignoring dozens of previous investigations on the subject. Avoiding such overexpression experiments would have saved a lot of time and resources as well as reaching wrong conclusions highly damaging for gerontology like erroneously considering the mitochondrial free radical theory "dead". Such mistake would "eliminate" from current models one of the two aging effectors changing longevity in the DRs or rapamycin treatment, *mitROSp*, leaving autophagy alone to respond to DRs or rapamycin. It would "eliminate" precisely the aging effector about which more positive evidences are available, including the differences in longevity between mammalian and bird species. Such pernicious situation for biogerontology should be avoided.

11. CONFLICT OF INTEREST

None declared.

12. ACKNOWLEDGEMENTS

Results obtained at the author laboratory described in this review have been supported by 21 grants from the EU, NIA/NIH (USA), Complutense University of Madrid (UCM), the Madrid Community, Health Research Foundation (FISs), and the Ministries of Education and

Technology, of Education and Science, and of Science and Innovation, to the author received between 1988 and 2014.

13. REFERENCES

1. Harman D. The biological clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972; 20: 145-7.
2. Barja G. Longevity and Evolution. New York, Nova Science Publishers, Inc., pp. 1-194. 2010.
3. Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Rad Biol Med* 1993; 15: 621-7.
4. Lambert A, Boysen H, Buckingham JA, Yang T, Podlutzky A, Austad SN, et al. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell* 2007; 6: 607-18.
5. Pamplona R, Barja G, Portero-Otín M. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 475-90.
6. Naudi A, Jove M, Ayala V, Portero-Otín M, Barja G, Pamplona R. Regulation of membrane unsaturation as antioxidant adaptive mechanisms in long-lived animal species. *Free Rad Antiox* 2011; 1: 3-12.
7. Pérez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J Comp Physiol B* 1998; 168: 149-58.
8. Pamplona R, Constantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol* 2011; 301: R843-R63.
9. Tolmasoff JM, Ono T, Cutler RG. Superoxide dismutase: correlation with life span and specific metabolic rate in primate species. *PNAS USA* 1980; 77: 2777-81.
10. Barja G, Cadenas S, Rojas C, López-Torres M, Pérez-Campo R. A decrease of free radical production near critical sites as the main cause of maximum longevity in animals. *Comp Biochem Physiol* 1994; 108B: 501-12.
11. Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M. Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high metabolic rates in birds *Free Rad Res* 1994; 21: 317-28.
12. Herrero A, Barja G. H₂O₂ production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mech Ageing Dev* 1998; 103: 133-46.
13. Boveris A, Cadenas E, Stoppani AOM. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1976; 156: 435-44.

14. Barja G, Herrero A. Localization at Complex I and mechanism of the higher free radical production of brain non-synaptic mitochondria in the short-lived rat than in the long-lived pigeon. *J Bioenerg Biomembr* 1998; 30: 235-43.
15. Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, et al. The state of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound semiquinone but presumably iron-sulphur cluster N2. *FEBS Lett* 2001; 505: 364-68.
16. Kushnareva Y, Murphy A, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P⁺) oxidation-reduction state. *Biochem J* 2002; 368: 545-53.
17. Herrero A, Barja G. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev* 1997; 98: 95-111.
18. Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the Complex I of heart and non-synaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2000; 32: 609-15.
19. Lambert A, Brand M. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 2004; 279: 39414-20.
20. Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J* 2000; 14: 312-18.
21. Herrero A, Barja G. 8-oxodeoxyguanosine levels in heart and brain mitochondrial and nuclear DNA of two mammals and three birds in relation to their different rates of aging. *Aging Clin Exper Res* 1999; 11: 294-300.
22. Gruber H, Wessels W, Boynton P, Xu J, Wohlgemuth S, Leeuwenburgh C et al. Age-related changes in the long-lived bivalve *A. islandica*. *AGE* 2015; Oct;37(5):90. doi: 10.1007/s11357-015-9831-8. Epub 2015 Aug 29.
23. Barja G. Free radicals and aging. *Trends Neurosci* 2004; 27: 595-600.
24. Pamplona R, Barja G. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Aging Res Reviews* 2007; 6: 189-210.
25. Strong R, Miller RA, Antebi A, Astle CM, Bogue M, Denzel MS et al. Longer lifespan in male mice treated with a weakly estrogenic agonist, an antioxidant, an alpha-glucosidase inhibitor or a Nrf2-inducer. *Aging Cell* 2016; 15: 872-84.
26. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Remmen HV. Trends in oxidative aging theories. *Free Rad Biol Med* 2007; 43: 477-503.
27. Perez VI, Bokov A, Van Remmen H., Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A. Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1005-14.
28. Correia-Meia C, Passos JF. Mitochondria: are they causal players in cellular senescence? *Biochim Biophys Acta* 2015; 1847: 1373-9.
29. Barja G. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects and confounding concepts. *Antiox. Redox Signaling* 2013; 19: 1420-45.
30. Van Diepeningen AD, Maas MF, Huberts DH, Goedbloed DJ, Engelmoer DJ, Slakhorst SM, et al. Calorie restriction causes healthy life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mech Ageing Dev* 2010; 131: 60-8.
31. Shen E-Z, Song C-Q, Lin Y, Zhang W-H, Su P-F, Liu W-Y et al. Mitoflash frequency in early adulthood predicts lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2014; 508: 128-32.
32. Barja G. Mitochondrial free radical generation: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relationship with aging rate. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 347-66.
33. Albring M, Griffith J, Attardi G. Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *PNAS USA* 1977; 74:1348-52.
34. Iborra FJ, Kimura H, Cook PR. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol* 2004; May 24; 2:9.
35. Kukat C, Wurm CASpahr H, Falkenberg M, Larsson NG, Jacobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *PNAS USA* 2001; 108: 13534-9.
36. Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M, et al. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case. *Mech Ageing Dev* 1996; 86: 53-66.
37. Bronnikov GE, Kulagina TP, Aripovskii AV, Kramarova LI. Correction of mitochondrial enzyme activities in the skeletal muscles of old rats in response to addition of olive oil to the ration. *Biogerontol* 2015; 199: 266-68.
38. Cortie CH, Hulbert AJ, Hancock SE, Mitchell TW, McAndrew D, Else PL. Of mice, pigs and humans: An analysis of mitochondrial phospholipids from mammals with very different maximal lifespans. *Exper Gerontol* 2015; 70: 135-43.
39. Ruiz MC, Ayala V, Portero-Otín M, Requena JR, Barja G, Pamplona R. Protein methionine content and MDA-lysine protein adducts are inversely related to maximum life span in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 1106-14.
40. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 2010; 328: 321-6.

41. Colman JR, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325: 201–4.
42. Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 2010; 143: 802-12.
43. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction. *Mech Ageing Dev* 1994; 74: 121-33.
44. Gredilla R, Barja G. The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinol* 2005; 146: 3713-7.
45. Burch HB, Lowry OH, Bradley ME, Max PF Jr. Hepatic metabolites and cofactors in riboflavin deficiency and caloric restriction. *Am J Physiol* 1970; 219: 409-15.
46. Jové M, Naudí A, Ramírez-Nuñez O, Portero-Otín M, Selman C, Withers DJ et al. Caloric restriction reveals a metabolomic and lipidomic signature in liver of male mice. *Aging Cell* 2014; 13: 828-37.
47. Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at Complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 2001; 15: 1589-91, 2001.
48. López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Rad Biol Med* 2002; 32: 882-9.
49. Sanz A, Caro P, Ibáñez J, Gómez J, Gredilla R, Barja G. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomembr* 2005; 37: 83-90.
50. Schauer M, Kottek T, Schönnerr M, Bhattacharya A, Ibrahim SM, Hirose M et al. A mutation in the NADH-dehydrogenase subunit 2 suppresses fibroblast aging. *Oncotarget* 2015; 6: 8552-66.
51. Matsuzaki S, Humphries KM. Selective inhibition of deactivated mitochondrial complex I by biguanides. *Biochemistry* 2015; 54: 2011-21.
52. Leduc-Gadet JP, Picard M, Pelletier FS, Sgariotto N, Auger MJ, Vallée J. et al. Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget* 2015; 6: 17923-37.
53. Miwa S, Jow H, Baty K, Johnson A, Czapiewski R, Saretzki G et al. Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice. *Nature Commun* 2014; May 12; 5:3837. doi: 10.1038/ncomms4837.
54. Villalba JM, López-Dominguez JA, Chen Y, Khraiweh H, González-Reyes JA, Del Rio LF et al. The influence of dietary fat source on liver and skeletal muscle mitochondrial modifications and lifespan changes in calorie-restricted mice. *Biogerontol* 2015; 16: 655-70.
55. Barja G. Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism? *Biol Reviews* 2004; 79: 235-51.
56. Richie J.P.Jr., Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats, *FASEB J* 1994; 8: 1302-7.
57. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 2005; 4: 119-25.
58. Lopez-Torres M, Barja G. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction Possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 1337-47.
59. Sun L, Amir A, Akha S, Millar RA, Harper J. Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; 64A: 711–22.
60. Piper MDW, Partridge L, Raubenheimer D, Simpson SJ. Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell Metab* 2011; 14: 154–60.
61. Ross MH. Nutrition and longevity in experimental animals. In: Winick M, Ed. *Nutrition and Aging*. New York, Wiley 1976; pp. 43–57.
62. Khorakova M, Deil Z, Khausman D, Matsek K. Effect of carbohydrate-enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fischer 344 male rats. *Fiziol Zh* 1990; 36: 16-21.
63. Shimokawa I, Higami Y, Yu BP, Masoro EJ, Ikeda T. Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Aging Clin Exp Res* 1996; 8: 254-2.
64. Min KJ, Tatar M Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev* 2006; 127: 643-6.
65. Troen AM, French EE, Roberts JF, Selhub J, Ordovas JM, Parnell LD, et al. Lifespan modification by glucose and methionine in *Drosophila melanogaster* fed a chemically defined diet. *Age (Dordr)* 2007; 29: 29-39.
66. Petti AA, Crutchfield CA, Rabinowitz JD, Botstein D. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *PNAS USA* 2011; 108: E1089–98.
67. Kabil H, Kabil O, Banerjee R, Harshman LG, Pletcher SD. Increased transsulfuration mediates longevity and dietary restriction in *Drosophila*. *PNAS USA* 2011;

- 108: 16831-6.
68. Kalhan SC, Uppal SO, Moorman JL, Bennett C, Gruca LL, Parimi PS, et al. Metabolic and genomic response to dietary isocaloric protein restriction in the rat. *J Biol Chem* 2011; 286: 5266-77.
 69. Malloy VL, Perrone CE, Mattocks DA, Ables GP, Caliendo NS, Orentreich DS. Methionine restriction prevents the progression of hepatic steatosis in leptin-deficient obese mice. *Metabolism* 2013; 62: 1651-61.
 70. Orgeron ML, Stone KP, Wanders D, Cortez CC, Vant NT, Gettys TW. The impact of dietary methionine restriction on biomarkers of metabolic health. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2014; 121: 351-76.
 71. Ramaligan A, Wang X, Gabello M, Valenzano MC, Soler AP, Ko A, et al. Dietary methionine restriction improves colon tight junction barrier function and alters claudin expression pattern. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C1028-35.
 72. Hasek BE, Stewart LK, Henagan TM, Boudreau A, Lenard NR, Black C, et al. Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 299: R728-39.
 73. Komninou D, Leutzinger Y, Reddy BS, Richie JP Jr. Methionine restriction inhibits colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 2006; 54: 202-8.
 74. Cavuoto P, Fenech MF. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat Rev* 2012; 38: 726-36.
 75. Cao WX, Ou JM, Fei XF, Zhu ZG, Yin HR, Yan M, et al. Methionine-dependence and combination chemotherapy on human gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 230-2.
 76. Malloy VL, Krajcik RA, Bailey SJ, Hristopoulos G, Plummer JD, Orentreich N. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell* 2006; 5: 305-14.
 77. Perrone CE, Malloy VE, Orentreich DS, Orentreich N. Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents. *Exp Gerontol* 2013; 48: 654-60.
 78. Perrone CE, Mattocks DAL, Plummer JD, Chittur SV, Mohny R, Vignola K, et al. Genomic and metabolic responses to methionine-restricted and methionine-restricted, cysteine-supplemented diets in Fischer 344 rat inguinal adipose tissue, liver and quadriceps muscle. *J Nutrigenet Nutrigenom* 2012; 5: 132-157.
 79. Elshorbagy AK, Valdivia-Garcia M, Mattocks DA, Plummer JD, Smith AD, Drevon CA, et al. Cysteine supplementation reverses methionine restriction effects on rat adiposity: significance of stearyl-coenzyme A desaturase. *J Lipid Res* 2011; 52: 104-12.
 80. Harper AE, Benevenga NJ, Wohlhueter RM. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol Rev* 1970; 50: 428-558.
 81. Park CM, Cho CW, Rosenfeld ME, Song YS. Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor kappaB activation in livers of C57BL/6 mice. *J Med Food* 2008; 11: 667-74.
 82. Gomez J, Caro P, Sanchez I, Naudi A, Jove M, Portero-Otin M, et al. Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. *J Bioenerg Biomembr* 2009; 41: 309-21.
 83. Hidiroglou N, Gilani GS, Long L, Zhao X, Madere R, Cockell K et al. The influence of dietary vitamin E, fat, and methionine on blood cholesterol profile, homocysteine levels, and oxidizability of low density lipoprotein in the gerbil. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 730-40.
 84. Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *PNAS USA* 2003; 100: 15089-94.
 85. Kumagai H, Katoh S, Hirosawa K, Kimura M, Hishida A, Ikegaya N. Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia. *Kidney Int* 2002; 62: 1219-28.
 86. Mori N, Hirayama K. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. *J Nutr* 2000; 130: 2349-55.
 87. Gomez J, Sanchez-Roman I, Gomez A, Sanchez C, Suarez H, Lopez-Torres M, et al. Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro. *J Bioenerg Biomembr* 2011; 43: 377-86.
 88. Ciorba MA, Heinemann SH, Weissbach H, Brot N, Hoshi T. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *PNAS USA* 1997; 94: 9932-7.
 89. Chung H, Kim AK, Jung SA, Kim SW, Yu K, Lee JH. The *Drosophila* homolog of methionine sulfoxide reductase A extends lifespan and increases nuclear localization of FOXO. *FEBS Lett* 2010; 584: 3609-14.
 90. Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *PNAS USA* 2001; 98: 12920-5.
 91. Lim DH, Han JY, Kim JR, Lee YS, Kim HY. Methionine sulfoxide reductase B in the endoplasmic reticulum is critical for stress resistance and aging in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419: 20-6.
 92. Uthus EO, Brown-Borg HM. Methionine flux to transsulfuration is enhanced in the long living Ames dwarf mouse. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 444-50.
 93. Sanz A, Caro P, Sanchez JG, Barja G. Effect of lipid restriction on mitochondrial free radical production and oxidative DNA damage. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1067: 200-9.

94. Sanz A, Gomez J, Caro P, Barja G. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr* 2006; 38: 327-33.
95. Sanz A, Caro P, Barja G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36: 545-52.
96. Ayala V, Naudi A, Sanz A, Caro P, Portero-Otin M, Barja G, et al. Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62: 352-60.
97. Sanz A, Caro P, Ayala V, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. *FASEB J* 2006; 20: 1064-73.
98. Sanchez-Roman I, Gomez A, Gomez J, Suarez H, Sanchez C, Naudi A, et al. Forty percent methionine restriction lowers DNA methylation, complex I ROS generation, and oxidative damage to mtDNA and mitochondrial proteins in rat heart. *J Bioenerg Biomembr* 2011; 43: 699-708.
99. Sanchez-Roman I, Gómez A, Pérez I, Sanchez C, Suarez H, Naudi A, et al. Effects of aging and methionine restriction applied at old age on ROS generation and oxidative damage in rat liver mitochondria. *Biogerontology* 2012; 13: 399-411.
100. Caro P, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudi A, Jove M, et al. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 2008; 9: 183–96.
101. Naudi A, Caro P, Jove M, Gomez J, Boada J, Ayala V, et al. Methionine restriction decreases endogenous oxidative molecular damage and increases mitochondrial biogenesis and uncoupling protein 4 in rat brain. *Rejuvenation Res* 2007; 10: 473-84.
102. Caro P, Gomez J, Sanchez I, Naudi A, Ayala V, Lopez-Torres M, et al. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. *Rejuvenation Res* 2009; 12: 421–34.
103. Yang Y, Ji Y, Wu G, Sun K, Dai Z, Wu Z. Dietary L-methionine restriction decreases oxidative stress in porcine liver mitochondria. *Exper Gerontol* 2015; 65: 35-41.
104. Caro P, Gomez J, Sanchez I, Garcia R, López-Torres M, Naudi A, et al. Effect of 40 % restriction of dietary amino acids—except methionine— on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* 2009; 10: 579–92.
105. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784–90.
106. Pamplona R, Portero-Otin M, Sanz A, Ayala V, Vasileva E, Barja G. Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigards and canaries than in mice. Relation to aging rate. *AGE (Dordr)* 2005; 27: 267–80.
107. Spasojević I, Bogdanović Pristov J, Vujisić L, Spasić M. The reaction of methionine with hydroxyl radical: reactive intermediates and methanethiol production. *Amino Acids* 2012; 42: 2439-45.
108. Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, Lin TK, Hirst J, Murphy MP. Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J Biol Chem* 2003; 278: 19603–10.
109. Robert L, Labat-Robert J, Robert AM. Genetic, epigenetic and posttranslational mechanisms of aging. *Biogerontology* 2010; 11: 387–99.
110. Passarino G, Rose G, Bellizzi D. Mitochondrial function, mitochondrial DNA and ageing: a reappraisal. *Biogerontology* 2010; 11: 575–88.
111. Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr* 2006; 136: 1636S–40S.
112. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet* 2009; Aug;5(8):e1000602.doi: 10.1371/journal.pgen.1000602. Epub.
113. Wakeling LA, Ions LJ, Ford D. Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? *Age (Dordr)* 2009; 31: 327-41.
114. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, Shen L, Zhang L, Zhang J, et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res* 2010; 20: 332-40.
115. Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 97-117.
116. Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gómez A, Diez J, et al. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *PNAS USA* 2012; 109: 10522-7.
117. Zhang H, Ryu D, Wu Y, Gariani K, Wang X, Luan P et al. NAD repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. 2016; 352: 1436-43.
118. Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging Cell* 2008; 7: 681-7.
119. Miller RA, Harrison DE, Astle CM, Baur JA, Boyd AR, de Cabo R, et al. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically

- heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66: 191-201.
120. Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, Chan CC, Friedline S, Harrison DE, et al. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell* 2012; 11: 675-82.
 121. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; 460: 392-5.
 122. Zhang Y, Bokov A, Gelfond J, Soto V, Ikeno Y, Hubbard G, et al. Rapamycin extends life and health in C57BL/6 mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69: 119-130.
 123. Neff F, Flores-Dominguez D, Ryan DP, Horsch M, Schröder S, Adler T, L.C. et al. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *J Clin Invest* 2013; 123: 3272-91.
 124. Kaerberlein M, Powers RW 3rd, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, et al. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 2005; 310: 1193-6.
 125. Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 2003; 426: 620.
 126. Schieke SM, Phillips D, McCoy JP Jr, Aponte AM, Shen RF, Balaban RS et al. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem* 2006; 281: 27643-52.
 127. McGaugh SE, Bronikowski AM, Kuo CH, Reding DM, Addis EA, Flagel LE et al. Rapid molecular evolution across amniotes of the IIS/TOR network. *PNAS USA* 2015; 112: 7055-60.
 128. Johnson SC, Yanos ME, Bitto A, Castanza A, Gagnidze A, Gonzalez B, et al. Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. *Front Genet* 2015; 6: 247.
 129. S.C. Johnson, P.S. Rabinovitch, M. Kaerberlein, 2013. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* 493, 338-45.
 130. Carter CS, Khamiss D, Matheny M, Toklu HZ, Kirichenko N, Stehler KY et al. Rapamycin versus intermittent feeding: dissociable effects on physiological and behavioral outcomes when initiated early and late in life. *J Gerontol A Biol Sci* 2016; 71: 865-75.
 131. Fischer KE, Gelfond JA, Soto VY, Han C, Someya S, Richardson A, et al. Health effects of long-term rapamycin treatment: The impact on mouse health of enteric rapamycin treatment from four months of age throughout life. *PLoS One* 2015; 10:e0126644. doi: 10.1371/journal.pone.0126644.
 132. Fisher A, Seguel JM, de la Torre AN, Wilson D, Merchant A, Arora RK, et al. Effect of sirolimus on infection incidence in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2004; 10: 193-8.
 133. Jagannath C, Bakhru P. Rapamycin-induced enhancement of vaccine efficacy in mice. *Methods Mol Biol.* 2012; 821:295-303.
 134. Richardson A, Galvan V, Lin AL, Oddo S. How longevity research can lead to therapies for Alzheimer's disease: The rapamycin story. *Exper Gerontol.* 2015; 68: 51-8.
 135. Apelo A, Pumper CP, Baar EL, Cummings NE, Lamning DW. Intermittent administration of rapamycin extends life span of female C57BL/6J mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71: 876-81.
 136. Stanfel MN, Shamieh LS, Kaerberlein M, Kennedy BK. The TOR pathway comes of age. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1067-74.
 137. Kaerberlein M, Kennedy BK. Ageing: A midlife longevity drug? *Nature* 2009; 460: 331-2.
 138. Selman C, Tullet JM, Wieser D, Irvine E, Lingard SJ, Choudhury AI. et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science* 2009; 326: 140-4.
 139. Martínez-Cisuelo V, Gómez J, García-Junceda I, Naudí A, Cabré R, Mota-Martorell N et al. Rapamycin reverses age-related increases in mitochondrial ROS production at complex I, oxidative stress, accumulation of mtDNA fragments inside nuclear DNA, and lipofuscin level in liver of middle-aged mice. *Exper. Gerontol.* 2016; 83: 130-138.
 140. Sato A, Nakada K, Shitara H, Kasahara A, Yonekawa H, Hayashi JI. Deletion-mutant mtDNA increases in somatic tissues but decreases in female germ cells with age. *Genetics* 2007; 177: 2031-2037.
 141. Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nature Genetics* 2006; 38: 518-20.
 142. Bender A, Kishnan K, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat. Genet* 2006; 38: 515-7.
 143. Richter C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* 1988; 241: 1-5.
 144. Suter M, Richter C. Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry* 1999; 38: 459-64.
 145. Patrushev M, Kasymov V, Patrusheva V, Ushakova T, Gogvadze V, Gaziev A. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 3100-3.
 146. Patrushev M, Kasymov V, Patrusheva V, Ushakova T, Gogvadze V, Gaziev AI. Release of mitochondrial DNA fragments from brain mitochondria of irradiated mice. *Mitochondrion* 2006; 6: 43-7.
 147. Cheng X, Ivessa AS. The migration of mitochondrial DNA fragments to the nucleus affects the

- chronological aging process of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2010; 9: 919-23.
148. Caro P, Gómez J, Arduini A, González-Sánchez M, González García M, Borrás C, et al. Mitochondrial DNA sequences are present inside nuclear DNA in rat tissues and increase with age. *Mitochondrion* 2010; 10: 479-86.
 149. Cheng X, Ivessa AS. Accumulation of linear mitochondrial DNA fragments in the nucleus shortens the chronological life span of yeast. *Eur J Cell Biol* 2012; 91:782-8.
 150. Fu C, Hickey M, Morrison M, McCarter R, Han E-S. Tissue specific and non-specific changes in gene expression by aging and by early stage CR. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 905-16.
 151. Plank M, Wuttke D, van Dam S, Clarke SA, de Magalhães JP. A meta-analysis of caloric restriction gene expression profiles to infer common signatures and regulatory mechanisms. *Mol Biosyst* 2012; 8: 1339-49.
 152. Hofmann JW, Zhao X, De Cecco M, Peterson AL, Pagliaroli L, Manivannan J et al. Reduced expression of MYC increases longevity and enhances healthspan. *Cell* 2015; 160: 477-88.
 153. Barja G. The Gene Cluster Hypothesis of Aging and Longevity. *Biogerontol* 2008; 9: 57-66.
 154. Lapiere LR, Kumsta C, Sandri M, Ballabio A, Hansen M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy* 2015; 11:867-80.
 155. Linton PJ, Gurney M, Sengstock D, Mentzer RM Jr, Gottlieb RA. This old heart: Cardiac aging and autophagy. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 83: 44-54.
 156. Biala AK, Dhingra R, Kirshenbaum LA. Mitochondrial dynamics: Orchestrating the journey to advanced age. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 83 :37-43.
 157. Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, Nah J, Hong SH, Kam TI et al. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun* 2013; 4: 2300.
 158. Tan Q, Soerensen M, Kruse TA, Christensen K, Christiansen L. A novel permutation test for case-only analysis identifies epistatic effects on human longevity in the FOXO gene family. *Aging Cell* 2013; 12: 690-4.
 159. Gomez A, Gomez J, Lopez-Torres M, Naudi A, Mota-Martorell N, R Pamplona, G Barja. Cysteine dietary supplementation reverses the decrease in mitochondrial ROS production at complex I induced by methionine restriction. *J Bioenerg Biomembr* 2015; 47: 199-208.
 160. Liu D, Zhang Y, Gharavi R, Park HR, Lee J, Siddiqui S. The mitochondrial uncoupler DNP triggers brain cell mTOR signaling network reprogramming and CREB pathway up-regulation. *J Neurochem* 2015; 134: 677-92.
 161. Knuppertz L, Osiewacz HD. Orchestrating the network of molecular pathways affecting aging: Role of nonselective autophagy and mitophagy. *Mech Ageing Dev* 2016; 153: 30-40.
 162. D'Aquila P, Rose G, Bellizzi D, Passarino G. Epigenetics and aging. *Maturitas* 2013; 74: 130-6.
 163. Mitteldorf JJ. How does the body know how old it is? Introducing the epigenetic clock hypothesis. *Biochemistry (Moscow)* 2013; 78:1048-53.
 164. Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 2015; 14: 924-32.
 165. Johnson AA, Akman K, Calimport SR, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhães JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation, and age-related disease. *Rejuvenation Res.* 2012; 15: 483-94.
 166. Sun D, Yi SV. Impacts of Chromatin States and Long-Range Genomic Segments on Aging and DNA Methylation. *PLoS One* 2015; 10(6):e0128517. doi: 10.1371/journal.pone.0128517.
 167. Schultz MD, He Y, Whitaker JW, Hariharan M, Mukamel EA, Leung D et al. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature* 2015; 523: 212-6.
 168. Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review *J Histochem Cytochem* 2008; 56:711-21.
 169. Gong H, Qian H, Ertl R, Astle CM, Wang GG, Harrison DE. Histone modifications change with age, dietary restriction and rapamycin treatment in mouse brain. *Oncotarget* 2015; 6: 15882-90.
 170. Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 2010; 143: 802-12.
 171. Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 1645-51.
 172. Wallace DC, Fan W. Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion* 2010; 10: 12-31.
 173. D'Aquila P, Bellizzi D, Passarino G. Mitochondria in health, aging and diseases: the epigenetic perspective. *Biogerontology* 2015; 16:569-85.
 174. van der Wijst MG, Rots MG. Mitochondrial epigenetics: an overlooked layer of regulation? *Trends Genet* 2015; 31: 353-6.
 175. Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola SN, Morrow JD, Blair IA, et al. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 1994; 265: 1580-2.
 176. Fleming JE, Miquel J, Cottrell SF, Yengoyan LS, Economos AC. Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology* 1982; 28: 44-53.

177. Andziak B, Buffenstein R. Disparate patterns of age related changes in lipid peroxidation in long-lived naked mole-rats and shorter-lived mice. *Aging Cell* 2006; 5: 525–532.
178. Andziak B, O'Connor TP, Qi W, DeWaal EM, Pierce A, Chaudhuri AR, Van Remmen H, and Buffenstein R. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* 2006; 5: 463–471.



Targeting inflammation in the retina: a new therapeutic approach in diabetic retinopathy

Title in Spanish: *El tratamiento de la inflamación en la retina: una nueva estrategia terapéutica en la retinopatía diabética*

Ana I. Arroba^{1,2*}, Ángela M. Valverde^{1,2}

¹Alberto Sols Biomedical Research Institute (IIBm) (CSIC/UAM), 28029 Madrid, Spain. ²Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERdem), ISCIII, 28029 Madrid, Spain.

ABSTRACT: Retinal diseases linked to inflammation, including diabetic retinopathy (DR), are often accompanied by resident macrophage/microglial cells activation. During DR, there are substantial changes in the polarization status of the microglia from the M2 (anti-inflammatory) to the M1 (pro-inflammatory) stage. However, the dynamics between M1 and M2 polarization of microglia during DR has not been investigated and it might be therapeutically useful. In this study, we have characterized the evolution of microglia polarization during the early stages of DR in the retina of diabetic *db/db* mice. Moreover, we have analyzed microglia polarization in response to pro-(bacterial lipopolysaccharide; LPS) or anti-(IL4/IL13 cytokines or the bicyclic nojirimycin derivative (1*R*)-1-dodecylsulfinyl-5*N*,6*O*-oxomethylidenenojirimycin (*R*-DS-ONJ)) inflammatory stimuli. For this goal, we have performed in vitro experiments in Bv-2 murine microglial cells as well as ex vivo experiments in retinal explants from *db/db* mice. Treatment of Bv-2 cells with LPS together with IL4/IL13 or *R*-DS-ONJ switched the M1 response towards M2. In retinal explants from *db/db* mice, *R*-DS-ONJ induced a M2 response. In conclusion, the modulation of microglia polarization dynamics towards a M2 status at early stages of DR offers novel therapeutic interventions.

RESUMEN: Las enfermedades retinianas, entre las que se encuentra la retinopatía diabética (RD), están vinculadas a un contexto inflamatorio en el cual existe una activación de los macrófagos residentes en la retina (microglia). Durante la retinopatía diabética se producen cambios de polarización de la microglia, definiéndose éstos como transiciones entre el estado M1 (pro-inflamatorio) y el estado M2 (anti-inflamatorio), estando aún por determinar los tiempos de aparición y actuación de la microglia en cada uno de ellos. La identificación espacio-temporal de la transición de la microglia de un estado a otro podría constituir una potente herramienta clínica para diferentes abordajes terapéuticos. En este trabajo se ha caracterizado el estado de polarización de la microglia en la retina durante las primeras fases de la RD en el modelo de ratón diabético *db/db*. Además, se ha estudiado la polarización de la microglia en presencia de estímulos pro-inflamatorios (lipopolisacárido bacteriano; LPS) o anti-inflamatorios (citoquinas IL4/IL13 o un compuesto natural derivado de la castanospermina, *R*-DS-ONJ). Para ello, se ha realizado un abordaje in vitro utilizando la línea celular de microglia murina Bv-2 y un abordaje ex vivo con explantes de retinas procedentes de ratones diabéticos *db/db*. El tratamiento de las células Bv-2 con LPS en combinación con IL4/IL13 o alternativamente con el compuesto *R*-DS-ONJ indujo la transición en la polarización de la microglia desde el estado pro-inflamatorio M1, inducido por el LPS, al estado anti-inflamatorio M2. En los explantes de retinas de ratones *db/db*, el compuesto *R*-DS-ONJ indujo la respuesta M2 disminuyendo la respuesta M1. En conclusión, la polarización de la microglia hacia un estado M2 durante los estadios tempranos de la RD ofrece una nueva ventana terapéutica de actuación.

*Corresponding Author: aarroba@iib.uam.es

Received: Mars 21, 2017 Accepted: Mars 22, 2017

Premio del Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos del Concurso científico 2016 de la Real Academia Nacional de Farmacia

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 1 (2017), pp. 81-92

Language of Manuscript: English

1. INTRODUCTION

Insulin resistance and chronic inflammation are

implicated in the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D) and in diabetic retinopathy (DR), its most prevalent

complication (1). In fact, neuroinflammation induced by the diabetic milieu is a central contributing factor in DR progression (2). Similarly to other neurodegenerative diseases, DR exhibits characteristics of low-grade chronic inflammation (3) in which changes in retinal expression of inflammatory mediators occur in concert with functional changes in retinal permeability and apoptosis (4, 5). It has been proposed that in neuroinflammation microglia becomes activated and produce inflammatory mediators. Microglia, serving as resident macrophages of the retina, has multiple functional states and carries out diverse functions. Capable of rapid dynamism and motility, microglial cells synthesize and release cytokines, chemokines, neurotrophic factors, and neurotransmitters that interact with multiple cell types in the central nervous system (CNS) and exert cytotoxic, cytoprotective and scavenger effects depending on the tissue context (6). Retinal diseases such as proliferative DR and diabetic macular edema are often accompanied by macrophage/microglia cells activation (7, 8).

The existence of a continuum of polarization states in macrophages results from the integration of the intracellular signals triggered by their surrounding milieu (9, 10). M1, or classically-activated macrophages, mainly secrete pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL12, IL23, IL1 β , IL6 and chemotactic factors and are involved in the pro-inflammatory response. By contrast, alternatively-activated macrophages (M2) express high levels of arginase-1 and IL10, but low levels of IL12 and IL23 and are usually induced by the anti-inflammatory cytokines IL4 and IL13 (11).

DR exhibits many features of chronic inflammation such as increased NO production and release of pro-inflammatory cytokines (12). In fact, TNF α , IL1 β , IL-8 and MCP-1 have been found elevated in the vitreous of diabetic patients (13, 14). Recently, the inflammasome complex, which cleaves pro-IL1 β into secreted IL1 β via caspase-1, has been found activated in retinal pigment epithelial cells cultured under high glucose levels (15), but its modulation in the retina during DR has not yet been explored. In this scenario, microglia may underline its different functional properties and, therefore, targeting its polarization is a promising approach for the treatment of CNS diseases (16) including DR.

Among therapies targeting pro-inflammatory mediators, the natural compounds have emerged as an alternative to chemical drugs. Iminosugar glycosyl hydrolase inhibitors such as 1-deoxynojirimycin and castanospermine have a strong potential in therapies for cancer, viral infections, diabetes and glycosphingolipid storage disorders (17, 18). In particular, sp²-iminosugar-type bicyclic nojirimycin analogues with an alpha-

configured *N*-, *S*-, or *C*-linked pseudoanomeric group have been previously evaluated as antitumor agents (18). However, their effects in inflammatory processes during DR remain to be elucidated.

In recent years the C57BL/KsJ-*db/db* mouse model has been extensively used to investigate the pathogenesis of DR (19) since reproduce the neurodegenerative process that occur in the human diabetic retina (20). However, the events that occur in the retina at early stages of DR previous to neurodegeneration, and, in particular the role of microglia associated to neuroinflammation in *db/db* mice remain unknown. The aim of this study is to examine the polarization of microglia during the early stages of DR and its modulation by a sp²-iminosugar-type bicyclic nojirimycin analogue.

2. METHODS

2.1. Reagents and drugs

Fetal bovine serum (FBS) and culture media were obtained from Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Bovine serum albumin (BSA) and bacterial lipopolysaccharide (LPS) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). IL4 and IL13 were purchased from Preprotech (London, UK). Bradford reagent, acrylamide, immunoblot PVDF membranes and chemiluminiscent HRP Substrate were purchased from Bio-Rad (Madrid, Spain).

2.2. Cell culture

Mouse microglia Bv-2 cell line was provided by Dr. M.L. Nieto (CSIC, Spain). Bv-2 cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂ in RPMI supplemented with 10 % (v/v) heat-inactivated FBS, 1 % (v/v) penicillin/streptomycin (Sigma) and 2 mM L-glutamine (Gibco, Carlsbad, California, USA). Cells were grown up to 70 % confluence, washed with PBS and further stimulated in serum-free medium with LPS (200 ng/ml) with or without a mixture of IL4/IL13 (20 ng/ml each; M2) or R-DS-ONJ (compound C5) for several time-periods. For mouse cell line authentication, genomic DNA was isolated from Bv-2 cells and analyzed by PCR as described (21). Primer sequences used for amplification of mouse STR were: Forward (6-7) 5'AGTCCACCCAGTGCATTCTC 3'; Reverse (6-7) 5'CATGTGGCTGGTATGCTGTT 3'; Forward (15-3) 5'TCTGGGCGTGTCTGTCATAA 3'; Reverse (15-3) 5'TTCTCAGGGAGGAGTGTGCT 3'.

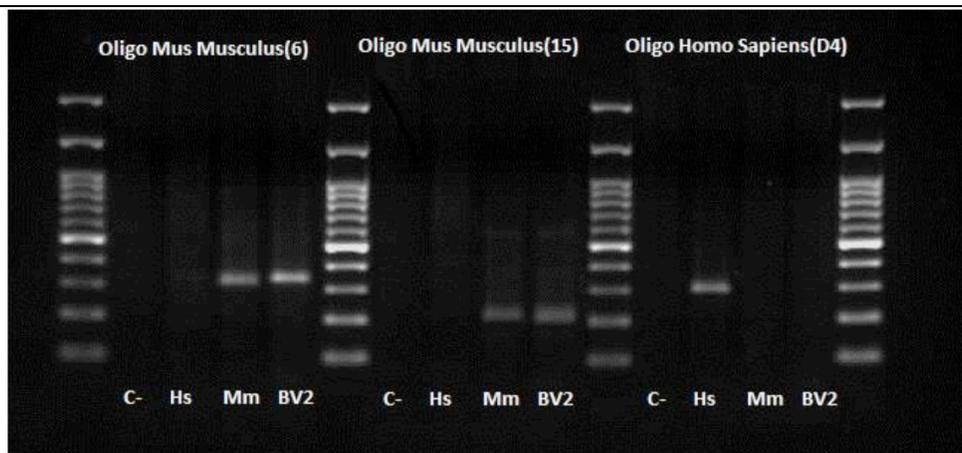


Figure 1. Murine Cell line authentication. Bv.2 murine microglia cell line was authenticated at IIBM Genomic Core Facility. HS: *Homo sapiens* control DNA; Mm: *Mus musculus* control DNA.

2.3. Animals and retina isolation

C57BL/KsJ *db/db* and *db/+* male mice were purchased from Harlan (Harlan Laboratories, Inc. UK). Mice were maintained in light/dark (12-hours light/12-hours dark)-, temperature (22°C)- and humidity-controlled rooms, and fed ad libitum with free access to water. All animal experimentation followed recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) on health monitoring in accordance with the regulations of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. Animals were killed by cervical dislocation and eyes were enucleated. The lens, anterior segment, vitreous body, retinal pigment epithelium and sclera were removed.

2.4. Retinal explants

Ex vivo assays were performed with retinas from 8 weeks old male *db/+* and *db/db* mice as previously described (22). Following isolation, retinas were cultured in R16 medium (provided by Dr. P.A. Ekstrom, Lund University, Sweden) with no additional serum. Retinas were stimulated with *R*-DS-ONJ (compound C5) at 50 μ M for 24 h as indicated in the figure legends.

2.5. Analysis of cellular viability

Bv-2 cells were seeded in 24-well plates and allowed to stabilize overnight. The cells were then treated with *R*-DS-ONJ (1-50 μ M) for 24 h. Following incubation, the viability of the cells was measured with crystal violet as described (23).

2.6. Analysis of Nitrites (NO_2^-)

Levels of NO_2^- were measured using the Griess method (24). In an acidic solution with 1 % sulphanilamide and 0.1 % N-(1-Naphthyl) ethylenediamine (NEDA), nitrites convert into a pink compound that is colorimetric calculated at 540 nm in a microplate reader (Versamax Tunable Microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU).

2.7. Western blot

Whole retinas or Bv-2 cells were homogenized in lysis

buffer containing 50 mM Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 2 mM EGTA, 10 mM EDTA acid, 100 mM NaF, 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM Na_3VO_4 , 100 μ g/mL phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 μ g/mL aprotinin, and 1 μ g/mL leupeptin, supplemented with protease inhibitors (10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, and 100 μ g/ml phenylmethylsulphonyl fluoride). All debris was removed by centrifugation at 14,000 x g for 10 min at 4°C and protein concentration was quantified using the Bio-Rad protein assay with BSA as a standard. Equivalent amounts of protein were resolved using denaturing sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by transfer to PVDF membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked using 5 % non-fat dried milk or 3 % BSA in 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 (TBS), and incubated overnight with several antibodies (1:2000 unless otherwise stated) in 0.05 % Tween-20-TBS. Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence reagent (Bio-Rad). Antibodies against iNOS (sc- 650), $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (sc-371), NF κ B p65(C-20) (sc-372), JNK (sc-571), phospho-38 MAPK (Thr180/Tyr182) (sc-17852-R) and p38 MAPK (sc-9212) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Palo Alto, CA, USA). Anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (#4668) antibody was purchased from Cell Signaling Technology (MA, USA). Anti-Arginase-1 (BD 610708) was purchased from BD Biosciences (Madrid, Spain). Anti- α -tubulin (T-5168) antibody was from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

2.8. Immunofluorescence

Eyes, retinal explants or Bv-2 cells were fixed in 4 % paraformaldehyde for 24 h at 4°C and infiltrated with sucrose 25 % (w/v). For immunofluorescence analysis, we followed the protocol previously detailed (25). The samples were then incubated overnight in a humid chamber at 4 °C with rabbit anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) (1:1000), mouse anti-arginase-1 (1:1000) and rabbit anti-iNOS (1:1000) antibodies in blocking solution. Samples were washed and incubated for 90 min with anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat or anti-rat

immunoglobulin antibodies conjugated to Alexa 647 or 488 (1:2000; Molecular Probes, Eugene, OR). After washing, sections were mounted with medium (Fluoromount G) containing 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Staining was observed with an inverted laser confocal microscope LSM710 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany). After washing, sections were mounted with medium (Fluoromount G) containing 4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Staining was observed with an inverted laser confocal microscope LSM710 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Germany).

2.9. Endotoxin detection

Serum endotoxin concentrations were measured with a commercial kit (QAYEE-BIO; Deltaclon, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. Briefly, blood samples were collected in non-pyrogenic and endotoxin-free tubes, centrifuged at 2,500 x g for 10 min and serum was separated. Samples were diluted (1/5) with endotoxin-free water and horseradish peroxidase (HRP) was added. Samples were gently shaken, incubated for 60 min at 37°C and then washed 5 times. Chromogen solution A was added to the samples that were gently shaken and further incubated for 10 min at 37°C protected from light. Finally, stop solution was added and samples were measured at 450 nm.

2.10. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted with Trizol® reagent (Invitrogen, Madrid, Spain) and reverse transcribed using a SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-qPCR following the manufacturer's indications (Invitrogen). RT-qPCR was performed with an ABI 7900 sequence detector. Primer-probe sets for mouse TNF α , IL6, IL1 β , iNOS, arginase-1 and 18s were purchased as predesigned TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Spain).

2.11. Statistical analysis

Densitometry of the Western blots was performed using the Image J program. Values in all graphs

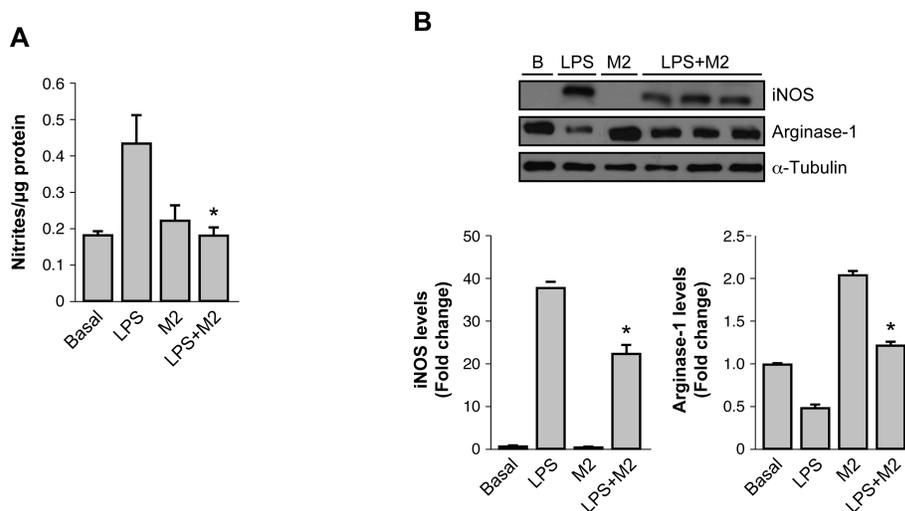
represented the mean \pm SEM. Statistical tests were performed using SPSS 21.0 for Windows (SPSS Inc. IBM, Armonk, NY, USA). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni t-test or by paired t-test when comparisons were among two groups. Differences were considered significant at * $p \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. LPS-treated Bv-2 cells induced a pro-inflammatory response that was reduced by co-treatment with M2 cytokines or the sp²-iminosugar derivative R-DS-ONJ

We stimulated Bv-2 cells, a mouse microglia cell line, with LPS (M1 stimulus) in the absence or presence of M2 cytokines (IL4/IL13). LPS was used as a pro-inflammatory stimulus since it induces an environment similar to that found in the obesity-related diabetic context (26). Based on that, Bv-2 cells were cultured in the presence of LPS, IL4/IL13 (M2) and the combination of both (LPS+M2). Figure 2A shows that the release of nitrites in the culture medium in LPS-treated Bv-2 cells was significantly reduced by the co-treatment with IL4/IL13. Likewise, iNOS, which was elevated in LPS-treated Bv-2 cells, significantly decreased by the co-treatment with M2 cytokines (Figure 2B). Conversely, arginase-1 decreased by LPS treatment, this effect being ameliorated in the combination of LPS plus IL4/IL13. The effect of M2 cytokines was also evident by the decrease of LPS-induced mRNA levels of TNF α , IL1 β , IL6 and iNOS (Figure 2C).

We tested a pharmacological approach using the sp²-iminosugar dodecylsulfoxide derivative *R-DS-ONJ* (referred as C5; Figure 3A). As shown in Figure 3B, the viability of Bv-2 cells exposed to *R-DS-ONJ* (50 μ M) was not affected. In Bv-2 cells cultured with LPS plus *R-DS-ONJ*, nitrite production and iNOS expression (mRNA and protein) were reduced as compared to the LPS condition (Figure 3C, 3D, 3E). *R-DS-ONJ* also decreased mRNA levels of the pro-inflammatory cytokines IL1 β and IL6 (Figure 3E).



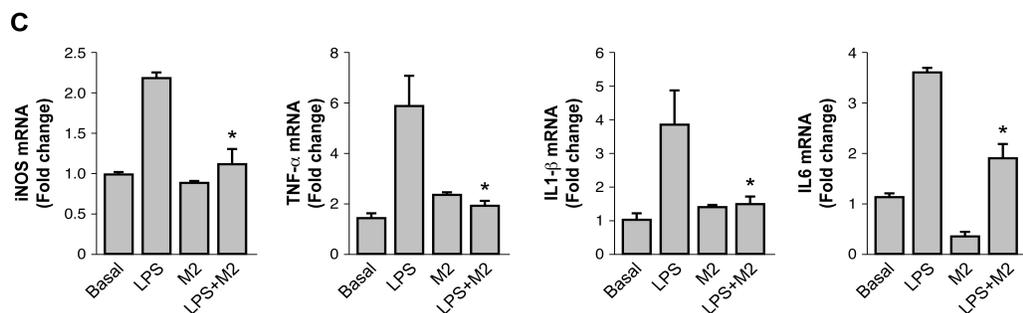


Figure 2. IL4/IL13 (M2 cytokines) prevented the pro-inflammatory effects of LPS in Bv-2 microglia cells. Bv-2 cells were treated with LPS (200 ng/ml) in the absence or presence of IL4/IL13 (20 ng/ml each). A) Nitrites in the culture medium. B) Western blot for arginase-1 and iNOS. C) mRNA levels of TNF α , IL1 β , IL6 and iNOS. Results are expressed as $2^{-\Delta Ct}$. Results are means \pm SEM (n=5 independent experiments); *p \leq 0.05 LPS+M2 vs LPS.

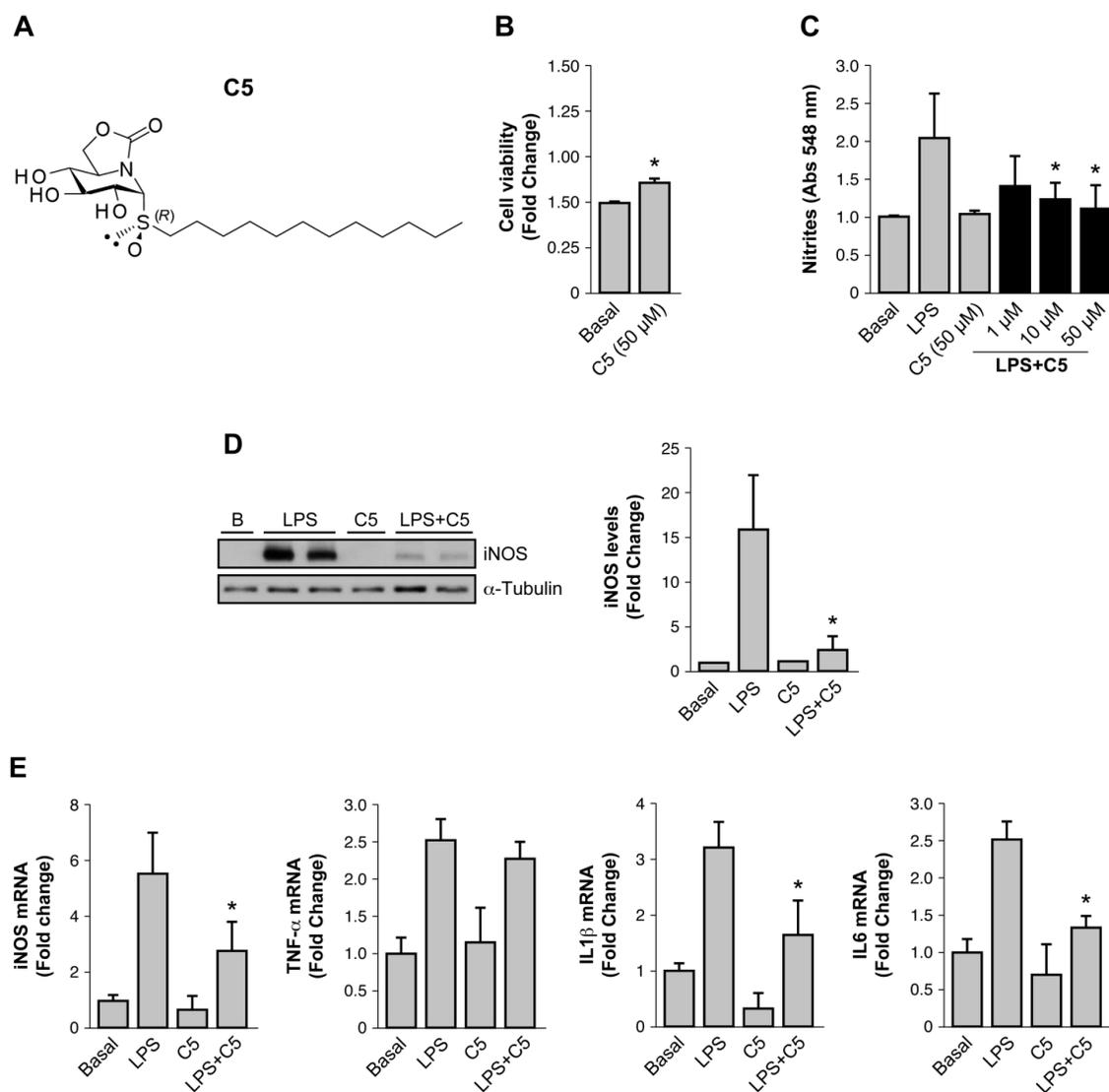


Figure 3. Sp²-iminosugar dodecylsulfoxide R-DS-ONJ (compound 5) prevented LPS-mediated effects in Bv-2 microglia cells and increased arginase-1 in retinal explants. Bv-2 cells were treated with LPS (200 ng/ml) in the absence or presence of (1*R*)-1-dodecylsulfinyl-5*N*,6*O*-oxomethylideneojirimycin (R-DS-ONJ, referred as C5 in the figures) at the indicated doses. A) Chemical structure of C5 compound. B) Crystal violet staining. C) Nitrites accumulation. D) Western blot for iNOS using α -Tubulin as a loading control. E) mRNA levels of TNF α , IL1 β , IL6 and iNOS. Results are expressed as $2^{-\Delta Ct}$. Results are means \pm SEM (n=5 independent experiments); *p \leq 0.05 LPS+R-DS-ONJ vs LPS.

3.2. M2 cytokines or *sp*²-iminosugar derivative *R-DS-ONJ* decreased the pro-inflammatory signaling pathways induced by LPS in Bv-2 cells

We also evaluated the impact of M2 cytokines or *R-DS-ONJ* in the early pro-inflammatory signaling pathways activated by LPS in Bv-2 cells. As Figure 4 shows, co-

treatment with M2 cytokines prevented LPS-mediated IκBα degradation, the phosphorylation of JNK, but this effect was less evident in the phosphorylation of p38 MAPK.

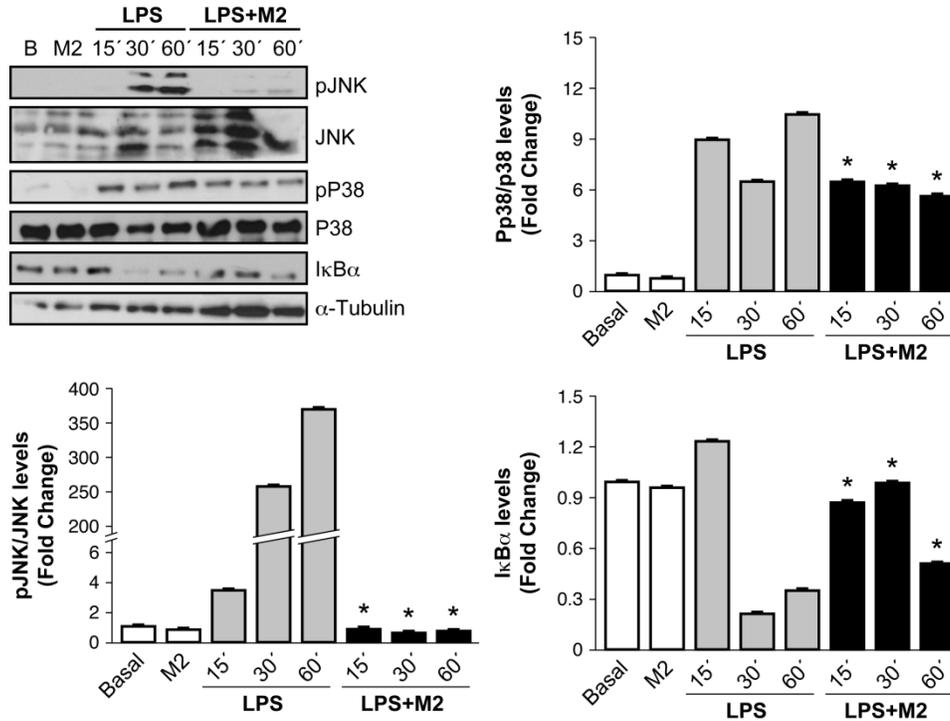


Figure 4. M2 cytokines decreased the pro-inflammatory signaling pathways induced by LPS in Bv-2 cells. Bv-2 cells were treated with LPS (200 ng/ml) in the absence or presence of IL4/IL13 (20 ng/ml each) for the indicated time-periods. Protein extracts (30 μg) were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot with antibodies against phospho-JNK, total JNK, phospho-p38 MAPK, total p38 MAPK and IκBα. α-tubulin was used as a loading control. Representative autoradiograms are shown (n=6 independent experiments). The blots were quantitated by scanning densitometry. The results are means ± SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni t-test; *p ≤ 0.05 LPS+M2 vs LPS.

The effect of *R-DS-ONJ* on the early proinflammatory signaling pathway induced by LPS in Bv-2 cells was also analyzed. Co-treatment with *R-DS-ONJ* prevented LPS-mediated IκBα degradation, the phosphorylation of JNK

and p38 MAPK (Figure 5A). As Figure 5B shows, the treatment with *R-DS-ONJ* in presence of LPS prevents from NFκB p65 translocation to the nucleus.

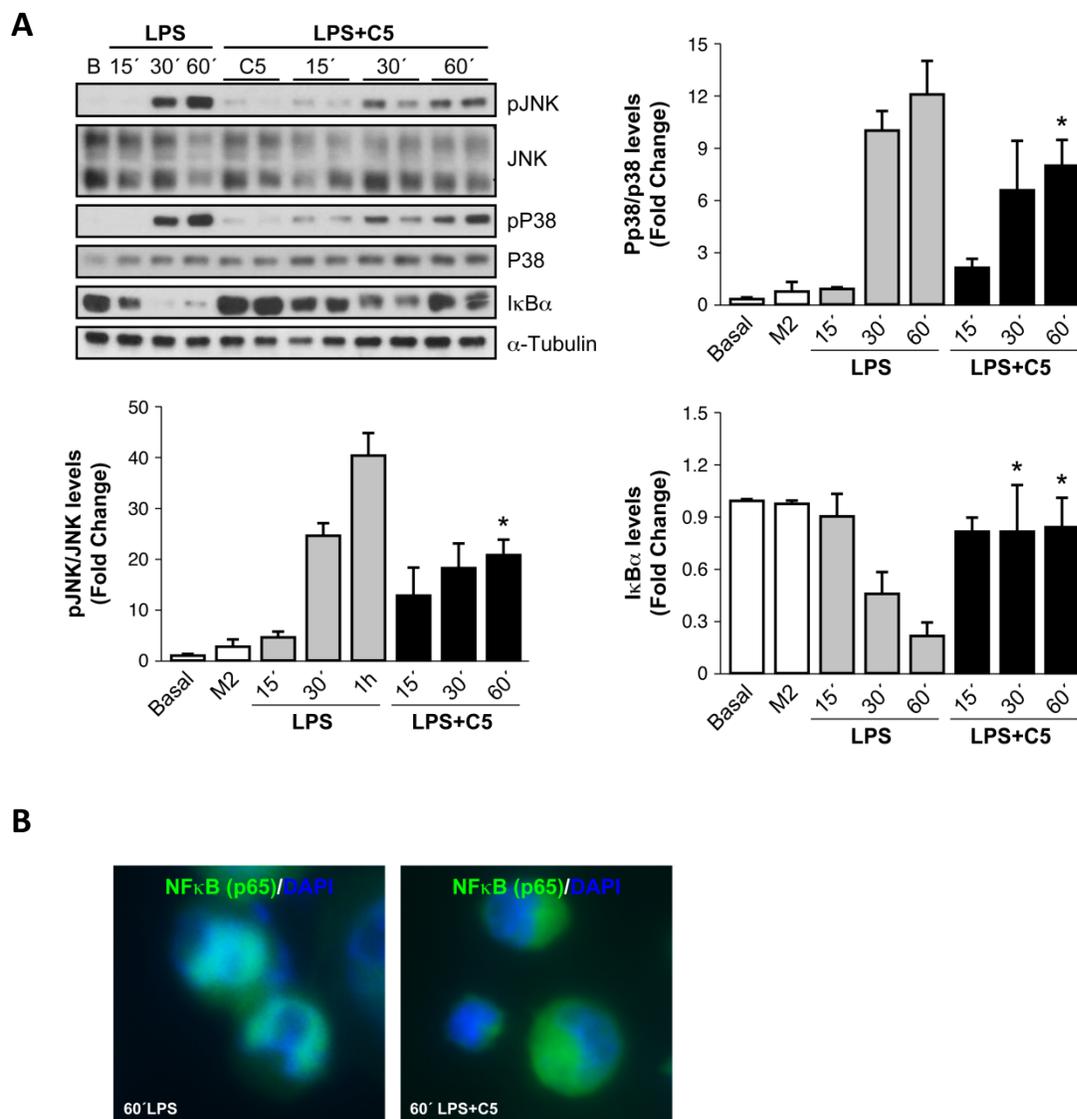


Figure 5. R-DS-ONJ decreased the pro-inflammatory signaling pathways induced by LPS in Bv-2 cells. Bv-2 cells were treated with LPS (200 ng/ml) in the absence or presence of R-DS-ONJ (50 μ M) for the indicated time-periods. A) Protein extracts (30 μ g) were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot with antibodies against phospho-JNK, total JNK, phospho-p38 MAPK, total p38 MAPK and I κ B α . α -Tubulin was used as a loading control. Representative autoradiograms are shown (n=6 independent experiments). The blots were quantified by scanning densitometry. The results are means \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni t-test; * $p \leq 0.05$ LPS+R-DS-ONJ vs LPS. B) Bv-2 cells treated for 60 min with LPS in the absence or presence of R-DS-ONJ were immunostained for p65 NF κ B (green) and counterstained with DAPI (blue). Representative images are shown.

3.3. Sp²-iminosugar derived R-DS-ONJ prevented gliosis and MI status associated to inflammation in retinas from db/db mice during DR

In order to determine the appropriate time-period in which to analyze the effect of Sp²-iminosugar derived R-DS-ONJ in retinal explants of db/db mice, we first study several parameters related to inflammation in circulation and in the retina in this mouse model.

During obesity, increased intestinal permeability leads to the leakage of bacterial products into the circulation that exacerbates the pro-inflammatory responses (27). Higher levels of serum endotoxin were detected in db/db mice at 5 weeks compared to age-matched db/+ controls (Figure 6A) and these differences were maintained up to 20 weeks.

Next, we evaluated the impact of the circulating endotoxemia on the inflammatory markers in the retina. Whereas in the retina of db/db mice iNOS mRNA and protein levels peaked at 5 weeks and remained elevated up to 8 weeks in comparison to age-matched db/+ controls, arginase-1 mRNA and protein levels increased at 5-6 weeks and returned to basal levels at 8 weeks. These data reflect the decrease in the anti-inflammatory profile of the retina in db/db mice during DR progression (Figure 6B).

The immunofluorescence analysis in retinal sections revealed iNOS specific immunostaining (green) in OS (outer segment), OPL (outer plexiform layer), INL (inner nuclear layer) and GCL (ganglion cell layer) at 5 and 8 weeks in db/db mice, being immunolabelling stronger at 8

weeks (Figure 6C).

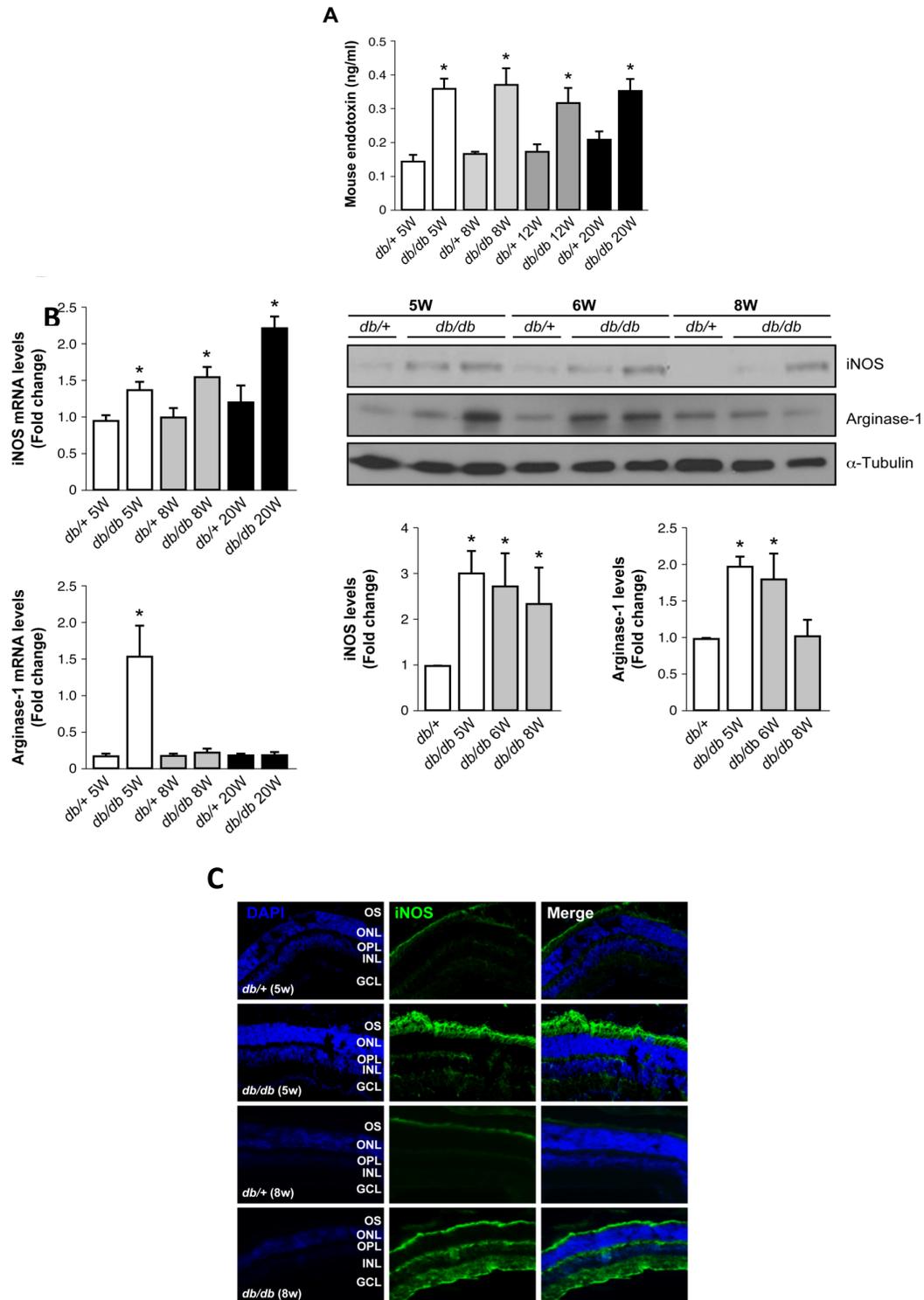


Figure 6. Circulating endotoxemia and pro-inflammatory cytokines during DR progression in *db/db* mice. A) Serum endotoxin in *db/db* and *db/+* mice at different ages. Results are means \pm SEM (n=5 retinas per condition). * $p \leq 0.05$ *db/db* vs *db/+* matched at each age. B) (left panel) M1 (iNOS) and M2 (arginase-1) mRNAs in *db/db* and *db/+* mice at 5, 8 and 20 weeks. Results are expressed as $2^{-\Delta Ct}$. (right panel) iNOS and arginase-1 protein levels in retinas from *db/db* and *db/+* mice analyzed by Western blot at the ages indicated. Results are means \pm SEM (n=5 retinas per condition). * $p \leq 0.05$ *db/db* vs *db/+* matched at each age. C) iNOS immunostaining (green) counterstained with DAPI (blue) (n=5 retinas per condition). Retinal layers are labelled as ONL (outer nuclear layer), OPL (outer plexiform layer), INL (inner nuclear layer), (IPL) inner plexiform layer and GCL (ganglion cell layer). At least 3 retinas and 4 non-adjacent sections per retina were analyzed for each experimental condition.

Based on these analysis of the inflammatory profile of the retina in *db/db* mice during DR progression, we performed the ex vivo analysis in retinal explants at 8 weeks of age. Retinal explants from 8 weeks old *db/+* and *db/db* mice treated for 24 h with R-DS-ONJ showed increased arginase-1 expression (M2 marker) compared to

their respective untreated retinas (Figure 7A). Moreover, reactive gliosis, which was already present in retinas from *db/db* mice at 8 weeks (28) was maintained in retinal explants and decreased by the treatment with R-DS-ONJ (Figure 7B).

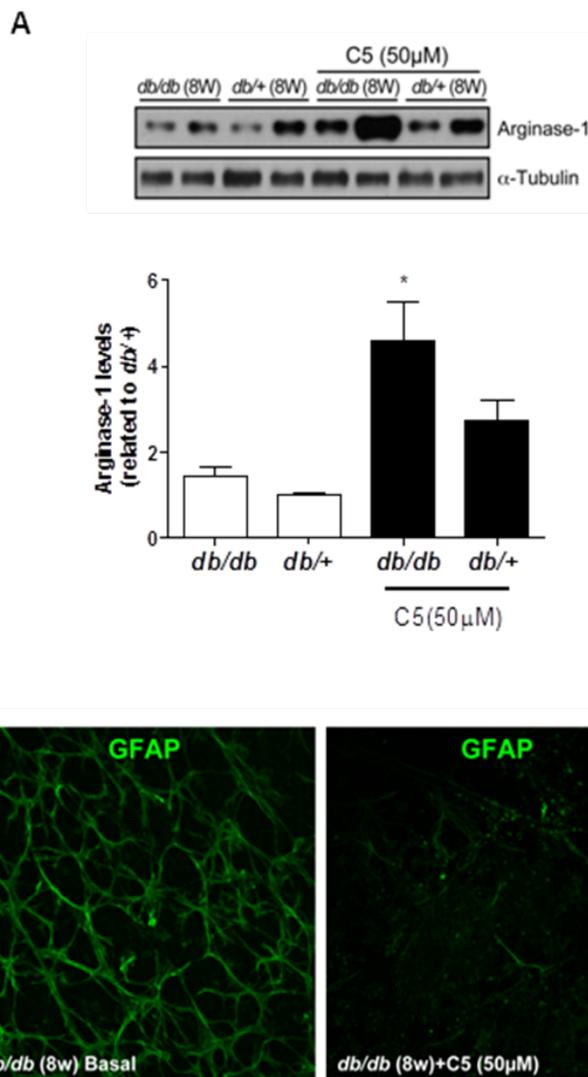


Figure 7. Retinal gliosis is detected in 8 weeks-old *db/db* mice. Retinal explants from 8 weeks old *db/+* and *db/db* mice were treated for 24 h with R-DS-ONJ. A) Western blot for arginase-1 (n=5 retinas per condition) G) Representative immunostaining for GFAP in whole retina.

4. DISCUSSION

T2D is considered a chronic low-grade systemic inflammatory disease characterized by changes in both the secretion of cytokines and the polarization of tissue-resident macrophages towards a M1 state (29-31) as demonstrated by the increased plasma levels of pro-inflammatory cytokines and C-reactive protein found in diabetic patients (32, 33). Among diabetic complications, DR is a multifactorial disease in which hyperglycaemia, inflammation and neuronal dysfunction are major factors involved in its etiopathology (34).

db/db mice recapitulate human DR progression and,

therefore, these mice have been extensively used to study relevant processes such as retinal vascular leakage and neurodegeneration, as well to test potential pharmacological approaches (20, 35). Herein we have used for the first time *db/db* mice to characterize the microglia polarization during DR in a systemic pro-inflammatory environment. Notably, at 5 weeks of age, systemic endotoxemia was detected in *db/db* mice, probably reflecting alterations in intestinal barrier permeability and gut microbiota at this early period (36, 37). Although circulating TNF α and IL6 are elevated in 5 weeks old *db/db* mice (results not shown), the local inflammation in the retina was not manifested at this age since mRNA

levels of pro-inflammatory cytokines remained similar as in age-matched *db+* lean mice. However, the analysis of M1/M2 markers in total retina revealed the coexistence of elevated iNOS (M1) and arginase-1 (M2) mRNA and protein levels only at an early stage of DR (5 weeks), both markers being localized mainly in the IPL, OPL and GCL where microglia was immunodetected. By contrast, in retinas of *db/db* mice at 8 weeks both the decrease in arginase-1 and the maintenance of high expression of iNOS paralleled the IL6 and TNF α mRNA levels. Taken together, these data indicate that in the retina of *db/db* mice the loss of the anti-inflammatory defense correlated with deterioration of the visual function in an age-dependent manner (20). Importantly, in retinas from *db/db* mice at 8 weeks treatment with R-DS-ONJ reduced GFAP immunostaining and also increased arginase-1, reflecting a regression towards an early stage of DR.

This study also provides new mechanistic insights in an *in vitro* bioassay that mimics the pro-inflammatory context of DR. We have used LPS as a pro-inflammatory stimulus in Bv-2 mouse microglia cell line since the M1 response of these cells resembles the *in vivo* situation in *db/db* mice in the course of DR. In Bv-2 microglial cells treated with LPS, the co-treatment with IL4/IL3 (M2 cytokines) or the sp²-iminoglycoside dodecylsulfoxide R-DS-ONJ ameliorated the M1 phenotype induced by endotoxemia, as reflected by decreases in iNOS, nitrites and reduction of expression/secretion of pro-inflammatory cytokines. At the molecular level, treatment with M2 cytokines or R-DS-ONJ decreased the early activation of stress kinases (JNK and p38 MAPK) (38), prevented I κ B α degradation and nuclear translocation of NF- κ B.

5. CONCLUSION

Our results have shown for the first time the dynamics of microglia polarization during DR evolution in *db/db* mice and strongly suggest that targeting neuroinflammation by switching microglia towards a M2 polarization state might be a therapeutic strategy to delay and/or prevent the deterioration of visual function in diabetic patients.

6. ABBREVIATIONS

CNS: Central Nervous System
 DR: Diabetic Retinopathy
 FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations
 GCL: Ganglion Cell Layer
 GFAP: Glial Fibrillar Acidic Protein
 I κ B α : Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells Inhibitor, alpha
 INL: Inner Nuclear Layer
 JNK: c-Jun N-terminal kinase
 LPS: Lipopolysaccharide
 mRNA: messenger Ribonucleic Acid
 OPL: Outer Plexiform Layer
 OS: Outer Segment

p38 MAPK: p38 Mitogen-activated Protein Kinase

qRT-PCR: quantitative Real-Time PCR

RNA: Ribonucleic Acid

RPE: Retinal Pigment Epithelium

SEM: Standar error of the Mean

7. CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

8. ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Drs EM. Sánchez-Fernández, C. Ortiz Mellet and JM. García Fernández (University of Sevilla, Spain) for supplying C5. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2015-65267-R and SAF2012-33283), Comunidad de Madrid S2010/BMD-2423 and S2010/BMD2439, Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERdem, Instituto Carlos III, Spain), European Union (EUROCONDOR (FP7 HEALTH.2011.2.4.3.1)).

9. REFERENCES

1. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care*. 2012;35(3):556-64.
2. Simo R, Hernandez C. Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence. *Progress in retinal and eye research*. 2015;48:160-80.
3. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*. 2011;30(5):343-58.
4. Abcouwer SF, Gardner TW. Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2014;1311:174-90.
5. Simo R, Hernandez C, European Consortium for the Early Treatment of Diabetic R. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2014;25(1):23-33.
6. Lynch JW. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):303-9.
7. Zeng HY, Green WR, Tso MO. Microglial activation in human diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*. 2008;126(2):227-32.
8. Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, et al. Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2005;54(5):1559-65.
9. Mantovani A, Garlanda C. Platelet-macrophage partnership in innate immunity and inflammation. *Nature immunology*. 2013;14(8):768-70.

10. Mosser DM, Zhang X. Activation of murine macrophages. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al]. 2008;Chapter 14:Unit 14.2.
11. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*. 2009;27:451-83.
12. Roquet A, Hallden G, Ihre E, Hed J, Zetterstrom O. Eosinophil activity markers in peripheral blood have high predictive value for bronchial hyperreactivity in patients with suspected mild asthma. *Allergy*. 1996;51(7):482-8.
13. Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye*. 2006;20(12):1366-9.
14. Hernandez C, Segura RM, Fonollosa A, Carrasco E, Francisco G, Simo R. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005;22(6):719-22.
15. Shi H, Zhang Z, Wang X, Li R, Hou W, Bi W, et al. Inhibition of autophagy induces IL-1beta release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;463(4):1071-6.
16. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences*. 2006;31(1):149-60.
17. Priestman DA, Platt FM, Dwek RA, Butters TD. Imino sugar therapy for type 1 Gaucher disease. *Glycobiology*. 2000;10(11):iv-vi.
18. Sanchez-Fernandez EM, Riquez-Cuadro R, Chasseraud M, Ahidouch A, Ortiz Mellet C, Ouadid-Ahidouch H, et al. Synthesis of N-, S-, and C-glycoside castanospermine analogues with selective neutral alpha-glucosidase inhibitory activity as antitumour agents. *Chemical communications*. 2010;46(29):5328-30.
19. Zhang L, Li R, Shi W, Liang X, Liu S, Ye Z, et al. NFAT2 inhibitor ameliorates diabetic nephropathy and podocyte injury in db/db mice. *British journal of pharmacology*. 2013;170(2):426-39.
20. Bogdanov P, Corraliza L, Villena JA, Carvalho AR, Garcia-Arumi J, Ramos D, et al. The db/db mouse: a useful model for the study of diabetic retinal neurodegeneration. *PloS one*. 2014;9(5):e97302.
21. Almeida JL, Hill CR, Cole KD. Mouse cell line authentication. *Cytotechnology*. 2014;66(1):133-47.
22. Arroba AI, Revuelta-Cervantes J, Menes L, Gonzalez-Rodriguez A, Pardo V, de la Villa P, et al. Loss of protein tyrosine phosphatase 1B increases IGF-I receptor tyrosine phosphorylation but does not rescue retinal defects in IRS2-deficient mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(6):4215-25.
23. Badisa RB, Tzakou O, Couladis M, Pilarinou E. Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. *Phytotherapy research : PTR*. 2003;17(5):472-6.
24. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*. 1982;126(1):131-8.
25. Arroba AI, Alvarez-Lindo N, van Rooijen N, de la Rosa EJ. Microglia-mediated IGF-I neuroprotection in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(12):9124-30.
26. Boutagy NE, Neilson AP, Osterberg KL, Smithson AT, Englund TR, Davy BM, et al. Short-term high-fat diet increases postprandial trimethylamine-N-oxide in humans. *Nutrition research*. 2015;35(10):858-64.
27. Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? *Biochimie*. 2016;124:11-20.
28. Arroba AI, Alcalde-Estevéz E, Garcia-Ramirez M, Cazzoni D, de la Villa P, Sanchez-Fernandez EM, et al. Modulation of microglia polarization dynamics during diabetic retinopathy in db/db mice. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1862(9):1663-74.
29. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*. 2010;72:219-46.
30. Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *International journal of obesity*. 2008;32 Suppl 7:S52-4.
31. Westcott DJ, Delproposito JB, Geletka LM, Wang T, Singer K, Saltiel AR, et al. MGL1 promotes adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating 7/4hi monocytes in obesity. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(13):3143-56.
32. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
33. Kim JK. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell metabolism*. 2006;4(6):417-9.
34. Gardiner TA, Canning P, Tipping N, Archer DB, Stitt AW. Abnormal Glycogen Storage by Retinal Neurons in Diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015;56(13):8008-18.
35. Jung E, Kim J, Kim CS, Kim SH, Cho MH. Gemigliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, inhibits retinal pericyte injury in db/db mice and retinal neovascularization in mice with ischemic retinopathy. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1852(12):2618-29.

36. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2007;292(2):G518-25.
37. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58(8):1091-103.
38. Traves PG, Pimentel-Santillana M, Rico D, Rodriguez N, Miethke T, Castrillo A, et al. Anti-inflammatory actions of acanthoic acid-related diterpenes involve activation of the PI3K p110gamma/delta subunits and inhibition of NF-kappaB. *Chemistry & biology*. 2014;21(8):955-66.



Clinical Pharmacy in the Genomic Era

Title in Spanish: *Farmacia clínica en la era del genoma*

Alain Li-Wan-Po¹

¹Centre for Evidence-Based Pharmacotherapy, Nottingham, United Kingdom NG9 3FD.

ABSTRACT: Over a century ago Gregor Mendel investigated quantitatively how physical traits of plants were passed on from one generation to the next. Soon after, William Bateson and Archibald Garrod showed the relevance of Mendel's findings to human disease. Pharmacists have throughout history marketed themselves as experts who could treat disease with specific medicines. Their claims were however poorly validated until Louis Pasteur and Robert Koch established the microbial aetiology of many diseases. Effective antimicrobial agents and immunotherapies soon became available for an expanding range of infections, and personalisation of treatment became possible through sensitivity testing. Later, a greater understanding of the molecular pathogenesis of non-microbial diseases led to the development of effective drugs, such as antihypertensives and anticoagulants. As a result, current pharmacopoeias bear no resemblance to their predecessors cluttered with predominantly useless drugs. With the unravelling of the double helical structure of DNA and greater understanding of its implications for health and disease, pharmacopoeias are being rewritten again. The new drugs enable an unprecedented level of individualisation of therapy. To optimise the promise of these drugs, input from a new generation of well-informed clinical pharmacists is needed. In this presentation, we identify some of these developments, and where input from pharmacists is most likely to be required. Will clinical pharmacists deliver?

RESUMEN: Hace más de un siglo Gregor Mendel investigó cuantitativamente cómo se transmitían los rasgos físicos de las plantas de una generación a la siguiente. Poco después, William Bateson y Archibald Garrod mostraron la relevancia de los hallazgos de Mendel en las enfermedades humanas. A lo largo de la historia, los farmacéuticos se han considerado como expertos que podían tratar la enfermedad con medicamentos específicos. Sin embargo, sus afirmaciones fueron mal validadas hasta que Louis Pasteur y Robert Koch establecieron la etiología microbiana de muchas enfermedades. Los agentes antimicrobianos eficaces y las inmunoterapias pronto estuvieron disponibles para un número de infecciones en expansión y la personalización del tratamiento se hizo posible a través de pruebas de sensibilidad. Posteriormente, una mayor comprensión de la patogénesis molecular de las enfermedades no microbianas condujo al desarrollo de fármacos eficaces, tales como antihipertensivos y anticoagulantes. Como resultado, las farmacopeas actuales no guardan ningún parecido con sus predecesoras llenas de drogas básicamente inútiles. Con la desintegración de la doble estructura helicoidal del ADN y una mayor comprensión de sus implicaciones para la salud y la enfermedad, las farmacopeas se están volviendo a escribir. Los nuevos fármacos permiten un nivel sin precedentes de individualización de la terapia. Para optimizar la promesa de estos fármacos, se necesita el aporte de una nueva generación de farmacéuticos clínicos bien informados. En esta presentación, identificamos algunos de estos desarrollos y el lugar en el que el papel de los farmacéuticos es más probable que sea necesario. ¿Cumplirán los farmacéuticos clínicos?

*Corresponding Author: alainliwanpo@yahoo.com.

Received: Mars 21, 2017 Accepted: Mars 22, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 1 (2017), pp. 93-100

Language of Manuscript: English

INTRODUCTION

I would like firstly to thank the President, Professor Mariano Esteban Rodriguez, and members of the Royal National Academy of Pharmacy, Instituto de España, for offering me the great honour of foreign membership. I am of course very thankful to Professor Alfonso Dominguez-

Gil for presenting my candidacy to your Academy. It is also with immense pleasure that I thank my great friend of many years, Professor Francisco Javier Burguillo for nominating me.

Historical accounts of the development of medicines often start with the Egyptian Ebers papyrus, the

application of the doctrine of signatures in Europe, or the pharmacopoeia of the Chinese Yellow Emperor. For this lecture, delivered in the grand city of Madrid at the kind invitation of the Spanish Royal Academy of Pharmaceutical Sciences, I would like to begin here. For it was the Jesuit Cardinal Juan de Lugo, a Madrilenian, trained at your famous University of Salamanca, only a few miles from here, who brought the first truly effective medicine, the first 'miracle' drug, to the attention of the old world while serving as the Director of the apothecary at the Santo Spirito Hospital in Rome. That medicine, the cinchona bark or quinine, has saved countless lives since those mid-seventeenth century days when Father Bartholmé Tafur, the Peruvian Jesuit brought a small stock from San Pablo for his Jesuit superior. As demand grew, a Spanish Royal Order was issued in 1751 for the establishment of a Royal monopoly for trading cinchona bark, with supplies located in the Royal Pharmacy here in Madrid.

There would not be another miracle medicine until the late nineteenth century although the therapeutic value of opium had been discovered centuries earlier, both in the East and West, and morphine was isolated as a pure medicinal chemical by Friedrich Sertürner in 1804 (1).

The age of modern synthetic medicines is perhaps best anchored to the late 19th century with heroin and aspirin, both derivatives of naturally-occurring molecules; morphine and salicin (the salicylic acid glucoside prodrug) respectively. However, compared to the next revolution, brought about by the Pasteur's and Koch's discovery and proof of the microbial basis of many of the most devastating diseases, those advances were modest in terms of lives saved though not necessarily of pain avoided.

THE BIRTH OF MODERN PERSONALISED MEDICINE

The medical and pharmaceutical professions have always claimed that their clinical practice was

personalised; the doctors that their diagnoses were specific and the pharmacists that their medicines were specifics. The emptiness of those claims have resonated down the centuries. Pasteur and Koch, and later Paul Ehrlich and Emil von Behring, established the methodology for validating such claims using the microscope and specific stains, and Behring's serum therapy against diphtheria was the first truly effective antibody therapy. Jenner had earlier, of course, developed the first vaccine which eventually eliminated smallpox worldwide on an empirical basis before the cause was identified.

VARIABILITY IN HUMAN RESPONSE

One of the great puzzles for the early non-charlatan physicians was the wide variability in their patients' responses to medicines. With the benefit of hindsight, some of the reasons are obvious: (i) natural variability in the chemical composition of plants (e.g. the variable pungency of Spanish chilies even of the same variety, and variation in the quality of wine, give some clear clues), (ii) misdiagnosis (e.g. of fevers), (iii) adulteration, deliberate or through ignorance, and (iv) variable dosing.

Paracelsus (2) knew of the importance of dosing, stating, 'All substances are poisons ... The right dose differentiates a poison and a remedy.' Arthur Koestler, the colourful writer, once imprisoned in Seville during the tumultuous period of your National history, knew after he failed in a suicide attempt. 'Trying to commit suicide is a gamble the outcome of which will be known to the gambler only if the attempt fails, but not if it succeeds,' he said when he tried again years later. Sadly, the dose and drug combination he chose did work that time, both for him and his wife in their double suicides.

If drug response is so variable, then it is obvious that personalizing their use would potentially improve therapy (Figure 1).

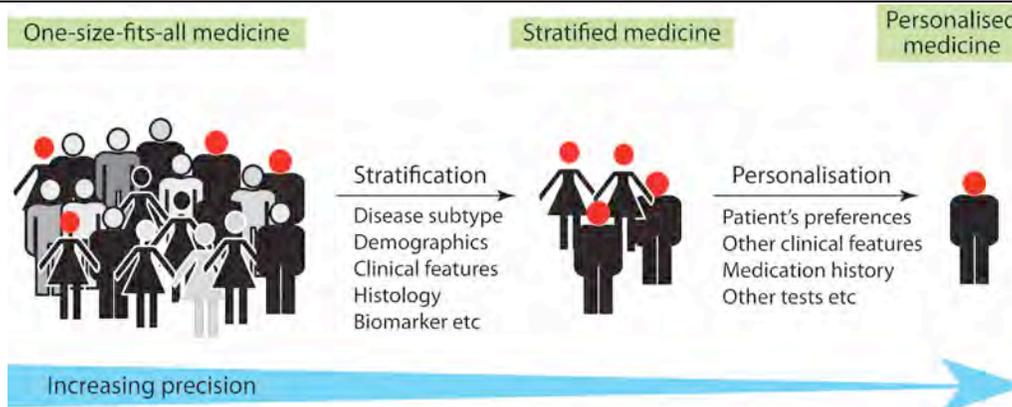


Figure 1 From one-size-fits-all to personalized therapy.

THE BIRTH OF PHARMACOGENETICS

Pharmacogenetics can be defined as the study of the impact of genetic variation on response to biologically active substances (pharmacocons). More generally, the term pharmacogenetics can be enlarged by substituting 'genetic

variation' with 'inheritance.' This extension is important as we inherit not only our genes from our parents but also our microbiome and our cultures, including our diet and our preferences, all of which may affect the action of the drugs we take.

Folklore ascribes the birth of pharmacogenetics to Pythagoras (3), the 6th to 5th century BC Greek philosopher, mathematician, and mystic because he forbade the eating of broad beans which causes haemolysis in some susceptible subjects. This causal association which was subsequently linked to an inborn deficiency in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) established him as the first pharmacogeneticist in the eyes of many.

Over two millennia later, the perceptive Charles Darwin recognised that adaptation contributed to wide variability in people's responses to toxins and that through natural selection different groups could develop different levels of resistance to toxins at the population level. However, Darwin found it difficult to provide a mechanism for inheritance. He theorized that when children are conceived, they inherit a blend of their parents' traits. Black and white would yield in-between shades of grey. He was unable to explain why blending did not continue until there was no more white or black.

The theory of numbers developed by Pythagoras and his followers would help resolve Darwin's dilemma. The sciences of numbers, they said, could be divided into two broad classes: numbers to describe how many (discrete mathematics) and numbers to describe how much (continuous mathematics). Pythagoras used continuous mathematics to describe music, and thereby also laid the foundation of harmonics.

It was with the use of discrete mathematics that Gregor Mendel generated the data for his Laws of Inheritance with his studies of the genetics of peas.

The discovery of monogenic diseases

Darwin was not aware of Mendel's work. In fact, even Mendel's contemporaries working on plant breeding did not immediately recognise the significance of Mendel's work. However, one biologist, William Bateson, working in Cambridge, soon recognised the wider significance of Mendel's discoveries.

Archibald Garrod, an astute London clinician inferred that alkaptonuria, a strange and rare condition characterised by the deep browning, and eventual blackening of urine, when exposed to air, was due to a metabolic abnormality that led to the accumulation of homogentisic acid (4). When he discussed this abnormality, which he established was an 'inborn error of metabolism,' with Bateson, the latter worked out that it was indeed a hereditary abnormality, and even more importantly that its inheritance followed Mendel's Law of segregation. Much of the genetics terminology that we use today owe their origins to Bateson (5). Over 6000 single-gene disorders are known and many, once fatal, are now manageable with recombinant replacement enzymes.

Although he was no pharmacogeneticist during his lifetime, with his development of the mathematical concepts that allowed Mendel's to develop his theory, Pythagoras has earned his place as one. What is discrete and what is continuous is of course often just an illusion as mathematicians studying wave mechanics have shown us.

Werner Heisenberg (6) showed us that there was much uncertainty in the observation of physical phenomena. We have come to realise that in pharmacogenetics, discrete units of inheritance can produce apparent Darwinian 'blending' when many genes contribute to a trait of interest, such as a drug response. Such traits are described as polygenic. Sometimes matters become more complicated and the traits are also affected by environmental influences as Darwin first surmised. Such traits are referred to as complex polygenic and multifactorial. Skin colour is an example but so are many drug responses. All pharmacists are of course aware of the potential clinical impact of drug-drug and drug-diet interactions.

Much of the early pharmacogenetics work focussed on adverse effects of drugs (7). These included excessive prolongation of the action of suxamethonium (8), and the haemolysis induced by antimalarial drugs, notably primaquine (9,10). The latter case brought us back to Pythagoras as the adverse effect was associated once again with G6PD dehydrogenase (11). Such adverse effects led Motulsky to observe:

'In discussions of drug idiosyncrasy, careful distinction should be made between toxic reactions caused by immunologic mechanisms (drug allergy) and abnormal reaction caused by exaggeration or diminution of the usual effect of a given dose. Although some progress has been made in the study of mechanisms of drug allergy, little was known until recently about the pathogenesis of hypersusceptibility reactions and hyposusceptibility reactions. Data are available now which suggest that reactions of this type may be caused by otherwise innocuous genetic traits or enzyme deficiencies' (12).

The genetic basis of several hypersensitivity reactions, previously referred to as idiosyncratic, is now well established (13,14).

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

The discovery of the importance of the cytochrome P450 enzymes in the biotransformation of drugs, led to an explosion of studies on the impact of variants of those enzymes on drug action. Those studies coincided with the development of analytical and mathematical methods for probing the disposition of drugs in the body; a field defined by the terms pharmacokinetics and bioavailability. Many members of the cytochrome P450 enzyme superfamily have been identified. Although there was much hope that identification of dysfunctional variants would help us to personalise therapy, in practice the value of such insights has been limited for many reasons, including the following four.

Firstly, our body, like the great city of Madrid or Barcelona, is complex; much more complex. There are many roads leading to and out of it. When one road is blocked, there is usually another road that one can use. So, when one metabolic pathway is blocked, the body uses another pathway to get rid of the drugs it receives.

Predicting the impact of an ineffective enzyme on a drug's action is difficult for a body that has evolved over millions of years. Secondly, the relationships between dose and blood level, and blood level and activity are complex. It is usually better to measure blood level than to predict it from the genetic variants, particularly for drugs with narrow therapeutic windows. That is why for drugs such as vancomycin and tacrolimus, therapeutic blood level monitoring is still the best optimizer. Thirdly, when a pharmacodynamic effect or biomarker of beneficial or adverse effect is measurable it is usually better to use it

than to go one step back to a defective genetic variant. That is why with warfarin, measuring blood clotting (INR; International Normalised Ratio) is better than using genetic algorithms. Well over one hundred studies have shown this. In any case, new drugs that are easier to use than warfarin are available. One day costs will come down to make them more affordable and perhaps make warfarin obsolete.

Fourth, the road from drug to action is long and winding. For example, over one hundred genes are said to be involved in the action and disposition of warfarin.

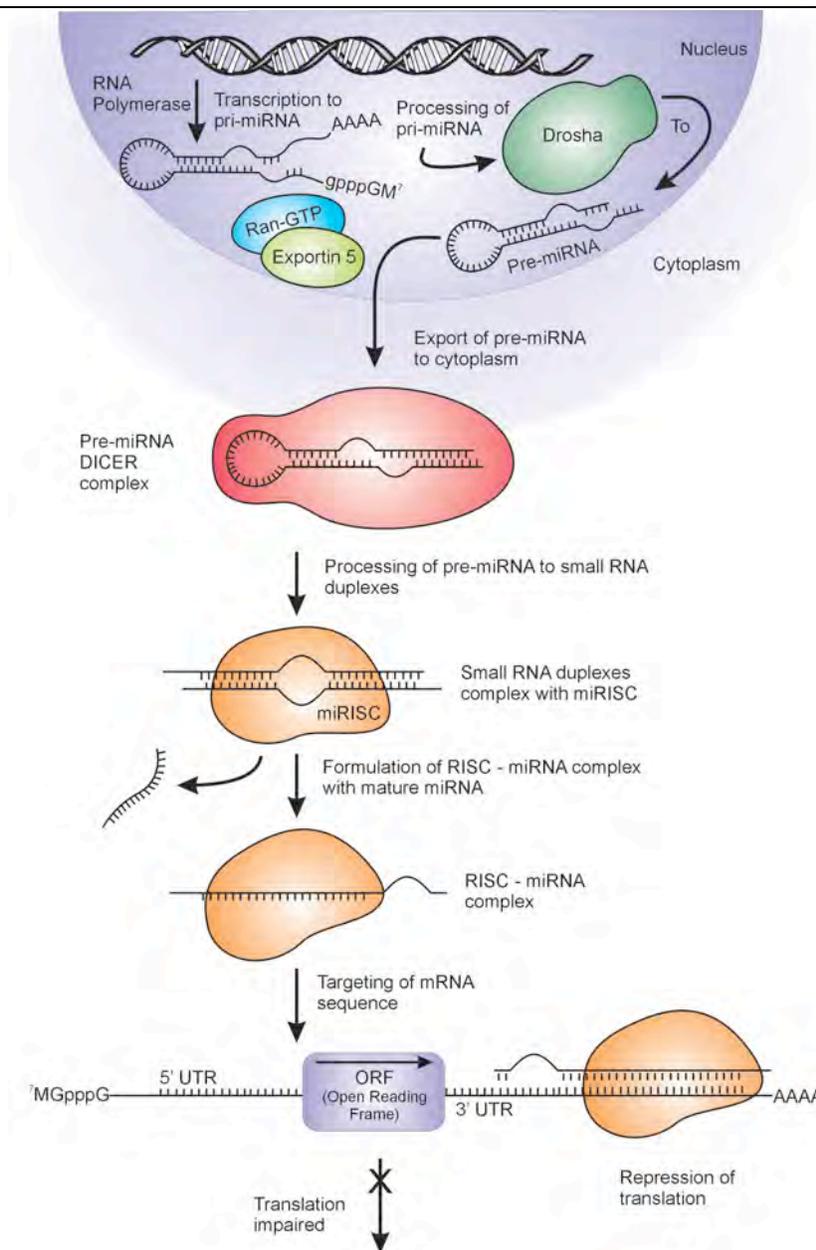


Figure 2. Processing and function of microRNAs.

EPIGENETICS AND AN EXPANDING RNA WORLD

The study of epigenesis, or the study of the functional impact of DNA modifications that do not involve any

change in DNA sequence, initially applied to the study of embryonic development, now provides considerable insight into the action of drugs, including drug resistance. We know now that the bases that make up DNA are often

modified to provide control for gene expression.

One of the greatest discoveries of recent years is that RNA molecules are not simply intermediates for translation to protein but that in their many different guises, they have many different functions in gene expression (15). MicroRNAs have attracted significant attention, and understanding their in-vivo processing (Figure 2) is leading to the development of new classes of medicines such as the oligos described below.

OUR IMMUNE SELF AND IMMUNOTHERAPY

Quite aside from the ageing process that makes us different with every passing day, we are also continuously shaped by our environment. To survive our body needs specialist cells that act as expert agents to recognise friend

from foe, and for this we have evolved an exquisitely effective immunological surveillance system over evolutionary time: An immediate response innate system that recognises enemies met over evolutionary time, and an adaptive system that remoulds itself quickly to recognise new enemies both from within (e.g. in the form of cancer cells), and from outside, in the form of new microorganisms and new aggressive variants of old organisms (e.g. Zika and Ebola viruses, and new strains of influenza viruses). Cancer can be regarded as a failure of the immune system. Our resident microorganisms (our microbiome; Figure 3) participate more closely in our immunological remoulding than we thought even as recently as two decades ago (16,17).

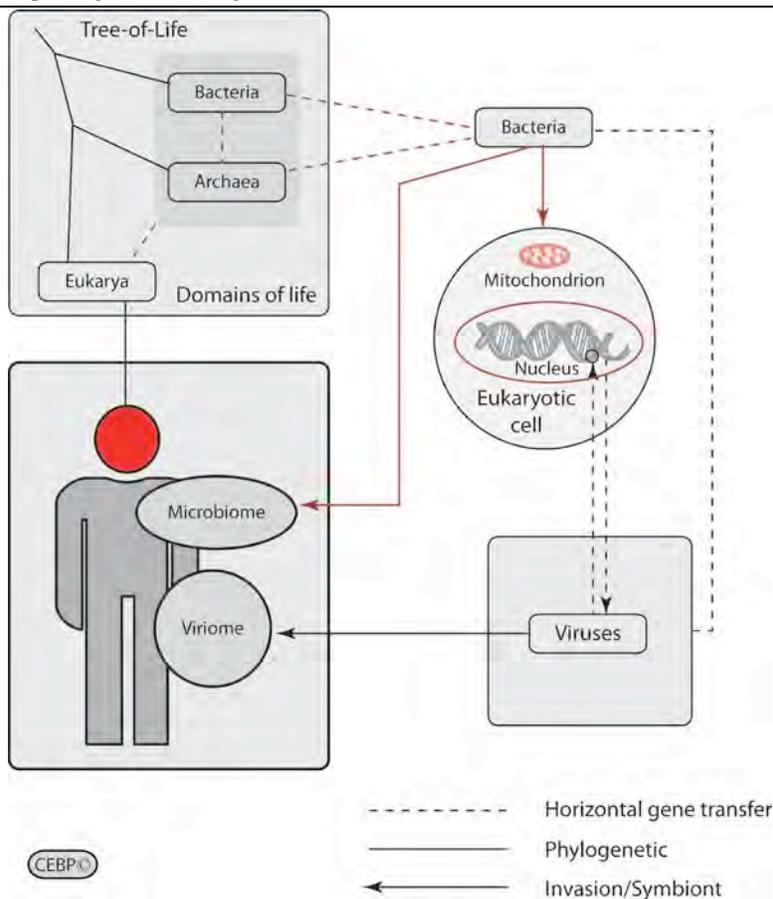


Figure 3. Tree of life.

From the new insights into our immunological system, Behring’s first serum therapy, or antibody therapy, against diphtheria has now expanded into a whole host of immunotherapies, not only against microorganisms but also against cells that have become renegade as cancer cells, and self-molecules that are misrecognised by our immune system as foreign, and molecules that cause atherosclerosis.

The nature of targeting

Drug targeting or drug delivery has been on the minds of drug developers ever since Ehrlich proposed his magic bullet theory of drug action (18). His approach was

structural modification of a lead compound to optimise the benefit-harm balance. Salvarsan his first magic bullet was compound 606 in the series he screened. This approach to drug screening is still current and has found new life in the repurposing of existing drugs. The second major approach to optimising drug delivery was through the development of sophisticated dosage forms such as osmotic pumps, transdermal patches. Depot injections, and liposomal systems. Both approaches contributed albeit modestly to the march of medicine towards better therapies.

With the unravelling of the double-helical structure of DNA and detailed understanding of the expression of genes to functional proteins, drug developers began to

dream of targeting DNA itself, first crudely and non-selectively with drugs that intercalated with or broke down DNA, but later more selectively at specific nucleotide sequences with short chains of nucleotides (oligonucleotides or oligos) (19,20). The road for oligos from the laboratory to the bedside has been a long and hard one but recent successes in the form of both licensed medicines (see below) and promising clinical reports suggest that the future may indeed be bright.

New therapies

From the greater insight into the phenomena which we have mentioned have emerged a whole host of new therapies that even Pasteur and Koch would have wondered at.

- (i) Small molecule targeted agents such as imatinib and gefitinib which have revolutionised the therapy of some cancers (21).
- (ii) Macromolecular agents such as tacrolimus which make possible long-term engraftment of organs sometimes using age-old approaches (22).
- (iii) Exquisitely specific antibodies that tame severe arthritis and skin diseases as well as various cancers.
- (iv) Epigenetic medicines that treat hitherto intractable disease and reverse drug resistance (23).
- (v) Medicines such as ivacaftor that chaperone defective receptor molecules to improve their function (24).
- (vi) Medicines such as bortezomib, a proteasome inhibitor that acts on protein processing and cell-death (25).
- (vii) Antiviral agents that can cure rather than only suppress (26).
- (viii) Gene therapies that have less severe off-target effects and prolong life meaningfully (27,28).
- (ix) Licensed antisense oligonucleotides such as eteplirsen and nusinersen that improve the production of functional proteins in severe muscular dystrophies (29,30).

FUTURE THERAPIES

Small molecules will no doubt continue to be important but will most likely be increasingly targeted. As such they may require companion diagnostics to optimise their use. Several such drugs are already on the market. Individualisation of therapy will require more pre-prescription testing but great care must be exercised so that unnecessary tests are not introduced (31,32).

We can perhaps also predict that macromolecular and cellular therapies will increase in importance in the form of a widening range of immunotherapies not only for treatment of disease but also for its prophylaxis.

The discovery of how to reprogram somatic cells to pluripotency led to hopes that regenerative medicine could

at last become reality (33). It was hoped that with the use of a patient's own cells (autologous), problems associated with immune rejection and poor engraftment could be overcome. However, clinical success has remained elusive (34) and the use of donor (allogenic) cells for induction might well be the better way forward. The history of the development of therapeutic monoclonal antibodies show us that persistence eventually pays off. Sales of such antibodies not exceed over 50 billion dollars annually (35). A recent report of regeneration of vision with surgical interventions that preserve endogenous stem or progenitor cells provides cause for optimism (36,37).

ROLE OF THE CLINICAL PHARMACIST

What then is the role of the clinical pharmacist in this new genomic era? Over four decades ago, the American Association of Colleges of Pharmacy, recognising the rapid changes taking place in pharmacy practice commissioned and published an influential report on the future of pharmacy. It recognised that despite *'the real and multifaceted differentiation in the practice roles of pharmacists, there is a common body of knowledge skill, attitudes and behaviour which all pharmacists must possess'* (38). *In redefining pharmacy, they called attention to three key elements: firstly, ready and comprehensive knowledge of drugs, their actions and use; secondly, competencies to serve; and thirdly service to meet both individual and societal needs.'*

I think that, by and large, these elements are still key. For this presentation, I draw attention to another of their main perceptions: *'a lack of an adequate number of clinical scientists who can relate their specialized scientific knowledge to the development of the practice skills required to provide effective, efficient and needed patient services.'* Although as we have indicated, what is a drug has expanded to include an array of immunotherapies and cellular therapies, the main challenge for schools and leaders of pharmacy is probably still the training of sufficient numbers of clinical scientists with expert knowledge of drugs.

It may be fitting to end my presentation with Paul Ehrlich's words, uttered over a century ago:

'..to allude to my quotation from Bacon, we no longer find ourselves lost on a boundless sea but we have already caught a distinct glimpse of the land which we hope, nay, which we expect, will yield rich treasures for biology and therapeutics' (39).

Many rich treasures have indeed been discovered. Many more will follow. However, the licensing of targeted agents now involves testing fewer subjects prior to marketing. As custodians of drugs, clinical pharmacists will no doubt wish to ponder on some more of Ehrlich's words:

'I have before me the records of over 9,000 cases. ... The primary object of these large numbers is to explore the possible dangers of the remedy, because nothing less than an accurate knowledge of these will provide a sound basis for the introduction of a new medicament into general

medical use. Indeed, it has often been demanded that in the treatment of man only such agents shall be used as are absolutely free from danger. Were one to yield to this demand, any progress of therapeutics, in a chemotherapeutic sense, would be altogether impossible; for substances which are capable of freeing the living body from an infection cannot be regarded as indifferent; there must rather be inherent in them a certain characteristic toxicity' (40).

The use of medicines always involves important trade-offs and clinical pharmacists may help their patients in better appreciating this.

Acknowledgments: The Figures are all taken from the author's *Genomic Medicine 101* (41).

REFERENCES

- Serturmer FW. Analyse de l'Opium. De la Morphine et de l'Acide méconique, considérés comme parties essentielles de l'opium. Annales de Chimie et de Physique 1817;5:23-41.
- Berdoe E. Paracelsus: the reformer of medicine. Edinburgh: Royal College of Physicians of Edinburgh; 1888.
- Farrington B. Greek Science and its meaning for us. London: Penguin Books; 1961.
- Garrod AE. A Contribution to the Study of Alkaptonuria. Med Chir Trans 1899;82:367-94.
- Bateson W. Mendel's principles of heredity. Cambridge: Cambridge University Press; 1909.
- Cassidy DC. Uncertainty. The life and science of Werner Heisenberg. New York: W.H. Freeman and Company; 1991.
- Kalow W. Pharmacogenetics Heredity and the response to drugs. Philadelphia: W.B. Saunders; 1962.
- Evans FT, Gray PW, Lehmann H, Silk E. Sensitivity to succinylcholine in relation to serum-cholinesterase. Lancet 1952;1:1229-30.
- Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. Science 1956;124:484-5.
- Alving AS, Kellermeyer RW, Tarlov A, Schrier S, Carson PE. Biochemical and genetic aspects of primaquine-sensitive hemolytic anemia. Ann Intern Med 1958;49:240-8.
- Tarlov AR, Brewer GJ, Carson PE, Alving AS. Primaquine sensitivity. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: an inborn error of metabolism of medical and biological significance. Arch Intern Med 1962;109:209-34.
- Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. J Am Med Assoc 1957;165:835-7.
- Mallal S, Phillips E, Carosi G, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. N Engl J Med 2008;358:568-79.
- Bell CC, Faulkner L, Martinsson K, et al. T-cells from HLA-B*57:01+ human subjects are activated with abacavir through two independent pathways and induce cell death by multiple mechanisms. Chem Res Toxicol 2013;26:759-66.
- Darnell J. RNA: Life's indispensable molecule. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011.
- Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. N Engl J Med 2016;375:2369-79.
- Maurice CF, Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. Cell 2013;152:39-50.
- Ehrlich P. Address in Pathology, On chemotherapy: Delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. Br Med J 1913;2:353-9.
- Weiss B. Antisense oligodeoxynucleotides and antisense RNA. Novel pharmacological and therapeutic agents. New York: CRC Press; 1997.
- Melton DA. Antisense RNA and DNA. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
- Druker BJ. David A. Karnofsky Award lecture. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. J Clin Oncol 2003;21:239s-45s.
- Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. The exploration of macrocycles for drug discovery--an underexploited structural class. Nat Rev Drug Discov 2008;7:608-24.
- Raynal NJ, Da Costa EM, Lee JT, et al. Repositioning Fda-Approved Drugs in Combination with Epigenetic Drugs to Reprogram Colon Cancer Epigenome. Mol Cancer Ther 2016.
- Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. N Engl J Med 2015;373:220-31.
- Adams J, Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). Cancer Invest 2004;22:304-11.
- Ward JW, Mermin JH. Simple, Effective, but Out of Reach? Public Health Implications of HCV Drugs. N Engl J Med 2015;373:2678-80.
- Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. N Engl J Med 2014;371:1994-2004.
- Booth C, Gaspar HB, Thrasher AJ. Treating Immunodeficiency through HSC Gene Therapy. Trends Mol Med 2016;22:317-27.
- Syed YY. Eteplirsen: First Global Approval. Drugs 2016;76:1699-704.
- Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. Lancet 2017;388:3017-26.
- Li-Wan-Po A. Pharmacogenetics begins to deliver on its promises. Bmj 2015;351:h5042.

32. Li-Wan-Po A, Farndon P, Cooley C, Lithgow J. When Is a Genetic Test Suitable for Prime Time? Predicting the Risk of Prostate Cancer as a Case-Example. *Public Health Genomics* 2009;13:55-62.
33. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
34. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 2016.
35. Udpa N, Million RP. Monoclonal antibody biosimilars. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:13-4.
36. Lin H, Ouyang H, Zhu J, et al. Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function. *Nature* 2016;531:323-8.
37. Lin H, Ouyang H, Zhu J, et al. Corrigendum: Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function. *Nature* 2016.
38. Millis JS. Pharmacists for the future. The report of the study commission on pharmacy Ann Arbor: The American Association of Colleges of Pharmacy; 1975.
39. Ehrlich P. On immunity with special reference to the cell life. In: Himmelweit F, ed. The collected papers of Paul Ehrlich. London: Pergamon Press; 1900:178-95.
40. Ehrlich P. Closing notes on the experimental chemotherapy of Spirillooses. In: Die experimentelle Chemotherapie der Spirilloesen. Ehrlich P, Hata S. Springer Berlin 1910. In: Himmelweit F, Marquardt M, Dale H, eds. The collected papers of Paul Ehrlich 1960. London: Pergamon Press; 1910:282-309.
41. Li-Wan-Po A. Genomic Medicine 101 Keynotes and Concepts. Nottingham: Centre for Evidence-Based Practice; 2014.



¿Se puede curar la vejez? ¿Cómo se puede mantener la juventud? Sesión científica celebrada el 1 de diciembre de 2016



María Cascales Angosto
Coordinadora de la sesión
Sesión celebrada el 1 de diciembre de 2016
e-mail: cascales1934@gmail.com

ORDEN DEL DÍA

Introducción:

Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto
Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia

Ponentes:

“La ciencia reta al envejecimiento: hacia un futuro sin enfermedad”

Dra. María Blasco
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

“Edad cronológica y edad biológica”

Dra. Mónica de la Fuente
Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre de Madrid

“Envejecimiento y reprogramación epigenética”

Dr. Manel Esteller Badosa
Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL)

“El sistema de regulación celular del envejecimiento”

Dr. Gustavo Barja
Departamento de Fisiología Animal-II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid

Introducción

María Cascales Agosto

La respuesta socio-económica y sanitaria al rápido envejecimiento demográfico, supone uno de los grandes desafíos del siglo XXI. La esperanza de vida, que en España ha aumentado en el siglo XX desde los 40 hasta más de los 80 años, es un fenómeno que no se puede detener, que afecta a la mayoría de países y que trae consigo un aumento progresivo de la población con más edad. Se calcula que en 2050 la población con más de 80 años superará los 400 millones, lo que traerá consigo enormes problemas para la sociedad. Para paliar estos problemas están surgiendo estudios para retrasar o revertir el fenotipo senescente. Así, un conocido gerontólogo británico, propone siete estrategias para superar la vejez. También el alargamiento de los telómeros así como la tan recomendada restricción calórica, dan las pautas para conseguir una vejez saludable y con la mejor calidad de vida. Por último, estudios en modelos de parabiosis están consiguiendo demostrar que existen factores sistémicos que nos pueden rejuvenecer.

HACIA DÓNDE VAMOS

Cómo «curar» las enfermedades asociadas a la vejez. Cómo detener los achaques del envejecimiento, que causan un grave problema social y familiar. Cómo aumentar los años de vida saludable

El REJUVENECIMIENTO es un tema que aparece cada día en los medios, noticias en la red, prensa Radio y TV, y así nos encontramos con una gran cantidad de información entre la que voy a citar unos cuantos ejemplos:

- *Longevity and evolution*, libro escrito recientemente por Gustavo Barja de Quiroga
- *Morir Joven a los 140 años*, libro publicado por María Blasco que salió a la luz el pasado mes de abril
- *El Dr Esteller* en una reciente entrevista que he encontrado en la red nos confirma que morimos con el mismo DNA con el que nacemos y que las enfermedades de la vejez tienen un componente epigenético que se puede revertir.
- *Vyss Coray* de la Universidad de Stanford, en la conferencia que pronunció en junio de este año, en la Fundación Severo Ochoa en la UAM, habló de la existencia de factores sistémicos responsables del rejuvenecimiento, que ya están siendo una realidad... por último
- **CALICO** (California Life company) ahora Alphabet es una empresa biotecnológica creada por Google en 2013 con un objetivo claro: luchar contra el **envejecimiento** humano, y en última instancia, “curar” la **muerte**. Calico ya ha presentado un fármaco experimental P7C3 potenciador de la nicotinamido fosforibosil transferasa, que biosintetiza el [nicotinamido adenina dinucleótido](#). P7C3 y se ha demostrado beneficioso en modelos animales de neurodegeneración.

Toda esta información y más, nos lleva a considerar que lo que buscamos es frenar y detener la vejez, única forma de conseguir una verdadera calidad de vida eliminando las enfermedades degenerativas. Sabemos que existen factores en la célula que señalizan para el envejecimiento. Si los eliminamos, cosa que se está logrando ¿No estamos acercándonos a la idea de la eterna Juventud?

¿Qué soluciones podemos aportar hoy?

- **Terapia génica:** este es un tema muy discutido, aunque ya hay un caso aislado con resultados comprobados, el de Liz Parrish estadounidense que se ha inyectado el gen de la telomerasa y el de la folistatina. En un reciente reportaje ella misma confirma su satisfacción ante el alargamiento de sus telómeros, con lo que ha conseguido rejuvenecer 20 años.

- **Restricción calórica de la dieta:** Comprobada en levaduras, gusanos y ratones y prueba de ello son los habitantes de Okinawa quienes siguen a pie juntillas el principio de Confucio de “evitar comer hasta saciarse”, y con una dieta de frutas, verduras, hierbas, té, algas y pescado, poca carne y nada de leche ni azúcar, han conseguido tener más centenarios con calidad de vida que en ninguna otra parte del mundo

- **Factores sistémicos:** Se sabe que las células madre no envejecen, lo que envejece es el medio ambiente que las rodea. Este tema apasionante está en estudio ya con algún resultado positivo

Además de todo lo dicho, hay otro hecho evidente: cada persona envejece a un ritmo diferente, es decir cada uno tiene su edad biológica que puede coincidir o no con su edad cronológica.

Mónica de la Fuente ha desarrollado análisis que determinan parámetros del sistema inmune que nos indican cómo va nuestro envejecimiento. Esta es otra realidad más

Ante estas investigaciones de tanta repercusión en la población a la que pertenecemos, la Real Academia Nacional de Farmacia se ha hecho eco de este problema que considera del mayor interés científico, sanitario, social y familiar, y hoy traemos a esta Sesión Científica cuatro primeras figuras que nos van a poner al día de diferentes aspectos de cómo Rejuvenecer y controlar la vejez.

Termino esta breve introducción con mi agradecimiento a los cuatro ponentes que escucharemos a continuación, mi agradecimiento también a los alumnos de nuestras facultades, los profesionales de mañana, hoy muy jóvenes, que han tenido la generosidad de asistir y engalanar con su presencia esta sala. Muchas gracias a todos.

La ciencia reta al envejecimiento: hacia un futuro sin enfermedad

María Blasco

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

Corresponding Author: mblasco@cniio.es

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 1 (2017), pp. 103-105

INTRODUCCIÓN

La pregunta que me he hecho a lo largo mi vida científica, es una pregunta bastante simple. De hecho, estoy segura que ustedes también se han hecho esta misma pregunta muchas veces, incluso cuando eran niños o niñas... ¿Por qué somos mortales? ¿Por qué es nuestra vida finita? ¿Por qué la duración de la vida es una y no otra? En definitiva... ¿Por qué crecemos, envejecemos y morimos? ¿Qué leyes de la biología determinan eso? ¿Por qué enfermamos?... y si lo averiguamos... ¿Podríamos erradicar las enfermedades? Y si erradicamos las enfermedades... ¿Sería posible vivir más?

Estas son las preguntas a la que he dedicado mi vida científica.

Los griegos ya se hacían estas mismas preguntas, y tenían un mito muy bien pensado para explicar la mortalidad de los humanos, permítanme que lo relate:

La **Parcas** eran tres hermanas hilanderas llamadas **Cloto**, **Láquesis** y **Átropos**. Eran las que regulaban la duración de la vida de los mortales, desde el nacimiento hasta la muerte. Esto lo hacían con ayuda de un hilo que la primera hilaba con una rueca, la segunda enrollaba y medía, y la tercera cortaba sin previo aviso terminando con la existencia del correspondiente individuo. **Así, la longitud de este hilo determinaba la vida de cada mortal**. De esta manera, estas criaturas mitológicas y sobrehumanas dictaban la longevidad humana. Según el mito, poco se podía hacer al respecto, era el destino, y había que asumirlo. Y creo que, 2000 años después, aun queda algo de ese mito, y aun asumimos que hay un destino sobrehumano e ineludible (llámenlo leyes naturales si quieren): aún asumimos que un día nos tocará irnos de este mundo, seguramente sin previo aviso, y que poco podremos hacer para evitarlo.

Sin embargo, frente a esa resignación, fueron también los griegos, quienes desafiaron a los dioses, a las leyes naturales, y con ello escribieron algunas de las primeras líneas de la historia de la ciencia y de la medicina. La primera autopsia documentada se realizó en el año 300 ac en Alejandría y así se averiguó que la muerte tiene una causa fisiológica, no es un designio divino ni una ley natural inalterable. Posteriormente, el medico griego Galeno correlacionó lo encontrado en la autopsia con los síntomas que mostraban los pacientes antes de morir. Morimos porque hay enfermedades. Y así, gracias las autopsias, los griegos describieron muchas enfermedades, como por ejemplo, el cáncer (que se llamó *karkinoma* en Griego, por la similitud de su crecimiento con las patas de

un cangrejo). Pero además de aprender que las **Parcas** no eran las que decidían la muerte, se abría la posibilidad de intervenir, de cambiar las cosas: si la muerte no es un designio divino, si hay una causa fisiológica identificada y eso causa las enfermedades, entonces podremos intentar evitarla, o al menos podremos intentar curar las enfermedades antes de que nos maten.

Y en ello estamos. Más de 2000 años después de aquella primera autopsia con la que los humanos retamos a dioses, y a las leyes naturales, hemos avanzado muchísimo, y conocemos mucho de las enfermedades. Un ejemplo de éxito son las enfermedades infecciosas, algunas de las cuales hemos conseguido hasta erradicar (viruela) y otras podemos controlar. Esto ha sido posible gracias a que, primero hemos descubierto los gérmenes que las causan, y después hemos conseguido neutralizar o matar esos gérmenes. Un éxito reciente ha sido el SIDA, una enfermedad que mataba a las personas infectadas en menos de dos años y que hoy en día es crónica. De hecho, tenemos una cierta tranquilidad de que, aunque aparezcan gérmenes nuevos en el futuro, sabemos que el camino es primero identificarlos y después matarlos. El controlar las enfermedades infecciosas ha hecho que la esperanza de vida al nacimiento se haya duplicado desde principios del siglo XX.

Sin embargo, 2000 años después, aun no hemos sido capaces de acabar con las grandes enfermedades de nuestra sociedad, aquellas que no son enfermedades infecciosas, y que hoy en día son la primera causa de muerte en los países desarrollados. El cáncer, el infarto, el Alzheimer, nos siguen matando prematuramente. Sabemos que el camino para acabar con ellas es identificar su germen, su causa, y así poder prevenirlas, curarlas cuando aparezcan, e incluso poder erradicarlas. Pero ¿Cuál es su germen? Sabemos que el germen es el proceso mismo del envejecimiento del organismo. En definitiva, es el hecho de nacemos, crecemos, envejecemos y morimos. ¿Podemos retar esa ley natural? ¿Será por eso por lo que aún no hemos conseguido acabar con ellas? Conseguirlo implicaría controlar nuestro propio destino biológico.

El físico y premio Nobel Richard Feynman dijo: *“No se ha encontrado aún nada en la biología que indique la inevitabilidad de la muerte. Esto sugiere que no es algo inevitable, y que es sólo cuestión de tiempo hasta que los biólogos descubran que es lo que la causa, y entonces, esa enfermedad universal y terrible, la temporalidad del cuerpo humano, será curada”*.

La temporalidad del cuerpo humano... entenderla es a

lo que he dedicado mi vida científica. Me he dedicado a tratar de entender las causas moleculares de por qué envejecemos, ya que es el envejecimiento en sí mismo, la causa de la mayor parte de las enfermedades que afectan a nuestra sociedad. Algunos científicos, entre los cuales me incluyo, pensamos que cáncer y Alzheimer tienen el mismo origen molecular, que es este proceso de envejecimiento. De acuerdo con esta idea, hoy sabemos que las enfermedades no aparecen de un día para otro, cual Parca cortando el hilo de la vida caprichosamente, sino que se inician y desarrollan en nuestro organismo durante décadas antes de que se diagnostiquen como tales. También pensamos que si no envejeciéramos, si fuéramos capaces de ser eternamente jóvenes, sería muy raro que sufriéramos estas enfermedades. Y claro, si fuésemos siempre jóvenes y no enfermáramos, seguramente también viviríamos mucho más...se alargaría indefinidamente ese hilo de las Parcas, que sólo se podría cortar de manera accidental, quizás con un nuevo germen infeccioso contra el cual aún no tenemos terapias, o de muerte accidental...

En mi grupo hemos estado estudiando ese hilo de la vida de las Parcas, que no es otra cosa que una hebra molecular, una hebra hecha del ácido desoxirribonucleico o ADN. El ADN es la hebra de la vida. Si extendiéramos el ADN de una célula - y piensen que estamos formados por unos unos 37 trillones de células- éste mediría unos 2 metros. El ADN tiene codificada toda la información necesaria para la vida. Al final de esta hebra, justo en los extremos, hay una estructura especial llamada telómero, es especial por que al igual que Átropos se va acortando conforme vivimos. Ahora sabemos que la velocidad a la cual se acorta esta hebra, el telómero, está determinada por los genes, pero también por como vivimos, por lo que comemos, por si fumamos o no fumamos, por si hacemos o no ejercicio, y también por la buena o mala suerte que hemos tenido, incluso el estrés puede hacer que los telómeros se acorten más rápido de lo normal.

En mi grupo hemos demostrado que la erosión de los telómeros, es una de las causas principales del proceso de envejecimiento celular y de enfermedad, incluido el cáncer. Esto lo hemos demostrado aislando en mamíferos una máquina molecular (un enzima) que es capaz de rejuvenecer los telómeros, la llamada telomerasa (que vendría a ser como las Parcas hiladoras Cloto y Láquesis), y que fue originalmente descubierta por la que fue mi mentora, Carol W. Greider, y por su mentora, Elizabeth Blackburn, y que por ello recibieron el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2009 junto con Jack Szostak. El aislamiento de los genes de la telomerasa, en el que tuve la suerte de participar, nos ha permitido generar modelos animales donde hemos disminuido o aumentado la telomerasa. A menos telomerasa, hemos visto que los telómeros son más cortos y que se producen las enfermedades de manera prematura, y a más telomerasa los telómeros son más largos y hemos conseguido que se retrase la aparición de muchas enfermedades a la vez, en ratones. Y con ello, hemos conseguido que los ratones vivan sanos hasta un 40 % más. Que sería como si

consiguiéramos que la mayor parte de los humanos alcanzáramos a los 115-120 años en buen estado de salud.

Aquí me gustaría hacer un inciso sobre la necesidad de innovar, de trasladar los descubrimientos básicos a aplicaciones. Los científicos no somos unos seres despistados que estamos al margen del mundo y de las necesidades humanas. No vivimos de espaldas a la innovación, de hecho, estamos ávidos de poder tener el apoyo necesario para poder trasladar nuestros descubrimientos a aplicaciones, ya que para un científico, no hay nada más gratificante que el ver que sus descubrimientos pueden tener un impacto en la sociedad.

En mi grupo, hemos trasladado algunos de nuestros descubrimientos sobre los telómeros y la telomerasa al desarrollo de biomarcadores de este proceso de envejecimiento, así los llamados test teloméricos nos permiten detectar a los individuos que tienen un proceso de envejecimiento acelerado, con el fin de detectar a tiempo o quizás también en el futuro de prevenir enfermedades. Además, estamos probando el potencial de usar la telomerasa como tratamiento para la prevención y tratamiento de distintas enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento en modelos de ratón, entre ellas la enfermedad cardiovascular, distintos tipos de fibrosis, y enfermedades neurodegenerativas. Quien sabe, quizás en un futuro no tan lejano podríamos evitar muchas enfermedades, y conseguir vivir más y mejor.

En el caso del cáncer, aunque también es una enfermedad asociada al envejecimiento, sin embargo, se da un fenómeno único, que no ocurre en otras enfermedades del envejecimiento. El cáncer es especial. Las células del cáncer despiertan a la telomerasa de manera aberrante y así consiguen la inmortalidad. Por ello en el caso del cáncer, lo que estamos haciendo es intentar destruir sus telómeros, tal tijera de Átropos, para hacerlo envejecer y morir.

¿Cuál es entonces el objetivo final?

No queremos ser inmortales como el cáncer, que perpetua la existencia de células dañadas que nos acaban matando... lo que nos gustaría es ser eternamente jóvenes y no enfermar...

Y para esa diferencia entre inmortalidad y ser eternamente jóvenes también hay un ilustrativo mito griego.

Titón era un mortal hijo del rey de [Troya](#), era muy bello, y la diosa [Aurora](#) se enamoró de él. Para poder estar siempre con él, Aurora pidió a [Zeus](#) que concediera la [inmortalidad](#) a Titón, y Zeus se lo concedió. Pero a la diosa se le olvidó pedir también la juventud eterna, de modo que Titón fue haciéndose cada vez más viejo y arrugado hasta que se convirtió en un grillo.

Hoy en día, quizás los humanos somos un poco como Titón, conseguimos vivir cada vez más años pero seguimos envejeciendo, de tal modo que cada vez estamos más viejos y tenemos más enfermedades. Lo que tendríamos que conseguir es alargar la juventud y de este modo viviríamos sanos durante más tiempo y habría menos enfermedades: eso es lo que hemos visto que pasa

en los ratones a los que alargamos los telómeros con telomerasa, no es que vivan más tiempo estando viejos, sino que lo que hacemos es aumentar la juventud y evitar las enfermedades, y por ello viven más.

Edad cronológica y edad biológica

Mónica de la Fuente

Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

ABSTRACT: Chronological age is not always coincident with biological age, a concept established to assess, after reaching adulthood, the speed at which the aging process is carried out, the longest period in human life and which determines the longevity of each individual. The need to have markers that determine that biological age has been a challenge for years. Our group has verified how certain functions of immune cells are not only important health indicators, also biological age and predictors of longevity. The cause of the changes that the immune system undergoes in aging, which constitutes the immunosenescence, is the same that affects to the other systems of the organism, an oxidative stress, that takes place together with an inflammatory stress. The theory of oxidation-inflammation of aging, proposed by us, in addition to suggesting that fact contemplates the implication of the immune system in the speed at which each individual ages. It has been proven that subjects who achieve great longevity, such as centenarians, have leukocytes with less oxidation and inflammation and work better than those of seventy. On the other hand, those adult subjects who have more oxidized leukocytes, present premature immunosenescence and show a shorter life expectancy. A series of lifestyle strategies (nutrition, exercise, social relationships, etc.) are proposed to improve redox status and immune function and consequently achieve greater longevity.

RESUMEN: La edad cronológica no es siempre coincidente con la edad biológica, concepto establecido para valorar, tras alcanzar la edad adulta, la velocidad a la que se lleva a cabo el proceso de envejecimiento, el periodo más largo en la vida del ser humano y que determina la longevidad de cada individuo. La necesidad de tener marcadores que determinen esa edad biológica ha sido un reto desde hace años. Nuestro grupo ha comprobado como determinadas funciones de las células inmunitarias no sólo son importantes indicadores de salud, también de edad biológica y predictores de longevidad. La causa de los cambios que sufre el sistema inmunitario al envejecer, lo que constituye la inmunosenescencia, es la misma que afecta a los otros sistemas del organismo, un estrés oxidativo, que tiene lugar conjuntamente con un estrés inflamatorio. La teoría de la oxidación-inflamación del envejecimiento, propuesta por nosotros, además de sugerir ese hecho contempla la implicación del sistema inmunitario en la velocidad a la que cada individuo envejece. Se ha comprobado que los sujetos que alcanzan gran longevidad, como los centenarios, tienen unos leucocitos con menor oxidación e inflamación y funcionan mejor que los de personas de setenta. Por su parte aquellos sujetos adultos que tienen leucocitos más oxidados, presentan prematura inmunosenescencia y muestran una esperanza de vida menor. Se proponen una serie de estrategias de estilo de vida (nutrición, ejercicio, relaciones sociales,..) para mejorar el estado redox y la función inmunitaria y consecuentemente alcanzar una mayor longevidad saludable.

Corresponding Author: mondelaf@bio.ucm.es

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 1 (2017), pp. 106-115

LOS PROBLEMAS DE LA ELEVADA EDAD CRONOLÓGICA

La edad cronológica la podemos definir como el tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo. De todas las etapas que constituyen esa edad nos vamos a centrar en la del envejecimiento, esto es el periodo comprendido desde la edad adulta hasta el final de la vida. En el ser humano esta fase tiene gran relevancia por lo que representa demográficamente y biológicamente, y además supone el periodo más largo de nuestra existencia.

Demográficamente el número de personas que superan los 65 años está aumentando considerablemente en muchos países y de forma especial en España. Así, en 2011 suponía el 17,3 % de la población y para el 2021 será el 20,6 %. Si el aumento del número de personas mayores de 65 ha sido espectacular en los últimos años, más lo es y será el de los mayores de 80 años. Esto, junto con la

disminución del número de nacimientos hace que la pirámide de la población de España sea de forma de bulbo, esto es, la denominada “regresiva”.

Biológicamente podemos definir el envejecimiento como “la disminución progresiva y generalizada de la función del organismo, con un estado de menor adaptación al cambio y con una disminuida capacidad para restaurar la homeostasis”. Si el mantenimiento de la homeostasis es la base de la salud, se entiende que al envejecer se tenga peor salud y aumente del riesgo de morbilidad y mortalidad, lo cual no quiere decir que el envejecimiento sea una enfermedad. No lo es. Es un proceso biológico natural, pero por sus características las personas van percibiendo una peor salud al avanzar la edad.

Dado que el proceso de envejecimiento empieza al terminar el desarrollo y alcanzar la edad reproductora, esto es, en la edad adulta, y finaliza con la muerte del

individuo, en el ser humano supone el periodo más largo de nuestra vida. Así, desde los 20 años estamos envejeciendo, siendo la duración de este proceso la que determina la longevidad de cada persona.

En el concepto de longevidad debemos distinguir la “longevidad máxima” o “esperanza de vida máxima” de la “longevidad media” o “esperanza de vida media”. La longevidad máxima se define como “el total de tiempo de la vida del individuo que más ha vivido de una especie”, y no se ha modificado desde que cada especie se instauró en nuestro planeta. Podemos encontrar insectos con una longevidad máxima de un día, roedores con cuatro años, algún molusco con más de quinientos, como la *Arctica islandica*, y el ser humano con sus algo más de ciento veinte años. Es posible que Jeanne Louise Calment, nacida en Arles, Francia en 1875 y fallecida en 1997, sea con sus 122 años la persona claramente documentada como más longeva. Respecto a la longevidad media, la misma se define como “la media de tiempo de vida para una determinada población que ha nacido en la misma fecha”. Esta ha aumentado en el caso del ser humano, de forma evidente en los países desarrollados y especialmente en las últimas décadas. Así, en los datos recogidos en 1990 aparece para España una esperanza de vida media de 78,6 años en mujeres y de 72,5 en los hombres. En 2009 esos valores eran ya de 84,9 y 78,9, respectivamente. Un país en el que los individuos alcanzan una gran longevidad es Japón. En el mismo se ha pasado de 80,2 años y 74,5, para mujeres y hombres en 1990 a 85,6 y 78,8 en 2009. Actualmente la esperanza de vida media en Japón y España es la misma, 84 años.

¿TODOS LOS INDIVIDUOS ENVEJECEN A LA MISMA VELOCIDAD?

Es evidente que la respuesta a esta pregunta es un rotundo “No”. Todos conocemos personas que parecen

mayores de lo que le corresponde por su edad cronológica, mientras que otras alcanzan una edad avanzada con salud y con una apariencia juvenil. Dado que el envejecimiento, de momento, es inevitable, lo que todos queremos es vivir esa etapa de la vida en las mejores condiciones.

El proceso de envejecimiento es muy heterogéneo. Dentro del organismo no envejece a la misma velocidad unos sistemas que otros, pero tampoco lo hacen los individuos de un colectivo que han nacido en la misma fecha. Esto generó ya a mediados del siglo pasado el concepto de “Edad Biológica”, más representativa que la “Edad cronológica” para saber cómo está envejeciendo cada persona.

Esa velocidad a la que se envejece va a depender de cómo se sea capaz de mantener el estado de salud, lo cual viene condicionado por el “genoma” y lo que se ha denominado “ambioma” de cada sujeto. Los genes son los que heredamos, pero se ha comprobado que ellos influyen tan solo con un 25 % en ese mantenimiento de la salud. Lo que más participa en la misma son los factores ambientales y de estilo de vida. Así, tanto genes como ambiente están repercutiendo en cada individuo desde el momento de su concepción, a lo largo de la vida fetal, en la vida postnatal, durante todo el desarrollo, la edad adulta y el envejecimiento. Lo que hay que tener presente es que si bien en la vida fetal y en el primer periodo postnatal tenemos poca capacidad para controlar nuestro ambiente y no podemos hablar de estilo de vida, posteriormente, y de forma especial en el envejecimiento, sí es cada uno responsable de su estilo de vida, y por tanto, de la salud y la longevidad que se pueda alcanzar. Lo que se coma y se beba, la actividad física que se haga, cómo afrontemos las situaciones cotidianas del estrés de la vida, las relaciones que establezcamos, son algunas de las cosas que van a determinar esa longevidad saludable (Figura 1).



MARCADORES DE EDAD BIOLÓGICA

La edad cronológica es fácil de medir, pero, como ya

se ha indicado falla a la hora de ser un buen indicador de la velocidad de envejecimiento de cada individuo. Para saber cómo estamos envejeciendo y cual será por tanto nuestra

esperanza de vida, tenemos a la edad biológica, pero ésta tiene la dificultad de su valoración. Por ello, desde que se instauró ese concepto, los científicos han intentado encontrar marcadores que permitan determinarla. La mayoría de los estudios se han centrado en detectar algunos parámetros fisiológicos (capacidad respiratoria vital, presión arterial, entre otras), bioquímicos (niveles sanguíneos de colesterol, triglicéridos, glucosa, ...) o psicológicos (rapidez de respuesta a estímulos, ..) que pudiesen ser indicadores de esa edad biológica. Más recientemente, la longitud de los telómeros o marcadores epigenéticos como la metilación del ADN han sido también propuestos. No obstante, ninguno de ellos ha sido adecuadamente validado como indicadores de edad biológica.

Nuestro grupo de investigación ha conseguido demostrar que varios parámetros de función de las células inmunitarias pueden ser utilizados para la determinación de la edad biológica de un individuo.

EL SISTEMA INMUNITARIO, UN MARCADOR DE EDAD BIOLÓGICA

El sistema inmunitario es el encargado de defendernos frente a infecciones y cánceres a las que estamos constantemente expuestos. Este sistema está constituido por una gran variedad de células y moléculas capaces de reconocer y eliminar un número ilimitado de diferentes agentes extraños al organismo, entre los que se incluyen no sólo los microorganismos invasores sino también las células de nuestro cuerpo que continuamente se nos malignizan. El conjunto de mecanismos que se ponen en marcha para llevar a cabo esa función se conoce como respuesta inmunitaria. En esta respuesta se da una primera fase de reconocimiento de lo extraño, el antígeno, para posteriormente llevarse a cabo una activación de las células y moléculas que van a permitir la eliminación de ese antígeno. En ese proceso de destrucción se establece una respuesta inflamatoria, la cual es necesaria para la eliminación de los patógenos, pero que debe finalizar para no promover una inflamación crónica que suponga la aparición de una patología. Por ello, la activación del sistema inmunitario debe estar perfectamente regulada, pues si no lo está podría darse, y de hecho sucede, la aparición de enfermedad y muerte del individuo. Además de defendernos de lo extraño, el sistema inmunitario se dedica a eliminar los tejidos dañados, proceso que también implica una inflamación.

El sistema neuroinmunoendocrino

El sistema inmunitario es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis corporal, siendo un claro sistema regulador, en igualdad de condiciones con los sistemas reguladores clásicos como el sistema nervioso y el endocrino, con los que se comunica estrechamente constituyendo el denominado sistema neuroinmunoendocrino.

El sistema inmunitario representa un sistema de recepción de información de estímulos denominados “no cognocitivos” que aparecen en el organismo (infecciones,

células malignizadas o extrañas) y respuesta a los mismos, comunicando dicha información (a través de las citoquinas que produce) al sistema neuroendocrino. Por su parte el sistema nervioso y neuroendocrino es receptor de estímulos “cognitivos” (luz, sonido, situación de estrés, etc.) a los que responde, y sus mediadores (neurotransmisores y hormonas) llegan al sistema inmunitario informándole de la situación. La demostración científica de esa comunicación ha permitido comprender toda una serie de hechos observados en la vida cotidiana. Es evidente que las situaciones de depresión, estrés emocional o ansiedad, provocadas por ejemplo por la pérdida de trabajo o de un ser querido, entre otras, se acompañan de una mayor propensión a padecer desde procesos infecciosos hasta cánceres o enfermedades autoinmunes, lo que supone que el sistema inmunitario se encuentra deteriorado y consecuentemente hay una peor salud y menor longevidad. Por el contrario, situaciones agradables o una “visión optimista” de la vida nos ayuda a superar enfermedades que tienen una base inmunitaria y, en general, a tener mejor salud. Por otra parte, se ha confirmado que alteraciones en el sistema inmunitario, como puede suceder en un proceso infeccioso, modifican la funcionalidad del sistema nervioso pudiendo llegarse, en algunas situaciones extremas, a estados psicóticos. Hoy se sabe que las células de los tres sistemas comparten receptores para los mediadores típicos de los otros y además pueden sintetizar dichos mediadores. Se ha comprobado que los leucocitos producen neurotransmisores y hormonas y que las células nerviosas pueden producir citoquinas típicas de los leucocitos. Así, cualquier incidencia que podamos ejercer en el sistema inmunitario repercutirá en los sistemas nervioso y endocrino, y a la inversa. Actualmente la “psiconeuroinmunoendocrinología” o más abreviadamente “psiconeuroinmunología” es un área científica en expansión.

Es precisamente en la capacidad de respuesta a las múltiples situaciones de estrés emocional con las que cada individuo se enfrenta en su vida cotidiana donde mejor se entiende la comunicación entre los sistemas homeostáticos. Una inadecuada respuesta al estrés, uno de los hechos que mejor definen el envejecimiento de los individuos, va a repercutir en una mala función inmunitaria y, en general, en la de los otros sistemas fisiológicos, lo que supone una peor salud.

La inmunosenescencia

El deterioro que manifiesta el sistema inmunitario al avanzar la edad es evidente y de hecho, es conocido que al envejecer tienen lugar una mayor incidencia de fenómenos autoinmunes, infecciones y cánceres, patologías que indican la presencia de un sistema inmunitario poco eficiente. Además, el mayor porcentaje de muertes en la vejez tiene lugar por esos procesos patológicos, especialmente como consecuencia de los infecciosos.

Aunque con el envejecimiento las células inmunitarias cambian cuantitativamente y en su capacidad funcional, no todas las modificaciones van en el mismo sentido de

mostrar una disminución en sus características. Hay funciones que al envejecer se encuentran más activadas y otras no varían sustancialmente. Por ello, se ha sugerido que lo que se produce al envejecer es una “reestructuración” del sistema inmunitario que afecta a cada uno de sus componentes y a las interacciones entre los mismos, lo que se denomina “inmunosenescencia”. Actualmente todavía existen bastantes controversias sobre las modificaciones que experimenta la respuesta inmunitaria con el envejecimiento. Entre algunas de las causas que explican esos datos dispares se encuentra, por ejemplo, la elección de las edades en la que se efectúan los estudios, los cuales son, mayoritariamente, de tipo transversal. La comparación de los resultados entre individuos que, muchas veces con criterios bastante arbitrarios, se denominan jóvenes y viejos, crea más confusión que clarifica el tema. En este contexto, otro hecho a tener en cuenta es que los estudios llevados a cabo en individuos de edad muy avanzada no son de utilidad para entender el proceso de inmunosenescencia, pues los longevos o centenarios no son representativos de la población anciana, como posteriormente se comentará con más detalle. Otros hechos a considerar son las diferencias que hay entre especies, entre sexos, así como la diversidad interindividual que se manifiesta en cada especie, de forma evidente en el ser humano, pero también en los animales de experimentación. Factores nutricionales, psicológicos o ambientales influyen decisivamente en la funcionalidad inmunitaria. También hay que tener en cuenta los cambios circadianos y circanales. Así, no está igual la respuesta inmunitaria en un individuo por la mañana que por la tarde (de hecho se está más envejecido inmunológicamente por la tarde), o en primavera que en invierno (siendo esta estación la de mayor inmunosenescencia). Las localizaciones de las que se obtengan las células inmunitarias, la dificultad de tener una estandarización en las técnicas que analizan la función leucocitaria, son otros hechos a tener en cuenta para entender los resultados tan diferentes que se pueden obtener. Todo ello hace necesario establecer estudios longitudinales muy bien estandarizados que realmente aporten una idea de lo que sucede con el sistema inmunitario al envejecer.

Ya se ha comentado la utilidad de establecer parámetros que permitan determinar la edad biológica y que se relacionen claramente con la longevidad de cada individuo. Nuestro grupo ha conseguido estandarizar, tanto en ratones como en humanos, una serie de parámetros funcionales de las células inmunitarias que se modifican con la edad. De todas las funciones posibles que llevan a cabo las células inmunitarias nuestro grupo se ha centrado en una serie de ellas. En los linfocitos su propiedad de adherirse a los endotelios vasculares, la de moverse hacia el sitio de reconocimiento antigénico (quimiotaxis), la de proliferar en respuesta a mitógenos y la de liberar citoquinas como la IL-2. En los fagocitos se han estandarizado las funciones del proceso fagocítico: la adherencia, quimiotaxis, ingestión o fagocitosis de partículas extrañas y la destrucción de los agentes

patógenos mediante la producción intracelular de radicales libres como el anión superóxido, los cuales se quedan en el fagosoma de estas células. Por su parte, en las *natural killer* (NK) se ha analizado su capacidad de lisar células tumorales propias de la especie animal estudiada. Estos parámetros han sido valorados en las diferentes décadas de la vida del ser humano, desde la edad adulta de los veinte años a los ochenta, en leucocitos de sangre periférica, y a lo largo de los meses de vida de ratones de varias cepas, en sus leucocitos peritoneales. Este tipo de estudios longitudinales que, aunque muy costosos, se pueden hacer en ratones (con poco más de dos años de vida) son prácticamente imposibles de llevar a cabo en humanos. Nuestros resultados han demostrado que en las dos especies tiene lugar una evolución semejante de dichos parámetros a lo largo de la vida de los individuos pertenecientes a las mismas. Al envejecer, disminuyen las capacidades funcionales que son más beneficiosas, como pueden ser la respuesta linfoproliferativa a los antígenos o la actividad NK que nos defiende frente a las células tumorales. También lo hace la IL-2, que está regulando las dos funciones indicadas, así como la capacidad de quimiotaxis, la de ingerir lo extraño por parte de los fagocitos e incluso la de tener niveles adecuados de anión superóxido en los fagosomas. Sin embargo, se activan aquellas funciones que podrían resultar perjudiciales si lo hacen en exceso, como es el caso, por ejemplo, de la expresión de moléculas de adhesión que favorecen la adherencia de los leucocitos a los tejidos, impidiéndoles cumplir llegar al sitio donde tienen que llevar a cabo su misión.

Es evidente que para acreditar a esos parámetros como marcadores de “edad biológica” y consecuentemente de longevidad es necesario que el valor que muestren en los individuos se relacione con lo que viven los mismos. Hay dos aproximaciones que lo permiten. Una es comprobar que aquellos individuos que en la edad adulta tengan valores en esos parámetros similares a los que presentan los de mayor edad cronológica, realmente mueren antes. Esto no puede llevarse a cabo en humanos por su elevada longevidad, pero se ha hecho en modelos animales como se comentará más adelante. La otra aproximación es corroborar que aquellos sujetos que alcanzan una gran longevidad muestran unos valores de esos parámetros similares a los de los adultos sanos. Aquí sí podemos tener el modelo humano de los centenarios, además de los animales de experimentación que llegan a longevos.

Modelos de envejecimiento prematuro en ratones

Uno de los modelos de envejecimiento prematuro que hemos descrito en ratones, se basa en la diferente realización de una prueba conductual en un laberinto en T simple por ratones del mismo sexo y edad cronológica. Los animales jóvenes-adultos que realizan peor la prueba tienen una mayor edad biológica, esto es un envejecimiento prematuro. Esto se detectó en primer lugar por tener dichos animales un sistema inmunitario más envejecido, con valores propios de los de animales con mayor edad cronológica. También mostraron estos ratones

prematuramente envejecidos, a los que hemos denominado PAM (*prematurely ageing mice*), en relación con los no prematuramente envejecidos (denominados NPAM: *nonprematurely ageing mice*) de la misma edad, unos niveles de ansiedad mayores y una neuroquímica cerebral correspondiente a animales más viejos. Sin embargo, lo que definitivamente aseguró tales parámetros como marcadores de edad biológica es que dichos animales prematuramente envejecidos tenían una significativamente menor longevidad que sus compañeros de igual edad cronológica NPAM. Dada la idéntica evolución de los parámetros estandarizados en ratones y en el ser humano, los resultados en aquellos nos permiten extrapolar la idea de que cuando una persona presenta valores típicos de una edad mayor en esos parámetros, tiene una esperanza de vida más limitada.

El paradigma de los centenarios

Un hecho que demuestra el importante papel del sistema inmunitario en la salud y la longevidad de los individuos es la comprobación de que aquellos que llegan a edades muy avanzadas en buenas condiciones son los que mantienen una funcionalidad de sus células inmunitarias semejante a la de los adultos. Los centenarios, que son el paradigma del envejecimiento satisfactorio, parecen presentar una mejor adaptación a las agresiones internas y externas, en particular con respecto a las que inciden en el sistema inmunitario, el cual muestra una capacidad funcional semejante a la de las personas adultas (de 30 años) y en cualquier caso mucho mejor que la que tienen los de setenta años. Un hecho similar al indicado para centenarios lo hemos observado en células inmunitarias peritoneales de ratones longevos. Todos estos resultados confirman que el sistema inmunitario es un buen indicador del estado de salud y predictor de longevidad.

CAUSAS DE LA INMUNOSENESCENCIA

Los mecanismos que subyacen al envejecimiento deben ser de aplicación universal, por lo que la causa de la inmunosenescencia será la misma que la que hace envejecer a las demás células del organismo: el estrés oxidativo que se genera por el imprescindible uso del oxígeno para la función celular. En esta utilización del oxígeno se generan radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS: *reactive oxygen species*). Sabido es el daño que los oxidantes producen en las moléculas y consecuentemente en la función de las células y como éstas generan defensas antioxidantes para evitarlo. Pero cada vez se tiene más claro que los oxidantes, que evidentemente son dañinos, también son necesarios para muchas funciones celulares. Este hecho es aún más evidente en las células inmunitarias. Los leucocitos, como ya se ha comentado, necesitan producir radicales libres y compuestos oxidantes e inflamatorios para llevar a cabo sus funciones y conseguir la destrucción de los antígenos. Hay que tener presente que la oxidación y la inflamación son procesos íntimamente relacionados. También, hay que tener en consideración que las células inmunitarias son

particularmente sensibles a la oxidación dado el alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados que tienen en sus membranas, el papel crítico de la señalización intracelular relacionada con esas membranas y la expresión génica que requieren en su labor defensiva. Por todo ello, si en cualquier célula del organismo es importante preservar el equilibrio entre producción de oxidantes y niveles de defensas antioxidantes, más lo es en las células de nuestro sistema defensivo. Tanto el estrés oxidativo (mayor cantidad de oxidantes que de antioxidantes) como el estrés reductor (exceso de antioxidantes que anulan las acciones de los oxidantes) son desequilibrios que pueden determinar la inadecuada capacidad funcional del sistema inmunitario, y con ello, condicionar la salud del organismo.

Para poder conocer cómo se encuentra el estado redox de los leucocitos a lo largo de la edad, nuestro grupo ha estudiado en dichas células los niveles de toda una serie de oxidantes y de defensas antioxidantes. De estas defensas antioxidantes el glutatión es, posiblemente, la más relevante. En su forma reducida (GSH) se utiliza para eliminar peróxidos, lo que hace mediante la activación de otra defensa antioxidante enzimática, la glutatión peroxidasa (GPx). El glutatión oxidado que se genera (GSSG) es un importante oxidante, teniendo que recuperarse a la forma reducida de GSH mediante la glutatión reductasa (GR), otra importante enzima antioxidante. De hecho, el índice GSSG/GSH se considera un importante marcador de estrés oxidativo celular. Como otras defensas enzimáticas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), enzima que convierte al anión superóxido en peróxido de hidrógeno y la catalasa (CAT) que, entre otras actividades, elimina el peróxido de hidrógeno pasándolo a agua (Figura 2). Los resultados obtenidos por nuestro grupo muestran como los parámetros de oxidación analizados aumentan en los leucocitos con la edad, mientras disminuyen las defensas antioxidantes y, como consecuencia de esta situación de estrés oxidativo, se produce un aumento del daño a biomoléculas en las células inmunitarias, tanto a nivel de lípidos como del ADN nuclear. A la vista de nuestras investigaciones y de la de algunos otros grupos, se puede afirmar que los cambios que se producen en la funcionalidad de las células inmunitarias con el envejecimiento se deben al “estrés oxidativo crónico” que experimentan las mismas con el paso del tiempo. Más aún, en estudios longitudinales llevados a cabo en ratones, hemos observado que aquellos animales que mantienen desde la edad adulta unos mayores niveles de defensas antioxidantes y menores de oxidantes y daño oxidativo en sus células inmunitarias, en relación al resto de la población de igual edad cronológica analizada, son los que llegan a gran longevidad. De hecho, los centenarios tienen un estado redox en sus células inmunitarias semejante al de los adultos sanos. Por el contrario los que muestran menores antioxidantes y mayores niveles de oxidación y daño mueren prematuramente.



Fig.2

TEORÍA DE LA OXIDACIÓN-INFLAMACIÓN DEL ENVEJECIMIENTO

Desde hace unas décadas la idea de la presencia de un estado de inflamación crónica al envejecer está siendo ampliamente aceptada, habiéndose generado el término de “*inflamm-aging*” para describir lo que sucede en el envejecimiento. Como ya se ha comentado, inflamación y oxidación son dos procesos íntimamente relacionados. En base a todo lo indicado anteriormente, propusimos hace unos años una nueva teoría del envejecimiento, la de la “oxidación-inflamación”, acuñando el término “*oxi-inflamm-aging*” para describir lo que sucede al envejecer. La teoría sugiere que el envejecimiento es un estrés oxidativo crónico, asociado a un estrés inflamatorio, los cuales afectarían a todas las células del organismo, pero tendría especial relevancia en las de los sistemas homeostáticos, el nervioso, el endocrino y el inmunitario. De esta forma, la falta de función que acabaría sucediendo en las células de estos sistemas y el deterioro en la comunicación entre los mismos, impediría un mantenimiento adecuado de la homeostasis y el consecuente aumento de morbilidad y mortalidad típico de la vejez. En este contexto, el sistema inmunitario por su característico funcionamiento en el que requiere generar continuamente una elevada cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios, podría activar factores, como por ejemplo el ubicuo factor de transcripción NF-kB, que, al alcanzar un cierto grado de activación, estimularía la expresión de genes de compuestos oxidantes e inflamatorios. De hecho, este factor manifiesta una gran activación en leucocitos de individuos viejos, no apareciendo la misma en los de adultos sanos y de longevos. Así, si esa producción de compuestos oxidantes/inflamatorios no se regula adecuadamente, se podría generar un “círculo vicioso” con mayor cantidad de compuestos oxidantes e inflamatorios por parte del sistema inmunitario que podría acelerar el estrés oxidativo e

inflamatorio del organismo, y por tanto, la velocidad de envejecimiento. Por tanto, nuestra propuesta es que el sistema inmunitario podría estar implicado en cómo cada individuo lleva a cabo su envejecimiento, en la edad biológica del mismo (Figura 3).

Una serie de hechos demuestran esta hipótesis. Así, se ha indicado que los individuos que llegan a centenarios o los animales que alcanzan una elevada longevidad, son aquellos que mantienen mejor el estado redox de sus células inmunitarias y consecuentemente la función de las mismas. En el modelo de envejecimiento prematuro anteriormente comentado, los PAM, con una menor longevidad que los NPAM, mostraron un mayor estrés oxidativo en sus leucocitos, los cuales tienen también, como ya se ha indicado, una peor capacidad funcional que la de los NPAM de la misma edad. Además, ese mayor estrés oxidativo lo hemos detectado también en el cerebro y en otras localizaciones del organismo como hígado, corazón, riñón, etc de esos PAM en comparación con lo que sucede en los NPAM.

Esta relación de una mayor oxidación en las células inmunitarias con una peor capacidad funcional de las mismas se ha observado en varias situaciones que se han propuesto como modelos de envejecimiento prematuro. Así, personas adultas con ansiedad o depresión, obesidad y con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, presentan esa característica de un mayor estrés oxidativo en sus leucocitos y una inmunosenescencia prematura. Para saber si tal hecho realmente supone un envejecimiento prematuro hay que demostrar que el mismo supone una menor longevidad de los individuos. Esto hay que analizarlo en ratones. Efectivamente, hemos demostrado que en animales adultos con ansiedad, depresión y obesidad, y en transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, tiene lugar en sus células inmunitarias un mayor estrés oxidativo y una inmunosenescencia que no aparece en los correspondientes controles, y eso se acompaña de una menor esperanza de

vida.



ESTRATEGIAS PARA UNA LONGEVIDAD SALUDABLE

Una vez establecido que el estrés oxidativo-inflamatorio es el mecanismo que subyace a la inmunosenescencia y ante la propuesta de la participación del sistema inmunitario en ese estrés crónico que experimenta el organismo con el envejecimiento, se pueden plantear estrategias que, mejorando la situación de las células inmunitarias y consecuentemente de los otros sistemas homeostáticos y del organismo en general, puedan repercutir en el mantenimiento de una mejor salud. Además, dado el carácter de marcador de edad biológica que hemos comprobado tiene el estado funcional de las células inmunitarias, dichas intervenciones podrían, al mantener más joven dicha edad biológica, proporcionar una mejor y mayor longevidad a los individuos. Por otra parte, la efectividad de dichas intervenciones apoyaría la hipótesis previamente expuesta de la oxidación-inflamación en el envejecimiento y de la participación del sistema inmunitario en la misma.

De todas las posibles estrategias nos hemos centrado en aquellas más asequibles en el contexto de la vida cotidiana. Así, lo que comemos, la actividad física y mental que hacemos, con quien nos relacionamos, son posibilidades de intervención para alcanzar una longevidad saludable (Figura 3).

Nutrición

Es de todos conocido la inadecuada nutrición que en general tiene el ser humano, especialmente al envejecer. Si partimos de que el envejecimiento es un estrés oxidativo-inflamatorio, parece evidente que una de las estrategias nutricionales sea la utilización de compuestos antioxidantes, muchos de los cuales tienen también un carácter antiinflamatorio. La ingestión de cantidades apropiadas de estos compuestos podrían re-equilibrar el

balance redox celular, disminuyendo el estrés oxidativo-inflamatorio. Dada la disminución en los antioxidantes endógenos al envejecer (muchos empleados en la neutralización del exceso de oxidantes que se van produciendo), su incorporación a nuestro organismo, a través de la dieta o mediante la suplementación de cantidades apropiadas de antioxidantes exógenos, podría ser muy beneficioso. Dentro de los antioxidantes exógenos, son posiblemente los más conocidos la vitamina C, la E, los carotenos o los polifenoles, pero los compuestos con esta capacidad son muy numerosos. Toda una serie de grupos de investigación, incluido el nuestro, han comprobado que esos antioxidantes son necesarios y se utilizan para llevar a cabo una adecuada función de nuestro sistema inmunitario. Así, durante la actuación de las células inmunitarias, éstas van consumiendo sus reservas de antioxidantes. Si consideramos que al envejecer se producen mayores niveles de oxidantes junto a frecuentes estados de malnutrición y una clara disminución de los niveles de defensas antioxidantes, parece evidente que la suplementación con este tipo de compuestos podría tener un efecto beneficioso en la neutralización de dicho estrés oxidativo, consiguiéndose el equilibrio oxidante/antioxidante perdido. Tanto en humanos como en animales de experimentación se ha comprobado que esa ingestión de antioxidantes por individuos viejos o prematuramente envejecidos modifica los parámetros funcionales de los leucocitos, como también lo hacen de los de estado de oxidación e inflamación, dejándolos en niveles similares a los de los adultos. Pero lo más importante es que este "rejuvenecimiento" inmunitario se manifiesta, en los animales de experimentación, con una mayor longevidad.

El papel regulador de los antioxidantes afecta no sólo al sistema inmunitario sino también a los otros sistemas reguladores, como el sistema nervioso, lo cual ha sido

comprobado por diversos investigadores. De hecho, en el modelo de los PAM, la ingestión de antioxidantes mejora no sólo la inmunidad, también la respuesta conductual, lo que prueba que el estrés oxidativo que subyace al deterioro de los sistemas homeostáticos, se neutraliza con la administración de antioxidantes.

Asociado a esta idea de utilizar dietas antioxidantes para mejorar la salud en el proceso de envejecimiento, actualmente hay que considerar el empleo de probióticos. Recientemente se ha conocido el importante papel que tiene la microbiota intestinal en el estado funcional de los sistemas homeostáticos y por tanto en la salud de cada individuo. Teniendo en cuenta que esa microbiota cambia al avanzar la edad, dándose una disbiosis, la utilización de probióticos como estrategia nutricional se hace relevante. Los probióticos, microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas producen un beneficio al huésped, pueden equilibrar la microbiota autóctona y presentar sus mismas funciones positivas antes indicadas. Aunque hay muy pocos trabajos científicos al respecto, los que se han llevado a cabo demuestran que ciertas cepas de probióticos pueden ser muy útiles para mejorar los sistemas homeostáticos y por tanto la salud de los individuos. Además, se ha comprobado que muchas cepas de probióticos tienen capacidades antioxidantes y anti-inflamatorias, lo que explicaría ese positivo papel en el envejecimiento.

La otra herramienta nutricional que se ha comprobado puede ser efectiva en el proceso de envejecimiento, al limitar la oxidación celular, es la restricción calórica. Esta restricción protege a los animales de experimentación, atenuando la inducción asociada a la edad de genes que codifican productos proinflamatorios y de estrés, aumentando las defensas antioxidantes y reduciendo la oxidación de macromoléculas. La restricción calórica mejora la funcionalidad de las células inmunitarias en el envejecimiento y la de los otros sistemas homeostáticos.

Actividad física

Otra estrategia para llegar a resultados similares de mejora de la función inmunitaria en la vejez es la realización de ejercicio físico moderado. Hay numerosos estudios que han comprobado el importante papel que tiene el ejercicio físico sobre los sistemas homeostáticos. No obstante, la actividad física que resulta beneficiosa es la que se lleva a cabo de forma moderada y de manera más o menos habitual, siendo, por el contrario, bastante perjudicial la que se hace de forma exhaustiva, puntual o con dilatadas sesiones. Este ejercicio intenso, como el que llevan a cabo muchos deportistas de alta competición, puede suponer un estrés añadido que hace envejecer nuestras defensas inmunitarias y nuestro organismo. Aunque los estudios sobre los efectos del ejercicio físico en la vejez son bastante escasos, nosotros hemos podido comprobar que la realización de ejercicios moderados conlleva un mejor estado inmunitario a cualquier edad, pero de forma más evidente al envejecer. En individuos viejos, tanto en animales de experimentación como en humanos, ese ejercicio moderado restaura la función

inmunitaria deteriorada, asemejándola a la de adultos.

Curiosamente los resultados obtenidos en la inmunidad al envejecer, tanto con la ingestión de dietas con antioxidantes como con la realización de ejercicio físico moderado, son muy parecidos. Una posible explicación es que hemos comprobado que el ejercicio moderado favorece, entre otras cosas, el aumento de los niveles de antioxidantes intracelulares en las células inmunitarias, y por consiguiente la función de las mismas. Por su parte, un ejercicio con sobre-entrenamiento produce una disminución de esos niveles intracelulares, con una consecuente menor actividad inmunitaria. De este modo, la realización de ejercicio físico, de forma adecuada, tanto *per se* como por su capacidad de aumentar los niveles de antioxidantes celulares, permitirá recuperar el balance oxidantes/antioxidantes que se ha perdido al envejecer, y de este modo puede incidir positivamente en la función del sistema inmunitario. Pero además, también lo hará en la del sistema nervioso y en la del endocrino, así como en la comunicación entre los tres sistemas reguladores. Todo ello evitará el deterioro homeostático que por el estrés oxidativo va teniendo lugar con la edad, y, consecuentemente, se disminuirá la morbilidad y se mejorará la supervivencia de los individuos.

Control del estrés emocional

La actividad mental y el adecuado control del estrés emocional también mejoran la función inmunitaria y, consecuentemente, pueden ayudar para una longevidad saludable. Es este un campo en el que se está empezando a incidir con estudios científicos bien diseñados. Nuestro grupo ha comprobado que, en personas adultas con estado de ansiedad y depresión, que muestran una inmunosenescencia prematura, ciertas terapias psicológicas son muy útiles para revertirla. También se ha comprobado que la “risoterapia” puede ser efectiva, pero todas estas intervenciones apenas han sido investigadas en el contexto que nos ocupa. Para saber si una estrategia que mejora la función inmunitaria y el estado redox puede incidir en un aumento de longevidad, se requiere el uso de animales de experimentación como los ratones. Una aproximación a las intervenciones comentadas en humanos que puede llevarse a cabo en animales de experimentación es el enriquecimiento ambiental. Tanto el uso de objetos diversos que se introducen en las jaulas, y que se recambian cada poco tiempo, como la utilización de un “spa” para ratones (una estrategia ideada por nuestro grupo) mejoran la función y el estado redox de las células inmunitarias y alargan la longevidad de los animales.

Relaciones sociales

Para especies sociales como es la humana y lo son los roedores utilizados como animales de experimentación, las relaciones sociales pueden ser una fuente de estrés. Tanto el aislamiento como el hacinamiento o la convivencia con individuos enfermos pueden generar alteraciones de los sistemas homeostáticos y por tanto de la salud. Por el contrario la convivencia con sujetos apropiados puede ser una excelente estrategia para una longevidad saludable.

Nuestro grupo ha comprobado que ratones hemicingotos para el gen de la tirosina hidroxilasa, la primera enzima en la síntesis de las catecolaminas, los cuales presentan en la edad adulta alteraciones en los sistemas homeostáticos, con una inmunosenescencia prematura y una menor longevidad que los controles, pueden revertir esas características al convivir con animales controles. También, hemos comprobado recientemente que los ratones cronológicamente viejos, tras dos meses de convivencia con adultos sanos, presentan un rejuvenecimiento de sus sistemas homeostáticos y de su estado redox, consiguiendo aumentar significativamente su esperanza de vida.

CONCLUSIONES

El envejecimiento es un proceso biológico que, aunque sea actualmente inevitable, lo podemos llevar a cabo de una forma saludable. Es evidente que la edad cronológica siempre va avanzando y no se puede hacer que retroceda, pero la edad biológica, que nos indica la velocidad a la que cada individuo envejece, sí se puede “rejuvenecer”. En un momento del proceso de envejecimiento esa edad biológica puede ser elevada, y si no se pone remedio la esperanza de vida será más corta. Pero en esos casos se puede intervenir cambiando ciertos hábitos, con diferentes estrategias de estilo de vida y hacer que esa velocidad sea más lenta, que disminuya la edad biológica y podamos conseguir una longevidad saludable.

El conocer que el sistema inmunitario puede ser un adecuado marcador para determinar la edad biológica de cada persona, permite poder tomar medidas si la misma es mayor de lo que nos corresponde o nos gustaría. Además, nos permitirá saber si los cambios que hacemos en nuestro estilo de vida están siendo de utilidad. Más aún, como se ha comprobado que el estado del sistema inmunitario incide en el estado de salud y, consecuentemente, en la velocidad de envejecimiento, nos interesa que ese sistema sea el mejor posible para que tal velocidad resulte mínima.

Como recomendaciones se podría decir que el evitar hábitos nocivos (exceso de tabaco, alcohol, falta de sueño, etc), hacer una nutrición apropiada, la realización de un ejercicio físico moderado, no olvidar el ejercicio mental, una buena “actitud” ante la vida (con un buen control del estrés emocional) y unas adecuadas relaciones sociales, pueden ser estrategias que mejoren la función y el estado redox de las células inmunitarias y por consiguiente la homeostasis corporal, lo que supone una mejor salud y mayor longevidad.

Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años en este campo del envejecimiento, queda aún mucho más por conocer.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Fernandez P, Puerto M, Maté I, Ribera JM, De la Fuente M (2008) Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J Am Geriatrics Soc.* 56, 2244-2251.
- Arranz L, Caamano J, Lord JM, De la Fuente M (2010) Preserved immune functions and controlled leukocyte oxidative stress in naturally long-lived mice: Possible role of nuclear factor-kappaB. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65, 941-950.
- Arranz L, De Castro NM, Baeza I, Maté I, Viveros MP, De la Fuente M (2010) Environmental enrichment improves age-related immune system impairment. Long-term exposure since adulthood increases life span in mice. *Rejuvenation Research.* 13, 415-428.
- Bauer M, De la Fuente M (2016) The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 158, 27-37.
- Cruces J, Venero C, Pereda-Perez I, De la Fuente M (2014) A higher anxiety state in old rats after social isolation is associated to an impairment of the immune response. *J Neuroimmunol.* 277,18-25.
- Cruces J, Venero C, Pereda-Pérez I, De la Fuente M (2014) The effect of psychological stress and social isolation on neuroimmunoendocrine communication. *Curr Pharm Des.* 20, 4608-4628.
- De la Fuente M (2009) Teorías del envejecimiento. En: “Retos de la Nutrición en el Siglo XXI ante el Envejecimiento Poblacional”. Varela G, Alonso E (eds). Instituto Tomás Pascuala Sanz y Universidad San Pablo CEU. pp:29-48.
- De la Fuente M (2009) ¿Hasta dónde el deporte es saludable?. En: Nuevas miradas sobre el Envejecimiento. Ed: Ministerio de Sanidad y Política Social. Secretaria General de Política Social y Consumo. IMSERSO. Madrid. Pp: 293-320.
- De la Fuente M (2010) Murine models of premature ageing for the study of diet-induced immune changes. Improvement of leukocyte functions in two strains of old prematurely ageing mice by dietary supplementation with sulphur-containing antioxidants. *Proc Nutr Soc.* 69, 651-659.
- De la Fuente M (2011) Los antioxidantes y la función inmunitaria. En: Inmunonutrición. En la salud y la enfermedad. A. Marcos (ed.). Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid. Pp: 254-273.
- De la Fuente M (2014) Crosstalk between the nervous and the immune systems in health and sickness. *Curr Pharm Des.* 20, 4605-4607.
- De la Fuente M (2014) The Immune System, a Marker and Modulator of the Rate of Aging. En: “Immunology of Aging”. Massoud, A., Rezaei, N.(eds). Chapter 2. Pp: 3-23. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- De la Fuente M (2014) Inmunosenescencia. En: “Tratado de Medicina Geriátrica”. Abizanda P. (Ed). Elsevier España. Pp: 134-141.
- De la Fuente M, De Castro NM (2012) Obesity as a model of premature immunosenescence. *Current Immunol Reviews.* 8, 63-75.
- De la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, Ortega E (2011) Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des.* 17, 3966-3993.

- De la Fuente M, Miquel J (2009) An update of the oxidation-inflammation theory of aging. The involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des.* 15, 3003-3026.
- De la Fuente M, Requena T, Perez G (2016) Envejecimiento y Microbiota. En “Probióticos, Prebióticos y Salud. Evidencia Científica”. Alvarez G, Marcos A, Margolles A (eds). Ergon Madrid. Capítulo 24, 183-189.
- Garrido A, Cruces J, Iriarte I, Hernandez-Sanchez C, De Pablo F, De la Fuente M (2017) Premature immunosenescence in catecholamines síntesis déficit mice. Effect of social environment. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* DOI: Doi: 10.1016/j.regg.2016.01.002
- Hunsche C, Hernandez O, De la Fuente M (2016) Impaired immune response in old mice suffering from obesity and premature immunosenescence in adulthood. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 71, 983-991.
- Martinez de Toda I, Mate I, Vida C, Cruces J, De la Fuente M (2016) Immune function parameters as markers of biological age and predictors of longevity. *Aging.* 8, 3110-3119.
- Maté I, Cruces J, Gimenez-Llort L, De la Fuente M (2015) Function and redox state of peritoneal leukocytes as preclinical and prodromic markers in a longitudinal study of triple-transgenic mice for Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis.* 43, 213-226.
- Maté I, Madrid JA, De la Fuente M (2014) Chronobiology of the neuroimmunoendocrine system and aging. *Curr Pharm Des.* 20, 4642-4655.
- Pacheco G, De la Fuente M (2016) Psiconeuroinmunología. En “Probióticos, Prebióticos y Salud. Evidencia Científica”. Alvarez G, Marcos A, Margolles A (eds). Ergon Madrid. Capítulo 23. Pp.: 173-181.
- Vida C, Gonzalez EM, De la Fuente M (2014) Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. *Curr Pharm Des.* 20, 4656-4678.

Envejecimiento y reprogramación epigenética

Manel Esteller Badosa

Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL)

ABSTRACT: Epigenetics of aging is an emerging field that promises exciting revelations in the near future. Epigenetic pathways, including DNA methylation and histone modification, are determinants of normal development and can change during aging. Some of the epigenetic alterations described during aging, as hypermethylation at specific promoters and decrease of global DNA methylation, are also associated with tumor development. The epigenetic changes occurring during development and aging can be stochastic or depend on environmental factors. Future challenges in the field involve the determination of the precise molecular mechanisms that create age-dependent epigenetic variation and how these epigenetic changes affect the aging phenotype.

RESUMEN: La epigenética del envejecimiento es un campo emergente extraordinariamente prometedor. Las vías epigenéticas, la metilación del DNA y la modificación de las histonas, determinan el desarrollo normal y cambian con la edad. Algunas de las alteraciones epigenéticas descritas en el envejecimiento, como la hipermetilación en promotores específicos y la disminución de la metilación global del DNA están también asociadas al desarrollo tumoral. Los cambios epigenéticos que ocurren durante el desarrollo y la vejez pueden ser estocásticos o depender del ambiente. El desafío futuro es estudiar los mecanismos moleculares que originan las variaciones epigenéticas dependientes de la edad y cómo esos cambios afectan al fenotipo en la edad avanzada.

Corresponding Author: mesteller@idibell.cat

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 1 (2017), pp. 116-128

INTRODUCCIÓN

La epigenética, es una frontera de la ciencia, que estudia los cambios hereditarios en la regulación de la actividad y expresión genética que no depende de la secuencia del genoma. Todos nuestros tejidos presentan los mismos genes, pero debido al código epigenético sólo unos pocos se expresan en un determinado tejido y en un determinado momento, dando lugar al fenotipo. Los perfiles epigenéticos específicos condicionan la accesibilidad de los factores de transcripción a la cromatina y facilitan su reconocimiento por parte de los genes, para ser silenciados temporal o permanentemente. Las marcas epigenéticas de la cromatina pueden ser propagadas por mitosis dando lugar a la herencia estable de esos factores reguladores. La modificación epigenética mejor estudiada es la metilación del DNA, en aquellos residuos citosina que van seguidos de un nucleótido guanina. Normalmente, la metilación conduce al silenciamiento del gen, pero puede llevar también a la expresión de genes vecinos. La expresión de genes está también determinada por la organización de las histonas y principalmente por su acetilación, metilación, etc., que puede alterar la accesibilidad al DNA para la transcripción. La longevidad del organismo y el envejecimiento están influenciados por muchos factores complejos que interaccionan, entre los que cabe destacar, el acumulo de mutaciones en los genomas nuclear y mitocondrial, el acortamiento y disfunción de los telómeros, el daño oxidativo al DNA y otras macromoléculas celulares y factores hormonales sistémicos. La epigenética del cáncer ha sido estudiada durante muchos años, pero la epigenética del envejecimiento es una nueva disciplina que promete avances importantes, tales como la definición del metiloma

del DNA y un mapa de modificación de las histonas, que han de ayudar a definir una célula joven *versus* una vieja y caracterizar los enzimas modificadores de la cromatina implicados en el proceso.

¿QUÉ ES LA EPIGENÉTICA?

Aunque nuestro destino está escrito en los genes, ¿qué rol juega el ambiente en lo que somos? Nadie tiene una respuesta definitiva a estos interrogantes, pero hay un campo del conocimiento que puede indagar el vínculo entre la genética y otros factores, como por ejemplo, las condiciones del entorno. Se trata de la *epigenética*, término que significa por encima (epi) de los genes y que fue descrito en 1942 por el paleontólogo y genetista escocés Conrad H Waddington para designar el estudio de las interacciones entre el genotipo y el fenotipo, es decir, entre la información codificada en los genes y aquella que efectivamente se expresa. (1) El objeto de análisis son las modificaciones en la expresión de los genes, y una de las fuentes de cambio es el ambiente. En la actualidad, se entiende como “epigenética” la regulación génica mediada por modificaciones de la estructura de la cromatina (material genético empaquetado alrededor de proteínas), o como aquellos cambios hereditarios en la expresión genética independientes de la secuencia de nucleótidos del DNA (2).

La epigenética son las marcas químicas, que aunque no originan mutaciones, pueden influir en la expresión de los genes. Waddington la concibió como el *análisis causal del desarrollo*, que implicaba las interacciones de los genes con su medio ambiente y desarrolló el concepto del *paisaje epigenético*, que se visualiza como cimas y valles o regiones con alta y baja concentración de marcas

epigenéticas, respectivamente. El paisaje epigenético describe las opciones que una célula madre en un embrión sigue en puntos clave del desarrollo, y se dirige hacia un punto u otro por acción de factores inductores epigenéticos embrionarios o *genes homeóticos* (3). Waddington

percibió que el camino para determinar las características adquiridas por herencia era descubrir las formas existentes de plasticidad en el desarrollo de una población o descubrir que el ambiente podía persuadir a la población para ser canalizada. (Figura 1) (4).

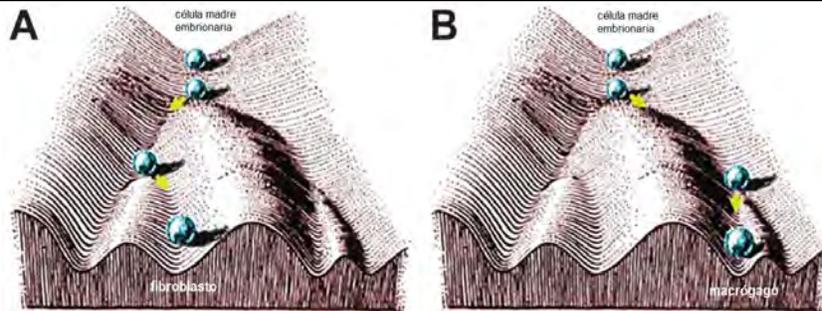


Figura 1. Diagrama de la panorámica del desarrollo de Waddington. La panorámica y la bola en lo alto son de su diagrama original. Las posiciones de la bola se han añadido para ilustrar su idea de que el desarrollo puede ser canalizado siguiendo rutas diferentes (A y B). (4) (diagrama modificado por K Mitchell).

PROPIEDADES DINÁMICAS Y ESTOCÁSTICAS DE LA CROMATINA

La estructura de la cromatina es dinámica y está sometida a grandes remodelaciones durante el desarrollo, el envejecimiento y la enfermedad. Por esta razón, esta remodelación tiene que ver con enfermedades tales como el cáncer y también con la esperanza de vida del organismo. Sin embargo, los cambios estocásticos no determinísticos en la estructura de la cromatina, pueden, en el transcurso del tiempo, contribuir también a alterar la función nuclear, celular y tisular y por consiguiente conducir a la vejez y a sus achaques. La longevidad del organismo y el envejecimiento están influenciados por muchos factores complejos, entre los que cabe destacar: el acumulo de mutaciones en los genomas nuclear y mitocondrial, el acortamiento y disfunción de los telómeros, el daño oxidativo al DNA y a otras macromoléculas celulares y factores hormonales sistémicos (insulina/factor insulínico), la senescencia, la apoptosis y la diferenciación alterada de los tejidos autorrenovables, que dependen de las células madre (5).

La unidad básica repetitiva en la estructura de la cromatina es el nucleosoma, que comprende 146 pares de bases enrolladas alrededor de un octámero de histonas (H1 – H4) (Figura 2). La cromatina se divide en dos tipos, heterocromatina y eucromatina. La eucromatina se descondensa durante la interfase, es activa transcripcionalmente y se replica al inicio de la fase S. Por el contrario, la heterocromatina permanece condensada durante la interfase, es transcripcionalmente silente y se replica más tarde. La heterocromatina se subdivide en dos tipos: constitutiva y facultativa. La constitutiva se encuentra en el DNA pericentromérico y telomérico, es heterocromática en todas las células de un organismo y se ha considerado que es esencialmente fija e irreversible a lo largo de la vida. Por el contrario, la heterocromatina facultativa interviene en los procesos regulados de diferenciación celular u otros cambios en el fenotipo celular. Por ejemplo, un solo cromosoma X se silencia por

heterocromatinización en células de mamífero hembra, para la compensación de la dosis de cromosoma sexual. El que la cromatina forme eucromatina o heterocromatina lo dictan las modificaciones de las histonas y del DNA. Por ejemplo, la acetilación de las colas del N-terminal de las histonas, promueve la formación de eucromatina. A la inversa, la metilación del DNA es característica de la heterocromatina (6, 7).

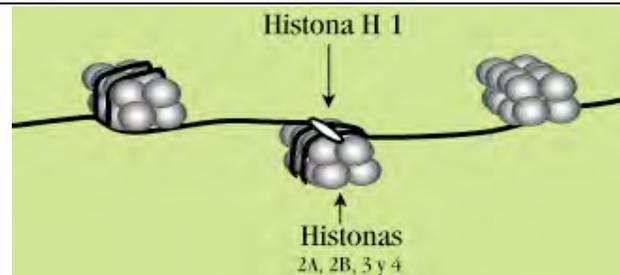


Figura 2. Nucleosoma: 146 pares de bases enrolladas alrededor de un octámero de histonas.

SENESCENCIA CELULAR Y REDISTRIBUCIÓN DE LA CROMATINA

La senescencia celular se caracteriza por una parada irreversible de la proliferación, que se inicia por varios desencadenantes, entre ellos, el excesivo número de divisiones celulares y el acortamiento de los telómeros (senescencia replicativa) (8). Debido a la senescencia, la mayoría de células primarias humanas tienen una vida proliferativa limitada y la senescencia contribuye al envejecimiento del tejido *in vivo* porque limita su autorrenovación celular. Las células senescentes y los marcadores moleculares del fenotipo senescente, aumentan en algunos tejidos y están conectados con patologías asociadas a la edad, como la osteoartritis, la aterosclerosis y la cirrosis hepática. Además, la manipulación de las señales que inician la senescencia, como la longitud de los telómeros y la expresión del inhibidor de la proliferación p16INK4a, pueden modular algunos aspectos del envejecimiento del organismo. La senescencia celular, es también un proceso bien establecido de supresión tumoral,

por su capacidad de frenar la proliferación y la progresión neoplásica en células que acarrean lesiones oncogénicas.

Muchas células senescentes, tanto si son consecuencia de excesivas rondas de proliferación o activadas por oncogenes, muestran grandes cambios en la estructura de la cromatina, porque forman dominios especializados de heterocromatina facultativa, denominados *focos de heterocromatina asociados a la senescencia* (SAHF). Estos SAHF están más condensados que la cromatina de la interfase y contienen modificaciones en las histonas y proteínas asociadas a las características de la heterocromatina. Los SAHF silencian la expresión de genes promotores de la división celular, y así contribuyen a la parada de la proliferación típica de la senescencia. Aunque los SAHF parecen ser el resultado de la condensación de cromosomas casi enteros, las secuencias de DNA que están típicamente contenidas en la heterocromatina constitutiva, tal como los pericentromeros y telómeros, parece que son excluidos del grueso del cromosoma condensado. Esto sugiere que estas regiones heterocromáticas, son quizás desheterocromatinizadas en células senescentes. De acuerdo con esta idea, al menos para los telómeros, María Blasco ha demostrado que los telómeros cortos de ratones que carecen de telomerasa, tienen la heterocromatina reducida cuando se los compara con los telómeros de las células normales (9). Así que, en tanto en cuanto envejece el tejido, la senescencia celular parece estar acompañada por una redistribución de la heterocromatina, desde la heterocromatina constitutiva hasta otros sitios normalmente eucromáticos, específicamente hasta aquellos dominios especializados de heterocromatina facultativa.

CAMBIOS EPIGENÉTICOS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

La modificación epigenética más estudiada es la *metilación del DNA* en los residuos citosina que van seguidos de un nucleótido guanina. Normalmente, la metilación conduce al silenciamiento del gen, pero puede llevar también a la expresión de genes vecinos. Otra modificación epigenética, es la que determina la organización de las *histonas* (*acetilación, metilación, etc.*), produciendo una alteración en la accesibilidad al DNA para la transcripción.

La *metilación covalente del DNA* en el genoma de mamíferos supone la adición de un grupo metilo al anillo aromático de una base del DNA. Esta reacción está restringida, en mamíferos, al anillo de la citosina del dinucleótido CpG, que da lugar a la 5 metil citosina (5mC), y está catalizada por la DNA metiltransferasa (DNMT), en presencia de un donador de grupos metilos, la S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 3). La 5mC puede sufrir una desaminación espontánea y dar lugar a timina (T) lo cual hace que los CpG sean puntos calientes para la mutación y se eliminen poco a poco durante la evolución.

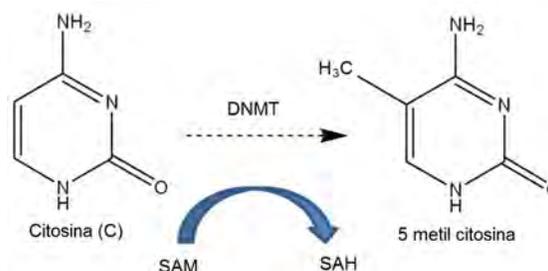


Figura 3. Metilación de la citosina mediante la actividad enzimática de la (DNMT) en presencia de un agente donador de grupos metilos la S adenosilmetionina (SAM).

La metilación del genoma origina el silenciamiento de determinadas áreas del DNA. Hay dos tipos de metilación, la metilación de mantenimiento y la metilación *de novo*. La primera añade grupos metilo a cadenas de DNA recientemente sintetizadas en puntos *opuestos* a los sitios metilados en la cadena madre. Esta actividad asegura que las moléculas hijas de DNA mantengan un perfil de metilación después de la división celular. La metilación *de novo*, añade grupos metilo en posiciones nuevas, cambiando el del perfil de metilación en una región localizada del genoma. Los genes que se deben expresar en los tejidos, tienen regiones no metiladas conocidas como islas CpG, localizadas en la dirección opuesta a los genes. Los genes que se deben silenciar en los tejidos diferenciados tienen metiladas las islas CpC, lo que permite que un complejo histona-desacetilasa (HDAC), se una y comprima la forma del material genómico e inactive el gen. Las islas CpG son regiones del DNA que poseen dinucleótidos de citosina y guanina en elevada frecuencia, y su metilación cerca o dentro de los promotores de los genes es lo que causa el silenciamiento de dichos genes (10). Dado que envejecimiento y cáncer presentan alteraciones epigenéticas que convergen en algunos casos, interesa conocer la función y la significación biológica de las alteraciones epigenéticas que se acumulan durante el envejecimiento y son importantes en la tumorigénesis. Ejemplos los proporcionan la pérdida global de la metilación del DNA en el envejecimiento y en el cáncer por el promotor de la hipermetilación de genes con un papel dual en la supresión tumoral y en la progeria (11).

La *modificación de la cromatina* es el segundo y más complejo aspecto de la epigenética. Las protagonistas aquí son las histonas, las proteínas básicas que forman el nucleosoma (Figura 2).

Las histonas H2A, H2B, H3 y H4, junto con 147 pares de bases de DNA genómico, que se enrollan alrededor de los nucleosomas, son las unidades básicas de la cromatina. Las interacciones entre el DNA y las histonas conducen a un elevado grado de condensación que impide la transcripción génica. La *modificación epigenética de las histonas*, tiene un perfil definido durante el envejecimiento y la transformación celular. Las sirtuínas, una familia de desacetilasas dependientes de NAD, actúan sobre la lisina (K) 16 de la histona 4, y se les considera que establecen una conexión entre la transformación celular y la longevidad. Por ejemplo, la trimetilación de la H4-K20,

está enriquecida en células indiferenciadas, se eleva con la edad, y está normalmente reducida en células cancerosas (Figura 4). Es curioso observar que la trimetilación de la H4-K20, se reduce después del tratamiento con el hepatocarcinógeno tamoxifeno. La pérdida de la H4-K20 trimetilada en células cancerosas puede estar causada por la pérdida de expresión de la metiltransferasa específica de H4-K20, Suv4-20h (homólogo 4-20 del supresor de la variegación de la *Drosophila*), la pérdida del supresor de tumores retinoblastoma, o la alteración de otros enzimas modificadores de las histonas. El incremento de la H4-K20 trimetilada en células envejecidas se ha asociado con defectos en la lamina nuclear, pero existen pocos datos sobre los mecanismos moleculares que conectan las laminas nucleares con la maquinaria modificadora de histonas. Sin embargo, existe una asociación entre las alteraciones de las laminas nucleares y la morfología nuclear alterada. En este aspecto, se ha observado que la alteración de FACE1, metaloproteasa implicada en la maduración proteolítica del precursor de la lamina A, se asocia con la vejez prematura y con la disrupción de la integridad de la envuelta nuclear. No se sabe si las alteraciones nucleares dependientes de lamina se asocian con alteraciones epigenéticas, aunque se observan también alteraciones en la morfología nuclear en células humanas deficientes en DNMT (10, 12).

DISCORDANCIA EPIGENÉTICA Y VARIABILIDAD FENOTÍPICA

La interacción de los factores medioambientales con la discordancia fenotípica entre gemelos monocigóticos (MZ), fueron observadas hace muchos años (13), sin embargo, poco se sabía entonces de los mecanismos moleculares mediante los cuales los factores medioambientales podían de manera permanente, o transitoria, influenciar la función genética. Posteriormente, datos obtenidos de gemelos monocigóticos (MZ), han proporcionado evidencias que corroboran que las variantes epigenéticas se acumulan con la edad de manera independiente de la secuencia genética (14). Este estudio analizó la contribución epigenética a la discordancia entre gemelos y aclaró el efecto de las características ambientales sobre la función genética. Hasta la fecha se han analizado en una gran cantidad de gemelos homocigóticos, las diferencias globales, la metilación específica del DNA y la modificación de las histonas. Los datos obtenidos han revelado un cambio epigenético entre estos hermanos MZ durante el envejecimiento, que se asoció con discordancias fenotípicas, las cuales fueron atribuida a un ambiente no compartido (15, 16). Existen evidencias experimentales de la modulación epigenética en respuesta a factores ambientales y a partir de otras fuentes. Ejemplos incluyen un ambiente intrauterino anormal asociado con la regulación de genes implicados en la función de las células beta pancreáticas y la dieta materna, respecto al perfil de metilación del DNA de la descendencia. Existen cambios epigenéticos que ocurren durante el desarrollo ontogénico, que no se pueden explicar solo por factores ambientales, tales como en

animales gemelos y endogámicos, cuando las diferencias fenotípicas ocurren en ausencia de diferencias ambientales y también cuando estas diferencias ambientales no aumentan significativamente el grado de variación fenotípica. Esto demuestra que, aparte del medioambiente, se requieren otros componentes para conseguir la variabilidad fenotípica. Éstos pueden ser el resultado de una clase de recombinación epigenética estocástica, también conocida como el *tercer componente*, después de la reproducción sexual. La hipótesis del tercer componente está en consonancia con el concepto de epigenotipos múltiples tales como variaciones epigenéticas intraindividuales (específicas de los tejidos), e interindividuales, que pueden explicar los diferentes perfiles encontrados incluso entre individuos jóvenes (17). Como la función genética y la estructura de la cromatina pueden ser moduladas por medio de modificaciones químicas en el DNA y en las histonas que lo acompañan, la idea de que el medio ambiente pueda provocar respuestas fenotípicas mediadas por factores epigenéticos resulta muy atractiva. No obstante, los mecanismos precisos mediante los cuales el ambiente puede generar estas respuestas fenotípicas adaptativas no se conoce todavía y representa un área de extraordinario interés.

Las consecuencias de los cambios epigenéticos asociados al envejecimiento se han estudiado con profundidad en levadura. En este organismo la redistribución de Sir2 y las proteínas heterocromáticas, contrarrestan el proceso del envejecimiento. La consecuencia de los varios modos de regulación epigenética asociada a la edad en mamíferos, permanece de alguna manera especulativa. Sin embargo, el envejecimiento va acompañado por varios fenotipos alterados que pueden estar conectados con los cambios epigenéticos asociados a la edad. Estudios pioneros de Richard Doll *et al.*, (18) en los pasados sesenta, indicaron que la edad se asociaba con la aneuploidia celular. Como la propia segregación cromosómica depende de la estructura y función de la heterocromatina constitutiva pericéntrica, la disminución en la metilación del DNA y la desheterocromatinización de secuencias pericentroméricas repetitivas, pueden contribuir a la segregación cromosómica defectuosa y a la aneuploidia asociada a la edad. Estudios más recientes en levadura han demostrado que la aneuploidia confiere varios fenotipos celulares alterados, incluyendo una alteración proliferativa, que puede contribuir a la disminución de la capacidad de renovación tisular con la edad. La aneuploidia puede también promover el cáncer, enfermedad para la cual el envejecimiento es el principal factor de riesgo (19). El envejecimiento está también acompañado con cambios de expresión génica. Es importante destacar que alguno de estos cambios parece que tiene un componente estocástico. Por ejemplo, el envejecimiento está asociado con una variabilidad incrementada en la expresión génica en cardiomiocitos. Las células madre hematopoyéticas viejas también exhiben cambios en la expresión génica. Estos cambios son consistentes con una predisposición hacia la

diferenciación mieloide y parecen asemejarse al cambio de linfocito a mieloide, que va unido al envejecimiento del sistema inmune y contribuye al declinar de la inmunidad adaptativa. No está claro si estas modificaciones asociadas a la edad se deben a alteraciones epigenéticas o a alteraciones genéticas (acúmulo en el daño al DNA), pero es posible que la epigenética cuente en una buena parte. De acuerdo con esta posibilidad, están las divergencias dependientes de la edad, en el perfil de metilación del DNA y acetilación de las histonas, en parejas de los gemelos MZ, antes citados. En este estudio con gemelos, aquellos genes que estaban modificados de manera diferente se expresaron también de manera diferente, lo que sugiere que la divergencia epigenética dependiente de la edad en individuos genéticamente idénticos conduce a la divergencia de los perfiles de expresión génica (14).

La metilación de las islas CpG dependiente del envejecimiento, puede presentar profundas consecuencias funcionales, en los supresores *INK4a* y *VHL* que preceden al desarrollo de cambios neoplásicos en la organización tisular. Si una consecuencia de esta metilación de los CpG es silenciar genes supresores de tumores, proceso desventajoso para el organismo, es posible que esté conectado a otros cambios beneficiosos en la estructura de la cromatina, pero refleja una dirección estocástica no determinada de este proceso. Por ejemplo, si los focos de heterocromatina asociados a la senescencia (SAHF) contribuyen al fenotipo senescente, han de contribuir en primer lugar a la supresión tumoral mediada por la senescencia. Sin embargo, los errores estocásticos en los procesos de ensamblaje de los SAHF, pueden contribuir de manera errónea a la metilación de las islas CpG en los promotores de algunos genes supresores de tumores, teniendo en cuenta el silenciamiento de estos genes en el envejecimiento. Si estos errores epigenéticos estocásticos, ocurren solo como raras mutaciones genéticas, deben conferir la primera ventaja selectiva en el camino hacia el cáncer.

DNA METILOMAS, ENVEJECIMIENTO Y CÁNCER

El perfil de metilación del DNA se hereda con una gran fidelidad en la célula normal, en cada ronda de división celular, y está asegurada por las DNA metiltransferasas (DNMT). Sin embargo, la célula vieja sufre un cambio en la metilación del DNA (Figura 4). Está demostrado que la metilación global del DNA disminuye en el envejecimiento en muchos tipos de tejidos (20) y se ha observado, que los fibroblastos de mamíferos cultivados hasta la senescencia, sufrían una mayor pérdida de la metilación del DNA. La pérdida de la metilación del DNA en la vejez se debe probablemente a la desmetilación pasiva de la heterocromatina, como consecuencia de una pérdida progresiva de la eficacia de las DNMT o de la expresión errónea del enzima por otros cofactores. Es también posible que la respuesta natural de la célula a la pérdida de la metilación del DNA, en secuencias repetidas del DNA, sea la sobreexpresión *de novo* de la metilasa del DNA, DNMT3b, como se ha encontrado en fibroblastos en

cultivo. Un resultado lógico de la sobreexpresión de DNMT3b es que regiones tales como las islas CpG, que se encuentran no metiladas en células normales, sean hipermetiladas de manera aberrante, en los genes humanos *MUTL* homólogo 1 *MutL (MLH1)* y *p14ARF*. Curiosamente, la hipometilación global del DNA, la aberrante hipermetilación y la modesta sobreexpresión de la DNMT3b, son alteraciones epigenéticas conocidas en cáncer. Así que, el acumulo de alteraciones epigenéticas durante el envejecimiento puede contribuir a la transformación tumorigénica (12).

Varias regiones del DNA genómico se hipermetilan con la edad. Por ejemplo, se ha detectado un incremento en metilcitosina dentro de los grupos de DNA ribosómico en hígado de ratas viejas, que puede asociarse con la disminución de los niveles del RNA durante el envejecimiento. La metilación de las islas CpG en tejidos no tumorigénicos se ha descrito para varios genes, incluyendo el receptor de estrógenos (ER), el antígeno de diferenciación miogénica 1 (MYOD1), el factor de crecimiento insulínico II (IGF2) y el candidato 33 supresor tumoral (N33). En algunos casos, tales como *MLH1* y *p14ARF*, la hipermetilación del promotor fue más común en tejidos envejecidos. Un estudio más reciente ha encontrado hipermetilación en el promotor de los genes supresores de tumores lisil oxidasa (*LOX*), *p16INK4a*, factor de transcripción 3 relacionado con runt (*RUNX3*), y el gen inducible TPA (*TIG1*), en mucosa gástrica no neoplásica, que se relacionó significativamente con el envejecimiento (12).

Aunque es posible asociar el acumulo de la metilación en los promotores de los genes supresores de tumores durante el envejecimiento, con la predisposición a desarrollar cáncer, no existe evidencia experimental de una relación directa entre estos genes y el envejecimiento (12). La regulación del *locus INK4/ARF* durante el envejecimiento reclama atención especial, porque la región promotora del gen *p16INK4a* gana un número mayor de islas CpG metiladas en tejidos normales envejecidos. Aunque todavía no se ha investigado, la hipermetilación en el interior de este promotor, se sugiere que *p16INK4a* se encuentra reducido en células viejas. Por otra parte, la expresión de *p16INK4a* se sabe que aumenta con la edad en mamíferos y lo más notable es que su regulación (activación) está directamente implicada en la disminución del potencial de autorrenovación de algunas células madre maduras. Así que, la regulación del *locus INK4/ARF* tiene que tener un papel importante en el envejecimiento y el cáncer. Durante el envejecimiento *INK4/ARF* puede llegar a hipermetilarse y a veces cuando la hipermetilación es extensa y densa en las islas CpG del promotor, el *locus* puede ser reprimido, favoreciendo así la transformación maligna. Al mismo tiempo, este *locus* parece estar epigenética e independientemente activado durante el envejecimiento en un proceso que puede tener un papel directo en el menor del potencial proliferativo de células progenitoras maduras (12).

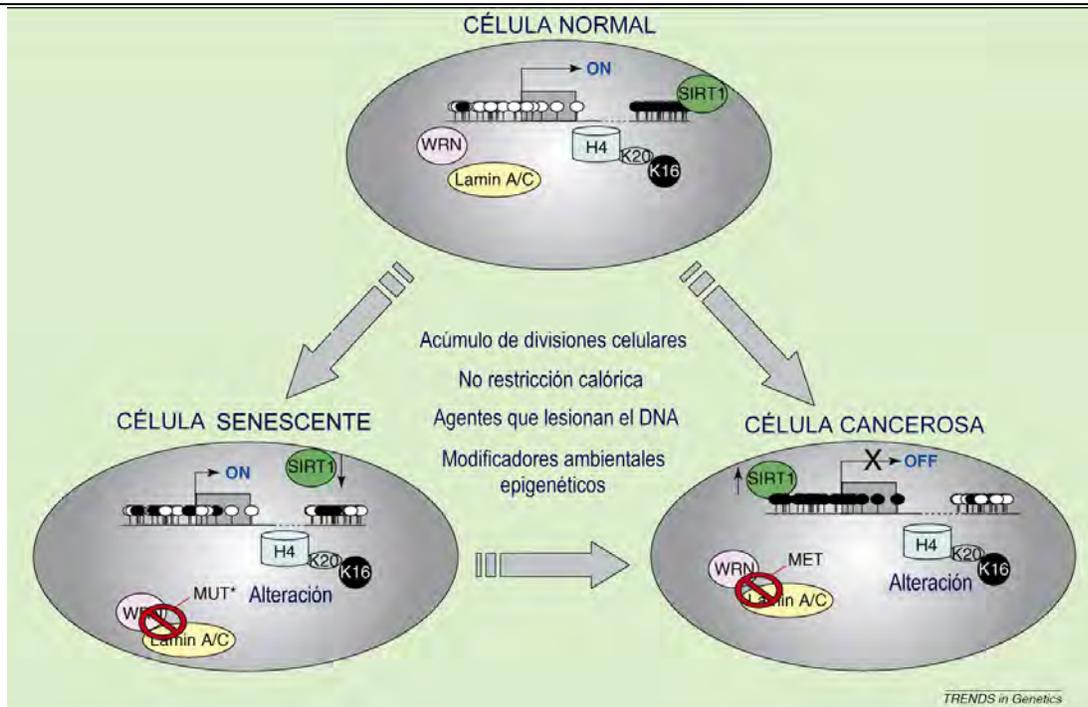


Figura 4. Epigenomas de células normales, senescentes y cancerosas. Los círculos blancos y negros indican dinucleótidos no metilados y metilados, respectivamente. Las células sanas tienen una disposición epigenética caracterizada por secuencias repetitivas con densa metilación del DNA, islotos CpG no metilados de genes constitutivos, y elevados niveles de lisina 16 monoacetilada y lisina 20 trimetilada en la histona H4. Las células cancerosas sufren hipometilación en secuencias repetitivas de DNA, hipermetilación en CpG de los genes supresores de tumores asociados con el silenciamiento transcripcional, reclutamiento de DNMT y SIRT1 en estos locus y reducción de las formas lisina 16 monoacetilada y lisina 20 trimetilada, de la histona H4. En las células senescentes debe haber una pérdida progresiva de citosinas metiladas en las regiones repetitivas y la presencia de sitios de 5-metilcitosina en las regiones promotoras, acompañados por una disminución en la actividad SIRT1. Genes relacionados con el envejecimiento, tales como WRN y lámina A/C, que funcionan correctamente en la célula joven sana, pueden convertirse en hipermetilados y silenciados en células cancerosas o tener mutaciones en la línea germinal (MUT*) en casos de síndromes progeroides, como el de Werner (WRN) o la progeria de Hutchinson–Gilford (lamin A/C) (Fraga y Esteller 2006) (12).

SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO DE LOS GENES PROGEROIDES

Los síndromes progeroides comprenden un grupo de enfermedades caracterizadas por rasgos clínicos de envejecimiento prematuro. Dos de las entidades clínicas reconocidas son el síndrome de Werner y la progeria de Hutchinson–Gilford, asociadas con mutaciones genéticas en el gen *WRN*, que codifica un miembro de la familia de RECQ de helicasas, y el de la lamina nuclear A/C (*LMNA*), respectivamente. Se ha demostrado que la inactivación epigenética de los genes progeroides, *WRN* y *LMNA*, pueden también contribuir a la transformación maligna (Figura 4). El gen *LMNA* fue el primer gen conocido implicado en el envejecimiento, que exhibe actividad supresora de tumores y está frecuentemente reprimido en cáncer por hipermetilación del promotor. La lamina nuclear se localiza en el lado interno de la membrana nuclear y consiste en filamentos del intermediario lamina tipo A y B. Las laminas nucleares son muy dinámicas sugiriéndose que están implicadas en el posicionamiento, no al azar, de los dominios subcromosómicos en la organización total de la cromatina y posiblemente en la regulación de la expresión génica. Las laminas se agrupan en las dos subfamilias

anteriormente mencionadas: tipo A, cuyos miembros se expresan en la mayoría de las células somáticas diferenciadas; y tipo B, cuyos miembros se expresan en casi todas las células y son esenciales para la viabilidad celular. El gen lamina A/C codifica las laminas A y C, dos isoformas que surgen como resultado de una rotura del RNA alternativo. Aunque las del tipo A son importantes en el mantenimiento de la estabilidad de las laminas nucleares, también tienen un papel central en el control de la expresión genética. Las mutaciones en el gen lamina A/C causa varias enfermedades hereditarias específicas de tejidos, como el síndrome de distrofia muscular Emery–Dreifuss y la lipodistrofia familiar parcial tipo Dunnigan. Es interesante destacar que la represión del gen de lamina A/C en leucemia y linfoma está frecuentemente asociado con la metilación de su promotor. Otras proteínas asociadas a lamina, tal como LAP2a, se han asociado también con la tumorigénesis; sin embargo, los mecanismos precisos moleculares mediante los cuales las laminas contribuyen al cáncer están todavía poco claros.

El síndrome de Werner proporciona otro ejemplo de un gen implicado directamente en el envejecimiento y con propiedades de supresor tumoral. El síndrome de Werner es una enfermedad de hereditaria autosómica recesiva rara,

que se caracteriza por un prematuro envejecimiento, inestabilidad genómica y un incremento en la incidencia del cáncer. Esta patología está causada por la pérdida de función del gen *WRN*, que codifica una proteína miembro de la familia RecQ con actividad helicasa y exonucleasa. Los rasgos indicativos del envejecimiento acelerado, incluyen cataratas, diabetes tipo 2, osteoporosis, varias formas de arterioesclerosis e hipogonadismo a una edad relativamente temprana. La proteína *WRN* ejerce un papel importante en muchas vías diferentes, tales como las mediadas por p53, la replicación del DNA, la reparación del DNA y el metabolismo de los telómeros. Se ha sugerido que la familia de proteínas RECQ tiene propiedades supresoras de tumores, y se ha demostrado que la expresión de *WRN* está frecuentemente reprimida en cáncer humano, por hipermetilación de las islas CpG del promotor. Incluso es más interesante el hecho que el tipo de los neoplasmas que ocurre en pacientes con el síndrome de Werner es notablemente diferente al de aquellos observados en individuos que no padecían el síndrome. Así, el cociente cáncer mesenquimático/cáncer epitelial es 1:1, mientras que en la población normal senescente es de 1:10. Por tanto, parece que el proceso acelerado del envejecimiento en pacientes con el síndrome de Werner contribuye a la mayor incidencia en tumores, pero la pérdida específica del gen *WRN* confiere un fenotipo particular propenso a tumores, de manera similar a la observada con otros genes supresores familiares con función reparadora del DNA, tal como *MLH1* (12, 21).

SIRTUINAS Y SU RELACIÓN CON EL ENVEJECIMIENTO Y EL CÁNCER

Se han descrito otros mecanismos epigenéticos que están potencialmente implicados en el envejecimiento y el cáncer. De estos, merece atención especial la familia de enzimas epigenéticos con actividad histona desacetilasa (HDAC), conocidos como sirtuinas. La acetilación de las histonas es crucial para el control de la estructura de la cromatina y para la regulación de la expresión génica. Las sirtuinas, que comprenden la clase III de la familia de las HDAC, dependientes del NAD (nicotinamido adenina dinucleótido), se encuentran implicadas en eventos celulares múltiples, entre los que se incluyen la remodelación de la cromatina, el silenciamiento transcripcional, la mitosis y el control de la longevidad. El primer miembro de la familia, SIR2 (regulador silente de la información 2), fue inicialmente descrito en levadura. Los enzimas SIR2, catalizan una reacción que implica la rotura del NAD. La delección de SIR2 acorta la vida de la levadura, mientras que una copia extra del gen la alarga, lo que implica que la familia SIR2 juega un importante papel en el envejecimiento y en la longevidad. La importancia del NAD en muchas vías metabólicas, y el hecho de que las sirtuinas puedan controlar la actividad de muchas otras proteínas que intervienen en el crecimiento celular, sugiere que la familia SIR2 se encuentra implicada en la longevidad mediada por restricción calórica (22). Se ha sugerido que el flujo de carbono en la glucólisis y el ciclo tricarbóxico están muy reducidos en condiciones de

restricción calórica y de esta manera SIR2 dispone de más cantidad de NAD para ejercer su actividad catalítica. Esto demuestra que las SIR2 establecen conexión entre el ritmo metabólico y el envejecimiento, mediante la regulación de genes que dependen del NAD y la remodelación de la cromatina. La longevidad alcanzada por restricción calórica requiere SIR2 y se acompaña por un incremento en la respiración, el cual, a su vez, eleva la actividad de las SIR2. Esta evidencia ha provocado un interés considerable en estas proteínas de mamíferos, que comprenden siete homólogos de la SIR2 de levadura: las sirtuinas 1–7 (SIRT1–7), que juegan papeles importantes en la expresión de genes, en la respuesta al estrés, reparación del DNA, apoptosis, ciclo celular, estabilidad genómica y regulación de la insulina. Por tanto, las sirtuinas intervienen en el control de vías metabólicas y en la regulación del crecimiento celular y el cáncer. Entre los miembros de esta familia, SIRT1 y SIRT2 son de interés particular porque se ha descrito que están alteradas en células cancerosas, que su expresión puede depender del envejecimiento y que actúan sobre las colas de las histonas.

La proteína SIRT1 muestra actividad desacetilasa dependiente de NAD, similar a la de SIR2 de la levadura. En mamíferos SIRT1 puede actuar sobre las histonas, principalmente sobre las posiciones H4-K16 y H3-K9, y también sobre factores de transcripción claves, como la proteína supresora de tumores p53, factores de transcripción forkhead (FOXO), histona p300 acetiltransferasa, el supresor tumoral p73, el factor de transcripción E2F1, la subunidad del antígeno de 70 kDa (Ku70) del factor de reparación del DNA, el factor nuclear kappa B (NF-κB) y el receptor de andrógenos (AR). SIRT1 se expresada ampliamente en la mayoría de los tejidos y se inhibe en células senescentes y durante el envejecimiento. SIRT1 se activa en carcinomas de pulmón, linfomas y sarcomas de tejidos de ratón, y en cáncer de pulmón, cáncer de próstata y leucemia en humanos. Más importante aún es que las histonas dianas de SIRT1, H4-K16 y H3-K9 están alteradas en varios tipos de tumor. Las células cancerosas tienen un nivel más bajo de H4-K16 monoacetilada y la hipoacetilación de H3-K9 se asocia con mayor riesgo de recurrencia en cáncer de próstata. Como SIRT1 puede desacetilar específicamente estas posiciones, su regulación en tumorigenesis podría contribuir al establecimiento del perfil específico de modificación de histonas en cáncer. En el caso de la H4-K16 monoacetilada, SIRT1 actúa como activadora a nivel del promotor del gen. De este modo, puede ser modulada la influencia de las alteraciones de SIRT1 en la H4-K16 acetilada global puede ser modulada. De hecho, una porción sustancial de las histonas H4-K16 monoacetiladas, que se pierden en células cancerosas, puede proceder de la acetilación de otras lisinas de la cola de histona y del incremento de la cantidad de isoformas H4 poliacetiladas (22).

La activación de la proteína SIRT1 en algunos tipos de tumor y su relación con la proliferación y esperanza de vida, sugiere que esta desacetilasa dependiente de NAD,

puede estar directamente implicada en la tumorigenesis. El potencial oncogénico de SIRT1 es el resultado de su papel en el control de varias moléculas cruciales. La relación más obvia con el cáncer es probablemente su capacidad de desacetilar e inactivar los genes supresores de tumores p53 y p73, aunque se ha implicado también en otros mecanismos como la desacetilación de las histonas H4-K16 localizadas dentro de los promotores de los genes supresores de tumores y otros factores como E2F1, Ku70, FOXO, el receptor de andrógenos y el NfκB (23).

SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO POR lncRNA

Los genes que codifican proteínas ocupan solo el 2 % del genoma humano, el otro 98 % se ha considerado durante mucho tiempo como “DNA basura” hasta que el proyecto de la enciclopedia de los elementos DNA (ENCODE) y el consorcio funcional del genoma de mamíferos (FANTOM) hizo sus primeras publicaciones. Con estos estudios se han identificado, mediante análisis transcriptómicos un gran número de nuevos transcritos denominados RNA no codificantes (ncRNA), procedentes de las regiones del DNA consideradas “basura”. En los últimos años el estudio de la función de los genes y su relevancia en enfermedades se ha enriquecido enormemente con el descubrimiento de estos mini genes, que si bien no producen proteínas con las que se estructuran los organismos, generan unas pequeñas moléculas de RNA capaces de regular la mayor parte de los genes de nuestras células. Estos ncRNA son una clase abundante de pequeños RNA endógenos, evolutivamente conservados, que regulan los mRNA por mecanismos tales como emparejamiento de bases y silenciamiento post-transcripcional de genes. En base a la longitud de estos transcritos, los ncRNA se han dividido en ncRNA pequeños o micro RNA (miRNA) y ncRNA grandes (lncRNAs).

Los miRNA, de unos 22 nucleótidos de tamaño, regulan la expresión génica post transcripcional, al afectar la degradación y traducción de los mRNA. Los miRNA juegan un papel importante en el crecimiento celular, diferenciación, proliferación, apoptosis y polarización de neuronas. Hasta un 30 % de genes humanos están probablemente regulados por los miRNA y cada uno de ellos puede controlar cientos de genes. Sin embargo, solo unos pocos de estos genes han sido confirmados hasta la fecha para un miRNA particular. La patogénesis de muchas enfermedades tales como cardíacas, cáncer y autoinmunes se relaciona con la expresión aberrante de genes regulados potencialmente por miRNA (24, 25).

Los lncRNA son la clase principal de ncRNA heterogéneos con magnitudes de más de 200 nucleótidos. Se les reconoce ahora como nuevos reguladores en múltiples procesos celulares: desarrollo, diferenciación, remodelación cromosómica, *imprinting* y control del ciclo celular. Se ha demostrado que los lncRNA se encuentran muy regulados y son muy específicos de cada tejido. Además la alteración de los lncRNA se ha asociado con enfermedades tales como cáncer y enfermedades

neurodegenerativas. Sin embargo, la función de la mayoría de los lncRNA permanece sin caracterizar (24, 25).

Los rasgos del envejecimiento están gobernados mediante cambios en subgrupos de proteínas. Los lncRNA pueden modular la expresión del perfil de las proteínas, controlando la transcripción genética, la estabilidad del mRNA y la abundancia de proteínas. La influencia de los lncRNA modula los eventos moleculares clave implicados en el envejecimiento, entre los que se incluyen la longitud telomérica, la expresión epigenética de los genes, la proteostasis, la función de las células madre, la comunicación intercelular, la proliferación celular y la senescencia celular. Existen evidencias, que apoyan que los lncRNA, ejercen un efecto sobre el declinar fisiológico de la vejez y las patologías asociadas. Por tanto, existe gran interés en el diagnóstico, pronóstico y valor terapéutico de los lncRNA. La fácil detección de los lncRNA en fluidos biológicos, y el fácil diseño de moléculas que eleven o disminuyan sus niveles, los hacen muy atractivos como dianas clínicas. Sin embargo, la utilidad potencial de los lncRNAs sobre las disfunciones y enfermedades asociadas a la vejez no puede hacerse realidad en la actualidad (26). Primero, porque se necesita un mayor conocimiento de los lncRNA, su modelo espacio temporal de expresión, las moléculas con las que interactúan (proteínas, DNA y RNA), y el impacto de alterar su abundancia sobre la función celular. Segundo, porque hay que desarrollar modelos animales apropiados para estudiar su función en tejidos, órganos y sistemas, y evaluar cómo actúan sobre el envejecimiento. El avance en estas áreas proporcionara mayor conocimiento molecular con intervenciones efectivas para mejorar las patologías de la edad avanzada (27).

EVOLUCIÓN EPIGENÉTICA ENTRE ENVEJECIMIENTO Y CÁNCER

La señalización anormal epigenética juega un papel importante en la tumorigenesis y además, los cambios epigenéticos pueden ser determinantes importantes en la senescencia celular y el envejecimiento del organismo. Se ha comentado anteriormente, que las modificaciones epigenéticas mejor conocidas son la metilación del DNA y las modificaciones post-transcripcionales de las histonas, tales como metilación, acetilación, ubiquitinación, ADP ribosilación, fosforilación, etc. Diversas alteraciones epigenéticas, tales como la hipometilación global y la hipermetilación de los islotes CpG, se acumulan progresivamente durante el envejecimiento y contribuyen directamente a la transformación celular. Aunque el campo de las modificaciones epigenéticas en cáncer ha sido intensamente estudiado, no ocurre lo mismo con el envejecimiento. La epigenética del envejecimiento es una disciplina que en el momento actual se encuentra en estado emergente, lo que hace concebir grandes esperanzas en las revelaciones futuras, que han de presentar un enorme interés y ser de gran utilidad por su gran repercusión a nivel patológico y social (28, 29). Interesa saber la significación biológica de las alteraciones epigenéticas en términos de sus relativas contribuciones al desarrollo

ontogénico, la senescencia y la proliferación celular. También interesa conocer cuáles son las alteraciones epigenéticas que se acumulan por efecto de la vejez y tienen un papel directo en la transformación celular, y aquellas modificaciones epigenéticas que muestran una clara evolución durante el envejecimiento, que se invierten en cáncer (30). El ejemplo mejor conocido del primer caso, es la pérdida global de metilación del DNA en envejecimiento y en cáncer y la hipermetilación del promotor de genes con un doble papel en la supresión tumoral y en la progeria, tales como *WRN* y *LNMA*. Uno de los ejemplos más estudiados del segundo caso es probablemente la longitud telomérica que puede ser

controlada por modificaciones epigenéticas y decrece con la edad, pero se eleva rápidamente después de la transformación (31). Recientemente se ha descrito que la actividad de varios miembros de la familia de sirtuínas, que actúan sobre las histonas, disminuye en el envejecimiento, mientras que se eleva en células cancerosas. Como las sirtuínas se ha propuesto que establecen una relación entre la restricción de la dieta y la longevidad, considerando el papel específico de varios miembros de esta familia en la tumorigénesis, surge la posibilidad que las sirtuínas establezcan también conexión entre la dieta y el cáncer (Figura 5) (28).

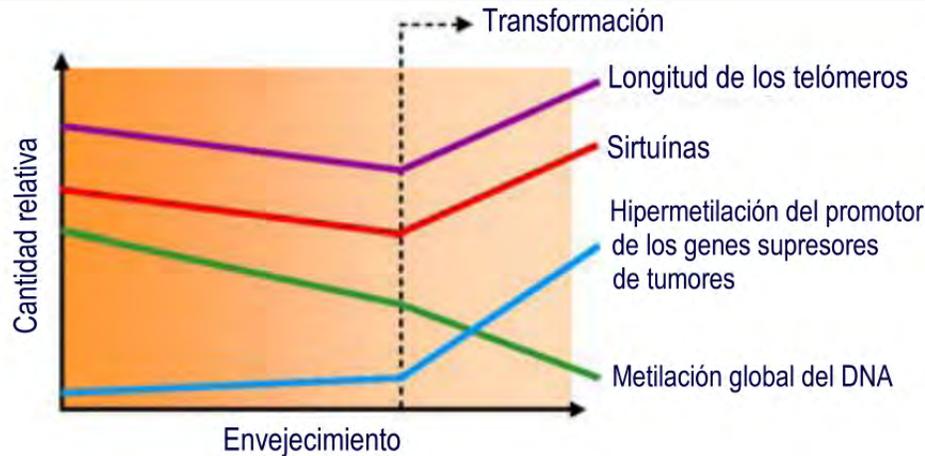


Figura 5. Evolución de los mecanismos moleculares relacionados con la epigenética durante el envejecimiento y el cáncer (Fraga, Agrelo y Esteller 2007) (28).

FÁRMACOS EPIGENÉTICOS

Entre las dianas terapéuticas epigenéticas, las metiltransferasas del DNA y las desacetilasas de las histonas, son en la actualidad las más estudiadas en lo que se refiere a nuevos fármacos. Los perfiles de metilación del DNA son relativamente maleables y la exploración de las marcas epigenéticas está siendo en la actualidad un medio útil de detección temprana y diagnóstico. Como las alteraciones en las modificaciones epigenéticas son reversibles, los fármacos epigenéticos que revierten la metilación aberrante del DNA, inhibiendo la actividad de las DNMT o la de los enzimas que modifican las histonas, específicamente las HDAC, ya son quimioterapias aprobadas para algunas clases de cáncer. Como el epigenoma puede también ser modulado por la dieta, la prevención es un campo emergente de investigación para enfermedades asociadas a la edad. Por ejemplo, las modificaciones epigenéticas responsables de la enfermedad de Alzheimer (AD), en los genes implicados en la memoria y el aprendizaje, se ha demostrado que están hipometiladas en esta enfermedad. Por tanto, se ha postulado que el suplemento dietético con agentes donadores de metilo, como el ácido fólico (precursor de la SAM), puede ayudar a restaurar la capacidad cognitiva que declina con la edad (31). Los inhibidores de la HDAC se ha demostrado que poseen relevancia clínica potencial en

la AD; así, el ácido valproico, reduce la producción del β -amiloide y alivia los déficits de comportamiento en modelos murinos de AD (Figura 6). Como los fármacos que revierten las modificaciones epigenéticas anómalas no son específicos, hay de tratar de buscar la especificidad para mejorar la terapéutica epigenética. También hay que considerar que un epigenoma individual puede ser modulado por dietas sanas y un estilo de vida saludable, que reducen el riesgo de enfermedad y los achaques propios de la vejez (32). Componentes fitoquímicos como el resveratrol (activador de las sirtuínas) y la curcumina (poderoso antioxidante), están siendo considerados y recomendados por sus efectos sobre el envejecimiento y la calidad de vida.

En la actualidad, las dianas más avanzadas en este campo son las DNA metiltransferasas (DNMT), y las histona desacetilasas (HDAC), para las que ya hay fármacos aprobados por las agencias reguladoras y están utilizándose en clínica. Además, diversos inhibidores de la HDAC y de la DNMT se encuentran hoy en día en ensayos clínicos que incluyen terapias combinadas. Las restantes dianas, histona acetiltransferasas (HAT), histona metiltransferasas (HMT), e histona desmetilasas (HD) se encuentran en estadios menos avanzados que van desde los desarrollos preclínicos a las fases clínicas. Hay que destacar que estos inhibidores están siendo estudiados en enfermedades asociadas al envejecimiento, por

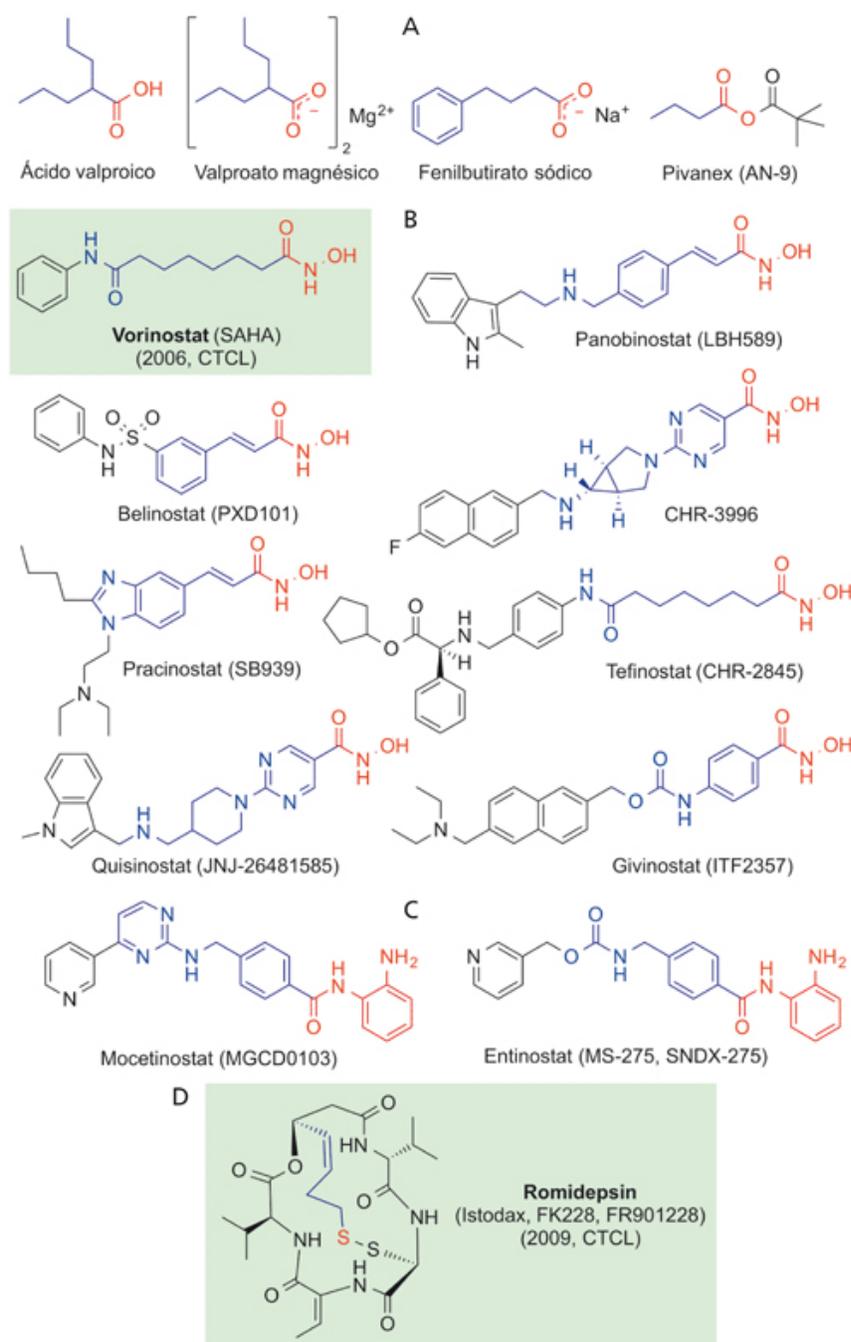


Figura 6. Inhibidores de HDAC I, II y IV que se encuentran en uso clínico (enmarcados en verde, con la fecha de aprobación y el uso) o en ensayos clínicos. Los grupos o ciclos de cierre, los grupos quelantes (A: carboxilo o carboxilato; B: hidroxamato o ácido hidroxámico; C: benzamida y D: tiol o sulfuro) y los brazos separadores entre ambos están marcados en negro, rojo y azul, respectivamente (Cossio FP) (33)

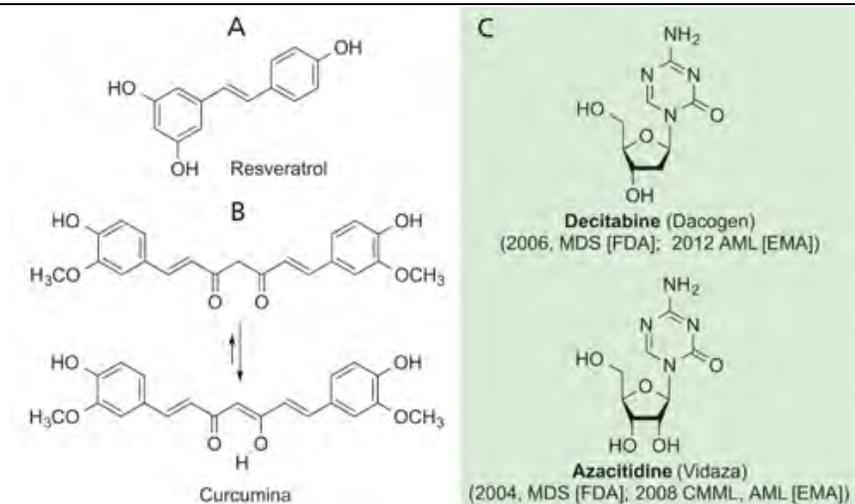


Figura 7. (A) Activadores de la SIRT1, (B) inhibidores de la HAT, y (C) inhibidores de la DNMT, que se encuentran en uso clínico (enmarcados en verde con la fecha de aprobación y el uso) o en ensayos clínicos (Cossio FP) (33).

Es un hecho reconocido que las vías biológicas implicadas en las enfermedades asociadas a la vejez, tienen algún componente de disregulación epigenética, sin embargo, todavía permanecen sin resolver muchas preguntas: los mecanismos precisos que gobiernan estos procesos, el efecto del envejecimiento y las interacciones entre el medio ambiente individual, el epigenoma y el genoma.

CUESTIONES PENDIENTES Y DIRECCIONES FUTURAS

Es aparente que la estructura de la cromatina cambia con la edad en organismos tan diversos como la levadura y los mamíferos. Sin embargo, con la excepción de SIR2 en levadura, la intensidad a la cual esto ejerce impacto en el proceso de envejecimiento no ha sido aún definido. Aunque nos encontramos al principio de las investigaciones sobre este campo, se puede proponer que algunas alteraciones epigenéticas asociadas a la edad en mamíferos, tal como la formación de SAHF, pueden influir sobre la longevidad al suprimir las enfermedades asociadas al envejecimiento. Se ha sugerido que un componente estocástico no regulado, derivado de los cambios en la estructura de la cromatina, puede conducir al gradual deterioro en la función de células y tejidos. Por analogía con las alteraciones genéticas (daño al DNA), el acumulo de los cambios epigenéticos puede considerarse como “daño a la cromatina”. En resumen, los efectos de la cromatina sobre el envejecimiento es probable que sean complejos y bidireccionales. Un prerrequisito para conocer la contribución de la epigenética al envejecimiento es comprender mejor los fenotipos senescentes específicos, tales como la osteoporosis, sarcopenia, el declinar de la función inmune, alopecia, cáncer y muchos otros. Entonces será posible analizar la contribución a cada fenotipo, de los candidatos epigenéticos determinantes, tales como la hipometilación global, la hipermetilación de los islotes CpG y la aparición de SAHF. Hasta que esto llegue, se puede ya empezar a aplicar el conocimiento adquirido. Por ejemplo, se pueden usar las alteraciones

epigenéticas, como un medio de detección temprana y estratificación del riesgo de enfermedades asociadas al envejecimiento. Existe ya un considerable interés en el desarrollo de métodos para la detección temprana del cáncer, basados en la hipermetilación de las islas CpG del promotor de genes supresores de tumores, en un número muy pequeño de células cancerosas encontradas en sangre u otros fluidos accesibles del organismo. Sin embargo, si la hipermetilación de CpG es un evento frecuente preneoplásico asociado a la edad, ha de ser posible ampliar esta tecnología al riesgo del cáncer, en base a la hipermetilación en tejidos preneoplásicos. De la misma manera, puede ser también posible usar los cambios epigenéticos de la edad en células cardiacas o inmunes para la valoración del riesgo o la detección temprana de enfermedad cardiovascular o pérdida de la función inmune. La meta última de la investigación sobre el envejecimiento es retrasar o aliviar las enfermedades o achaques de la edad, prolongando la vida de manera saludable. Para los aspectos epigenéticos del envejecimiento, esto puede ser un logro accesible, porque en principio las alteraciones epigenéticas son más reversibles que las alteraciones genéticas. No solo pueden utilizarse en la valoración del riesgo y en la detección temprana del cáncer, sino que pueden ser una estrategia quimiopreventiva del mismo cáncer. Es un hecho demostrado que la adición de un activador de la SIRT1, el *resveratrol*, a la dieta de ratones alimentados con dieta rica en grasas, prolonga la vida saludable de estos ratones, simulando la contribución bien establecida de la restricción calórica de la dieta a la longevidad. Aunque hay mucho por resolver, estos estudios demuestran que existe en la actualidad gran interés en profundizar en estos temas y en un potencial de estrategias quimiopreventivas para combatir los achaques del envejecimiento y el desarrollo del cáncer. La modificación epigenómica por estímulos ambientales afectan la transcripción y la estabilidad genómica con consecuencias importantes en la longevidad y establece a grandes rasgos diferencias epigenéticas entre

el soma mortal y la línea germinal inmortal.

CONCLUSIONES

La epigenética ejerce un papel importante en la determinación de las diferencias fenotípicas en la vejez. Una vez que se conocen los cambios en la metilación del DNA y las modificaciones de las histonas en el transcurso de la edad, es razonable esperar que estos descubrimientos tengan su repercusión en la clínica y se diseñen fármacos que eviten o aminoren los achaques propios de la edad, tales como la enfermedad mental, la diabetes y el desarrollo de algunos tipos de cáncer. El conocimiento de la naturaleza de las modificaciones epigenéticas en la vejez nos va a proporcionar nuevas estrategias para contrarrestar su impacto en las enfermedades asociadas a la edad. Sin embargo esto no será tan fácil porque algunos cambios epigenéticos que tienen lugar en la vejez no pueden explicarse solo por los factores ambientales. Existe también un componente estocástico en la variabilidad fenotípica. Se necesita establecer, por un lado, los mecanismos moleculares mediante los cuales exposiciones ambientales particulares inducen cambios epigenéticos específicos, y, por otro lado, en qué proporción la variabilidad fenotípica hereditaria asociada con la vejez puede ser ascrita a los factores epigenéticos. Nuestro conocimiento de la variación epigenética y la herencia está todavía en su infancia, pero posteriores estudios han de proporcionar sin duda información importante en un futuro cercano.

REFERENCIAS

1. Waddington CH. Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* 1942; 150: 563-4.
2. Goldberg AD, Allis AD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007; 128: 635-8.
3. Slack JMW. Conrad Hal Waddington: the last renaissance biologist?, *Nature reviews genetics* 2002; 3: 889-95.
4. Noble D. Conrad Waddington and the origin of epigenetics. *Journal of Experimental Biology* 2015; 218: 816-8.
5. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153: 1194-1217.
6. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693-705.
7. Sedivy JM, Banumathy G, Adams PD. Aging by epigenetics – a consequence of chromatin damage? *Exp Cell Res* 2008; 314: 1909-17.
8. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130: 223-33
9. Blasco MA. Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *EMBO J* 2005; 24: 1095-103.
10. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21: 5427-40.
11. Lara E, Calvanese V, Fraga MF. Epigenetic Drift and Aging. In: *Epigenetics of Aging Tollefsbol TO* (ed.), Springer Sciences 2010; pp. 258-73.
12. Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 2006; 38: 413-8.
13. Wilson RS. Synchronies in mental development: an epigenetic perspective. *Science* 1978; 202: 939-48.
14. Fraga MF, Ballester E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu Y-Z, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10604-9.
15. Petronis A. Epigenetics and twins: three variations on the theme. *Trends Genet* 2006; 22: 347-50.
16. Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF. The epigenetic basis of twin discordance in age related diseases. *Pediatr Res* 2007; 61: 38R- 42R.
17. Gartner K. A third component causing random variability beside environment and genotype. A reason for the limited success of a 30 year long effort to standardize laboratory animals? *Lab Anim* 1990; 24: 71.
18. Doll R. Susceptibility to carcinogenesis at different ages. *Gerontol Clin* 1962; 4: 211-21.
19. Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? *Nature Rev Cancer* 2003; 3: 339-49.
20. Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 1983; 220: 1055-7.
21. Agrelo R, Cheng WH, Setien F, Ropero S, Espada J, Fraga MF, Herranz M, Paz MF, Sanchez-Cespedes M, Artiga MJ, Guerrero I, Castells A, von Kobbe C, Bohr VA, Esteller M. Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103: 8822-7.
22. Mostoslavsky R, Esteller M, Vaquero A. At the crossroad of lifespan, calorie restriction, chromatin and disease: meeting of sirtuins. *Cell Cycle* 2010; 9: 1907-12.
23. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv* 2016; 2: 7.
24. Liz J, Esteller M. lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development. ; 1859: 169-76.
25. Hammond SM. MicroRNAs as tumor suppressors. *Nature Genetics* 2007; 39: 582-4.
26. Grammatikakis I, Panda AC, Abdelmohsen K, Gorospe M. Long noncoding RNAs (lncRNAs). *Aging* 2014; 6: 992-1009.
27. Degirmenci U, Lei S. Role of lncRNAs in Cellular Aging. *Front Endocrinol* 2017; 7: 151.
28. Fraga MF, Agrelo R, Esteller M. Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language. ; 1100: 60-74.
29. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of

- epigenetics events in cancer. *Nature Rev Genet* 2002; 3: 415-28.
30. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethyloma. *Human Mol Genet* 2007; 16: R50-R59.
 31. Bernardes de Jesus B, Blasco MA. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet* 2013; 29: 513-20.
 32. Feil R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res* 2006; 600: 46-57.
 33. Cossio FP. Fármacos epigenéticos. *Revista Epigenética de la SEBBM* 2017; 191.

El sistema de regulación celular de envejecimiento

Gustavo Barja de Quiroga

Departamento de Fisiología Animal-II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid

ABSTRACT: The mitochondrial rate of reactive oxygen species (ROS) production and the degree of fatty acid unsaturation of cellular membranes are low in long-lived animals. Dietary restriction, protein and methionine restriction, and rapamycin, the four known experimental manipulations which increase mammalian longevity, also decrease mitROSp at complex I and oxidative damage to mtDNA. This could increase longevity by decreasing mtDNA fragments accumulation inside nuclear DNA. Pre-nuclear signaling of longevity, the nuclear aging program, and the aging effectors are the three main constituents of the cellular aging regulation system (CARS). The three best known aging effectors of the genetic aging program of aerobic tissues are mitochondrial ROS production, membrane fatty acid unsaturation, and autophagy. This program reacts to cytoplasmic signaling proteins, influenced by nutrients, drugs and hormones, varying the activity of the mitROSp and autophagy aging effectors. An analogous program, although with additional gene clusters of aging involved and wider output activity, can determine longevity in different animal species.

RESUMEN: Los animales longevos tienen niveles bajos de producción mitocondrial de ROS y de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares. La restricción de calorías, de proteínas, o de metionina, y la rapamicina, que son las cuatro manipulaciones experimentales conocidas que aumentan la longevidad de los mamíferos, también disminuyen la producción mitocondrial de ROS en el complejo I y el daño oxidativo al ADNmt. Esto parece contribuir a aumentar la longevidad porque disminuye la acumulación de fragmentos del ADNmt insertados dentro del ADN nuclear. La señalización pre-nuclear de la longevidad, el programa nuclear del envejecimiento, y los efectores de envejecimiento, son los tres constituyentes principales del sistema de regulación del envejecimiento celular (CARS). Los tres efectores del envejecimiento mejor conocidos de los tejidos aerobios son la producción mitocondrial de ROS, la insaturación de los ácidos grasos de las membranas, y la autofagia. El programa de envejecimiento nuclear reacciona a las proteínas citoplásmicas de señalización influenciadas a su vez por nutrientes, fármacos y hormonas, variando al menos dos efectores, la producción mitocondrial de ROS y la autofagia. Un programa análogo, aunque con clusters génicos adicionales implicados, y con mayor nivel de expresión génica, puede determinar la longevidad de las distintas especies animales.

Corresponding Author: gbarja@bio.ucm.es

An Real Acad Farm Vol. 83, N° 1 (2017), pp. 129-139

El envejecimiento causa 100.000 muertes al día y 40 millones al año en todo el mundo. Es responsable del 70 % de todas las muertes a nivel mundial y del 90 % en España y los demás países desarrollados. Todas las enfermedades degenerativas, como la mayoría de los casos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, demencias seniles como al enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la osteoporosis, la diabetes tipo 2, o las autoinmunes por definición tienen una raíz común: el proceso endógeno del envejecimiento. Cuando somos mayores, incluso si tenemos la suerte de sobrevivir a una de estas enfermedades terribles, casi siempre acaba viniendo otra que acabará con nosotros. La razón es que el cuerpo, incluso en personas mayores sanas, está envejecido y seriamente dañado de forma irreversible en multitud de sus células y componentes celulares. Mientras no eliminemos el envejecimiento, no se podrán evitar la inmensa mayoría de los cánceres y de las demás enfermedades degenerativas. Intentar curar las enfermedades degenerativas una a una conforme van apareciendo nunca acabará con ellas. En cambio, si derrotamos al envejecimiento, las eliminaremos a todas con una única manipulación.

La ralentización del envejecimiento volverá a poner en marcha la evolución hacia una mayor longevidad, que es

una de las claves del éxito de nuestra especie, junto con la inteligencia, la postura erguida o la sociabilidad. Nuestra longevidad se multiplicó por diez, desde los aproximadamente diez años que vivirían nuestros primeros ancestros primates, los pequeños Plesiadatiformes como el *Purgatorius* del tamaño de una ardilla, hasta los 120 años de longevidad máxima de los centenarios humanos más longevos. Este 1.000 % de aumento de la longevidad ha dado el resultado maravilloso del que todos podemos disfrutar, incluyendo por primera vez la autoconciencia de la naturaleza, la belleza, la bondad, la búsqueda de la verdad y tantas otras cosas de valor incalculable. Sin ese aumento evolutivo de longevidad de un orden de magnitud nada de eso hubiese aparecido o hubiese sido apreciado por ningún ser vivo. Para conseguir reanudar ese proceso de aumento de longevidad que nos libraré de todas las terribles enfermedades degenerativas y volverá a poner en marcha nuestro camino evolutivo hacia una complejidad, inteligencia y sociabilidad aún mayor, primero hay que comprender bien los mecanismos fundamentales del envejecimiento desde el nivel celular y subcelular hacia arriba por los distintos niveles de organización biológica. Dicho conocimiento ha aumentado de modo exponencial desde el umbral del nuevo siglo en el año 2.000. Una vez en

posesión de ese conocimiento científico básico, la enorme capacidad de las técnicas de la biología molecular, junto con la nutrigenómica y farmacogenómica modernas, nos permitirán por fin llevar a cabo el viejo sueño de la humanidad: disminuir, por primera vez en la historia, la velocidad del envejecimiento humano.

Cuando consigamos disminuir, de verdad, la velocidad del envejecimiento del ser humano de con una intensidad importante, podremos alcanzar por ejemplo los 120 años con una edad biológica equivalente a la que tiene hoy una persona de 30 años. Eso sería una extensión de la longevidad de "solamente" tres veces, en lugar de las diez veces que ya logramos desde nuestro antepasado de tipo Plesiadatiforme. Eso sí que sería vivir mucho pero con salud, fuerza y vitalidad, nada que ver con la situación de los pocos centenarios que hoy día se acercan a los 120 años de edad. La aproximación contraria aplicada el pasado siglo XX, proteger a la gente solamente de la muerte pero no del envejecimiento, ha dado lugar a un gran incremento de las personas que alcanzan la edad avanzada, de forma que llegan a mayores pero están biológicamente viejos y por lo tanto frágiles y con cada vez mayor probabilidad de sufrir tarde o temprano una enfermedad degenerativa mortal. Este incremento de la población mayor está generando una enorme carga a los sistemas de sanidad y seguridad social de nuestra sociedad, aumentando enormemente la proporción de individuos muchas veces crónicamente enfermos y en general social y económicamente dependientes. Nuestras sociedades desarrolladas pero envejecidas, con su carga socioeconómica y sanitaria cada vez más insostenible, sufren lo que se denomina "el problema del envejecimiento". Todo esto se podrá solucionar acercándonos cada vez más hacia el envejecimiento insignificante, la "negligible senescence". La biogerontología es la clave para solucionar este enorme problema y ayudar a impulsar a la humanidad a un futuro aún más brillante en la senda evolutiva desde la simplicidad hacia la complejidad en la que está ya comprometida desde hace millones de años, desde el polvo inerte a las bacterias, a las células eucariotas modernas, la vida multicelular, el ser humano actual, y una sociedad futura sin envejecimiento y mejor que la actual.

EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

Es muy difícil definir el envejecimiento, por lo que existen varias definiciones de este proceso. Una de ellas es que consiste en el conjunto de cambios negativos que ocurren en el individuo adulto que dan lugar a un aumento de la probabilidad de sufrir enfermedades y la muerte. También lo caracterizan las llamadas "cuatro reglas del envejecimiento". La primera regla nos dice que el envejecimiento es **universal**. Esto significa que lo experimentan absolutamente todos los individuos humanos. Esto también es aplicable a la mayoría de las especies animales, sobretodo a las más cercanas a nosotros como los mamíferos. Cuando se trata de animales complejos como nosotros, todas las especies estudiadas muestran envejecimiento, aunque eso sí, a velocidades muy distintas.

La segunda regla nos dice que es **progresivo**. No nos mantenemos jóvenes hasta los 80 años y luego envejecemos de golpe. Por el contrario, las distintas manifestaciones del envejecimiento, como las disminuciones de las distintas funciones fisiológicas, van ocurriendo progresivamente a todas las edades desde el adulto joven hasta el viejo. Aunque dicha velocidad sea diferente en los distintos individuos y aún en los distintos órganos dentro de un mismo individuo. Pero la diferencia en la velocidad del proceso es muchísimo mayor entre especies que dentro de especies. Sólo en los mamíferos, la ballena más longeva envejece 200 veces más despacio que una musaraña, y el hombre lo hace 35 veces más lentamente que un ratón. En los animales en su conjunto la velocidad de envejecimiento entre especies puede variar hasta 200.000 veces o incluso millones de veces desde insectos que viven un día o incluso menos hasta el mejillón *Arctica islandica* que vive 512 años o la esponja *Scolymastra joubini* que parece poder alcanzar los 15.000 años.

La tercera regla nos dice que el envejecimiento es **irreversible**. Es un proceso que se produce, de modo natural, en una sola dirección, de joven a viejo, y nunca en sentido contrario. Por eso los gerontólogos piensan que su explicación fundamental ha de incluir cambios que se acumulan con la edad en nuestros órganos y tejidos sin posibilidad de ser reparados. Por último, el envejecimiento es un proceso de origen **endógeno**. A él se le puede sumar daño de origen externo que empeora nuestra salud. Pero aunque vivamos aislados en un ambiente óptimo seguiremos envejeciendo a la velocidad típica de nuestra especie. Porque el origen mismo del proceso procede del interior de nuestro cuerpo.

Además de estas cuatro reglas básicas, es importante señalar que el envejecimiento se manifiesta de forma más acusada en los órganos y tejidos llamados **post-mitóticos**. Éstos son los que tienen poca o nula capacidad de división celular. Cuando en un tejido las células se dividen continuamente, aunque algunas se dañan durante el envejecimiento, las no dañadas dan lugar a células sanas nuevas, y así la función del tejido puede mantenerse bastante bien con el tiempo. Además la división celular por sí misma disminuye el daño, ya que las alteraciones quedan diluidas en las células hijas debido al crecimiento del material celular tras la mitosis. En cambio el daño celular en los tejidos post-mitóticos da lugar a células alteradas permanentemente o a muerte celular. Esto es lo que ocurre en la mayoría de las neuronas, o en las células musculares esqueléticas o cardíacas. Estas células son en su inmensa mayoría postmitóticas, y los órganos que las contienen, cerebro, corazón y sistema muscular, son los más afectados durante el envejecimiento.

El envejecimiento afecta a los distintos órganos y sistemas. En el hombre produce cambios en la figura corporal, disminuye la estatura y redistribuye la grasa corporal desde zonas periféricas hasta zonas internas como las abdominales. Se produce un deterioro en la capacidad de regulación de la temperatura y de muchos otros parámetros fisiológicos, disminuye la frecuencia cardíaca,

especialmente la frecuencia máxima durante el ejercicio y los vasos sanguíneos se hacen menos elásticos. En el aparato respiratorio disminuye el número de alvéolos y de capilares, con un descenso de la elasticidad pulmonar y de la distensibilidad de la caja torácica, y la función pulmonar máxima disminuye. En el aparato digestivo se reduce la cantidad de saliva, disminuye la sensación gustativa, suele haber alteraciones en la dentición y descienden las funciones motora y secretora. El sistema nervioso se ve particularmente afectado debido a fenómenos de atrofia y muerte neuronal con alteraciones en los neurotransmisores y en los distintos circuitos neuronales. Disminuye el flujo sanguíneo cerebral y la velocidad de procesamiento en las funciones intelectuales superiores, disminuye la fijación de la memoria, y aumenta el tiempo de reacción. En la parte sensitiva del sistema nervioso se producen pérdidas importantes en los sentidos del oído, la vista, y el tacto.

Hay una pérdida muy importante de masa y densidad ósea, especialmente en las mujeres a partir de la menopausia. También hay una pérdida importante de masa muscular conocida como sarcopenia, y hay cambios negativos en las articulaciones con aumento de fibrosis en la membrana sinovial y pérdida de elasticidad del cartílago. También disminuyen la masa renal, la tasa de filtración glomerular y la función renal. Todos estos cambios disminuyen la capacidad de homeostasis, la capacidad de reaccionar de forma compensatoria frente al estrés y las agresiones externas. El anciano se hace frágil y vulnerable.

LONGEVIDAD MEDIA Y MÁXIMA

Cuando se habla de longevidad es necesario distinguir la

longevidad media (parecida a la esperanza de vida de una población) de la longevidad máxima. La primera corresponde al tiempo medio de vida de los individuos de una población dada, mientras que la segunda se refiere al tiempo de vida de los individuos más longevos de la misma.

La longevidad media depende en gran medida de las condiciones ambientales y por eso es mucho mayor en los países desarrollados que en los subdesarrollados. La longevidad media ha aumentado mucho a lo largo de los últimos cien años en los países desarrollados hasta situarse alrededor de los 82 años en las mujeres y un 10 % menos en los hombres, mientras que a principios del siglo veinte alcanzaba en muchos de esos países solamente unos 40-50 años. En este proceso han intervenido multitud de factores como los avances en la higiene, la aparición de fármacos efectivos como los antibióticos, el descenso de mortalidad infantil, o las mejoras marcadas en las técnicas y cuidados médicos y su grado de cobertura social. El aumento de la longevidad media da lugar a lo que se conoce en gerontología como rectangularización de las curvas de supervivencia (Figura 1). Conforme mejoran las condiciones de vida, las curvas de supervivencia se van volviendo más rectangulares porque cada vez es mayor el porcentaje de individuos que llegan a viejos, pero el problema es que están viejos. Todas las curvas siguen cortando el eje X (de abscisas) en el mismo punto, que corresponde a la longevidad máxima de la especie, y que supera sólo un poco los 100 años en la especie humana. Siempre ha habido centenarios, lo que ocurre es que cuando las condiciones de vida eran malas, había muchos menos.

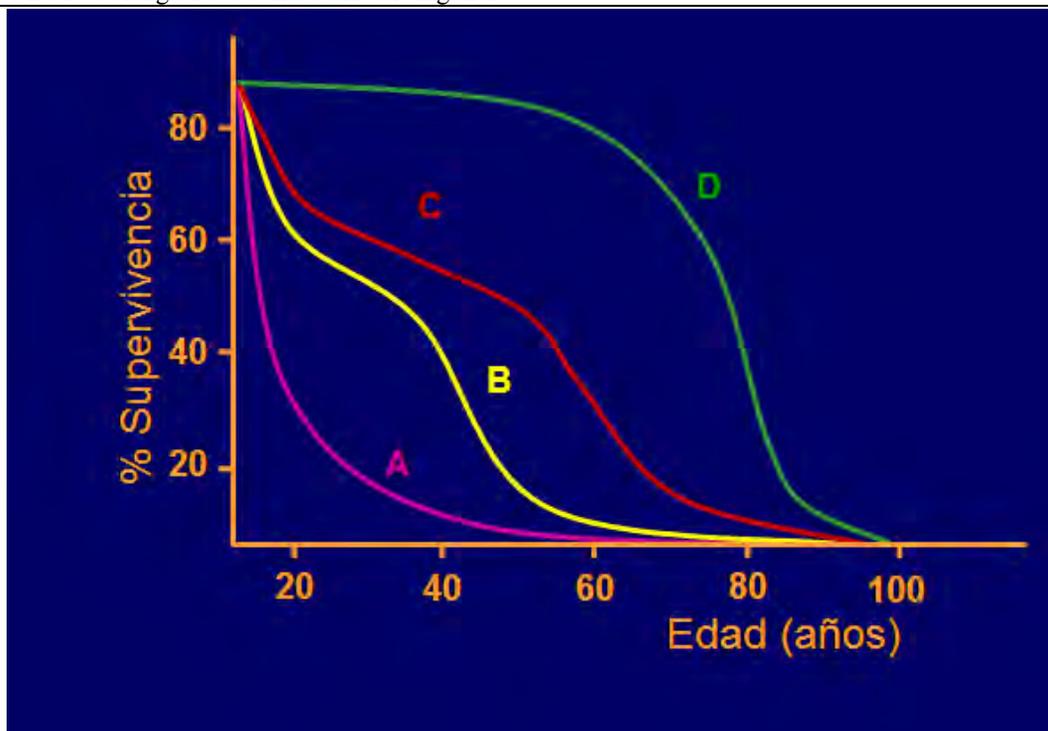


Figura 1. Las curvas de supervivencia de las poblaciones humanas se han ido rectangularizando en los países desarrollados desde la antigüedad (curva A) hasta la actualidad (curva D) conforme mejoraban las condiciones de vida, lo cual ha aumentado mucho la longevidad media. Sin embargo el punto donde caen todas las curvas en el eje x, la longevidad máxima, no se ha modificado. Esto se debe a que en este proceso ha aumentado la probabilidad de sobrevivir y llegar a viejo, pero no ha disminuido la velocidad del envejecimiento.

La rectangularización de la curva de supervivencia aumenta el porcentaje de individuos que llegan a viejos, así como el número de centenarios, pero no aumenta la longevidad máxima porque la velocidad del proceso biológico intrínseco del envejecimiento sigue siendo la misma. Por eso el aumento de longevidad media sin aumento de longevidad máxima, sin disminución de la velocidad del envejecimiento, ha envejecido la población, e irónicamente ha creado "el problema del envejecimiento". Ha permitido que el envejecimiento se manifieste de forma masiva. Un tratamiento futuro que sea capaz de retrasar el envejecimiento no sólo rectangularizará la curva de supervivencia, sino que la desplazará a la derecha en el tiempo, aumentando la longevidad máxima de la población. Esto sería muy beneficioso porque solamente esto nos permitirá vivir más años pero (de verdad) con buena calidad de vida. Por ejemplo alcanzando los 80 años de edad cronológica con la salud y el estado general de un hombre actual de 57 años de edad biológica si disminuimos en sólo un 40 % la velocidad del envejecimiento, algo que ya se ha conseguido en mamíferos como los ratones (ver más abajo). Eso solo se conseguirá si se consigue ralentizar la velocidad del envejecimiento humano y por lo tanto aumentar su longevidad máxima. La **longevidad máxima** es específica de cada especie y alcanza sólo unos días en las moscas, 3-4 años en ratas y ratones o 120 años en la especie humana. Esto se debe a que la longevidad máxima, a diferencia de la media, está fundamentalmente bajo control genético. Sin embargo, en experimentos con animales ya se ha conseguido aumentarla de forma apreciable mediante manipulaciones genéticas, o incluso ambientales que inciden en las vías celulares internas bajo control genético. Estos experimentos se han realizado con levaduras, gusanos o insectos, pero también en mamíferos como ratones de laboratorio, lo que abre la esperanza de que en un futuro no muy lejano se puedan aplicar al hombre.

TEORÍAS DEL ENVEJECIMIENTO

En el pasado se han propuesto un gran número de teorías para intentar explicar el fenómeno del envejecimiento. La mayoría de ellas se fijan en algún aspecto particular del deterioro a nivel orgánico, celular o molecular. Las teorías orgánicas incluyen a la **neuroendocrina** y la **inmunitaria**. La teoría neuroendocrina se centra en que los sistemas nervioso y endocrino son los principales encargados de controlar y regular a todo el organismo. Por lo tanto, su deterioro daría lugar a un mal funcionamiento de los demás órganos y sistemas. En cuanto al sistema inmunitario, es el que nos defiende de los ataques de agentes patógenos como virus y bacterias. Su deterioro, por lo tanto, podría ser también causa de daño en todos los demás sistemas. Sin embargo estas teorías no explican cual es la causa del envejecimiento de los propios sistemas neuroendocrino e inmunitario, dejando al final sin explicar qué causa el envejecimiento. Hoy en día se considera que las causas fundamentales del envejecimiento se sitúan a nivel celular o molecular, aunque es probable que existan también fenómenos de comunicación interorgánicos que ayuden a coordinar el envejecimiento del individuo en su

conjunto.

Una teoría celular que tuvo mucho éxito en los años 70 del siglo XX fue la del **límite de la duplicación celular** de Leonard Hayflick. Esta teoría se basaba en la observación de que los fibroblastos cultivados en el laboratorio podían duplicar sus poblaciones mediante división celular un número limitado de veces y dicho número era mayor cuanto más longeva era la especie animal de la que procedían las células. Esta teoría cayó en desuso cuando se pudo observar que dicho límite no era tan fijo como se creía al principio, sino que podía aumentar cuando se mejoraban las condiciones ambientales en las que se cultivaban las células. La teoría del límite de la duplicación celular ha resurgido en parte en los últimos años cuando se ha comprobado que los **telómeros** (los extremos de los cromosomas) pierden material genético cada vez que la célula se divide. Esto podría ser la base de la existencia de límites a la duplicación celular, cuando el ADN telomérico se agota. Sin embargo existen muchos puntos oscuros, como el hecho de que la longitud telomérica no correlaciona bien con la longevidad máxima del ratón y el hombre. En cualquier caso, este fenómeno no puede explicar por qué envejecen las células postmitóticas (que no se dividen) como muchas neuronas y células musculares y cardíacas. Sí podría, en cambio, dar cuenta de parte del envejecimiento en tejidos con gran actividad de división celular.

Las teorías más exitosas hoy en día son las teorías "**moleculares**" que son las más abundantes en número. La mayoría de ellas se centran en algún tipo de deterioro que ocurre en las macromoléculas celulares con la edad. Uno de los cambios mejor conocidos que ocurren en las células postmitóticas durante el envejecimiento es la acumulación de **lipofuscina**. Se trata de acumulaciones heterogéneas de proteínas y lípidos oxidados y entrecruzados, relacionados con unos orgánulos citoplásmicos con capacidad degradativa llamados lisosomas, que se van acumulando con la edad en el citoplasma de la célula y que se pueden observar al microscopio. Representan materiales que la célula no ha podido ni expulsar ni digerir, es decir, una especie de acumulación de "basura" celular. No hay acuerdo en si dicha acumulación puede llegar o no a disminuir las funciones celulares, pero en cualquier caso la lipofuscina es un excelente marcador de envejecimiento a nivel celular. En los últimos años ha cobrado importancia el fenómeno de la autofagia, que en relación con los lisosomas, permite la eliminación de macromoléculas e incluso de orgánulos celulares muy dañados como mitocondrias que no pueden repararse. Cuanto mayor autofagia, menor es la acumulación irreversible de basura celular (lipofuscina) que parece ser capaz de acabar dañando a la célula.

Otra teoría molecular se basa en la observación de que conforme las células envejecen se forman puentes cruzados intra- o intermoleculares en muchas macromoléculas, como por ejemplo en el colágeno, o entre proteínas y ADN en el núcleo celular. Estos **entrecruzamientos** aumentan la rigidez y dificultan la funcionalidad de las moléculas implicadas. Otra fuente de modificación de macromoléculas es el fenómeno de la **glicación o glicooxidación** no

enzimática. En este caso moléculas del tipo de los carbohidratos, que poseen grupos químicos activos, se unen de forma covalente a proteínas (o incluso al ADN) celulares modificándolas y, mediante reacciones químicas posteriores que incluyen fenómenos oxidativos, dan lugar a productos de glicosilación avanzada (AGE) con potencialidad para alterar las funciones de las moléculas implicadas. También se ha propuesto que el envejecimiento podría deberse a la acumulación de **mutaciones somáticas**, que son cambios en el ADN de las células no germinales, es decir, las que constituyen la mayoría de los órganos y sistemas. El atractivo principal de esta teoría es que puede explicar el carácter claramente **irreversible** del envejecimiento mediante la acumulación de cambios genéticos no reparables aunque, como muchas otras teorías, no es capaz de explicar qué podría causar la aparición de esas mutaciones a velocidades tan diferentes en las distintas especies animales.

Otra teoría es la de la **velocidad de vida** ("rate of living"). Según ella la velocidad del envejecimiento es mayor cuanto más grande es la tasa metabólica por gramo de cada especie animal. Por eso suelen vivir menos los animales pequeños que los grandes dentro de un mismo grupo como por ejemplo los ratones frente a los elefantes en el caso de los mamíferos. Aunque esto es cierto en muchas especies, también son muchas las excepciones, razón por la cual, al menos en su forma primitiva, esta teoría se considera descartada como explicación general. Una teoría que tuvo bastante difusión en su día pero que se considera errónea por falta de evidencias en su favor es la de los **errores catastróficos** en el proceso por el cual la información pasa desde el ADN a las proteínas. Por otra parte, durante la última década se ha descubierto que las mutaciones que disminuyen la actividad del sistema de señalización de la "**insulina/IGF-1-like**" son capaces de incrementar la longevidad en especies que cubren un amplio abanico de la escala evolutiva, desde las levaduras hasta los ratones pasando por la mosca *Drosophila* o el gusano nematodo *C. elegans*. Entre las teorías moleculares también está la de los **radicales libres** que discutimos más abajo en detalle.

Por último, se han propuesto también **teorías "evolutivas"**. Estas no pretenden explicar como las anteriores a qué se debe el envejecimiento, sino **por qué** apareció en la evolución. Incluyen las del **soma desechable, la de la pleiotropía antagonista, o la de la mortalidad extrínseca**, y la que hoy en día está ganando cada vez más adeptos a la vista de multitud de evidencias en su favor, la del **envejecimiento programado**. Parece cada vez más claro que la velocidad del envejecimiento está escrita en nuestro genoma, lo que explicaría la enorme diversidad y la gran variación cuantitativa de la longevidad entre especies e incluso en una misma especie cuando se somete a restricción calórica (ver mas abajo) o a mutaciones de un único gen como por ejemplo los de la señalización insulina/IGF-1-like que ya consiguen aumentar la longevidad hasta en un 40 % frente a

la de los individuos normales en mamíferos como los ratones. Esto es equivalente a aumentar la longevidad máxima humana desde los más de 115 años actuales hasta los 160 años. Los distintos ratones longevos por mutación de un sólo gen que suben la longevidad hasta un 40 % son tantos que se cuentan ya por muchas decenas.

EL ENVEJECIMIENTO POR RADICALES LIBRES DE ORIGEN MITOCONDRIAL

Esta teoría fue propuesta inicialmente por el estadounidense Denham Harman y tiene muchos apoyos científicos en la actualidad. Los radicales libres son sustancias nocivas derivadas del oxígeno que respiramos, que se producen en nuestras células, especialmente en una parte de las mismas encargada de producir la energía celular durante la combustión de los derivados de los alimentos: en las mitocondrias. Irónicamente el oxígeno, indispensable para la vida, parece ser también un responsable principal de que nos vayamos degradando poco a poco.

Los radicales libres atacan a las macromoléculas que constituyen las células, sean proteínas, lípidos o ADN (Figura 2). Estas lo soportan gracias a que poseen una multitud de sustancias antioxidantes. A la vista de esto, se ha intentado alargar la vida de muchas especies animales aumentando sus niveles de antioxidantes, suplementándolos en la dieta o manipulando los genes que controlan los antioxidantes celulares. Sin embargo, estas investigaciones no han dado resultado, especialmente en el caso de los mamíferos. Parece que la situación no es tan simple y se ha estado incidiendo en el lado equivocado.

Se ha observado que los animales pertenecientes a especies de vida larga (como la vaca, nosotros o muchas aves) producen menos radicales libres por unidad de tiempo que los de vida corta como las ratas de laboratorio (que envejecen en dos años), lo que puede explicar porqué tienen menor daño oxidativo en el ADN mitocondrial (ADNmt) y envejecen más despacio. La cercanía física entre el ADNmt y el generador mitocondrial de ROS, que incluso parecen estar en contacto físico, explica la poca capacidad de los antioxidantes para interceptar a los radicales antes de que dañen al ADNmt. Parece que la madre naturaleza ha organizado así las cosas para impedir que la ingesta de antioxidantes modifique un parámetro tan vital para una especie como es la velocidad de su envejecimiento, lo cual sería catastrófico para la especie o el grupo. De acuerdo con estos conceptos, se ha observado que cuanto más longeva es una especie, menor es el grado de daño oxidativo en su ADN mitocondrial de modo análogo a lo que ocurre con su producción mitocondrial de ROS (Figura 3). Además, la teoría de los radicales libres puede explicar muchos de los fenómenos básicos de otras teorías moleculares, ya que están implicados en la formación de lipofuscina, dan lugar a entrecruzamientos moleculares, intervienen en la glicooxidación, pueden explicar la teoría de la "velocidad de vida", y dan lugar a mutaciones cuando impactan en el ADN.

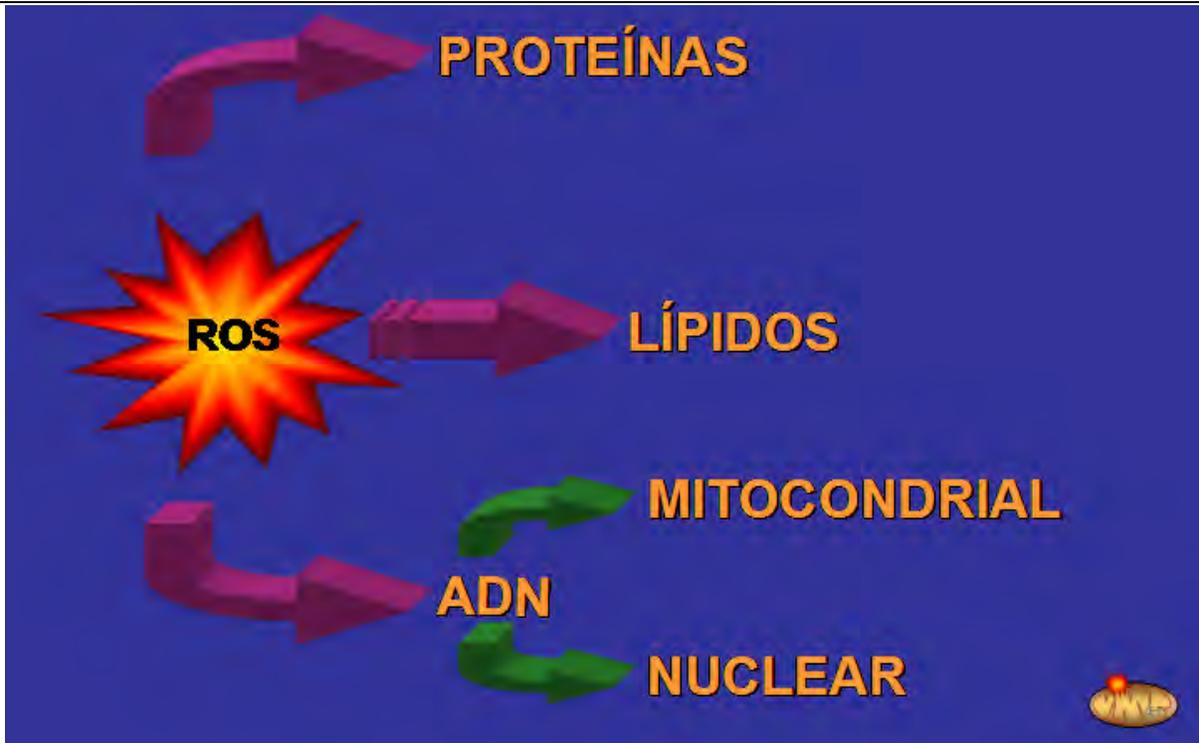


Figura 2. Los radicales libres (especies reactivas derivadas del oxígeno, ROS) son moléculas con un electrón desapareado en su orbital más externo. Debido a esto, reaccionan con rapidez con las macromoléculas celulares, sean proteínas, lípidos o ADN, modificándolas y dañándolas.

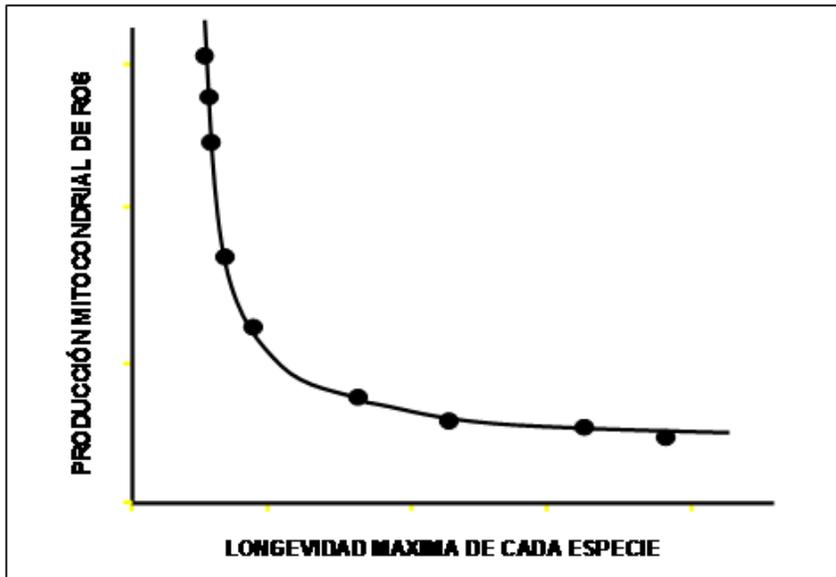


Figura 3. Cuanto mayor es la longevidad de una especie animal menor es su producción mitocondrial de ROS. Cada punto corresponde a una especie de mamífero con longevidad diferente. Se observó también una relación con una curva similar para el daño oxidativo en el ADNmt frente a longevidad de la especie.

El daño oxidativo crítico para el envejecimiento depende de la intensidad con la que las mitocondrias producen radicales libres. Aunque dichos radicales atacan a las proteínas o lípidos mitocondriales o celulares, éstos se reparan tarde o temprano. Sin embargo, cuando el ADNmt es atacado por radicales libres, este se rompe dando lugar a

grandes deleciones y fragmentos de ADNmt. Antes se pensaba que las grandes deleciones eran importantes pero como existen miles de copias de los genes mitocondriales por célula hoy se sabe que en la mayoría de los tejidos postmitóticos de los individuos viejos las deleciones del ADNmt no alcanzan el tanto por ciento suficiente en

homoplasma para causar daño. Sin embargo, las roturas del ADNmt producen además de deleciones, fragmentos de ADNmt que no se habían estudiado antes. Quizás el problema es que se había centrado el enfoque en las deleciones en vez de lo que falta del ADNmt, los fragmentos. Recientemente se ha descubierto que los fragmentos del ADNmt salen de las mitocondrias, viajan por el citoplasma, entran en el núcleo y se insertan en el ADN nuclear durante el envejecimiento del individuo, análogamente a lo que ocurrió durante la evolución de las células eucariotas (Figura 4). Esto se ha visto tanto en la levadura como en cerebro o hígado de ratas y ratones. Estas inserciones pueden producir daño durante el envejecimiento de diversas formas. Los fragmentos de ADNmt pueden insertarse en genes estructurales o regiones reguladoras,

causando cáncer y envejecimiento. Se ha demostrado que la puerta de entrada al núcleo son las regiones pericentroméricas de los cromosomas. Por su cercanía física al aparato de división celular, la gran cantidad de fragmentos de ADNmt presentes en esas regiones podrían dar lugar a aneuploidías o reorganizaciones cromosómicas causando inestabilidad genética durante el envejecimiento, análogamente a lo que ya se sabía que ocurre en el cáncer. Estos distintos mecanismos se investigan en la actualidad y son importantes porque su carácter es un daño irreversible que no puede repararse, a diferencia del daño oxidativo *per se* a macromoléculas, y se acumula en forma de muerte o malfuncionamiento celular en los órganos con células postmitóticas.

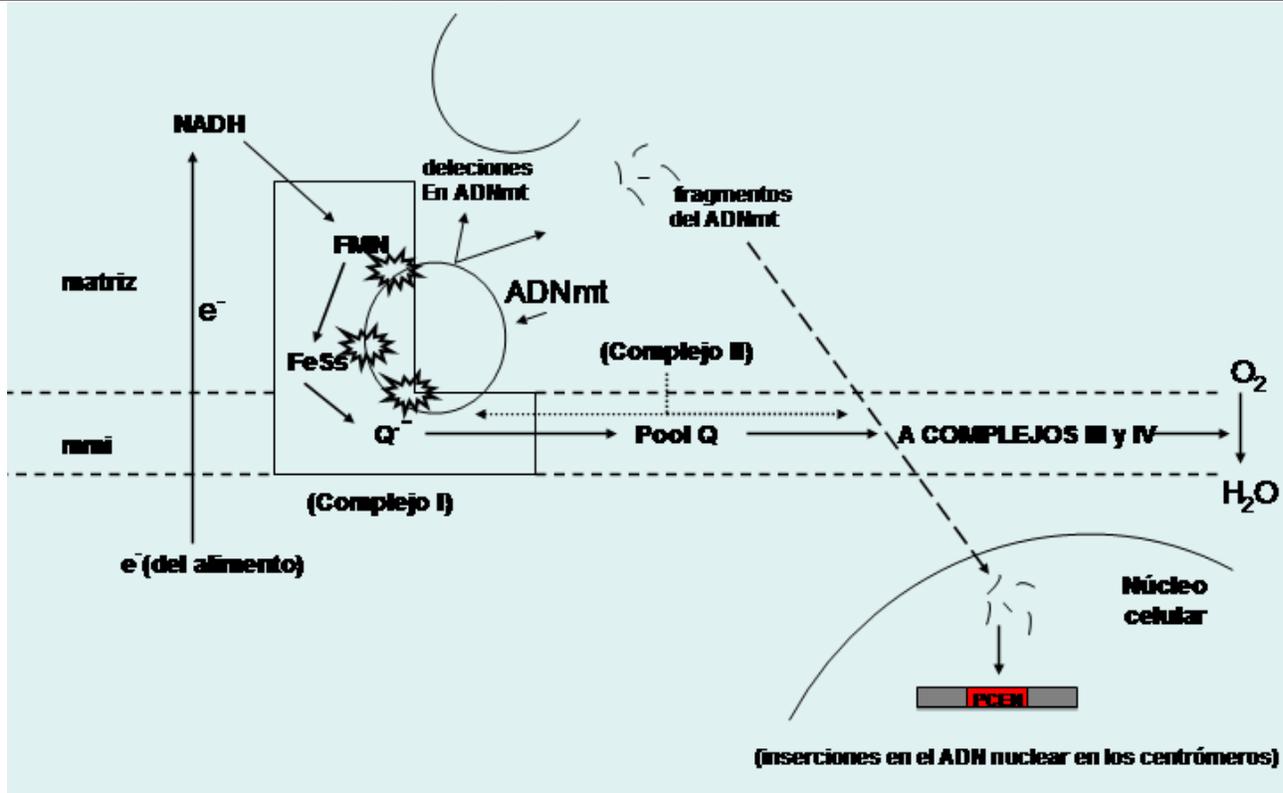


Figura 4. Los ROS producidos en el complejo I mitocondrial producen deleciones y fragmentos de ADNmt. Dichos fragmentos viajan al núcleo celular durante la vida del individuo y se insertan en el ADN nuclear entrando a través de los centrómeros de los cromosomas. Esto puede causar muerte y/o malfuncionamiento celular durante el envejecimiento. mmi = membrana mitocondrial interna; e- = electrones; FMN = flavina; FeS = centros hierro-sulfurados; Q = ubiquinona; las estrellas representan los sitios de producción de ROS en el complejo I.

LAS RESTRICCIÓN CALÓRICA, O SÓLO DE PROTEÍNAS, ALARGA LA VIDA

A pesar de las dificultades para manipular el envejecimiento, existe una forma bien conocida de disminuir su velocidad: la restricción calórica o restricción de dieta (DR). Cuando un animal come poco, bastante menos de lo que le apetece, su cuerpo envejece más despacio. Esto se ha comprobado en multitud de especies animales cuando se les restringe el aporte calórico sin caer en la malnutrición ni en ningún tipo de deficiencia. El fenómeno se observa en todo tipo de especies, desde levaduras e invertebrados hasta mamíferos como las ratas y ratones de laboratorio y recientemente se ha comprobado en

experimentos de 20 años de duración en EEUU en los primates *Macacus rhesus*. Es la manipulación más robusta conocida que aumenta la longevidad animal. Es la DR pero sin malnutrición ni deficiencia en ningún elemento esencial o vitamina, lo que les alarga la vida. Biológicamente tiene sentido. ¿Para qué traer hijos al mundo si no hay forma de alimentarlos adecuadamente? En lugar de eso el animal retrasa su envejecimiento esperando a tiempos mejores para reproducirse. Es decir, que se trata de una respuesta programada en el genoma por ser adaptativa para la especie.

En los EEUU hace ya casi dos décadas que existen grupos de humanos voluntarios que realizan DR bajo supervisión de expertos. Los resultados son positivos y

similares a los obtenidos en roedores de laboratorio. Se sabe que el cuerpo humano se adapta a la DR de forma que el individuo no pasa hambre ni siquiera aunque combine DR con ejercicio. Por otra parte, se ha visto que restringiendo sólo la ingesta de proteínas sin necesidad de disminuir las calorías (PR), también aumenta la longevidad y lo mismo ocurre disminuyendo la ingesta de un único aminoácido, la metionina (MetR), mientras que no hay evidencias de que la restricción de carbohidratos o de grasas modifique la longevidad. El aumento de la longevidad conseguido con PR y MetR es aproximadamente la mitad del obtenido haciendo DR al 40 %, pero la ventaja es que no hay que disminuir la cantidad total de ingesta. Podemos comer cuanto queramos y basta con restringir sólo las proteínas para obtener aún un beneficio sustancial, un 20 % de aumento de longevidad. Esto es interesante también porque se sabe que la ingesta proteica de los humanos en las sociedades desarrolladas es varias veces superior a la cantidad recomendada por día, lo que indica que existe un amplio margen para su disminución. Además, si la MetR se hace al 40 % no se produce retraso del crecimiento en animales inmaduros, cosa que sí ocurre con la DR al 40 %. Las tres restricciones, DR, PR y MetR, han demostrado también disminuir las enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento como cánceres, cardiovasculares, demencias seniles, inmunitarias, etc. y mejorar los descensos en funcionalidad asociados a la edad e indicadores biológicos asociados a la morbilidad de muchas enfermedades, todo lo cual indica que retrasan el proceso endógeno del envejecimiento.

LA RAPAMICINA, EL PRIMER FÁRMACO QUE AUMENTA LA LONGEVIDAD EN MAMÍFEROS

Puesto que se había sostenido que muchas sustancias podrían tener efectos antienvjecimiento, para aclararlo los institutos de salud de los EEUU (NIH) lanzaron un programa llamado ITP (Intervention Testing Program) para ponerlas a prueba simultáneamente en tres laboratorios diferentes e independientes. Los resultados demostraron que muchas de esas sustancias no aumentaban la longevidad de los mamíferos, excepto una sola de ellas, la rapamicina. La rapamicina es el primer y de momento el único fármaco en la historia que ha demostrado aumentar la longevidad

máxima en ratones de laboratorio. Su efecto es aún un poco menor que el de la PR, pues aumenta la longevidad un 14 % cuando se usa a la dosis más óptima. Se sabe que su acción se debe a que la rapamicina inhibe la proteína de señalización celular del envejecimiento mTOR. La MetR, la PR y la DR tienen efectos mayores sobre la longevidad que la rapamicina porque inciden en otras vías de señalización celular además de en mTOR.

ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL, RESTRICCIONES DE DIETA Y RAPAMICINA

De modo análogo a lo que ocurre entre especies, se sabe que todos los tipos de restricciones de dieta que aumentan la longevidad (DR, PR y MetR) disminuyen la intensidad de producción mitocondrial de ROS y el daño oxidativo al ADN mitocondrial, cosa que no ocurre al restringir las grasas o los carbohidratos de la dieta. Es decir, que ocurre lo mismo con la longevidad y con la producción mitocondrial de ROS y el responsable de que este parámetro aumente es la proteína de la dieta, y más concretamente un solo aminoácido: la metionina. Es muy interesante que el único fármaco conocido que aumenta la longevidad de los mamíferos, la rapamicina, también disminuye la producción mitocondrial de ROS. De hecho consigue revertir por completo el aumento de dicha producción desde los ratones jóvenes a los de mediana edad y hace lo mismo con la acumulación de fragmentos de ADNmt en el ADN nuclear, disminuyendo así el daño que dichos fragmentos vimos antes que causaban en el genoma nuclear durante el envejecimiento.

En resumen, todas las manipulaciones conocidas que aumentan la longevidad de los mamíferos, la DR, la PR, la MetR y la rapamicina (Figura 5), disminuyen la producción mitocondrial de ROS. Y curiosamente, el sitio donde lo hacen no es cualquiera. En los cuatro casos dicha disminución ocurre en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, concretamente en su dominio hidrofílico dirigido hacia el interior de la mitocondria donde se sitúa el ADNmt. Es muy interesante que en las especies especialmente longevas en las que se ha estudiado, las aves, se ha encontrado lo mismo: su menor producción de ROS ocurre también exclusivamente en el complejo I.

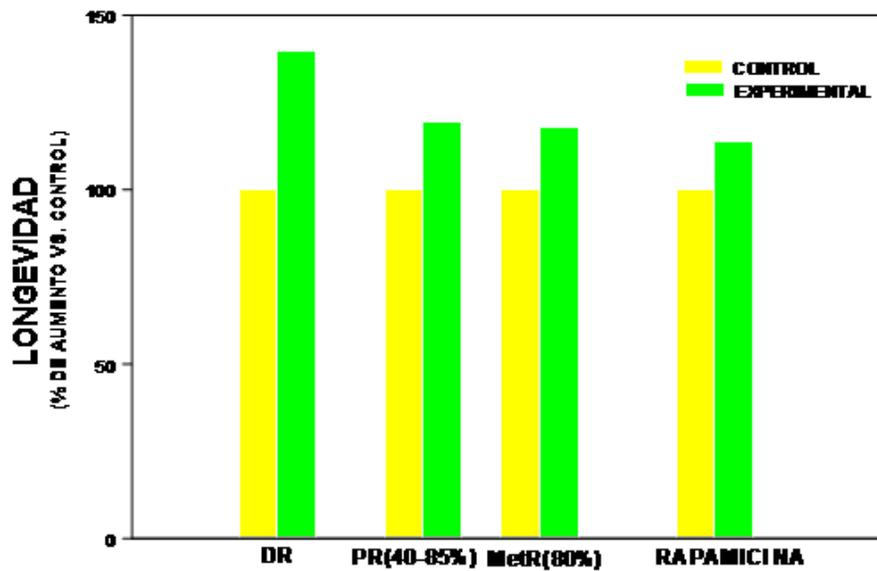


Figura 5. Los tres tipos de restricciones de dieta DR, PR, y MetR y la rapamicina aumentan la longevidad media y máxima en los mamíferos y las cuatro disminuyen la producción mitocondrial de ROS en el complejo I y el daño al ADNmt. La DR es la que tiene mayor efecto sobre la longevidad, seguida por la PR y MetR, y la que menos efecto tiene es la rapamicina. La DR tiene ese efecto implementándola al 40 % (el grado de restricción de la PR y la MetR utilizados se muestran en la figura).

EL SISTEMA DE REGULACIÓN CELULAR DEL ENVEJECIMIENTO (CARS)

Todos los datos anteriores encajan en un modelo general que controla el envejecimiento a nivel celular (CARS; Figura 6). Las restricciones de dieta y la rapamicina impactan sobre proteínas de señalización celular del envejecimiento pre-nucleares (parte izquierda de la Figura 6). Éstas a su vez envían señales al programa de envejecimiento (aging program, AP) mediante factores de transcripción y otros reguladores génicos, el cual responde variando la expresión de cientos de genes. La respuesta se concreta en la acción de los efectores (ejecutores) del envejecimiento, de los cuales hay ya tres conocidos que actúan tanto en los órganos con células mitóticas como postmitóticas: disminuye la producción de ROS en las mitocondrias, baja el DBI (grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas), y aumenta la autofagia y el resultado es el aumento de longevidad. De los tres, la producción mitocondrial de ROS actúa tanto en las DRs

como entre especies. El DBI actúa entre especies y dentro de especies sólo baja en la restricción más intensa (80 %MetR), pero no en la DR estándar (al 40 %). Y la autofagia sube en la DR y no se ha estudiado si actúa entre especies de diferente longevidad. Si se eliminan genes de autofagia baja la longevidad pero lo inverso, que es lo más importante, aún no se ha demostrado. Otros posibles factores como el acortamiento telomérico, tendrían importancia pero restringida a las células mitóticas. Los mutantes longevos se explican también con este modelo ya que los genes mutados corresponden a proteínas de las vías de señalización pre-nucleares que son en parte las mismas (como las de insulina/IGF-1-like) que las implicadas en la señalización pre-nuclear de las DRs. El que la DR tenga más efecto que la PR y la MetR y que la rapamicina se debe al número de vías de señalización afectadas, que es mayor en la DR que en la PR y MetR, y en estas dos es mayor que en la rapamicina la cual sólo afectaría al complejo proteico de señalización m-TOR.

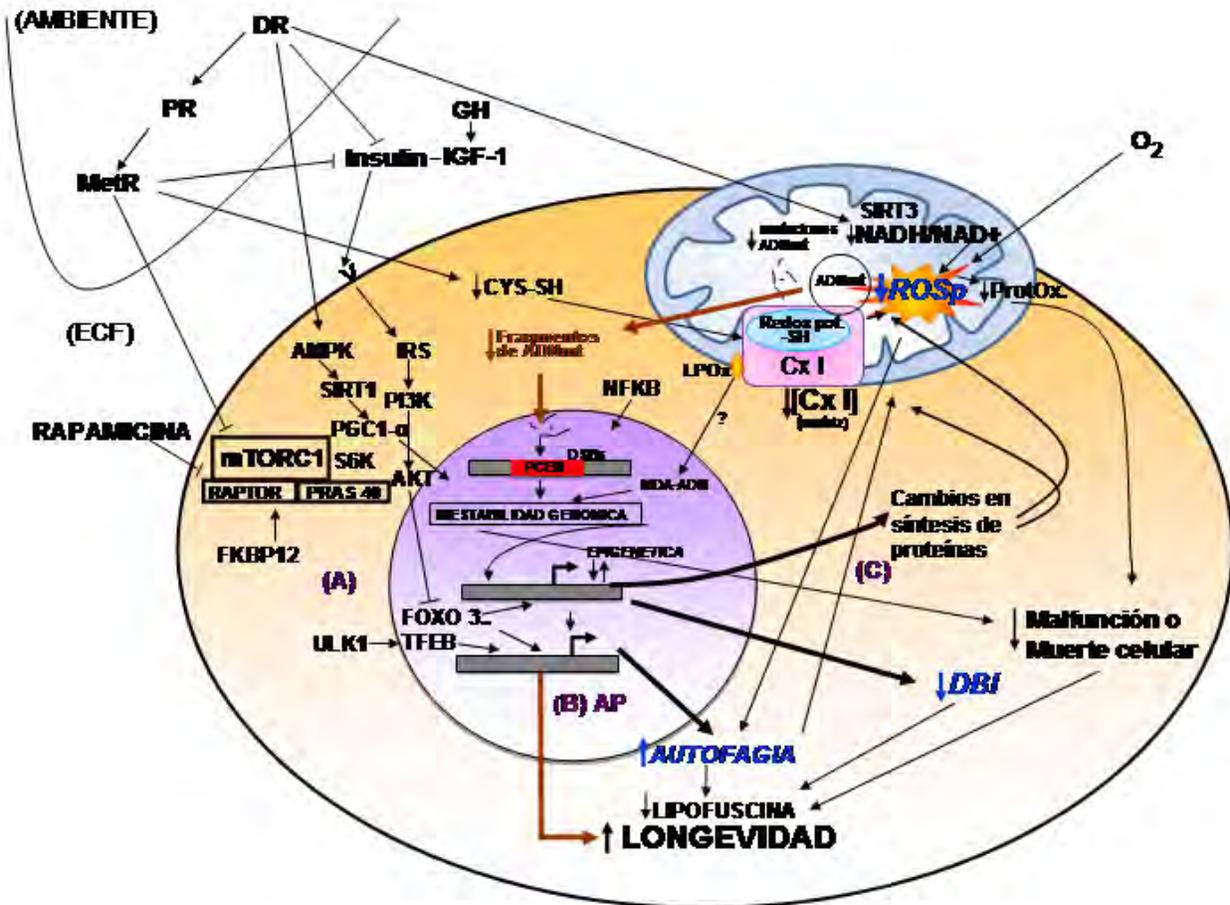


Figura 6. El Sistema de Regulación del Envejecimiento Celular (CARS) está compuesto básicamente de señales pre-nucleares de longevidad (A: izquierda), el programa de envejecimiento del núcleo (B: AP), y los efectores de envejecimiento (C: derecha). Se conocen al menos tres efectores de envejecimiento en células de tejidos tanto mitóticos como postmitóticos: la producción mitocondrial de ROS, el DBI (grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares), y la autofagia.

El modelo coincide con el hecho bien comprobado de que la respuesta de aumento de longevidad, tanto en DR como en MetR, supone cambios en la expresión de un gran número de genes, que además no son todos los mismos en los dos tipos de restricción sino que muestran solapamientos parciales. Estas respuestas son además específicas tanto de tejido como de especie, lo que supone la existencia de un programa de envejecimiento celular que responde a las señales ambientales de variación de nutrientes.

Aunque el AP implique a centenares de genes diana finales, es lógico esperar que éstos estén controlados por un número mucho menor de genes reguladores (genes maestros) que, una vez localizados y alterados pueden generar aumentos de longevidad mucho mayores que los de las DRs (máximo de 1,4 veces). Esto es así porque el AP debe poseer clusters de genes tanto para variar longevidad entre especies como dentro de especies. Es decir, que no hay dos APs separados sino que se solapan en parte. Entre especies se espera que el grado de expresión de los genes del AP varíe más y/o implique a mayor número de genes diana. La clarificación de la organización del AP del núcleo es fundamental para poder aumentar la longevidad de los

mamíferos aun más allá del 40 % que ya se ha logrado.

Por otra parte, en la figura 6 se observa que aunque muchas de las respuestas de longevidad dependen del núcleo celular, en algunos casos hay vías directas que conectan la DR o la MetR con los efectores de envejecimiento, por ejemplo con la producción de ROS en la mitocondria. Además, el flujo de información también está sujeto a retroalimentación. Por ejemplo el AP controla el nivel de producción de ROS en la mitocondria. Cuando este sube, se producen más fragmentos de ADN mitocondrial que pasan al núcleo, insertándose en el ADN nuclear, causando probablemente daño o muerte celular y contribuyendo así a producir envejecimiento y cáncer. Otro factor de complicación adicional es la epigenética que, en el mismo núcleo, a través de sus cambios con la edad, parece contribuir a modificar la acción del AP sobre el envejecimiento.

El modelo CARS integra los diferentes mecanismos moleculares conocidos que se sabe que están implicados en la determinación de la longevidad. Es un modelo de trabajo abierto a modificaciones conforme se vayan descubriendo nuevos mecanismos. También ayuda a minimizar la confusión entre causas, programas, efectores, y cambios

finales irreversibles en el envejecimiento. A la vista del CARS queda claro que no tiene sentido decir que la longevidad se debe a vías como la señalización insulina/IGF-1-like y no a la mitocondria. Sería análogo a decir que en un arco reflejo medular sólo existe la vía sensitiva pero no el centro integrador de la médula ni el efector muscular. Ambos son parte del CARS, la señalización de la insulina como una vía pre-nuclear del AP y las mitocondrias como un efector del mismo. En cualquier caso, la existencia de un programa de envejecimiento es una buena noticia porque su disminución y eliminación en el futuro, cuando lo conozcamos suficientemente bien, nos permitirá abrir las puertas en dirección a la eterna juventud. Mientras que con las teorías clásicas anteriores que suponían que el envejecimiento se debía a infinitas causas estocásticas no había esperanza de poder dominarlo.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Barja G. Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects and confounding concepts. *Antiox Redox Signaling* 2013; 19: 1420-45.
- Colman JR, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, *et al.* Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325: 201-4.
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; 460: 392-5.
- Lapierre LR, Kumsta C, Sandri M, Ballabio A, Hansen M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy* 2015; 11: 867-80.
- Martínez-Cisuelo V, Gómez J, García-Junceda I, Naudí A, Cabré R, Mota-Martorell N, *et al.* Rapamycin reverses age-related increases in mitochondrial ROS production at complex I, oxidative stress, accumulation of mtDNA fragments inside nuclear DNA, and lipofuscin level in liver of middle-aged mice. *Exper Gerontol* 2016; 83: 130-8.



MEMORIA ANUAL DE SECRETARÍA AÑO 2016

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia Mariano Esteban Rodríguez; Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Medicina, Joaquín Poch Brotó; Excmo. S. Secretario Luis Pablo Rodríguez Rodríguez. Excmas. y Excmos Sres. Académicos, Sras. y Sres.

La Real Academia Nacional de Farmacia, del Instituto de España, bajo la dirección de su Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez, inició las actividades del Curso Académico 2016, con la celebración de la Solemne Sesión Inaugural el 14 de enero, acompañándonos en la mesa presidencial el Presidente de la Real Academia de Ciencias, D. José Elguero Bertolini; el Vicepresidente de la R. A. Nacional de Medicina D. Manuel Escudero, Fernández, y del Presidente de la Real Academia de Doctores de España D. Jesús Álvarez Fernández-Represa. Tras unas palabras de salutación del Presidente, el Académico Secretario que les habla, procedió a la lectura de la Memoria de Secretaria del año 2015. Y a continuación, el Académico de Número, Don Benito del Castillo García, dio lectura al discurso reglamentario titulado “*Huella farmacéutica española en Filipinas*”. Intervenciones todas ellas, que fueron publicadas “in extenso” en la revista Anales de esta Real Academia, como van a ser publicadas las de esta Sesión solemne.



Se hizo entrega de la placa por los relevantes servicios prestados como Bibliotecario a nuestro Académico y de la Real Academia de la Historia D. Francisco Javier Puerto Sarmiento. Y al finalizar la Sesión solemne, se procedió a la entrega de los Premios del Concurso Científico 2015.

Antes de dicha Sesión inaugural se celebró solemne funeral por los Académicos fallecidos, en la Iglesia de San Ildefonso de Madrid, como lo ha sido hoy, oficiado también por el sacerdote Académico Correspondiente y Catedrático de las Facultades de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y de Teología de la Universidad de Navarra, D. José Manuel Giménez Amaya.



“IN MEMORIAM”

Hemos de lamentar la pérdida por el fallecimiento del Académico D. Román de Vicente Jordana; y de los Correspondientes D. José Manuel Arias de Saavedra Alías; y de D. José Luque Cabrera; y del miembro activo de la Comisión de Aguas D. Antonio Fermín Mestre Barceló.

Y tuvo lugar una Sesión Necrológica, en memoria del Académico D. Víctor Jiménez Torres, en homenaje a su ejemplar actividad académica y personalidad científica y humana.



ACTIVIDADES CIENTÍFICAS Y FUNDACIÓN JOSÉ CASARES GIL

La intensa y relevante actividad científica, como es tradicional en nuestra Corporación, se ha llevado a cabo en Sesiones de jueves, intercalando en otros días de la semana, conferencias, cursos, sesiones conjuntas con otras Reales Academias y numerosas instituciones, y los cursos correspondientes, para dar fluidez a la actividad desarrollada por los miembros de nuestra corporación y en numerosos casos con la ayuda de la Fundación José Casares Gil.

Las conferencias y Mesas Redondas colgadas en la página WEB (www.ranf-com), han sido objeto de numerosas felicitaciones por académicos, tutores universitarios y profesores de másteres, al ser utilizadas por profesores y alumnos universitarios.

Una de las actividades prioritarias de esta Academia (RANF) es la difusión de la ciencia y del conocimiento para la formación de la juventud universitaria y científica, así como de la sociedad y de toda la humanidad, con la difusión de los programas de actividades y de los resúmenes de sus Sesiones científicas a más de 500

direcciones. Para ello se tienen Convenios, las 4 Universidades del Área de Madrid (Complutense, Alcalá de Henares, CEU-San Pablo y Francisco d Vitoria), el Colegio Of. de Farmacéuticos de Madrid, COFARES y Merck, Sharp & Dohme (MS&D), este último firmado en febrero de este año en el marco de colaboración para el fomento de la investigación y la formación en ciencia. Siguen adelante el curso avanzado sobre: "Obesidad; el curso: Mecanismos fisiológicos sobre contracepción"; y planificado para el año 2017 el nuevo curso sobre: "Inmunonutrición".

La Fundación José Casares Gil, de amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia ha contribuido con su patronazgo, al desarrollo de las actividades científicas, Mesas Redondas, cursos, publicaciones, y difusión de la ciencia con prioridad en la juventud universitaria en temas de enseñanza y futuro de la investigación en Farmacia y sus Ciencias afines.

INCORPORACIÓN DE NUEVOS ACADÉMICOS

Como Académico de Número tomó posesión el Académico D. Sebastián Cerdán García Esteller, Profesor de Investigación del CSIC, presentado por la Académica Dña. María Cascales Angosto.

Como Académicos de Honor tomaron posesión los Dres. **Michel C. Nussenzweig**, de la Universidad Rockefeller de Nueva York, presentado por nuestro Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez; y **Juan Carlos Izpisua Belmonte**, Profesor en el Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, EE.UU. presentado por el Académico D. Rafael Sentandreu Ramón.

Y como **Académicos Correspondientes Extranjeros** tuvieron lugar **4** incorporaciones:

De la **Dra. Magdalena Götz**, de la Ludwig Maximilian Universität, del Max Planck de Bioquímica, y del Helmholtz Institut de Munich, y que dirige el grupo Fisiología Genómica, que fue presentada por la Académica Dña. María Teresa Miras Portugal, en cuyo acto nos acompañó en la Mesa de Presidencia. el Sr. Embajador de Alemania Sr. Peter Tempel.

De la **Dra. María Pía Abbraccio**, Profesora de Farmacología, Presidenta del Observatorio de Investigación; y Presidenta de la Fundación Filarete de la Universidad de Milán, presentada también por la Académica Dña. María Teresa Miras Portugal, para cuyo acto el Embajador Excmo. Sr. Stefano Sannino se excusó por ausencia y delegó su presencia al Ministro Consejero de Embajada, D. Massimo Branciforte.



Del Dr. Claude Monneret, Director de Investigación en el Conseil National de la Recherche Scientifique, de Francia, emérito en el Instituto Curie de Paris, y Presidente de la Academia Nacional de Farmacia de Francia, presentado por el Académico D. Bartolomé Ribas Ozonas, y en cuyo acto nos acompañó en la mesa de presidencia, el Excmo. Sr. Ministro Consejero de la Embajada de Francia **Cyrille Rogeau**.

Del Dr. Marc van Hulle, Director del Departamento de Neurociencias de la Universidad Católica de Lovaina y Académico Numerario de la Real Academia de Medicina de Bélgica, presentado por el Académico D. Bartolomé Ribas Ozonas, en cuyo acto tomo asiento en la mesa de presidencia el Embajador del Reino de Bélgica, Pierre Labouverie.

CONFERENCIAS

Las describimos a continuación, organizadas por las diversas Secciones, sobre temas de actualidad.

"LA MELATONINA ALGO MÁS QUE UN INDUCTOR DEL SUEÑO", que fue impartida por el Académico de Número el **Excmo. Sr. D. Jesús J. Pintor Just**.

"LOS HONGOS Y EL CAMBIO CLIMÁTICO", que fue impartida por el **Dr. Gabriel Moreno Horcajada**, Catedrático del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Alcalá de Henares, a quién presentó el Académico de Número el **Excmo. Sr. D. Fidel Ortega y Ortiz de Apodaca**.

"LA BIOLOGÍA DE LAS QUIMIOQUINAS Y SU PAPEL EN LA REGULACIÓN DINÁMICA DEL TRÁFICO LEUCOCITARIO" impartida por el **Dr. Mario Mellado**, Investigador científico del CSIC en el CNB/CSIC quien fue presentado por el **Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez**, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

TENIOSIS/CISTICERCOSIS: NUEVAS SOLUCIONES A UN VIEJO PROBLEMA" impartida por la Dra. Dña. Teresa Gárate Ormaechea, Jefe del Servicio de Parasitología en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), quien fue presentada por el Académico de Número, **Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández**.

"LA MICROBIOTA INTESTINAL. PAPEL EN LA OBESIDAD" impartida por el Dr. J. Alfredo Martínez Hernández, Académico Correspondiente de la RANF quien fue presentado por el **Excmo. Sr. D. Francisco José Sánchez Muniz**, Académico de Número de la RANF.

"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 **Excmo. Sra. Dña. M^a Teresa Miras Portugal**, Académica de Número de la RANF.

"DE LA FORMULACIÓN MAGISTRAL A LA DEL MEDICAMENTO PERSONALIZADO" a cargo del **Dr. Vicente Baixauli**, 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.

"FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS ÁCIDOS N-ACETILNEURAMÍNICO Y N-GLICOLILNEURAMÍNICO EN PROCESOS FISIOLÓGICOS, INMUNITARIOS, INFECCIOSOS, DIETÉTICOS Y CANCEROSOS, Y SUS APLICACIONES FARMACÉUTICAS", pronunciada por el **Excmo. Sr. D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo**, Académico de Número de la RANF.

"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**.

"VER PARA CREER: VISUALIZACIÓN Y TRATAMIENTO DE NICHOS PREMETASTÁSICOS EN EL MELANOMA" a cargo de la **Dra. María S. Soengas**, Jefa del Grupo de Melanoma del CNIO, Spanish National Cancer Research Centre, quien fue presentada por la Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, **Excmo. Sra. Dña. María Teresa Miras Portugal**.

"COOPERACIÓN FARMACÉUTICA. UNA VISIÓN AFRICANA" a cargo del **Dr. Ángel Huelamo**, Director General de FSFE (Farmacéuticos sin Fronteras de España). Fue presentado por el Académico de Número, **Excmo. Sr. D. Antonio Monge Vega**.

"CÁÑAMO INDIANO: CONCEPTOS GENERALES, ASPECTOS FARMACOLÓGICOS, TOXICOLÓGICOS Y SOCIALES" a cargo del Académico de Número de la RANF el **Excmo. Sr. D. Ángel María Villar del Fresno**.

"RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS: NUEVOS CONCEPTOS EN EL ORIGEN Y LUCHA CONTRA EL MAYOR RETO SANITARIO DEL SIGLO XXI" a cargo del **Dr. Bruno González Zorn**, Profesor Titular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Fue presentado por el Académico de Número, **Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández**.

"LA CALIDAD POR DISEÑO: UN NUEVO PARADIGMA EN EL DESARROLLO DE MEDICAMENTOS", impartida por la **Ilma. Sra. Dña. Gloria Frutos Cabanillas**, Académica Correspondiente de la RANF. Fue presentada por el Académico de Número, **Excmo. Sr. D. Fidel Ortega Ortiz de Apodaca**.

"DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE INTERÉS MÉDICO-FARMACÉUTICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS. APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE PRECONCENTRACIÓN INMUNOLÓGICAS ACOPLADAS A LA ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LA OBTENCIÓN DE RESULTADOS PRECISOS" a cargo del **Dr. Norberto A. Guzmán**, Princeton Biochemicals, Inc. Princeton, New Jersey. Fue presentado por el Presidente de la RANF, **Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez**.

"COMO ALCANZÓ ESPAÑA LOS 40 DONANTES PMP" a cargo de la **Dra. Beatriz Domínguez-Gil González**, Organización Nacional de Trasplantes quien fue presentada por el Presidente de la RANF, el **Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez**.

TERTULIAS CIENTÍFICAS

"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.

"NUEVOS ENFOQUES PARA RETRASAR O REVERTIR LA VEJEZ. ¿SE PUEDE "CURAR" LA VEJEZ?" coordinada por el **Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández** y a cargo de la Académica de Número, **Excma. Sra. Dña. María Cascales Angosto**.

"EL PASADO Y PRESENTE DE LAS ESPECIES ÚTILES DEL GÉNERO ARTEMISIA, VIEJOS REMEDIOS SUPERADOS Y FUENTE DEL MÁS IMPORTANTE DE LOS ANTI-PALÚDICOS ACTUALES" a cargo del **Excmo. Sr. D. Ángel Villar del Fresno**, Académico de Número de la RANF y Catedrático Emérito de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, que versó sobre, las artemisininas, esenciales en el tratamiento combinado contra estas enfermedades.

MESAS REDONDAS

Sobre **"LA BOTÁNICA EN LA ESPAÑA DE LA ILUSTRACIÓN. CIENCIA Y PODER A TRAVÉS DE UNA SAGA FAMILIAR: LOS HORTEGA/ORTEGA"**. Presentada y coordinada por la **Excma. Sra. Dña. Rosa Basante Pol**, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, y que contó con las siguientes ponencias: **Excma. Sra. Dña. Rosa Basante Pol**, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia: **"Los inicios: José Horteiga (1703-1761)"; Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento**, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y de la de Historia: **"La plenitud: Casimiro Gómez Ortega (1741-1818)"; Y el Ilmo. Sr. D. Antonio González Bueno**, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia: **"El agónico final: Hipólito Ruiz López (1754-1816)"**.



Sobre **"CÁNCER Y ENVEJECIMIENTO"** que fue presentada por la **Excma. Sra. Dña. María Vallet Regí** y que contó con las siguientes ponencias: **Excma. Sra. Dña. María Vallet Regí**, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia y de la de Ingeniería, con el título: **¿Existe relación entre Cáncer y Envejecimiento?"** y el **Excmo. Sr. D. Mariano Barbacid**, Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia, con el título: **"De la Oncología Molecular a las Terapias Personalizadas: Lo que hemos aprendido este siglo"**.

Sobre **"EDICIÓN GENÓMICA"**, Coordinada por el **Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón**, Académico de Número de la RANF. Actuaron como ponentes: **Dr. Lluís Montoliu José**, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC: **"La técnica CRISPR-Cas9: Fundamentos y aplicaciones"** y el **Excmo. Sr. D. Juan-Ramón Lacadena Calero**, Académico de Número de la RANF: **"La técnica CRISPR-Cas9: Ciencia y ética"**

Sobre **"EL FARMACÉUTICO PIEZA CLAVE EN LA ATENCIÓN SOCIO-SANITARIA. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO"**. Fue presentada y coordinada por la

Excma. Sra. Dña. Rosa Basante Pol, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Participaron como ponentes: **Ilmo. Sr. D. Luis J. González Díez**, Presidente del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid; **Ilmo. Sr. D. Jesús Aguilar Santamaría**, Presidente del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos y la **Ilma. Sra. D^a Carmen Peña López**, Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia y Presidenta de la FIP.

Sobre **“POLEN Y POLINOSIS: BOTÁNICA, AEROBIOLOGÍA, EPIDEMIOLOGÍA Y RELEVANCIA CLÍNICA”**, coordinado por el **Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez**, Presidente de la RANF y presentado por el **Ilmo. Sr. D. Daniel P. de la Cruz Sánchez Mata**, Académico Correspondiente de la RANF. Actuaron como ponentes: la **Dra. Patricia Cervigón Morales**, Coordinadora de la Red Palinológica de la Comunidad de Madrid-RED PALINOCAM, Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid: **“El polen como diáspora aerovagante: Aerobiología”**, y 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: **“Polinosis: Epidemiología y Relevancia Clínica”**.



Sobre **“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». Participaron como ponentes: **Excmo. Sr. D. David Ríos Insúa**: “El mecanismo de asesoría científica y las Academias Jóvenes”, Prof. Dr. Javier Martínez Moguerza: “Academia Joven: Mundial y Nacional” y el Prof. **Dr. Juan Antonio Gabaldón Estevan**: “La Academia Joven de Europa”.



Sobre **“ESTANDARIZACIÓN DE DOSIS DE ANTINEOPLÁSICOS PARENTERALES EN ONCOLOGÍA: MODELOS Y BENEFICIOS”**, organizada en colaboración con la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria y presentada por el **Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas**, Secretario de la RANF y el **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. El **Excmo. Sr. D. Alfonso Domínguez-Gil**, pronunció unas palabras en homenaje al Excmo. Sr. Nicolás Víctor Jiménez Torres. Actuó como moderadora la **Dra. Mónica Climente Martí**, Jefa de Servicio de Farmacia. Hospital Universitario Dr. Peset. Los ponentes fueron: **Dra. Angels Royo**, Especialista en Oncología Médica. Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Dr. Peset: **“Criterios actuales de dosificación y estrategias de estandarización de dosis en Oncología”**; **Dra. Begoña Porta**, Especialista en Farmacia Hospitalaria del mismo Servicio y Hospital, con el título: **“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, con el título: **“Individualización posológica en Oncología: modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos”**. Y la **Dra. Asunción Albert Marí**, Especialista en Farmacia Hospitalaria. Servicio de Farmacia Hospitalaria en el Hospital Universitario y Politécnico la Fe, Valencia, con el título: **“Beneficios de la estandarización de dosis en Oncología. Experiencias y casos de éxito”**

Este año se celebró la 2ª SESIÓN DE LA “CÁTEDRA JUAN ABELLÓ”, titulada: **“CANNABINOIDES: ASPECTOS FARMACOLÓGICOS Y CLÍNICOS”**. Fue presentada por la **Excma. Sra. D. María Teresa Miras Portugal**, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Actuaron como ponentes: el **Prof. Manuel Guzmán**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la UCM en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I. Facultad de Ciencias Biológicas: **“El sistema cannabinoide: un nuevo sistema de comunicación en nuestro organismo”**; el **Prof. Eduardo Muñoz Blanco**, Profesor de Inmunología. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMI-BIC) en la Universidad de Córdoba. Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología: **“Cannabinoides y Esclerodermia como Enfermedad Autoinmune”**; el **Dr. José Martínez Orgado**, Jefe de Sección de Neonatología. Instituto del Niño y del Adolescente del Hospital Clínico "San Carlos": **“Cannabinoides y enfermedades neurológicas en pediatría”** y el **Prof. Rafael Maldonado López**, Catedrático de Farmacología de la Universidad Pompeu Fabra, Institucio Catalana de Recerca/ estudis avançats- ICREA: **“Cannabinoides y dolor”**.

Sobre **“RESIDUOS, CONTAMINACIÓN Y SALUD AMBIENTAL”** bajo la Presidencia del **Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez**, Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia y con la Coordinación del **Excmo. Sr. D. Bernabé Sanz Pérez**, Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia contó con los siguientes ponentes: **Excmo. Sr. D. Elías Fereres Castiel**, Presidente de la Real Academia de Ingeniería: **“La seguridad alimentaria ante el calentamiento global”** y el **Excmo. Sr. D. Arturo Romero Salvador**, Académico de Número de las RRAA de Ciencias y de Doctores: **“Residuos sólidos: fuentes y problemas”**

Como todos los años, se celebró la **MESA REDONDA CONMEMORATIVA DE LOS PREMIOS NOBEL 2016 EN FISIOLOGÍA O MEDICINA Y EN QUÍMICA**, coordinada por el Académico de Número, **Excmo. Sr. D. Juan Ramón Lacadena Calero** y en la que intervinieron: **Dra. Patricia Boya**, Investigadora Científica del Departamento de Biología Celular y Molecular Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid: **“Autofagia: el sistema de reciclaje que necesitan todas nuestras células”** y el **Prof. Dr. Tomás Torres Cebada**, Catedrático de Química Orgánica y Director del Instituto de Investiga-

ción Avanzada en Ciencias Químicas, UAM: “Las “nanomáquinas” se crecen con el Nobel de Química 2016”.



Sobre "REJUVENECER: CONTROLAR LA VEJEZ". Coordinada y presentada por la **Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto** y en la que participaron: la **Dra. Mónica de la Fuente**, Catedrática de la Universidad Complutense de Madrid y Académica de Número de la Real Academia de Doctores de España: “Edad cronológica y edad biológica”; la **Dra. María A. Blasco**, Académica Correspondiente de la RANF: “¿Podemos frenar el envejecimiento y las enfermedades?”; el **Dr. Manel Esteller**, Académico Correspondiente de la RANF: “Rejuvenecimiento y reprogramación epigenética” y el **Dr. Gustavo Barja**, Académico Correspondiente de la RANF: “Sistema de regulación celular del envejecimiento (cars) I. producción de mitocondrial de Ros”, con la asistencia de más de 100 alumnos de la Facultad de Ciencias Biológicas.



Y finalmente, mencionar, las dos Mesas Redondas donde los miembros de la Comisión de Aguas Minerales y Minero-medicinales, que preside la Académica Dña. María del Carmen Francés Causapé, expusieron trabajos sobre el BALNEARIO DE SAN NICOLAS (Almería), en la que participaron numerosos profesores de diferentes instituciones, los responsables de Balnearios, de su Asociación oficial y público en general.

CURSOS Y SESIONES CIENTÍFICAS CON PROYECCIÓN UNIVERSITARIA

Destacamos la gran repercusión de nuestras actividades científicas en nuestra sociedad y a nivel internacio-

nal, por las conferencias y cursos retransmitidos por RANF-TV y colgados en nuestra red, cuyas felicitaciones hemos recibido. Ante este hecho, hace unos años la Doctora Cascales se le ocurrió la idea de abrir las puertas de nuestra Academia a los alumnos de nuestras Universidades y de esta manera daríamos a conocer nuestras actividades a los profesionales del mañana. También destacamos que la Académica Dña. María Cascales Angosto, reinauguró los cursos que antaño promocionara el Instituto de España en nuestra Academia, abriéndose de así de nuevo las puertas a los alumnos de las Facultades universitarias, todo ello de gran trascendencia social y formativa para nuestra sociedad por tratarse de ciudadanos jóvenes, para el futuro de nuestro país.

Con gran ilusión y esfuerzo, la Académica Dña. María Cascales Angosto, y con la colaboración de los Académicos D. Antonio Luis Doadrio, D. Francisco Sánchez Muniz y de D. Bartolomé Ribas Ozonas, organizó el "Primer curso Avanzado de Obesidad", que se celebró en Abril de 2014 con más de 70 alumnos de la Facultad de Farmacia. El "Segundo Curso Avanzado sobre Obesidad", en 2015, también dirigido por la Académica Dña. María Cascales, participaron unos cien alumnos españoles y 38 alumnos chilenos "on line. Este curso sobre Obesidad se continúa celebrando cada año, y en 2016 ha tenido lugar su tercera edición, dirigida por el Académico D. Francisco J. Sánchez Muniz, con los mismos coordinadores, D. Bartolomé Ribas Ozonas y D. Antonio Luis Doadrio Villarejo.

En Febrero de 2016 se ha celebrado el primer curso sobre "Mecanismos fisiológicos de la Anticoncepción", con la colaboración del Colegio oficial de Farmacéuticos y dirigido por el Académico D. Bartolomé Ribas Ozonas, con gran asistencia de profesionales farmacéuticos con Oficina de Farmacia.



Todo ello demuestra que aquella idea de hace unos años, de la proyección de nuestra Academia en la Sociedad española y principalmente en la población joven de España, se ha hecho una realidad. Nos produce una gran satisfacción contemplar nuestros salones llenos de gentes jóvenes que asisten plenamente gratificados a nuestras actividades en el espléndido marco de nuestra Academia, gracias a la iniciativa de nuestra compañera Académica Dña. María Cascales Angosto.

JORNADAS CIENTÍFICAS

Cabe destacar, las dos jornadas organizadas por la Fundación José Casares Gil, su Presidente D. Mariano Esteban Rodríguez y Secretario D. Honorio Carlos Bando Casado con los títulos: la primera sobre "**HUMANIZACIÓN y CALIDAD ASISTENCIAL**", patrocinada por Astellas Pharma donde figuras de la profesión farmacéutica, la Administración autonómica, la investigación y la Medicina reflexionaron sobre las actuales corrientes que buscan un trato más humano en la asistencia sanitaria, coincidiendo todas ellas en que todavía queda mucho por hacer en este terreno. Acudieron al encuentro, D. Vicente Arias Díaz (FIDAP), D. Eduardo Rodríguez Rovira (Fundación Edad & Vida), D. Ángel Puente (COGESA, Círculo de la Sanidad), D. José Vicente Galindo (Esteve), D. José Samblás, (Grupo IMO), D. Salvador Arribas (SEIS, Fundación Bamberg), Dña. Paloma Delgado (Novartis) y D. Luis González (COFM), entre otros.

La segunda es una jornada conjunta de MSD y la RANF sobre la "**LEY GENERAL DE SANIDAD. 30 años de vigencia y retos para el futuro**". Cuyo moderador fue el Dr. Honorio-Carlos Bando y presentada por el Presidente de la RANF, Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez. En esta jornada intervinie-

ron: la Dra. Regina Revilla, Académica Correspondiente de la RANF, D. Julio Sánchez Fierro, Vicepresidente Primero de la Asociación Española de Derecho Sanitario, el Dr. Pedro Sabando, Ex-Jefe de Servicio de Reumatología Hospital de la Princesa y Profesor Emérito, y el Dr. Félix Lobo, Catedrático de Economía de la Universidad Carlos III, Madrid.

La Real Academia Nacional de Farmacia y la Universidad CEU San Pablo tuvieron el honor de celebrar la Sesión Pública que titulada: **CELEBRANDO EL DÍA DE LA INMUNOLOGÍA: LA IMPORTANCIA DE LAS VACUNAS**. Presentada por 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. A esta sesión acudió la **Sra. Dña. Carmen Vela**, Secretaria de Estado de Investigación del Ministerio de Economía y Competitividad. Actuaron como ponentes: el Dr. Mariano Esteban, 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”**; y la 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?”**.



La Real Academia Nacional de Farmacia albergó un importante **Encuentro sobre Bioterrorismo** contó con la presidencia del Excmo. Sr. D. Mariano Esteban, Presidente de la RANF y el Ilmo. Sr. D. Antonio Alcami, Académico Correspondiente.

Asimismo se celebró la Jornada Científica, en colaboración con los laboratorios MSD, titulada **“EL FARMACEUTICO COMO AGENTE DE SALUD”**, que contó con las ponencias de los Dres. D. Luis González, Presidente del COFM; Dña. Carmen Peña, Presidenta de FIP y D. Juan Tamargo, Catedrático de Farmacología de la UCM.

Otro acontecimiento relevante, que tiene lugar de forma anual fue la reunión de las cuatro RR. AA. del Instituto de España, la de Ciencias, de Medicina, de Ingeniería y la de Farmacia, en la Sede de la Real Academia Nacional de Medicina, con el título: **“EL AGUA EN EL ÁMBITO DE LA SALUD Y LA CALIDAD DE VIDA”**, que contó con la participación del Excmo. Sr. D. Manuel Serrano Ríos, Académico de Número de la RANM: “El agua como nutriente esencial” y como ponentes de los Académicos Sres. Prof. Gonzalo Piédrola Angulo, Académico de Número de la RANM: “El agua en la transmisión de las enfermedades”; Prof. Miguel Ángel Alario Franco, Académico de Número de la R.A. de Ciencias: “El agua en que vivimos”; Prof. Cesar Dopazo García, Académico de Número de la R.A. de Ingeniería: “Un nuevo tratamiento físico de agua”; Prof. Federico Mayor Zaragoza, Académico de Número de la R.A. de Farmacia y Medicina: “Derecho a la vida, derecho al agua” y el Prof. Francisco González de Posada, Académico de Número de la R.A. de Medicina: “El agua: de hulla blanca a oro azul”.

REUNIONES ACADÉMICAS INTERNAS.

La Actividad Académica se complementa con las reuniones de las Secciones y Comisiones. Las Secciones se reunieron en 20 ocasiones y las Comisiones en 10. Además la Junta de Gobierno tuvo 10 Sesiones, y la Junta General se reunió en 3 ocasiones de forma Ordinaria y 8 en Sesión Extraordinaria.

Juntas Generales: Durante el año 2016, se celebraron elecciones en los cargos de Vicepresidente, que al no ser elegido ninguno de los candidatos presentados, continúa su labor en funciones el Excmo. Sr. D. Juan R.

Lacadena; y de Vicesecretario, para el que fue reelegido el Excmo. Sr. D. Francisco J. Sánchez Muniz, que aplaudido y felicitado al acabar cada sesión por todos los Académicos asistentes.

En la Junta General Extraordinaria de junio fue elegida Académica de Número, en la medalla 3, la Excm. Sra. Dña. Mercedes Salaices y en la de diciembre, no resultó elegido ningún Académico para la medalla 49, por lo que se declaró desierta la plaza.

En las Juntas Generales Extraordinarias de diciembre, se decidió entregar dos Medallas Carracido, una en su categoría de Oro a la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto, para recompensar servicios excepcionales a la Farmacia, y como premio a los servicios relevantes prestados a esta Real Academia Nacional de Farmacia, viendo el Curriculum e Informe razonado, que expresa su larga trayectoria en esta Real Academia de Farmacia por su gran dedicación, esfuerzo y excelencia por sus numerosas Monografías, presentación de conferenciantes, ponencias, conferencias, cursos y Mesas Redondas; y otra de Plata a la Ilma. Sra. Dña. María del Carmen de la Rosa Jorge, para recompensar servicios excepcionales a la Farmacia, y como premio a los servicios relevantes prestados a esta Real Academia Nacional de Farmacia, viendo el Informe razonado que expresa su larga trayectoria en la Comisión de Aguas que ha estudiado, analizado y evaluado numerosos Balnearios de toda la Geografía española, y la disposición de su Curriculum vitae.

Asimismo, resultó elegido Académico de Honor el Excmo. Sr. D. Pedro Guillén García, debido a los relevantes méritos y por los trabajos en ciencias farmacéuticas y afines habiendo alcanzado un eminente prestigio dentro de su campo en la Comunidad Científica Internacional.

PREMIOS Y DISTINCIONES RECIBIDAS POR LOS EXCMOS. SRES. ACADÉMICOS.

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos, hay que destacar:

Don Federico Mayor Zaragoza, Ex-Director General de la UNESCO, y marca España, con su Fundación para la Paz de renombre internacional, con gran actividad y reconocido prestigio, por sus múltiples conferencias de ámbito mundial en la lucha por la paz, la armonía y el entendimiento mundial entre naciones, para evitar conflictos y guerras, que da brillo y prestigio a nuestra Academia. Le deseamos el mayor de los éxitos, en beneficio de todos y de las futuras generaciones.



Dña. María Vallet Regí ha obtenido una ERC- Advanced Grant, del Consejo Europeo de Investigación. Con esta cualificación, se une al grupo cercano a diez investigadores españoles que cada año acceden a estas prestigiosas y exigentes Ayudas. Su proyecto ha sido elegido de entre unas 2.000 solicitudes y la española de María Vallet sobre el desarrollo de nanopartículas de sílice mesoporosa para aplicaciones médicas, en cuyo campo se la considera pionera y líder internacional.

Asimismo, la Dra. María Vallet Regí figura en el puesto 24 entre los 300 investigadores más citados en Ciencia e Ingeniería de Materiales. Publicado por la empresa MSE Supplies que se ha basado en los datos recogidos en la base de datos Scopus de Elsevier. Igualmente, destacamos y felicitamos a nuestro Académico Extranjero del College de France, Dr. Clement Sánchez por su puesto 20 en el mencionado ranking. También Dña. María Vallet Regí ha sido galardonada por la Fundación Lilly. Con el Premio a una Carrera Distinguida.

A Dña. M^a 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, e investida Doctora Honoris Causa por la Universidad Católica San Antonio de Murcia. Lo que eleva el prestigio de la Real Academia Nacional de Farmacia y de todos los Académicos.

A D. Benito del Castillo García la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno de Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) con ocasión de las primeras jornadas Académicas de Facultades de Farmacia y Bioquímica, los Decanos y Autoridades Académicas representantes de todas las Facultades de Farmacia y Bioquímica de las Uni-

versidades Públicas Bolivianas, acordaron por unanimidad designarle Asesor externo para la armonización de sus futuros planes de estudio.

D. Joan Guinovart Cirera que será investido Dr. Honoris Causa por la Universidad Andrés Bello de Chile, en un futuro próximo.

Dña. María José Alonso ha sido elegida para formar parte de la Academia Nacional de Medicina de Estados Unidos. Es un orgullo contar con tan insigne científica a nivel mundial.

Dña. Rosa Basante Pol leyó el Discurso con motivo de su toma de posesión como Académica Correspondiente de la Academia de Farmacia de Castilla y León titulado "Cosmética de ayer y de hoy: de los afeites a la cosmeto-vigilancia".

D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, presentó en Barcelona su libro "Medicamentos Falsificados, disponible en nuestra WEB".

D. Bartolomé Ribas Ozonas fue invitado para presentar en el "7º Congreso Mundial de la Academia Internacional de Ciencias Ararat", celebrado en el Palacio de las Naciones Unidas de Ginebra, la Sesión Necrológica y biografía en homenaje a nuestro Académico Correspondiente Prof. Rafael Melik-Ohanjanyan eminente exponente de aquella Academia Internacional; una ponencia; y presidir una de las Sesiones científicas sobre medicamentos y medio ambiente. Congreso al que también presentaron ponencias nuestros Académicos correspondientes extranjeros, Jan Dobrowolski de Polonia; Marc van Hulle, de Bélgica; y Tadashi Goino, de Japón.

DISTINCIONES A LOS ILMOS SRES ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES.

El Dr. 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) ha sido nombrado "Editor Invitado" para un número especial de la prestigiosa revista "Virus Research", dedicado a la respuesta celular a la infección vírica.

El Dr. D. Alfredo Martínez ha sido galardonado con el premio HIPOCRATES por la Real Academia de Medicina y Cirugía del Principado de Asturias.

DISTINCIONES DE ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES QUE ENALTECEN ESTA ACADEMIA

El eminente Académico D. Pedro Guillén García, su Clínica en Madrid, única en España con el reconocimiento internacional de "Centro de excelencia FIFA": (Federación Internacional de Fútbol) y "**Cátedra Pedro Guillén de Medicina Regenerativa**". Auspició la Sesión científica con la participación de nuestro Académico de Honor, el Prof. Juan Carlos Izpisua Belmonte de EE.UU., y que el mismo es Académico de Honor electo de nuestra Institución.

El Excmo. Sr. D. Francisco González de Posada y Académico de Número de la Real de Medicina, en el que destacamos su trayectoria de múltiples conferencias, y de excelente conferenciante en los ambientes Académicos, de comunicación y divulgación, en toda la geografía española, desde las Islas Canarias hasta Santander, donde fue Rector de la Univ. de Cantabria.

El Dr. D. Enrique Villar Ledesma, Catedrático, sucesor de nuestro Académico el Prof. José Antonio Cabezas en su Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, nombrado "Editor Invitado" de la prestigiosa revista "Virus Research", dedicado a la respuesta celular a la infección vírica.

El Dr. D. Alfredo Martínez ha sido galardonado con el "Premio Hipócrates" por la Real Academia de Medicina y Cirugía del Principado de Asturias; y Director de un grupo de la FAO de Alimentación y Nutrición.

A nuestro Académico del College de France, Dr. Clement Sánchez distinguido con el puesto 20, de los 300 investigadores destacados en el campo de las nanopartículas y biomateriales, fundamentándose en los proyectos ERC- Advanced Grant, del Consejo de Europa.

PUBLICACIONES

Se han editado "on line" los 4 números de la revista "Anales" correspondientes al año 2016. Así como dos números extraordinarios del II Curso de Obesidad y Monografía de Aguas Minerales y Minero-medicinales.

Y como todos los años, se ha publicado en papel, el Discurso de la Sesión Inaugural "Huella farmacéutica española en Filipinas" y el "Anuario 2016 con las Actividades 2015" nº 68.

Todas estas mencionadas obras, han sido coordinadas por nuestro Académico D. Antonio Luis Doadrio Villarejo, y se publicaron en formato de libro electrónico o "e-book" en edición "on line" y digital DVD para PC Windows y Mac.

BIBLIOTECA, ARCHIVO Y MUSEO

Bajo la dirección de la Excmo. Sra. Dña. Rosa Basante Pol, se continuó con el proceso de digitalización del fondo antiguo o histórico. Este año, se ha continuado con la digitalización de los **libros del siglo XIX, una vez terminada la de las publicaciones periódicas**. La ha llevado a cabo la empresa Digibis. Número total de obras digitalizadas: 62. Número de páginas: 11.500. Se pueden consultar en el Catálogo virtual ([Biblioteca virtual de la Real Academia Nacional de Farmacia](#)), existiendo la posibilidad de la búsqueda a texto

completo después del proceso de OCR a que han sido sometidas. También han sido integradas en los repositorios digitales colectivos [Hispana](#) y [Europeana](#). En el mes de junio se solicitó una nueva ayuda para continuar con la digitalización de los libros del siglo XIX, una vez completadas las publicaciones periódicas.

Se ha producido la colaboración con el grupo Bibliopagia de la Universidad Complutense de Madrid en el proyecto de la Universidad Complutense “Catálogo Colectivo de Encuadernaciones Artísticas”, que dará a conocer las mejores encuadernaciones que posee nuestra biblioteca. Se ha colaborado con la productora audiovisual Minoría Absoluta para la cesión de una fotografía de nuestro archivo para el documental “España dividida: la Guerra Civil en color”, ya estrenado.

Se han comprado dos libros: “Veinticinco años de labor en el Departamento de Bioquímica (Madrid, 1940-1964)”. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Español de Fisiología y Bioquímica, 1966; y “Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs”. 2nd ed. Elsevier, 2015 de los Dres. Carmen Avendaño y J. Carlos Menéndez. Como es costumbre del más alto servicio y dedicación a todos los académicos y bien de la ciencia, investigación y de la cultura de nuestro país, se ha atendido a quienes han solicitado nuestro servicio y nuestra ayuda desde la Biblioteca. Redactando unas nuevas normas de acceso y consulta a la biblioteca y el archivo de la RANF, incluyendo una ficha normalizada para la petición de fondos. Se han prestado revistas y libros, a través de los distintos medios, incluyendo digitalizaciones. Ha habido varios investigadores debidamente identificados que han sido autorizados para la consulta de documentos de nuestro archivo histórico.

Agradecemos las donaciones recibidas por parte de los siguientes Académicos: D^a Ana María Pascual-Leone, D^a Rosa Basante Pol, D. Manuel Ortega Mata, D. Bartolomé Ribas Ozonas, D. Benito del Castillo García, D. José Antonio Cabezas Fernández del Campo, D. Antonio González Bueno, D. Miguel Fernández Braña.

El Museo de la Farmacia y la Sala Utagawa han sido muy visitados por grupos de instituciones, como en años anteriores, acompañados principalmente por el Jefe del Gabinete Administrativo, Don Manuel Tirado y en ocasiones por el Académico Secretario D. Bartolomé Ribas Ozonas.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro profundo agradecimiento al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por las diversas ayudas recibidas. Por la ayuda especial para restauración de las fachadas exterior e interna del patio. Así como que, gracias a la subvención presupuestaria recibida en el Curso 2016, hemos podido realizar las actividades científicas programadas, el mantenimiento de la página web, y el mantenimiento de nuestro personal. Y la nueva subvención 2016 para proseguir en adelante con la digitalización de la Biblioteca.

Agradecemos a nuestro querido compañero Académico D. Juan Abelló Gallo, su inestimable ayuda y colaboración, por la “**Cátedra Juan Abelló de farmacología del dolor**”; así como para el concurso de premios, y a todos sus patrocinadores; a D. Pedro Guillén García por la “**Cátedra Pedro Guillén de Medicina Regenerativa**” para investigación y difusión de la regeneración de órganos y tejidos; a CINFA en la persona de D. Luis Ordíeres, al Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, al Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid; a COFARES, y a la viuda y familia del premio Antonio Doadrio López. Todos ellos posibilitan premiar la labor científica principalmente de jóvenes investigadores. Asimismo la Academia y sus Académicos, agradecen a los Patronos, miembros y socios de la “Fundación José Casares Gil” de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, su importante contribución y dedicación a las actividades académicas de difusión de la ciencia y formación de la juventud y de la sociedad española; y a gran número de Colegios de Farmacéuticos de España que en atención a la brevedad de esta exposición no podemos enumerar. Para todos ellos el agradecimiento de esta Real Academia Nacional de Farmacia, del Instituto de España.

Termino dando las gracias a todos los Académicos de Número y Correspondientes por la colaboración prestada, tanto a aquellos que han participado día a día en las actividades realizadas en esta sede académica, a los que han organizado e intervenido con interesantes conferencias y temas de actualidad, como a los que han permitido con su asistencia y contribución, colocar esta Real Academia en lo más alto del nivel científico y de mayor prestigio entre las instituciones españolas. Y al personal contratado, que con su exquisito trato a los Académicos, dedicación y esfuerzo, mantienen día a día el funcionamiento de la misma.

Académico Secretario RANF
Dr. Bartolomé Ribas Ozonas



Información académica

Bartolomé Ribas Ozonas

Académico Secretario de la Real Academia Nacional de Farmacia

e-mail: secretaria@ranf.com

En el año académico 2017 la Real Academia Nacional de Farmacia abrió sus puertas **el lunes 9 de enero** con la distribución de las actividades del mes y gestión de los temas en marcha, como el Concurso científico, Anuario, Calendario...

El jueves 12 de enero tuvo lugar la solemne Sesión de Apertura de curso académico en la que nos acompañaron el Presidente y el Secretario de la Real Academia Nacional de Medicina, que tomaron asiento en la mesa de presidencia, a ambos lados de nuestro Presidente, el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban Rodríguez.

El jueves 19 de enero 2017 se celebró sesión científica auspiciada por la Fundación de Amigos de la Real Academia Nacional de Farmacia, en la que intervino el responsable de la Unidad de Soporte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, el doctor Ramón Palop Baixauli, en representación de su directora, Dña. Belén Crespo, que fue presentado por el Académico Secretario D. Bartolomé Ribas Ozonas.

El Dr. D. Ramón Palop Baixauli explicó que la AEM y PS es un organismo dependiente de la Administración General del Estado, multidisciplinar, y sus miembros son licenciados, graduados y doctores en biología, enfermería, farmacia, medicina, veterinaria, etc. Tienen una amplia formación basada en el conocimiento científico avanzado y riguroso, sobre el medicamento y los productos sanitarios.

La Agencia sigue los principios de objetividad, independencia, transparencia y accesibilidad.

Desarrolla un amplio abanico de actividades sobre:

a) la exigencia de garantía de calidad y el control de los medicamentos y productos sanitarios, su presente y futuro en relación al incremento demográfico europeo en función de los millones de inmigrantes.; b) garantiza la calidad, seguridad, eficacia y correcta información de los medicamentos y productos sanitarios; c) asegura el acceso de los ciudadanos a los medicamentos; d) promociona y promueve nuevos tratamientos y nuevos medicamentos; e) el uso racional de los medicamentos; f) promociona a su vez la información y la innovación, que se concreta en la medicina traslacional, el eje investigador - atención primaria médico, farmacéutico y de enfermería, y viceversa; g) apoya la colaboración con organizaciones e instituciones públicas y privadas.

En definitiva, la protección y promoción de la salud y la calidad de vida de las personas y de los animales en su conjunto.

Como Agencia Estatal desde 2011 responde a las aspiraciones de modernidad y racionalización de la administración pública, con vistas a una gestión más eficiente y transparente de sus funciones, y con agilidad para implementar las Normativas europeas, sobre todo frente a los cambios actuales y futuros a los que tiene que hacer frente.

Es la autoridad sanitaria de referencia para ciudadanos y profesionales sanitarios en materia de garantías de calidad, seguridad, eficacia, información y accesibilidad a los medicamentos y productos sanitarios (web www.aemps.gob.es; es la herramienta para toda información). En esta presentación el Académico D. Bartolomé Ribas expuso la futura incertidumbre del medicamento a la que la Agencia del M y P. S. tendrá que hacer frente ante el incremento de población principalmente adolescente y joven con escasez de medios económicos; y que el S.N.S nacionales y europeos tendrán que hacer frente, en relación a los biosimilares de superior coste que los genéricos y que otros medicamentos en general. El ponente de la AEM y PS, Dr. Ramón Palop, presentó el organigrama de la Agencia y explicó sus funciones, interrelaciones con la Agencia europea (EMEA), la implementación de sus normativas y decisiones, presente, futuro y problemática futura, finalizando con un largo, interesante y atractivo debate.

El jueves 26 de enero 2017 tuvo lugar la Mesa Redonda presentada por nuestro Presidente y de la Sección 5ª. D. Mariano Esteban Rodríguez, y que fue organizada y moderada por nuestra eminente Académica Correspondiente Dña. Rosario de Felipe Antón, sobre: "Suelo, Planta, Contaminación y Salud". Los ponentes fueron:

La Dra. Rocío Millán de la División de Suelos y Geología Ambiental, del Departamento de Medio Ambiente, del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, del CIEMAT. Disertó sobre: “*La interacción suelo-planta en la restauración paisajística de escombreras y la recuperación de explotaciones mineras*”. Explicó que la conservación del medio edáfico, así como la recuperación de suelos degradados, es un tema que nos afecta a la sociedad por ser origen de materias primas, mantener las funciones básicas de ecosistemas, ser la base de la agricultura y la seguridad alimentaria así como un medio fundamental para el mantenimiento en la tierra. Por tanto, es un deber y un reto de futuro proteger nuestros suelos para poder asegurar los retos que plantea una población en crecimiento y un aumento de los usos que le exigimos a este recurso. En este contexto se exponen los trabajos centrados en la recuperación de espacios degradados y contaminados, entre ellos los desarrollados en el distrito minero de Almadén durante y tras el cierre de la mina, incidiendo en la base científica necesaria para la propuesta de alternativas socio-económicas seguras, la recuperación de escombreras y la aplicación de fitotecnologías. Asimismo, se abordará el tema de la incorporación de la recuperación edafo-paisajística en la restauración ecológica de emplazamientos. Los trabajos que se exponen se abordan desde el laboratorio hasta su puesta en práctica en situación real. La recuperación de espacios degradados y contaminados centrada en dos ejemplos: la restauración paisajística de escombreras y los trabajos desarrollados en el distrito minero de Almadén durante y tras el cierre de la mina (vegetación natural y propuesta de cultivos), incidiendo en la base científica necesaria para la propuesta de alternativas socio-económicas y de cultivos “seguros”. Desde el trabajo de laboratorio a su puesta en práctica en situación real. Propuesta de soluciones desde la I+D.

El Dr. D. Ramón Carpena, Catedrático del Departamento de Química Agrícola, en la Universidad Autónoma de Madrid, disertó sobre: “*Estrategias verdes contra la contaminación de suelos*”. Explicó sobre que los emplazamientos mineros abandonados son fuentes de metales pesados contaminantes, y para recuperarlos se ha planteado el empleo de plantas. Entre las tecnologías fitorremediadoras (verdes), la fitoestabilización es la más viable. Se basa en la acción inmovilizadora de la planta sobre los metales pesados del suelo. Los vertederos mineros serían revegetados con especies tolerantes a los contaminantes. La raíz puede actuar por adsorción/ precipitación/ absorción del metal o su complejación con sus exudados, y modificar propiedades del suelo. La selección de especies vegetales aptas requiere el estudio de sus mecanismos de tolerancia. Se realizaron experimentos hidropónicos o con suelos, en cámaras e invernaderos, estudiando mecanismos de absorción de arsénico, cadmio, zinc entre otros, y su distribución parte aérea/raíz. Los mecanismos de tolerancia preferentes conducían a la acumulación de los contaminantes en raíz: (i) retención en pared, salvo As, (ii) formación de fitoquelatinas y (iii) exudación de ácidos orgánicos. En campo, en la zona del vertido de Aznalcóllar, y en escombreras mineras, se observó que la revegetación con especies tolerantes a metales produjo un descenso en su biodisponibilidad, y una reducción en la parte aérea de la planta, evitando su paso a la cadena trófica.

El Dr. D. José Javier Pueyo, Profesor de Investigación, en el Instituto de Ciencias Agrarias Consejo Superior de Investigaciones Científicas – CSIC, disertó sobre el tema: “*Bacterias y plantas trabajando juntas por el medio ambiente: La simbiosis Rhizobium-leguminosa*”. Explicó que, durante las últimas décadas, el aumento de la población mundial y el desarrollo económico de los países emergentes ha ido acompañado de un incremento en la contaminación por metales pesados, como el Hg y el Cd, que están considerados como dos de los elementos liberados al medio ambiente más tóxicos para los humanos, según la Agencia de Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Debido a su carácter lipofílico y su baja solubilidad en agua, son muy difíciles de eliminar del organismo, provocando bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica, en la que entran principalmente a través de las plantas.

Los metales pesados no pueden ser degradados, pero se pueden retirar, extraer e inmovilizar en el suelo disminuyendo su disponibilidad. Para ello, la fitorremediación es el método más económico y respetuoso con el medio ambiente. Las leguminosas juegan un papel fundamental en el medio ambiente ya que poseen la cualidad de establecer simbiosis con los rizobios del suelo, lo que les permite fijar nitrógeno atmosférico, no dependiendo de la fertilización nitrogenada, que puede causar la eutrofización de acuíferos y plantear importantes riesgos para la salud. Los rizobios y otras bacterias que colonizan la raíz pueden aumentar la biodisponibilidad de los metales pesados y favorecer su absorción por la planta. Algunas leguminosas han sido probadas en suelos contaminados por metales y se ha constatado que la inoculación con rizobios aislados del propio suelo contaminado tiene un efecto positivo en su establecimiento y rendimiento. Por todo ello, la interacción simbiótica rizobio-leguminosa se presenta como una prometedora herramienta de fitorremediación.

1 febrero de 2017. Tuvo lugar la interesante Mesa Redonda de presentación del libro de la Directora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Ilma. Sra. Dña. María A. Blasco Marhuenda, con el título: “Morir joven, a los 140 años” y de coautora Dña. Mónica G. Salomone, cuya presentación estuvo a cargo del Académico D. Bartolomé Ribas Ozonasm, quien señaló que era un honor para él pronunciar las palabras de Introducción para el mencionado libro, como diamante que había caído en sus manos, con el título “Morir joven, a los 140 años”. Y que este honor de ocupar la tribuna se debía al ofrecimiento de la Excm. Sra. Dña. María Cascales Angosto, entrañable amiga y compañera desde el año 1960 cuando realizaban ambos la tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica de la UCM del Prof. Ángel Santos Ruiz, y que por lesión no podía acompañarnos en este feliz e importante acto de presentación del expectante libro, que prevé que el ser humano pueda alcanzar una longevidad activa de 140 años. Resultados de sus experimentos claramente justificados por su experiencia en ratones y cultivos celulares, porque son mamíferos como los seres humanos, con reacciones metabólicas, químicas y neuroquímicas idénticas, confirmadas en publicaciones de numerosos científicos y Premios Nobel.

En el ser humano hay armonía, belleza y perfección, infinitamente superior a un reloj. Se trata de saber apreciar la belleza a escala molecular y atómica a nivel del Armstrong. Es la realidad, donde acaecen millones de reacciones químicas por segundo, reacciones perfectas, graduales y en cadena. Como la secuencia de sonidos en sintonía interpretados por una Orquesta, y en parangón con el ser humano, no cabría desafinar como en una Orquesta, sin achaques y enfermedades.

Esa exactitud y armonía de las reacciones químicas las proyectó representando la glucólisis y el ciclo de KREBS, con la cadena de transporte de electrones, cuyo buen funcionamiento influye en el envejecimiento, longevidad activa, y mejoría de la salud; en dependencia con la nutrición, la dieta, estilo de vida, ejercicio, hábitos, etc., como explican las autoras en su libro.

María Blasco descubrió en una investigación con ratones tras un infarto de miocardio, que los corazones que expresaban telomerasa mostraban menos dilatación cardíaca, mejor función ventricular y cicatrices más pequeñas debidas al infarto que los que carecían de telomerasa. El trabajo de María Blasco sugiere que la activación de la **enzima telomerasa** podría ser una estrategia terapéutica para prevenir el fallo cardíaco tras el infarto de miocardio. Estos datos se pueden profundizar en el capítulo 1 del libro. Este tratamiento podría beneficiar, la actividad física, la salud y una mayor longevidad sobre la que habla en el capítulo 2, pág. 29, 32 y siguientes hasta la 42. Seguidamente proyectó una mitocondria normal y otra anciana, enferma o intoxicada, con claros signos de deterioro y daño fisiológico. En ella asienta la cadena de transporte de electrones, que produce la energía que necesitan sus propias células, sus tejidos y el cuerpo humano. La mitocondria se daña por una dieta excesiva, comida copiosa, por tóxicos y por la edad debido a los radicales libres, porque la cadena de transporte de electrones queda saturada y no puede neutralizarlos. Continuó señalando que la autora, María Blasco, ampliaría y explicaría donde y como asienta y funciona el DNA, los cromosomas y los telómeros, con su enzima telomerasa. Las reacciones químicas del núcleo dirigen la célula, y las de cada tejido tienen el número específico de mitocondrias que necesita para la función fisiológica y la homeostasis del cuerpo humano. Así, en el tejido adiposo 600, el muscular 1.000, y el tejido cardíaco 2.000 por célula.

En el libro se explica la aplicación por María Blasco de la terapia génica en su laboratorio, siendo pionera e innovadora en este campo de investigación, adquiriendo la fama y prestigio internacional que todos conocemos. Extrapola en humanos los resultados de sus experimentos en ratones, y aporta nuevos y originales datos a la bibliografía, que se pueden ampliar en el capítulo 3.

En capítulos posteriores, sigue explicando el Académico D. Bartolomé Ribas que en la literatura científica se han publicado experimentos en cuatro especies: levadura, gusano "*Coenorabditis elegans*", ratón y hombre, que también proyecta. A las preguntas: ¿Por qué tenemos que morirnos, y por qué no todos los seres vivos lo hacen? ¿hasta cuándo puede vivir un ser humano? María encontró en la literatura tres obras diferentes, de los autores Tom Kirkwood, Richard Feynman y Jorge Luis Borges, que la periodista Mónica Salomone resume muy bien, en el capítulo 4, explicando las diversas teorías, como por ejemplo que sobre el tiempo de vida influye el tamaño del cerebro, la reproducción, los predadores de la especie o amenazas de la vida, etc., la especialización y los cambios epigenéticos.

La coautora del libro, Mónica Salomone, entrevista también al Dr. Juan Luis Arsuaga, codirector del "Yacimiento de la Sierra de Atapuerca", en Burgos, uno de los principales focos mundiales de estudio de la evolución humana. En el capítulo 4 sobre la Inmortalidad, nos contarán que las células cancerígenas son inmortales, y tienen una gran actividad de la enzima telomerasa. Resaltan que la nutrición influye en la longevidad. Citan en su libro que la Dra. Elissa Epel señala que a más azúcar más cortos los telómeros y menos salud; y nos muestra una proyección sobre el daño del azúcar. Y las autoras describen que, beber un cuarto de litro diario de refrescos con azúcar, equivale a 1,9 años de envejecimiento en longitud de los telómeros, etc. capítulo 6, pág. 132, 139, 142.

Nos relata que una dieta sana, ejercicio, sueño reparador y menos estrés pueden contribuir a reparar los telómeros, lo que contribuiría a envejecer con menos dolencias y trastornos patológicos, alcanzando una longevidad activa y saludable, capítulo 6 y 7, páginas 132-147.

El Epílogo del libro se titula en el Umbral. Su autora es la polifacética y culta escritora Rosa Navarro Durán, profunda conocedora de la literatura universal. Considera los trabajos de María Blasco como un amanecer científico que nos lleva a la aurora, y el introductor Académico Ribas Ozonas, señaló que, era de la misma opinión, y de que María Blasco estaba en el umbral de nominaciones nacionales e internacionales. También comentó que, entre otras bonitas reflexiones de Rosa Navarro Durán, entre las que interpreta que la vida de los cristianos alcanzan el mar, y uniéndolo a otro comentario sobre el núcleo celular, comentó que, si la célula está dirigida por el núcleo, el cuerpo humano por el cerebro, como una ciudad por el Alcalde, y un país por el Presidente, el Universo por Dios.

Para el Curriculum vitae de la Ilma. Sra. Dña. María Blasco el presentador hace un resumen de lo reflejado en el capítulo 5, redactado por la coautora Mónica Salomone. Nació y pasó su infancia en San Vicente del Raspeig y en el Colegio Azorín, de Alicante, en cuya Universidad la semana anterior ha tomado posesión como Doctora Honoris Causa. Y se la dirige la más cálida felicitación en nombre de la Academia y de su Junta de Gobierno. María desde pequeña ha estado muy interesada en la ciencia, preguntando siempre el porqué de las cosas y pidiendo a sus padres juguetes científicos. La vocación profesional le llegó en bachillerato, cuando asistió a una charla de orientación universitaria en el instituto San Vicente del Raspeig, de Alicante. Les hablaron de la biología molecular y de ingeniería genética, lo cual para ella fue un

descubrimiento fascinante. Tuvo claro enseguida que se quería dedicar a la investigación en este campo. Vino a Madrid y realizó la tesis doctoral con la doctora Margarita Salas, que dirigía un brillante y prestigioso grupo de biología molecular en el Centro Severo Ochoa del CSIC y de la Universidad Autónoma de Madrid. Seguidamente comenzó a trabajar sobre la replicación de los extremos de los cromosomas, es decir, sobre los telómeros, en la replicación del virus PHI 29, y sobre la enzima que tiene análoga actividad metabólica que la telomerasa, en reparar los telómeros, importante para la longevidad. Una vez doctora, realiza su periodo posdoctoral a principios de los años 90 con la Premio Nobel Carol Greider en el Cold Spring Harbour Laboratory de Nueva York, EEUU. María Blasco, al preparar su estancia posdoctoral, descubrió un trabajo controvertido publicado 30 años atrás en los años 60 llamado “el límite de Hayflick”. Trabajo que es considerado como una primicia precursora sobre el envejecimiento. Recomendamos la singular y amena lectura de la entrevista telefónica entre María Blasco y Leonard Hayflick (de California) en el capítulo 5, p. 92-93. La cual la motivó aún más porque le quedó claro que la investigación en envejecimiento, es la acumulación de daño en el organismo y que no estaba avanzando en absoluto. Se trata de investigar la causa de estos daños. Lo que ella descubre en EE.UU. está relacionado con el acortamiento de los telómeros. Regresó a España cuando ganó una plaza de Investigadora del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Centro Nacional de Biotecnología; que a la sazón dirigía Mariano Esteban, nuestro Presidente, y años más tarde, de este Centro se traslada al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas que dirigía Mariano Barbacid, Académico de Honor de esta Real Academia. Actualmente, María Blasco dirige el prestigioso y productivo Grupo de Telómeros y Telomerasa, en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas del que además es su Directora. Se trata de uno de los principales centros de investigación sobre el cáncer en el mundo. Con su trabajo y dedicación día a día, el prestigio de María Blasco, y de su grupo de Investigación, ha crecido y alcanzado el nivel de líder internacional.

María ha realizado la primera terapia con telomerasa contra el envejecimiento, que alarga la juventud de los ratones y su longevidad. María ha exprimido su personalidad y dedicación, para sacar tiempo para este libro divulgativo, para la formación del público en este tema. María ha iniciado la terapia génica al aplicar el gen de la telomerasa en el tratamiento de varias enfermedades: el infarto, la fibrosis pulmonar e idiopática, la anemia aplásica y enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Huntington, Esclerosis lateral amiotrófica. Su objetivo es demostrar que reparando los telómeros se combaten enfermedades de la edad y ancianidad.

Curriculum vitae de la coautora Dña. Mónica G. Salomone. Es periodista especializada en ciencia, busca y cuenta historias sobre cómo la investigación de los científicos cambia la vida de los ciudadanos, aumenta la calidad de vida y la felicidad de la Sociedad y de la Humanidad. Ha publicado sus artículos y trabajos en numerosos medios nacionales y extranjeros, en España, con frecuencia en el periódico El País, Ha colaborado con instituciones como la Fundación BBVA, la Agencia Espacial Europea; el Instituto de Astrofísica de Canarias; y en Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Y se le ofreció la colaboración de la RANF. Su texto, “Morir Joven, a los 140 años”, es un apasionante libro que se ofrece al lector. Lo redacta y estructura de forma atractiva y formativa, no solo para especialistas, sino también para el gran público iberoamericano de habla española y afines. Se trata del relato de investigaciones y reflexiones e ideas creativas sobre el trabajo pasado, presente y futuro de María Blasco y el envejecimiento.

Comenta que este tema ha preocupado de continuo a la humanidad, y sin embargo, explica Mónica, que es María Blasco quien lo ha impulsado y lo ha puesto encima de la mesa con interesantes novedades y nuevos enfoques que nos proporcionan grandes esperanzas y un futuro prometedor, para evitar achaques y curar enfermedades. Felicitamos a Mónica Salomone por su excelente y amena elaboración de este libro.

Para terminar, comenta el Académico D. Bartolomé Ribas, que, debemos sintonizar nuestra vida, la química y los circuitos metabólicos de nuestro cuerpo. Donde hay química hay armonía y hay música, y la música es matemática, fundamento del Universo. Nuestra vida, como decía nuestro Premio Nobel Severo Ochoa es Química. Debe ser por tanto armonía, y no caben los achaques y las enfermedades. Eso es lo que buscamos los científicos. En el libro de la mano de las autoras queda explicado cómo podemos cambiar nuestra vida a mejor.

El jueves 2 de febrero se celebró la toma de posesión del Académico extranjero, de la Universidad de Coimbra, Portugal, Excmo. Sr. D. Fernando Ramos, cuyo discurso versó sobre “Residuos de Medicamentos en alimentos”, y fue presentado por el Académico D. Benito del Castillo García. En la Mesa de Presidencia tomó asiento el Cónsul General de Portugal D. Joao Martins y la Presidenta “Bastona da Ordem dos Farmacêuticos de Portugal”, y en cuyo acto estuvieron presentes otras numerosas autoridades portuguesas.

En los últimos años se han producido numerosos acontecimientos relacionados con diversos procesos de inseguridad alimentaria, tales como problemas de contaminación en sustancias que se utilizan para mejorar la producción de vegetales y animales.

En Portugal, en el caso de animales, y tan sólo en la última década, hemos de destacar varias intoxicaciones alimentarias con clenbuterol, casos de nitrofuranos en aves de corral, cloranfenicol en truchas o bien la presencia de antibióticos en pescados de acuicultura, sólo por reseñar ciertos casos ampliamente difundidos en la prensa.

La utilización de medicamentos asegura que, en principio, los animales entran sanos en la cadena alimentaria, pero esta práctica plantea una serie de problemas relacionados con la calidad y la seguridad de los alimentos consumidos. De entre todas estas situaciones de alerta, destacaremos la presencia de residuos de medicamentos en alimentos de origen animal, por

la resistencia bacteriana, cuando se administran antibióticos a los animales.

El Discurso de Toma de Posesión del Dr. Fernando Ramos, como Académico Extranjero de la RANF, se centrará en los temas mencionados anteriormente, teniendo como base su propia experiencia investigadora.

Los últimos años han sido fértiles en acontecimientos relacionados con varios procesos de inseguridad alimentaria, desde los problemas de contaminación ocasionales a las sustancias que se utilizan para mejorar la producción de las plantas y de los animales. En Portugal, en el caso de los animales, y sólo en la última década, nos permitimos a destacar las intoxicaciones alimentarias con clenbuterol, los casos de nitrofuranos en aves de corral, del cloranfenicol en la trucha o la presencia de antibióticos en pescado de acuicultura, sólo para nombrar casos ampliamente difundidos por la prensa. Si la utilización de medicamentos asegura que, en principio, los animales entran sanos en la cadena alimentaria, esta práctica plantea una serie de problemas relacionados con la calidad y la seguridad de los alimentos consumidos. Entre estas preocupaciones, destacamos la presencia de residuos de medicamentos en tejidos comestibles, incluso la contribución para la resistencia bacteriana, sobretodo cuando se administran antibióticos a los animales. El discurso de tomada de posesión de Fernando Ramos como Académico Extranjero en la RANF se centrará en los temas mencionados anteriormente, teniendo como base su propia experiencia de investigación.

Del 6 al 9 de febrero tuvo lugar el curso sobre “Inmunonutrición”, dirigido por los doctores Francisco José Sánchez Muniz, Académico de Número de esta Real Academia, y de la Académica Correspondiente Dña. Ascensión Marcos Sánchez.

La Inmunonutrición es un área de conocimiento emergente y transversal que estudia la interacción entre la nutrición y la inmunidad. Con el fin de mantener un buen estado de salud, el cuerpo humano desarrolla una serie de complejos sistemas de defensa naturales para protegerse de patógenos y factores ambientales nocivos. Situaciones de malnutrición, bien por exceso o por defecto, ocasionan alteraciones importantes del sistema inmunitario, sin olvidar el impacto que originan los determinantes del estilo de vida (dieta, actividad física, balance neuroendocrino, estrés) que influyen sobre la interacción nutrición-inmunidad. Este primer Curso Avanzado sobre Inmunonutrición pretende profundizar en el conocimiento de esta ciencia nueva y de los mecanismos de la interacción entre la nutrición y la inmunidad en la preservación de la salud y la prevención y el desarrollo de muchas patologías.

El 9 de febrero tuvo lugar en Sesión científica la Mesa Redonda, en colaboración con la Fundación José Casares Gil de Amigos de la RANF u en sesión conjunta con la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos, con el título: “*Probióticos y Prebióticos: evidencia científica*”. Fue presentada por el Académico D. Francisco José Sánchez Muniz y moderada por la Académica Correspondiente Dña. Ascensión Marcos. Y como ponentes actuaron los Dres. D. Guillermo Álvarez-Calatayud, del Hospital Materno-Infantil Gregorio Marañón y Presidente de SEPYP, “Aplicaciones clínicas de los probióticos”; D. Juan Miguel Rodríguez, del Equipo PROBISEARCH de la Facultad de Veterinaria, UCM: “Probióticos para el tratamiento y prevención de las mastitis durante la lactancia”; y Dña. Teresa Requena, del Centro de Investigación en Alimentación del CSIC: “Prebióticos y su impacto en la microbiota intestinal”.

El miércoles 15 de febrero tuvo lugar la sesión conjunta entre la Real Academia Nacional de Farmacia y la Fundación de Ciencias de la Salud, que versó sobre "Carlos III y La bandera de España" dentro del Ciclo "Los valores de la Historia", a cargo de Hugo O'Donnell y Duque de Estrada, Duque de Tetuán y miembro de la Real Academia de la Historia. Fue presentada por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Javier Puerto Sarmiento.

El jueves 16 de febrero se celebró la toma de posesión como Academia de Número de la Excm. Sra. Dña. Yolanda Barcina Angulo, quien leyó su discurso de ingreso titulado: "La huella humana: crisis de biodiversidad, su tratamiento" y fue presentada por el Académico de Número, Excmo. Sr. D. Benito del Castillo García.

La Dra. Barcina Angulo es Catedrática de Nutrición y Bromatología de la Universidad Pública de Navarra. Licenciada (1982) y Doctora (1984) en Farmacia por la Universidad de Navarra. Su tesina recibió el Premio del Consejo General del Colegio de Farmacéuticos y su Tesis la calificación de Premio Extraordinario. Fue Ayudante en la Universidad de Murcia (1986), Profesora Titular en la Universidad Autónoma de Barcelona (1988) y en la del País Vasco (1990) donde también fue Vicedecana de la Facultad de Farmacia. En 1991 se incorporó a la Universidad Pública de Navarra donde fue Directora del Departamento de Tecnología de Alimentos, obtuvo la Cátedra (1993) y fue Vicerrectora de Gestión Académica (1995-96). Ha sido investigadora principal de programas científicos nacionales e internacionales. El resultado de esta actividad científica han sido las numerosas comunicaciones y conferencias en congresos, así como libros y publicaciones en revistas de gran relevancia.

Inició su vida política en 1996, cuando fue nombrada Consejera de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio y Vivienda del Gobierno de Navarra. Ha sido alcaldesa de Pamplona (1999-2011), Presidenta del Gobierno de Navarra (2011-2015).

Dejó la política activa tras las últimas elecciones autonómicas a las que no concurrió para centrarse en su vida académica y profesional. Actualmente es Catedrática en la Universidad Pública de Navarra, Académica correspondiente de la Academia de Veterinaria de la Región de Murcia y Consejera de Telefónica Audiovisual Digital

Ha recibido reconocimientos tanto a nivel nacional como internacional. Es Doctora “Honoris Causa” por la Universidad San Ignacio de Loyola en Lima (Perú), Profesora Honoraria de la Universidad de Varna (Bulgaria) y de la Universidad

Nacional de Rosario (Argentina). y ha recibido la Cruz del Comendador de la República Federal de Alemania.

En su discurso de ingreso, la Dra. Barcina nos comentó que diversos organismos internacionales, ante la actual tasa de extinción de las especies, instan a que se adopten medidas para su conservación. También proponen estudiar la diversidad biológica para transferir conocimientos útiles a las industrias farmacéutica, agroalimentaria o textil. Pero la conservación de la biodiversidad y la adaptación al cambio climático sólo son compatibles con un modelo basado en el desarrollo sostenible. Dicho modelo debe implicar conjuntamente a las naciones en desarrollo y desarrolladas, tal que los beneficios económicos se distribuyan de forma justa. En este modelo intervienen la ciencia y la industria farmacéuticas, cuyos orígenes son ejemplo de los “servicios ecosistémicos”, es decir, el aprovechamiento de los recursos obtenidos de los ecosistemas. La ciencia farmacéutica no solo ha mejorado las propiedades terapéuticas de los productos naturales o ha sintetizado nuevos compuestos, sino que está investigando otros basados de la diversidad biológica. Todas estas circunstancias justifican implicar a la Real Academia en las tareas descritas, máxime cuando se trata de asuntos que afectan a toda la humanidad, que condicionen su futuro y que son complejas por su carácter multidisciplinar. El compromiso supone un desafío ético que precisa conocer los antecedentes y el estado actual de la crisis ambiental y de la diversidad biológica. Desde la actividad farmacéutica, en todo su espectro, se puede contribuir a lograr los objetivos formulados por los organismos internacionales en torno al Cambio Climático, la Conservación de la Diversidad Biológica, la Gestión Sostenible de los Recursos Hídricos, el Pacto Global de la industria farmacéutica en el ámbito de la Responsabilidad Social Corporativa y los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2030. Por todo lo antes señalado, el presente discurso revisa aspectos como la diversidad biológica en relación con los factores antropogénicos, los servicios de los ecosistemas y los recursos para la farmacia, especialmente la bioprospección y sus tendencias actuales. También explora los riesgos para la salud asociados al cambio climático, a la crisis del agua y a los contaminantes emergentes (los disruptores endocrinos). Se evalúa la responsabilidad social corporativa y el desarrollo sostenible en la actividad farmacéutica a través de diversas herramientas: la huella ecológica corporativa, la huella de carbono corporativa y el análisis de ciclo de vida como herramienta para el desarrollo sostenible en la industria farmacéutica.

El jueves 23 de febrero tuvo lugar la toma de posesión como Académico extranjero, el Prof. Alain Li Wan Po, Director del Center for Evidence-Based Pharmacotherapy, de Nottingham, Inglaterra. Cuyo discurso versó sobre “*Clinical Pharmacy in Genomic era*” y fue presentado por el Académico de Número D. Alfonso Domínguez-Gil Hurlé.

En el discurso de presentación le describió como Dr. en Farmacia por la Universidad de Londres, licenciado en Matemáticas y Director del “Center for Evidence-Based Pharmacotherapy”, en la Universidad de Nottingham. Disertó con el título “Clinical Pharmacy of the Genomic Era”. Es Profesor en las Universidades de Nottingham y Aston. Director de la Escuela de Farmacia en la Universidad de Queens en Belfast. Miembro del Comité de Seguridad de Medicamentos del Reino Unido. Autor de varios libros sobre Medicina Genómica. Editor de la Revista *Clinical Pharmacy and Therapeutics*, Es autor de más de 200 publicaciones sobre farmacogenética, farmacogenómica, meta-análisis, etc. Profesor en el Master de la Universidad de Salamanca sobre “Evaluación y desarrollo de medicamentos”.

La intervención del Prof. Alain Li Wan Po versó sobre “Clinical Pharmacy in the Genomic Era” durante el cual realizó una descripción histórica de la terapéutica con medicamentos, mostrando listado por siglo desde 1980 hasta la actualidad y el futuro de la terapia.

Over a century ago Gregor Mendel investigated, quantitatively, how physical traits of plants were passed on from one generation to the next. Soon after, William Bateson and Archibald Garrod showed the relevance of Mendel’s findings to human disease. Pharmacists have throughout history marketed themselves as experts who could treat disease with specific medicines. Their claims were however poorly validated until Louis Pasteur and Robert Koch established the microbial aetiology of many diseases. Effective antimicrobial agents and immunotherapies soon became available for an expanding range of infections, and personalisation of treatment became possible through sensitivity testing. Later, a greater understanding of the molecular pathogenesis of non-microbial diseases led to the development of effective drugs, such as antihypertensives and anticoagulants. As a result, current pharmacopoeias bear no resemblance to their predecessors cluttered with predominantly useless drugs. With the unravelling of the double helical structure of DNA and greater understanding of its implications for health and disease, pharmacopoeias are being rewritten again. The new drugs enable an unprecedented level of individualisation of therapy. To optimise the promise of these drugs, input from a new generation of well-informed clinical pharmacists is needed. In this presentation we identify some of these developments, and where input from pharmacists is most likely to be required. Will clinical pharmacists deliver?

El 2 de marzo, tuvo lugar la celebración de la Mesa Redonda sobre el BALNEARIO DE PARACUELOS DE JILOCA (Zaragoza).

En el estudio, realizado por los Dres. M^a del Carmen Francés Causapé, Académica de Número, José López Guzmán, Académico Correspondiente, y María López González, se trata el Centro Termal Balneario de Paracuellos de Jiloca, que está situado en las inmediaciones del término municipal de Paracuellos de Jiloca, en la carretera nacional 234, salida 232; en la provincia de Zaragoza, en la Comarca de Calatayud, en la Comunidad Autónoma de Aragón. Se hace mención de los personajes ilustres nacidos en la comarca, a su patrimonio arqueológico, arquitectónico, cultural y natural así como a los tres balnearios hoy convertidos en Centros Termales de gran confort: Alhama de Aragón y Jaraba ya estudiados por esta

Comisión en 1983 y 2004 respectivamente y el de Paracuellos de Jiloca que es el más antiguo de Aragón. Se comentan las noticias históricas acerca de la utilización de las aguas minero-medicinales de este Centro Termal que ya eran conocidas por romanos y árabes, de las que ya dan cuenta en el siglo XVI Miguel Martínez del Villar y en el siglo XVII Alfonso Limón Montero mientras que en el siglo XVIII fueron analizadas por el farmacéutico Pedro Gutiérrez Bueno. Los lugareños empleaban estas aguas para curar la escrófula y el herpetismo y se hace mención a la clasificación de sus aguas dependiendo de los diferentes análisis químicos realizados en los siglos XIX y XX así como su especificidad de estas aguas para la curación de las enfermedades de la piel. Se hace referencia a la declaración de utilidad pública de las aguas de los Baños Viejos en 1869 y de los Baños Nuevos en 1876, a sus diferentes propietarios hasta que fueron unificados en un mismo propietario. Se da cuenta de los Médicos Directores desde el año 1847 siendo tres de ellos naturales de Aragón: Gregorio Guedea Artigues, Manuel Millaruelo Pano y Alejandro de Gregorio Guajardo; asimismo de los cuatro farmacéuticos que realizaron análisis de sus aguas: Pedro Gutiérrez Bueno, Constantino Sáez Montoya, Gabriel de la Puerta Ródenas y Magaña, y José Muñoz del Castillo. Se hace referencia a las diversas distinciones con que se han distinguido a estas aguas desde el siglo XIX y en el siglo XXI como Empresa Centenaria de Aragón y su Hotel con la Q de Calidad Turística. Hemos de destacar que por un Decreto Legislativo 1/2013 del Gobierno de Aragón los balnearios de la región se definen como "los complejos turísticos que, contando con instalaciones de alojamiento hotelero y con un manantial de aguas mineromedicinales declaradas de utilidad pública utilizan estos y otros medios físicos naturales con fines terapéuticos de reposo y similares", es decir, este Centro Termal es un Centro de Salud donde los pacientes son atendidos desde el punto de vista sanitario, turístico, cultural ó lúdico.

El Dr. Antonio López Lafuente habló sobre las "Características generales de los suelos circundantes al Balneario". Las propiedades físico-químicas de los suelos que se encuentran situados en la superficie de la zona no saturada de acuífero, pueden jugar un papel muy importante en las características de las aguas subyacentes. Depende de donde se encuentre el área de recarga, y de la profundidad a la que estén las aguas, los fenómenos de disolución, hidratación, hidrólisis y procesos de óxido-reducción de las fracciones minerales y orgánicas de los suelos pueden influir de forma significativa en la composición de las mismas. En este trabajo analizaron las características edáficas de cuatro suelos muy representativos de los alrededores de la casa balneario, ubicada en la localidad de Paracuellos del Jiloca, provincia de Zaragoza.

El Dr. Juan Antonio López Geta y el Dr. Juan José Durán Valsero comentaron su "Estudio Hidrogeológico de las aguas del Balneario". El Balneario de Paracuellos del Jiloca se ubica en la provincia de Zaragoza. Geológicamente, se encuentra en la cuenca de Calatayud, relleno con sedimentos detríticos y evaporíticos de edad Miocena. Desde el punto de vista hidrogeológica, el Balneario está alimentado por unos pequeños manantiales, de baja temperatura, situados cerca del contacto entre una terraza aluvial del río Jiloca y los yesos miocenos, de naturaleza kárstica, cuya recarga procede fundamentalmente de la infiltración en los yesos de la serie miocena. El caudal de los manantiales es reducido, de entre 20 3 litros por segundo y aunque la facies hidroquímica del agua es sulfatada cálcica, posee una serie de aniones representativos de alta salinidad (cloruros en torno a 5000 mg/l).

Las Dras. M^a Antonia Simón Arauzo y Beatriz Romero del Hombrebueno, sobre "Análisis de la Radiactividad en las aguas del Balneario". En el estudio de la radiactividad en las aguas del balneario de Paracuellos de Jiloca (Zaragoza), las muestras se han tomado en punto de surgencia. Inicialmente, se han determinado los índices de actividad alfa total, beta total y la concentración de ²²²Rn. Como puede observarse en los resultados de la tabla 1, los índices de actividad alfa son superiores a los establecidos para la determinación de la dosis indicativa de las aguas de consumo humano (0,1 Bq/L), mientras que el índice beta total está por debajo (1 Bq/L). El análisis del ²²²Rn ha mostrado valores de 8,65 Bq/L, valor inferior a los 67,3 Bq/L para que puedan considerarse como radiactivas, según el Vademécum de las aguas mineromedicinales españolas. Los niveles detectados tampoco superan el valor paramétrico establecido en la normativa para aguas de consumo (100 Bq/L) Posteriormente se han analizado los isótopos más característicos de las distintas series naturales del ²³⁸U, ²³⁵U y ²³²Th, y los de origen cosmogénico ⁴⁰K y tritio. Como puede verse en los resultados, la actividad detectada en el índice alfa total, se debe principalmente a los isótopos de la serie de ²³⁸U, donde el ²²⁶Ra es el principal contribuyente. En cuanto al aporte de actividad beta, el ⁴⁰K es el más importante.

Por último, la Dra. Carmen de la Rosa Jorge habló sobre "Microbiología del manantial mineromedicinal del Balneario". En esta Mesa Redonda se expone el estudio de la microbiota autóctona y alóctona del agua mineromedicinal del Balneario de Paracuellos del Jiloca (Zaragoza). No se han encontrado indicadores fecales ni microorganismos patógenos en 250 mL de agua. El número total de microorganismos en el agua ha sido de $3,4 \times 10^6$ /mL, estando vivos el 57 % y siendo el número de bacterias viables heterótrofas y oligotrofas <100 ufc/mL. La microbiota autóctona está constituida, principalmente, por bacterias Gram positivas de los Phylla Firmicutes y Actinobacteria. Los géneros más frecuentes han sido: Staphylococcus, Micrococcus, Rhodococcus y Leifsonia. Se han detectado bacterias con actividades amonificantes, proteolíticas, amilolíticas y celulolíticas en 100 mL de muestra que contribuyen a la autodepuración de estas aguas, así como oxidantes del azufre y sulfato-reductoras que influyen en la composición química de las mismas.

El 9 de marzo 2017 se celebró la Mesa Redonda sobre "Ciencia, Política y Farmacia en la España del siglo XX: entre Giral y Albareda", con la presentación por la Excm. Sra. Dña. Rosa Basante Pol, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Como ponentes intervinieron el Ilmo. Sr. D. Antonio González Bueno, Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia, sobre "José Giral Pereira (1879-1962), acerca de Ciencia y

Política. Disertó fundamentándose en el libro: José Giral Pereira, de Francisco Javier Puerto Sarmiento”. La reciente publicación de un par de textos sobre estos dos farmacéuticos, José Giral Pereira (1879-1962) [Francisco Javier Puerto Sarmiento. Ciencia y Política. José Giral Pereira. Madrid: BOE / RAH, 2016] y José María Albareda Herrera (1902-1966) [Guillermo Reparz, Rosa Basante Pol, Antonio González Bueno. Ciencia y Farmacia en el franquismo: el Club Edaphos, vivero de investigadores en tiempos de José María Albareda. Madrid: RANF, 2016], prácticamente coetáneos, aunque con perfiles políticos diferentes, servirá, además de para difundir estos volúmenes, como elemento totémico que nos induzca a reflexionar sobre la participación de los farmacéuticos en la vida científica y política en la España del siglo XX.

Y como segundo ponente intervino el Excmo. Sr. D. Francisco Javier Puerto Sarmiento, Académico de Número de las Reales Academias Nacional de Farmacia y de la Historia. Se fundamentó también en el libro: “José María Albareda Herrera (1902-1966), en torno a la publicación Ciencia y Farmacia en el franquismo: el Club Edaphos, vivero de investigadores en tiempos de José María Albareda”. Del que son autores Guillermo Reparz, Rosa Basante Pol y Antonio González Bueno.

El día 16 de marzo tuvieron lugar dos sesiones científica. En la primera se celebró la toma de posesión como Académico Correspondiente extranjero, del eminente científico y profesor de la Ludwig Maximilian Universität de Munich, el Profesor Frits Kamp, que fue presentado en Sesión Pública, a las 17,30 horas y pronunció su discurso en español, por la facilidad de dominar 7 idiomas, titulado: “*Estudios biofísicos sobre las causas y tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer*”. Fue presentado por el Académico Secretario de la RANF, el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas Ozonas.

El Profesor Frits Kamp nace el 31 de mayo de 1958, en, la ciudad de Gouda, de Holanda. Casado con la Señora Dña. Mariana Browne Puga y tienen 3 hijos Annina; Adele y Federico.

En 1982 realizó la tesis doctoral en el ámbito de la Biofísica, con Maxima cum laude, en la Universidad de Groningen, Holanda. Seguidamente en 1984 se licenció en Ingeniería Bioquímica en la misma Universidad de Groningen; y en 1990 otra tesis en Bioquímica en el Slater Institute de la Universidad de Amsterdam, con el título “*Protons in Bioenergetics, why, how and where they go*”. Fue su Director de tesis el Prof. Karel van Dam, y como asesor, el Prof. H.V. Westerhoff.

Sus relaciones internacionales se ampliaron, pues en 1985 al 88 fue Visiting Fellow en el National Institutes of Health, en Bethesda, Maryland, EE.UU. De 1991 al 2000 Profesor Asistente, en el Departamento de Biofísica, del Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, EE.UU., y seguidamente se incorporó al Centro de Alemania donde actualmente trabaja, el Physiologisches Chemisches Institut, de la Ludwig Maximilian Universität de Múnich.

Durante estos años, simultaneó de 1998 al 99 Consultor de la Compañía Adipogenix, Obesity Drugs Company, Boston, EE.UU. De 1993 a 1995 fue Postdoctoral Asociado en la Cornell University Medical College, New York City, EE.UU. Donde conoció a su esposa Mariana. De 1996 a 1997 Fue Profesor Visitante y Asociado en el Centro de Estudios Científicos de Santiago de Chile.

El Profesor Frits Kamp es un experto en Biofísica, por sus investigaciones sobre los mecanismos moleculares en biomembranas, metabolismo de ácidos grasos y por tanto en el ámbito de la obesidad, en cuyo tema esta Real Academia dicta un curso al que acuden numerosos estudiantes de las facultades universitarias del área de Madrid, y “on line” para diversos países de hispanoamericanos, que por la numerosa asistencia de alumnos en ocasiones se repite dos veces al año.

Ha estudiado y sigue en la actualidad el estudio de nuevas moléculas, proteínas desacoplantes y la alfa-synucleína en la investigación y evaluación de la transferencia de diversas moléculas a través de membranas celulares, su evaluación y transporte, establece evidencias de sus causas y efectos para sus aplicaciones en terapéutica. Descubre el mecanismo del movimiento transbicapas (flip-flop) de ácidos grasos a través de membranas; y en relación a la obesidad. Y desde el año 2010 hasta la actualidad se dedica a los cambios de lípidos en membranas celulares y de las neuronas, en relación a las causas de la enfermedad de Alzheimer.

Es miembro de numerosas Sociedades científicas de Holanda, Alemania Estados Unidos e internacionales. Ha publicado sus trabajos en revistas de elevado índice de difusión, como en Nature; en Proceedings of the National Academy of Sciences, USA; y en EMBO Journal. Además de numerosas revisiones, y capítulos de libros en temas que mencionamos a continuación: sobre modelos matemáticos de proteínas que transportan protones a través de membranas, descubre y publica el mecanismo de transporte flip-flop de ácidos grasos a través de membranas; la alfa-Synucleína como chaperona que regula la fusión de membranas y sobre la regulación de la gamma-secretasa por lípidos específicos en la membrana.

Ejerce además numerosas actividades de dirección y de apoyo en:

a) Modelos y experimentos biofísicos apoyando colegas en la Universidad que hacen investigaciones en el campo de las enfermedades neurodegenerativas.

b) Actividad de formación de numerosos becarios alemanes y extranjeros en la investigación.

c) Promociona y promueve nuevos mecanismos moleculares en membranas celulares y neuronales.

d) Promociona a su vez la información y la innovación, que se concreta en la medicina traslacional: el eje investigador - científico - sanitario - paciente y viceversa.

e) Apoya la colaboración con organizaciones e instituciones públicas y privadas, que promocionan la investigación sobre enfermedades neurodegenerativas, como el tema de su discurso de toma de posesión, sobre la enfermedad de Alzheimer.

Nos va a hablar sobre las causas y tratamiento de la Enfermedad de alzhéimer, de la que sabemos mucho, pero poco en

Medicina Preventiva, como prevenirla y como evitarla. Esta enfermedad, no tan rara, neurodegenerativa, causada por una alteración genética, provoca problemas de aprendizaje de nuevas habilidades o de adquisición de lenguaje.

En los últimos años, los avances en las técnicas de imagen, especialmente la tomografía por emisión de positrones (PET), han permitido a los investigadores buscar cambios sutiles en los cerebros de pacientes con diferentes grados de deterioro cognitivo", explica Domenico Praticó, profesor en el Centro de Medicina Traslacional en la Escuela de Medicina, de Filadelfia, EE.UU. Quien ha señalado, que, una de las estructuras cerebrales más importantes es el hipocampo, que juega un papel clave en el procesamiento y el almacenamiento de los recuerdos.

Seguidamente el Prof. Frits Kamp desarrolló su discurso sobre los cambios de membrana y el significado de las proteínas de su línea investigadora, la alfa-synucleina y la gamma-secretasa, en beneficio de la Sociedad alemana, la europea y para toda la humanidad. "Biophysical studies on the causes and therapy of Alzheimer Disease".

Explica que Alzheimer disease (AD) is the most common neurodegenerative disease worldwide. It is widely believed that the disease is caused by plaque formation of amyloid β -peptide ($A\beta$) in the brain of affected patients. $A\beta$ peptides are generated by processing of the amyloid precursor protein (APP), a type I membrane protein. Two membrane-bound proteases are involved in this process: β - and γ -secretase, resulting in release of $A\beta$ peptides into the extracellular space. Being obvious AD drug targets, potent $A\beta$ -lowering inhibitors have been developed for both β - and γ -secretase. However, these drugs have unfortunately failed in clinical trials due to severe side effects. However, recent vaccination $A\beta$ therapies are promising.

The causes for the $A\beta$ imbalances in common sporadic forms of AD are not clear. One possibility is that membrane lipid changes that occur with aging causally contribute to onset of the disease. In our laboratory, by investigating various lipid classes, we found that its surrounding lipids potently modulate the activity of γ -secretase. In particular, we worked out in detail that membrane thickness has a substantial influence on the activity and precision of γ -secretase in the generation of $A\beta$. More recently, by focusing on neurosteroids, we found that the latter also have a major impact. The studies might open new venues in the understanding of the causes and treatment of AD.

La segunda sesión científica del día 16 de marzo tuvo lugar a las 19,00 horas. En ella intervino la Excm. Sra. Dña. María Vallet Regí, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, que pronunció la conferencia titulada: "Nanopartículas mesoporosas de sílice como portadoras de fármacos".

La nanomedicina estudia, entre otras cosas, la liberación de fármacos con una terapia focalizada que consigue mejorar su perfil farmacológico, logra una liberación selectiva a los tejidos diana, consigue superar las barreras biológicas y disminuir los posibles efectos secundarios de los fármacos. En esta charla vamos a comentar como se pueden fabricar nanosistemas inteligentes capaces de transportar diferentes agentes antitumorales de forma selectiva hacia la zona tumoral y liberarlos en respuesta a un estímulo externo. Un nanosistema tiene un tamaño muy pequeño, entre 100 y 200 nm. Para hacernos una idea de lo pequeño que es podemos pensar que el diámetro de un pelo mide 80000 nm. Al poner el adjetivo inteligente lo que estamos indicando es que queremos que libere los agentes antitumorales cuando nosotros demos la orden de hacerlo. Esto es, mediante sistemas estímulo –respuesta. La superficie de estos nanosistemas tendremos que decorarla con moléculas capaces de reconocer a las células tumorales, de tal forma que los nanotransportadores entren dentro de ellas como los guerreros en el Caballo de Troya. El que sea selectivo es para que descargue los citotóxicos sólo en el interior de las células tumorales. Una vez allí, la aplicación de un estímulo provocará la liberación de los agentes terapéuticos que causarán la destrucción de las células enfermas. El estímulo es la llave que abre la puerta para permitir que salgan los fármacos. La ventaja principal de esta aproximación está en la mayor selectividad de la terapia, mayor control sobre la dosis administrada y la reducción de efectos secundarios. Con todo esto lo que queremos es reducir muchísimo las dosis de citotóxicos, porque sólo necesitaremos cantidades mínimas para matar las células cancerígenas, sin que haya que aportar dosis altas como ocurre con la quimioterapia actual, que además reparte su carga por todo el cuerpo. Pero para eso tenemos que hacer que el nanosistema sea selectivo. De esta forma ya podemos utilizar dosis más pequeñas que deberán llegar solo a donde hace falta.

El jueves 23 de marzo tuvo lugar a las 17,30 horas, la Tertulia Científica moderada por el Excmo. Sr. D. Antonio R. Martínez Fernández, Académico de Número de la RANF. Como ponente intervino el Excmo. Sr. D. Rafael Sentandreu Ramón, Académico de Número de la RANF, sobre el tema: "El cerebro. ¿Somos sólo estímulos eléctricos?". Se trataron aspectos relacionados con los conocimientos actuales que se tienen sobre el cerebro: estructura, desarrollo y genética como así mismo, aquéllos de los que conocemos menos, como son los tocantes a las redes neuronales y los modelos de su funcionamiento: percepción, plasticidad, envejecimiento. Finalmente veremos aspectos avanzados de los Proyectos BRAIN de los EEUU y el HUMAN BRAIN de la Unión Europea.

Este mismo jueves se celebró la toma de posesión de Académico Correspondiente extranjero, del Prof. Rogerio Gaspar, de la Facultad de Farmacia, y Vicerrector de la Universidad de Lisboa. Presentó el discurso con el título: "Integrative personalized healthcare and the role of pharmaceutical sciences", y se explayó en una larga e ilustrada charla sobre las ciencias farmacéuticas, su evolución, el diagnóstico y tratamiento en el futuro, la medicina integral y tratamiento personalizado, interacciones medicamentosas, la necesidad de medicamentos innovadores, su costo, distribuían en Europa y en el mundo, la evolución de la natalidad en Europa y en el mundo. Exponemos un corto resumen en inglés: Pharmaceutical

sciences are evolving in a new world dominated by the need of better integrative and personalized healthcare. The way pharmaceutical scientists will respond to challenges in precision medicine and allowing for innovative therapies, defined by biomarkers that will allow rational design of delivery systems in therapy and diagnostics, will shape the next decade, but this is a reality that is already with us, in its main issues relating to materials science, biological interactions and technologies available.

El 27 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia, en colaboración con la Facultad de Farmacia, San Pablo CEU, celebraron la conferencia a cargo del Dr. Ignacio Melero Bermejo, Codirector del Servicio de Inmunología e Inmunoterapia. Clínica Universidad de Navarra. Investigador del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), titulada: “El sinuoso camino traslacional de la inmunoterapia del cáncer”.

La Sesión estuvo presidida por el Presidente de la Real Academia, el Excmo. Sr. D. Mariano Esteban, la Decana de la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo CEU, la Dra. Beatriz Pascual-Teresa y por el Académico Secretario de la corporación el Excmo. Sr. D. Bartolomé Ribas.

Del 27 al 30 de marzo, tuvo lugar la IV Edición de su Curso avanzado sobre Obesidad y Síndrome Metabólico, bajo la Dirección del Académico de Número, el Dr. Francisco J. Sánchez Muniz. Contó con la coordinación de los Excmos. Sres. Académicos de Número, Dres. Bartolomé Ribas Ozonas y Antonio L. Doadrio Villarejo, y los Ilmos. Sres. Académicos Correspondientes, Dres. Ascensión Marcos Sánchez y J. Alfredo Martínez Hernández.

La obesidad es la enfermedad metabólica más prevalente del siglo XXI. Su relación con otras patologías como el síndrome metabólico, la diabetes tipo 2, hipertensión, enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular e incluso cáncer es hoy por hoy innegable. El conocimiento, prevención y tratamiento de la obesidad constituyen, por tanto temas prioritarios de Salud y mecanismos por los que reducir sus comorbilidades. El IV Curso Avanzado sobre Obesidad supone una puesta al día, en la que se estudian y tratan muchos aspectos centrales de dicha patología y de sus comorbilidades asociadas. Este IV Curso pretende además en el marco de la Real Academia Nacional de Farmacia el acercamiento de alumnos, profesionales, investigadores y docentes seniors y nóveles interesados en el tema de obesidad con acercamiento a los factores nutricionales, genéticos, de estilo de vida, metabólicos, hormonales, etc.

El 30 de marzo, tuvo lugar la conferencia titulada: “La Microbiota intestinal y su relación con la Obesidad” a cargo del Excmo. Sr. D. César Nombela Cano, Académico de Número de la RANF. Fue el colofón al curso impartido en la RANF del 27 al 30 de marzo.

El conocimiento detallado de la microbiota de organismo humano progresa de forma muy notable desde la introducción de la tecnología metagenómica. A través del rastro genómico es posible detectar del conjunto de la población microbiana (microbioma), de cualquier localización del organismo, lo que ha permitido conocer también el conjunto de especies microbianas que alberga el tracto intestinal humano. A pesar de que las investigaciones sobre microbioma comenzaron hace pocos años, su avance resulta notablemente rápido; el microbioma intestinal integrado por un elevado número de células bacterianas, equivalente al menos al total de células propias del organismo, resulta ser básicamente simbiote, integrado por especies mutualistas, comensales y, algunas, eventualmente patógenas. La colonización microbiana tras el nacimiento genera una microbiota intestinal humana caracterizada por su funcionalidad, más que la homogeneidad de su composición, que muestra una alta variabilidad individual. Así mismo, la composición de la microbiota se ve afectada por la dieta, la edad y otras circunstancias individuales. La caracterización del microbioma intestinal en distintas situaciones, fisiológicas o patológicas, permite postular la relación de la microbiota con algunos trastornos metabólicos, entre ellos la obesidad. Algunos meta-análisis de datos sobre composición de la microbiota intestinal y obesidad muestran que no hay diferencias entre obesos y normales por lo que respecta a la presencia de Bacteroidetes, mientras que en obesos disminuye la proporción de Firmicutes, Bifidobacteria y Methanobrevibacter spp. La comunicación de la microbiota con el organismo supone el acceso de metabolitos a la circulación sistémica a través de la mucosa intestinal, lo que puede contribuir al desarrollo de obesidad a través del sistema endocannabinoide. El trasplante de microbiota humana a animales de experimentación, en especial el ratón, permite confirmar tanto la asociación de la microbiota con la obesidad, así como la corrección de estas situaciones patológicas mediante intervenciones que modifiquen la composición del microbioma. En cualquier caso, el microbioma humano añade una nueva dimensión a la individualidad en la valoración del estado de salud y en el tratamiento de patologías.

En cuanto a los honores que han recibido nuestros Académicos, hay que destacar:

La Excm. Sra. Dña. M^a Teresa Miras Portugal, ha sido financiada por la Fundación Ramón Areces en el XVIII Concurso Nacional para la Adjudicación de Ayudas a la Investigación en Ciencias de la Vida y de la Materia, con el Proyecto titulado: Role of purinergic signalling in human cortical development. A cerebral organoid-based approach.

El proyecto de tres años de duración les permitirá conocer el efecto de diversos compuestos y mutaciones genéticas en el desarrollo del córtex cerebral en sus fases tempranas.

La Real Academia Nacional de Farmacia felicita a su Académico Correspondiente, el Prof. Dr. D. Daniel Pablo de la Cruz Sánchez Mata por la obtención de una beca de investigación a través del Real Colegio Complutense (RCC-Harvard) adscrito a la prestigiosa Universidad de Harvard (MA, USA).

El Dr. Sánchez Mata, que se encuentra ya en el campus de Cambridge, está adscrito al Departamento Organismic and

Evolutionary Biology (OEB) desde donde, durante los cuatro próximos meses, investigará en las inconmensurables colecciones botánicas que se conservan en los diferentes herbarios institucionales de Harvard (HUH); sus estudios están relacionados con los importantes materiales originales de edafismos que se recolectaron durante las diferentes expediciones del siglo XIX al Pacífico Noroeste.

Por último, nuestro Académico Correspondiente, el Prof. D. Antonio M. Rabasco Álvarez ha sido elegido Secretario de la Academia Iberoamericana de Farmacia.

La Real Academia de Farmacia ha albergado y participado en sesiones y actos extraordinarios relevantes para el mundo de la ciencia y la investigación.

El pasado 16 de marzo la Real Academia Nacional de Farmacia y el Grupo SANED firmaron un convenio de colaboración cuyo fin es el impulso y difusión de la Ciencia, de la Investigación y la gran labor que para ello realizan ambas instituciones.

El presidente de Grupo SANED, Francisco Bascuas, y el presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia, Mariano Esteban, han firmado un acuerdo de colaboración para el desarrollo de actividades formativas e informativas. Las actividades se desarrollarán a través de las revistas AULA DE LA FARMACIA y EL MÉDICO, ambas cabeceras de dicho Grupo.

La cooperación se materializará en la puesta en marcha de acciones de formación y difusión, participación en cursos de especialización, jornadas, seminarios de actualización o ciclos de conferencias, entre otros; así como en el apoyo en las actividades de comunicación y divulgación que realizan ambas entidades.

El acuerdo contempla también la colaboración técnica en la realización de informes, dictámenes, estudios, proyectos y publicaciones sobre aspectos concretos que sean de interés sanitario. Ambas instituciones se podrán prestar asesoramiento, información, ayuda y apoyo mutuo en todos aquellos asuntos sean de interés común.

En la firma del acuerdo estuvieron también presentes el secretario general de la Real Academia Nacional de Farmacia, Bartolomé Ribas, el secretario de la Fundación de la Real Academia Nacional de Farmacia, Honorio Bando, y la directora de las revistas AULA DE LA FARMACIA y EL MÉDICO, Leonor Rodríguez.

Bartolomé Ribas Ozonas
Académico Secretario RANF