

Libro de actas del *Workshop* Internacional
**Metabolic Reprogramming as a Target
for Cancer and Other Diseases**

Coordinadores:

Beatriz Martínez Poveda

Juan Antonio Guadix

Miguel Ángel Medina Torres

umaeditorial 

Este libro sobre el *Workshop* Internacional “Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases” se ha publicado con el apoyo económico de los fondos para difusión y divulgación del Proyecto del Plan Estatal BIO2014-56092-R (MINECO y FEDER).

Libro de actas
del *Workshop* Internacional
Metabolic Reprogramming
as a Target for Cancer
and Other Diseases

Coordinadores:

Beatriz Martínez Poveda

Juan Antonio Guadix

Miguel Ángel Medina Torres

Libro de actas del Workshop Internacional
«Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases»



La versión electrónica de este libro, financiado por el Proyecto del Plan Estatal de Investigación BIO2014-56092-R, estará libremente disponible en el Repositorio Institucional RIUMA bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons (CC BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

© UMA editorial. Universidad de Málaga
Bulevar Louis Pasteur, 30 (Campus de Teatinos). 29071 Málaga
www.uma.es/servicio-publicaciones-y-divulgacion-cientifica

ISBN (edición en papel): 978-84-17449-55-1
ISBN (edición en PDF): 978-84-17449-56-8
Depósito Legal: MA-1550-2018

Diseño y maquetación: Ángel Olmos
Impresión: Podiprint
Impreso en España - Printed in Spain

Esta obra también está disponible en formato electrónico.



Esta editorial es miembro de la UNE,
lo que garantiza la difusión y comercialización
de sus publicaciones a nivel nacional.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

AGRADECIMIENTOS

Este libro sobre el *Workshop* Internacional *Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases* se ha publicado con el apoyo económico de los fondos para difusión y divulgación del Proyecto del Plan Estatal BIO2014-56092-R (MINECO y FEDER).

El *Workshop* Internacional *Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases* (Málaga, 15 y 16 de marzo de 2018) fue organizado por el Prof. Miguel Ángel Medina Torres, investigador principal del Proyecto del Plan Estatal BIO2014-56092-R, con la colaboración de Carmen González en su secretaría técnica. El evento científico fue posible gracias a los fondos aportados por el Proyecto del Plan Estatal BIO2014-56092-R (MINECO y FEDER) y una Ayuda para la Organización de Congresos del Plan Propio de Investigación y Transferencia de la Universidad de Málaga. Los fondos para conferencias del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga y del Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA) sufragaron las dos conferencias invitadas especiales [*Keynote Lectures*]. En la difusión del evento también colaboró el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

El trabajo científico desarrollado por nuestro grupo está apoyado por los fondos prevenientes del Proyecto del Plan Estatal BIO2014-56092-R (MINECO y FEDER), el Proyecto de Excelencia P12-CTS-1507 (Junta de Andalucía y FEDER) y fondos del grupo de investigación BIO 267 (Junta de Andalucía). El CIBER de Enfermedades Raras es una iniciativa del ISCIII.

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Coordinadores generales de la obra:

- Beatriz Martínez Poveda
- Juan Antonio Guadix Domínguez
- Miguel Ángel Medina

Colaboración en la organización del Programa y los resúmenes de comunicaciones:

- Carmen González *[Proyecta Científica]*
- José Joaquín Serrano Morales

Fotógrafos del *Workshop*:

- José Joaquín Serrano Morales
- Ana Dácil Marrero Capitán

Autor del capítulo de introducción:

- Miguel Ángel Medina

Autores de las conferencias invitadas [cuyos resúmenes aparecen en la segunda parte de este Libro de Actas]:

- Alberto Muñoz *[Instituto de Investigaciones Biológicas, CSIC/UAM, Madrid]*
- Arkaitz Carracedo *[IKERBASQUE, ERC investigator, University of the Basque Country, Spain]*
- Michael Potente *[Max Planck Research Group Leader, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany]*

Autores de las comunicaciones orales [cuyos resúmenes aparecen en la segunda parte de este Libro de Actas]:

- Ana Rodríguez Quesada *[Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, Spain]*

- **Andrej Bohac** (*Department of Organic Chemistry, Comenius University in Bratislava, Slovakia*)
- **Antonia Gutiérrez** (*Department of Cell Biology, Faculty of Science, University of Malaga. IBIMA. CIBERNED, Spain*)
- **Armando Reyes-Palomares** (*European Molecular Biology Laboratory, SCB unit, Heidelberg, Germany*)
- **Aurelio Moya García** (*Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, Spain*)
- **Beatriz Martínez Poveda** (*Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, Spain*)
- **Daniel Rodríguez Agudo** (*Department of Internal Medicine/Gastroenterology, Virginia Commonwealth University, USA*)
- **Daniele Passarella** (*Department of Chemistry, Università degli Studi di Milano, Italy*)
- **Francisca Sánchez Jiménez** (*Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, Spain*)
- **Gunna Pejler** (*Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Sweden*)
- **Ismael Navas Delgado** (*Languages and Computer Systems, Department of Languages and Computer Science, University of Malaga, Spain*)
- **José Manuel Matés Sánchez** (*Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, Spain*)
- **José María Pérez Pomares** (*Department of Animal Biology. Faculty of Science, University of Málaga, Spain*)
- **Juan Antonio García Ranea** (*Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, Spain*)
- **Juan Antonio Guadix Domínguez** (*Department of Animal Biology. Faculty of Science, University of Málaga, Spain*)
- **Manuel Gonzalo Claros Díaz** (*Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, Spain*)
- **Manuel Macías González** (*UGC Endocrinology and Nutrition of University Hospital Virgen de la Victoria. IMABIS. Málaga, Spain*)
- **María Calderón Domínguez** (*Facultad de Farmacia, Universidad CEU San Pablo, Madrid, Spain*)
- **María Victoria Ruiz Pérez** (*Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*)
- **Melissa García Caballero** (*Laboratory of Angiogenesis and Vascular Metabolism VIB-KU Leuven Center for Cancer Biology (CCB), Department of Oncology, KU Leuven, Belgium*)
- **Miguel Ángel Medina** (*Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, Spain*)
- **Nor Eddine Sounni** (*LBTD, GIGA-Cancer, ULiege, Belgium*)
- **Pedro Valdivielso Felices** (*UGC Medicine Internal, Virgen de la Victoria Hospital. IBIMA University of Malaga. Spain*)
- **Ramón Muñoz-Chápuli** (*Department of Animal Biology. Faculty of Science, University of Málaga, Spain*)

Coordinadores de las comunicaciones en formato panel y de la tercera parte de este libro de actas [capítulos de predoctorales derivados de sus comunicaciones en formato panel]:

- Beatriz Martínez Poveda
- Juan Antonio Guadix Domínguez

Autores de los capítulos de predoctorales incluidos en la tercera parte de este Libro de Actas:

- Antonio Benítez-Hidalgo, Antonio J. Nebro, Ismael Navas Delgado
- Cristina Núñez-Díaz, Javier Vitorica, Antonia Gutiérrez
- Cristina Pogontke, Juan Antonio Guadix, José María Pérez-Pomares
- Elena Rojano, Pedro Seonae, James R. Perkins, J. A. G. Ranea
- Juan Antonio García-León, Francisco Ruiz-Contreras, Javier Vitorica, Antonia Gutiérrez
- Juan José Fernández-Valenzuela, Raquel Sánchez-Varo, Antonia Gutiérrez
- M^a Carmen Ocaña, Miguel Ángel Medina
- Macarena Arroyo-Varela, Carmen María López-Rodríguez, Rocío Bautista, Rafael Larrosa-Jiménez, Manuel Cobo-Dols, M. Gonzalo Claros
- Marina García Frutos, David Carro Vázquez, Mercedes Martín-Rufián, Ana Peñalver, María C. Gómez-García, Laura Castilla, Javier Márquez
- Marina Mejías-Ortega, Elisabeth Sánchez-Mejías, Antonia Gutiérrez
- Paloma Carrillo, Beatriz Martínez-Poveda, Miguel Ángel Medina, Ana R. Quesada
- Paul Palmquist Gomez, Juan Antonio Guadix, José María Pérez-Pomares
- Sara Cano-Ballesteros, Juan Antonio Guadix, José M. Pérez-Pomares

Coordinadora de la “Crónica del *Workshop*” [cuarta parte de este Libro de Actas]:

- Belén Delgado Martín

Colaboradores de la “Crónica del *Workshop*” [cuarta parte de este Libro de Actas]:

Alumnos y ex-alumnos de la asignatura Biología Molecular del Cáncer del Grado en Bioquímica de las Universidades de Málaga y Sevilla: **Amber Hendrickx, Ana Dácil Marrero Capitán, Ángel Martínez Aragonés, Carmen Cáceres Moreno, David Hidalgo Gil, Inés López del Castillo, Irene V. Blanca Reyes, Javier Jurado Aguilar, Laura Sánchez Flores, Manuel Aguilar Galisteo, María Isabel Cabrera González, María Lara Jiménez, Marta Cazorla Calvente, Patricia Romero Cazorla.**

PRIMERA PARTE:

Introducción y programa del *Workshop*

Reprogramación metabólica: Introducción al *International Workshop “Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases”*

Miguel Ángel Medina Torres^{a, b, c}

^a Universidad de Málaga, Andalucía Tech, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, E-29071 Málaga, Spain

^b IBIMA (Biomedical Research Institute of Málaga), E-29071 Málaga, Spain

^c CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), E-29071 Málaga, Spain

Correspondencia: Miguel Ángel Medina Torres, medina@uma.es

Resumen

La primera ponencia del *Workshop* introdujo el tema del mismo, la reprogramación metabólica, e hizo una breve presentación del grupo de trabajo organizador y de los contenidos del propio *Workshop*. El presente trabajo recoge los contenidos de dicha ponencia, organizados en tres apartados. En el primero, se hace un recorrido histórico al concepto de reprogramación metabólica y se enfatiza su “universalidad”. En el segundo apartado, se presenta brevemente al grupo de trabajo BIO-267 y sus líneas de investigación. Finalmente, en el tercer apartado se hace una sucinta presentación de los contenidos del *Workshop* y de los ponentes.

1. Reprogramación metabólica: una perspectiva histórica

1.1. El concepto de metabolismo

Clásicamente, el metabolismo se ha entendido en los términos en los que todavía hoy en día lo define Hans Kornberg en la correspondiente entrada de la *Encyclopaedia Britannica* (versión electrónica)¹: “the sum of the **chemical** reactions that take place **within** each cell of a living organism and that provide energy for vital processes and for synthesizing new organic material”.* Llamo la atención con las negritas (que son más) que esta definición se restringe a reacciones químicas que tienen lugar en el interior de las células. Explícitamente, esta definición excluye a procesos físicos tan fundamentales como la absorción de luz en la fotosíntesis y a todos los procesos (metabólicos, sí) que suceden a través de la membrana plasmática,

*“La suma de las reacciones químicas que tienen lugar dentro de cada célula de un organismo vivo y que proporcionan energía para procesos vitales y para la síntesis de nueva materia orgánica”.

en la superficie celular o en los espacios extracelulares. Por otra parte, resulta chocante que el autor discrimine a los procesos biosintéticos como si ellos no fueran también "procesos vitales". En la actualidad, la versión española de *Wikipedia* define el metabolismo como:² "el conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en una célula y en el organismo". Esta definición parece más precisa que la aportada por la versión inglesa de *Wikipedia* que todavía restringe su definición a transformaciones exclusivamente químicas y que suceden dentro de las células:³ "Metabolism (from Greek: μεταβολή *metabolē*, "change") is the set of life-sustaining chemical transformations within the cells of organisms".** Mi experiencia de decenios de docencia del metabolismo me permitió introducir una definición más completa e integradora del metabolismo desde finales de los años ochenta, mucho antes de que dicho enfoque se abriera paso primero en algunos libros de texto de bioquímica y luego en la más grande de las enciclopedias genéricas, *Wikipedia*. La definición que propugno para el concepto "metabolismo" parte de la consideración *termodinámica* de la vida, según la cual un ser vivo es un sistema termodinámico alejado del equilibrio y en continuo intercambio de materia, energía e información con su entorno. Pues bien, el metabolismo es precisamente el complejo conjunto de procesos fisicoquímicos que garantizan ese adecuado intercambio de materia, energía e información con el entorno.

1.2. La red metabólica

En la actualidad se contempla el metabolismo como una compleja red, tal como ilustra el icónico *mapa metabólico* originalmente editado por Gerhard Michal (Figura 1) y actualmente mantenido en formato electrónico y navegable por la compañía Roche.⁴

La moderna *teoría de redes* ha permitido confirmar que la red metabólica es más robusta y resistente a los "ataques dirigidos" que las denominadas redes "libres de escala" y que ello es así gracias a la especial estructura topológica de la red metabólica, que es al mismo tiempo *jerárquica* y *modular*.⁵ Sin embargo, cualquiera de las múltiples versiones del mapa metabólico disponible en Internet representa una "foto fija", muy alejada de una peculiaridad esencial de la red metabólica: su carácter *dinámico*, esencial para entender la "plasticidad" del metabolismo para adaptarse casi de forma continua a los cambios en las condiciones externas e internas.

**Metabolismo (del griego μεταβολή, *metabolē*, "cambio") es el conjunto de transformaciones químicas dentro de las células de los organismos que mantienen la vida.

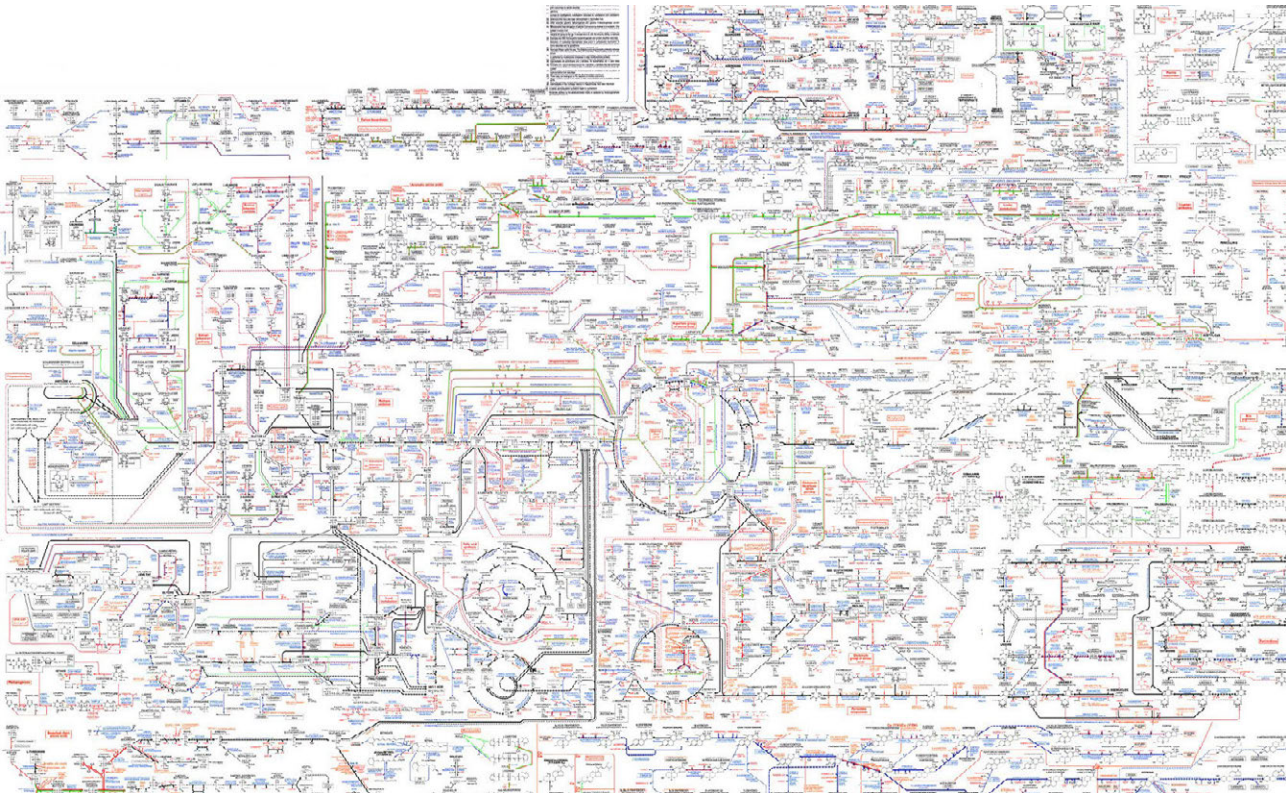


Figura 1: Mapa metabólico editado por Gerhard Michal y actualmente mantenido en formato electrónico por Roche en el espacio web biochemical-pathways.com.

1.3. Las subidas y las bajadas en el interés por el estudio científico del metabolismo

Los años veinte del pasado siglo marcan la primera “edad dorada” de los estudios sobre metabolismo, definiendo y caracterizando sus principales vías centrales gracias al trabajo de una excepcional generación de bioquímicos expertos en metabolismo que incluye a Embden, Meyerhof, Warburg, Krebs, Szent-Györgyi y Lipmann, entre muchos otros. Le siguió en los años cincuenta y sesenta una segunda “edad dorada” con los estudios sobre bioenergética de científicos tan relevantes como los premio Nobel Calvin y Mitchell, pero también Lehninger, Kennedy o Crane, entre otros.

Pero, con el advenimiento de la revolución científico-tecnológica del DNA recombinado a partir de mediados de los setenta se inició una etapa con un potente enfoque “genocéntrico” de la Biología, que ha predominado hasta finales del siglo XX. Este casi cuarto de siglo supuso un periodo oscuro para los estudios metabólicos,

entonces "desprestigiados" por "anticuados" al encontrarse fuera de las corrientes principales dictadas por la moda. Todo cambió, y el metabolismo volvió a estar en el candelero (y así hasta la actualidad) con el "redescubrimiento" del efecto Warburg por una nueva generación de científicos interesados por el metabolismo, empleando para ello las herramientas y técnicas más actuales de la bioquímica y la biología molecular, incluyendo los procedimientos "ómicos".



Figura 2: Otto Warburg (1883–1970), premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1931 (según el Comité Nobel, se le concedió el premio "por sus descubrimientos de la naturaleza y modo de acción de la enzima respiratoria").

1.4. La reprogramación metabólica en el cáncer

Hace más de 90 años, Otto Warburg (Figura 2) observó que un carcinoma de rata producía grandes cantidades de lactato incluso en presencia de oxígeno.⁶ La identificación de esta *glucolisis aerobia* (a la que posteriormente se conocería como *efecto Warburg*)⁷ como una característica común a múltiples tipos de células tumorales no fue sino el comienzo de nuestro conocimiento actual de las peculiaridades del metabolismo tumoral.

En plena "edad oscura" de los estudios metabólicos, se presentaron evidencias de que la glutamina puede suplir a la glucosa como principal fuente de energía en cierto tipos de células tumorales, como es el caso de las células HeLa.⁸ Posteriormente, se demostró que una elevada *glutaminolisis* es también un comportamiento metabólico característico de muchas células tumorales.^{9,10} Es más, las interrelaciones entre el metabolismo de la glucosa y el de la glutamina en el cáncer han sido estudiadas de forma extensiva, llegándose a la conclusión de que el uso preferencial de glucosa o glutamina como sustrato metabólico depende del contexto específico de la célula tumoral.¹⁰⁻¹⁴

Como queda dicho más arriba, el "redescubrimiento" del *efecto Warburg* a las puertas del nuevo milenio ha resultado un factor determinante para el renovado interés en el metabolismo tumoral que se mantiene hoy en día.¹⁵⁻¹⁷ Para aquellos que estudiábamos el metabolismo tumoral en los años ochenta y primeros noventa contra viento y marea en plena eclosión del enfoque genocéntrico de la Biología no

resultó ninguna sorpresa que al “redescubrimiento” del efecto Warburg le siguiera el “redescubrimiento” de la relevancia del metabolismo de la glutamina en el metabolismo tumoral.¹⁸⁻²⁰ En la actualidad está plenamente aceptado que en el cáncer se produce una *reprogramación* general de su metabolismo y que dicha reprogramación metabólica es, de hecho, una de las “señales distintivas” del cáncer.²¹ En efecto, en la actualidad sabemos que el cáncer no sólo tiene alterados el metabolismo de la glucosa y el de la glutamina, sino también el metabolismo de otros aminoácidos, de los ácidos grasos, del colesterol y de las poliaminas.^{20,22-29}

Pero el cáncer no crece en el vacío sino en el contexto de específicos tejidos y órganos del hospedador. Por ello, se hace necesario reanalizar no sólo el metabolismo de las células tumorales sino las complejas interrelaciones metabólicas entre los diferentes tipos celulares dentro del microentorno tumoral y entre el tumor y el organismo hospedador.^{30,31} Nuestro grupo fue el primero en demostrar hace 30 años que un cambio en el metabolismo de la glutamina del organismo hospedador se produce desde momentos muy tempranos del desarrollo de un tumor³² y que se establece un intercambio de aminoácidos entre el huésped y el tumor para contribuir al propio crecimiento del tumor.^{33,34} En estos últimos años se ha retomado un vivo interés por explorar las interrelaciones metabólicas en el microentorno tumoral.^{35,36} En el contexto del proyecto BIO2014-56092-R del Plan Estatal de Investigación, nuestro grupo ha contribuido con una actualizada y completa revisión sobre el metabolismo en el microentorno tumoral.³⁷

1.5. La reprogramación metabólica como una propiedad característica del carácter dinámico del metabolismo

Autores tan relevantes como Craig B. Thompson, Mathew Vander Heiden, Ralph DeBerardinis, Karen Vousden, Eyal Gottlieb y Almut Schulze encabezan la legión de autores que en los últimos veinte años vienen paulatinamente “redescubriendo” la importancia de la reprogramación del metabolismo de glúcidos, lípidos y metabolitos nitrogenados en el cáncer, encontrando sus trabajos acogida en las más importantes e “impactantes” revistas científicas.³⁸⁻⁴³ Sin negar el mérito de la buena ciencia que todos ellos están realizando, insisto en emplear el término “redescubrimiento” porque buena parte de esos “hallazgos” ya habían sido estudiados (si bien con procedimientos técnicos menos sofisticados que los actuales) décadas antes, como ejemplarmente ilustra el poco conocido y citado (y, sin embargo, imprescindible) libro “*Biochemical Aspects of Tumour Growth*” (1980), de V.S. Shapov.³⁰ A ellos se une el poderoso grupo del profesor Peter Carmeliet, quien en la última década viene reproduciendo miméticamente los pasos de la reprogramación metabólica tumoral en las células endoteliales durante la angiogénesis. Y así, en pocos años, ha pasado de remarcar que el metabolismo glucolítico es el esencial para las células endoteliales⁴⁴ a “descubrir” la importancia de la oxidación de los ácidos grasos y, más recientemente, del metabolismo de aminoácidos como la glutamina, la asparragina o la serina en la angiogénesis.⁴⁵⁻⁴⁷ Todo ello ha contribuido al establecimiento del concepto de la reprogramación global del metabolismo en el microentorno tumoral.^{37,48}

Sin embargo, todos estos cambios y adaptaciones metabólicas que se “venden” como “excepcionales” y como señal identitaria del propio cáncer no son en el fondo sino el reflejo del carácter complejo y dinámico de la red metabólica, capaz de adaptarse a los cambios y a las demandas metabólicas y bioenergéticas de cada situación.⁴⁹ Según este enfoque, la reprogramación metabólica del cáncer simplemente representaría un ejemplo (ciertamente notable) de la *flexibilidad* y *adaptabilidad* del metabolismo. Hay que remontarse a hace más de 40 años para identificar uno de los primeros trabajos científicos publicados ilustrando este concepto, cuando el grupo entonces dirigido por el profesor Federico Mayor Zaragoza demostró que el organismo anaerobio facultativo *Saccharomyces cerevisiae* (la levadura de panadería) adaptaba su metabolismo en la transición de normoxia a hipoxia con una drástica reducción de la actividad 2-oxoglutarato deshidrogenasa, conduciendo en la práctica a la “ruptura” del ciclo de Krebs y su transformación en las dos ramas de una ruta biosintética (de glutamato y compuesto de 4 carbonos) que opera también en organismos anaeróbicos estrictos (ver Figura 3).⁵⁰ De hecho, no sólo la hipoxia sino también los ritmos circadianos, el ejercicio, la hibernación y prácticamente cualquier otro factor medioambiental o interno que suponga un cambio en las demandas energéticas y biosintéticas de un organismo son capaces de modular la expresión génica y las características metabólicas de las células.⁵¹⁻⁵⁴ Incluso en un mismo organismo sus distintas partes y órganos responden autónoma pero concertadamente a los cambios en las demandas bioenergéticas y biosintéticas, como excelentemente ilustra la espectacular variedad de modos de flujos metabólicos en los que pueden estar implicadas las enzimas del ciclo de Krebs en distintos tejidos de las plantas bajo distintas condiciones de iluminación, estrés nutricional, etc.⁵⁵

Energy metabolism reprogramming in yeasts

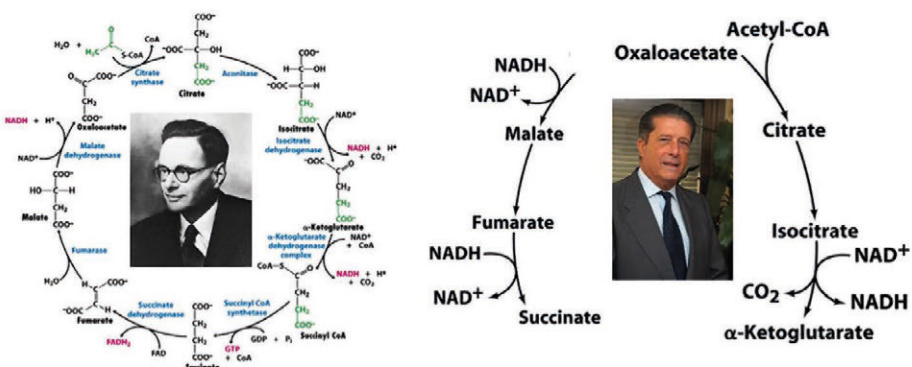


Figura 3: El ciclo de Krebs, tal como los describen los libros de Bioquímica (figura a la izquierda) es una ruta metabólica cíclica que constituye el denominado núcleo central del metabolismo oxidativo. En condiciones de hipoxia o anoxia dicho ciclo no es operativo y se “rompe”, reconfigurándose en una ruta biosintética ramificada (presente también en organismos anaerobios estrictos) para la biosíntesis de compuestos de 4 y 5 átomos de carbono, como inicialmente demostró el grupo de Federico Mayor Zaragoza⁵⁰ (figura a la derecha).

2. El grupo PAIDI BIO 267

2.1. Líneas de investigación autónomas integrantes de BIO 267

El investigador principal del proyecto BIO2014-56092-R y organizador del Workshop Internacional “Metabolic Reprogramming as a Target for Cancer and Other Diseases” es en la actualidad, además, Director del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga e investigador principal o responsable del grupo BIO 267 del PAIDI (Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación), del grupo B04.UMA de IBIMA (Instituto de Biomedicina de Málaga) y del grupo CB06/07/0046 (Unidad 741) de CIBERER (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras). El grupo más incluyente de los tres mencionados es el grupo PAIDI BIO 267, algunos de cuyos integrantes actuales o pasados se muestran en la Figura 4.



Figura 4: Componentes (actuales o previos) de los cuatro grupos de investigación autónomos de los que realmente consta el grupo PAIDI BIO 267. El Catedrático M. Gonzalo Claros es, además, responsable de la Plataforma Andaluza de Bioinformática (P.A.B.), sita en el Parque Tecnológico de Málaga.

Como muestra la Figura 5, el grupo está formado por cuatro líneas de investigación independientes pero interconectadas que confluyen en una quinta línea de investigación transversal en enfermedades raras. La Línea 1 es la coliderada por la Catedrática Ana Rodríguez Quesada y el organizador del Workshop y sobre ella se habla más extensamente en el próximo subapartado de este capítulo.

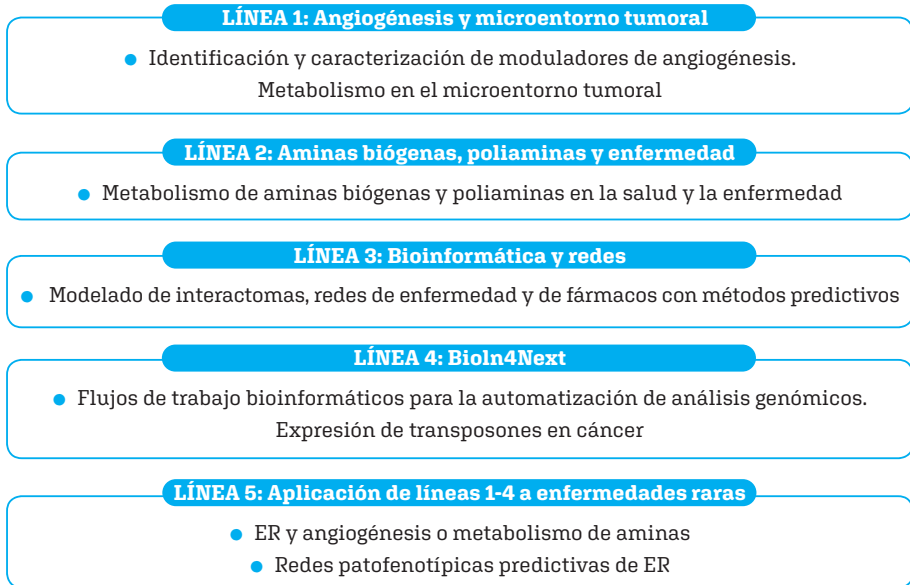


Figura 5: Las cuatro líneas de investigación autónomas incluidas en el grupo PAIDI BIO 267 y la línea quinta –transversal– de aplicación de las líneas 1-4 a enfermedades raras dentro del contexto del grupo CBO6/07/0046 (Unidad 471) de CIBERER.

La Línea 2, centrada en el estudio del metabolismo de las poliaminas y aminas biógenas y sus relaciones con las enfermedades fue liderada desde sus inicios por la Catedrática Francisca Sánchez Jiménez hasta su jubilación voluntaria en 2017. En sus más de 25 años de trabajo callado y continuo ha configurado una sólida y productiva estrategia investigadora con continuas incorporaciones de nuevos enfoques metodológicos, partiendo de los estudios enzimológicos y metabólicos tradicionales y pasando por la incorporación de procedimientos de la biología molecular, de la biofísica y la espectroscopía, de las ómicas y la biología de sistemas, del *docking* y el modelado molecular y metabólico para regresar a los enfoques metabólicos.⁵⁶⁻⁹⁶

La Línea 3, liderada por el Profesor Titular de Universidad Juan Antonio García Ranea, emplea métodos bioinformáticos para construcción y análisis de modelos predictivos de redes de enfermedades y el estudio de las interacciones fenotipo-genotipo en enfermedades raras.⁹⁷⁻¹⁰⁶

La Línea 4, liderada por el catedrático Manuel Gonzalo Claros se centra en el diseño y aplicación de flujos de trabajo bioinformáticos para la automatización de análisis genómicos masivos.¹⁰⁷⁻¹¹¹ En los últimos tiempos está desarrollando un estudio de expresión de transposones en cáncer.

Finalmente, en el marco del grupo CBO6/07/0046 (Unidad 471) de CIBERER, la Línea 5 es una línea de investigación transversal que se alimenta de la experiencia y procedimientos implementados en las Líneas 1-4 para su aplicación al estudio de enfermedades raras con enfoques de biología de sistemas.¹¹²⁻¹²⁶

2.2. Nuestro trabajo en angiogénesis y microentorno tumoral

La Línea de investigación 1 se configuró a partir de la confluencia de dos experiencias investigadoras previas. Por una parte, Miguel Ángel Medina incorporó las técnicas de cultivo y los procedimientos experimentales zimográficos aprendidos durante su estancia postdoctoral (1992) en la Universidad de Heidelberg (Alemania) como becario de la Fundación Alexander von Humboldt, fijando así los cimientos de una nueva línea de investigación sobre angiogénesis en los años inmediatamente posteriores.¹²⁷⁻¹³⁰ Por otra parte, Ana Rodríguez Quesada aportó su experiencia en *screening* de fármacos, adquirida durante su etapa como investigadora de la empresa biotecnológica Antibióticos Farma.¹³¹⁻¹³⁶ Con la ayuda del grupo del Catedrático de Zoología Ramón Muñoz Chápuli en los ensayos *in vivo*, a partir de 1998 de montamos una línea de investigación centrada en la búsqueda, selección y caracterización de compuestos moduladores de angiogénesis utilizando para ello un conjunto cada vez más extenso de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, a los que se han unido aproximaciones biocomputacionales, ómicas y de biología de sistemas.¹³⁷⁻¹⁹⁸ Sólo resaltaremos aquí algunos de los más destacados hitos de esta línea de investigación:

- La caracterización como anti-angiogénico de la aeroplisinina-1, un compuesto bioactivo extraído de unas esponjas.¹³⁷
- La identificación y caracterización como antiangiogénicos de dos compuestos presentes en la hierba de San Juan.^{148, 149}
- La publicación de la revisión más completa hasta ese momento sobre fármacos antiangiogénicos en la prestigiosa revista *Medicinal Research Reviews*.¹⁵⁰
- La caracterización de los efectos antiangiogénicos del compuesto dimetilfumarato como base molecular de sus efectos antipsoriáticos. El trabajo se publicó en la revista más prestigiosa de investigación en dermatología, el *Journal of Investigative Dermatology* del grupo editorial de *Nature*, donde fue merecedor de un comentario editorial y fue seleccionado para el *Journal Club*.¹⁶⁴
- La publicación de la primera red de angiogénesis.¹⁶⁷
- La publicación de la más exhaustiva revisión sistemática dedicada a enfermedades raras dependientes de o relacionadas con la angiogénesis.¹²⁰
- La caracterización del hidroxitirosol, un compuesto presente en el aceite de oliva virgen extra como inhibidor *in vitro* e *in vivo* de angiogénesis, así como la identificación de varios derivados de hidroxitirosol también antiangiogénicos.^{169, 175, 198}
- La caracterización del toloquinol y del compuesto AD0157 como antiangiogénicos y antilinfangiogénicos.^{176, 177, 187, 192}
- La publicación de una revisión sobre el modelo del pez cebra para la identificación de compuestos antiangiogénicos y antilinfangiogénicos.¹⁹⁵

En los últimos años, se han recuperado los estudios metabólicos dentro de esta línea de investigación y con el proyecto BIO2014-56092-R se está poniendo de nuevo el foco en el metabolismo energético y redox.^{37, 93, 199-203}

3. Presentación del *Workshop*

En el Prefacio de este libro se da cuenta de las circunstancias que posibilitaron y conformaron este *Workshop*, que tuvo lugar en la sede del Rectorado de la Universidad de Málaga los días jueves 15 y viernes 16 de marzo de 2018. Fueron dos jornadas muy densas, con notable participación de público y con un muy elevado nivel de calidad científica.

3.1. Dos conferencias invitadas y una lección magistral

Dos jóvenes científicos de primera línea internacional en los campos de la angiogénesis (Michael Potente, del Max Planck Institut for Heart and Lung Research) y del metabolismo tumoral (Arkaitz Carracedo, de IKERBASQUE) aceptaron la invitación a impartir conferencias plenarias (*keynote lectures*), ambas programadas (por motivos de sus respectivas agendas) en la mañana del viernes 16. Ambos conferenciantes con su presencia prestigiaron el *Workshop* y no se limitaron a "cubrir el expediente", pues ambos ofrecieron sendas conferencias muy bien preparadas y de gran nivel. "*Metabolic regulation of vascular growth and function*" fue el título de la conferencia impartida por Michael Potente y "*Fuel and oil of the cancer engine*" fue el título de la conferencia impartida por Arkaitz Carracedo.

Un tercer científico de relevancia internacional, Alberto Muñoz (del Instituto de Investigaciones Biológicas del CSIC), también contribuyó a prestigiar el *Workshop* impartiendo una auténtica lección magistral sobre "*El proceso de la carcinogénesis*" (única actividad en español, dirigida particularmente a los alumnos de la asignatura *Biología Molecular del Cáncer*, así como al resto de alumnos de los grados en Bioquímica y en Biología inscritos en el *Workshop*). Fue una actividad que levantó muchas expectativas y que fue muy seguida por un público que llenó la Sala de Juntas del Rectorado, a pesar de que al mismo tiempo se estaba celebrando en paralelo la sesión de presentación de pósteres en la Sala de Rectores.

Estas tres actividades fueron posibles gracias al co-patrocinio (junto con los fondos del proyecto BIO2014-56092-R dedicados a sufragar los gastos de viaje y alojamiento) de los fondos para conferenciantes del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica (conferencia de Michael Potente), de IBIMA (Arkaitz Carracedo) y del Programa de Doctorado y Máster de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Málaga (Alberto Muñoz). La Figura 6 muestra a los tres conferenciantes y sus patrocinadores.



Figura 6: Los dos conferenciantes de las “*invited keynote lectures*” y el profesor que impartió la “*lección magistral*” (en español) junto con sus respectivos co-patrocinadores.

3.2. Siete sesiones con 24 presentaciones orales y una mesa redonda final

El grueso de los contenidos científicos del *Workshop* estuvo conformado por las siete sesiones científicas en las que se agruparon 24 presentaciones orales de 20–30 minutos:

- Sesión 1. Temas básicos.
- Sesión 2. Metabolismo lipídico.
- Sesión 3. Temas biomédicos.
- Sesión 4. Temas bioinformáticos y de biología computacional.
- Sesión 5. (Linf)angiogénesis.
- Sesión 6. Química médica.
- Sesión 7. Temas de biología del desarrollo y oncología.

La nómina de ponentes estuvo formada por:

- Cuatro Catedráticos y un Profesor Titular de Bioquímica y Biología Celular pertenecientes al grupo PAIDI BIO 267 (ver Figura 4): Francisca Sánchez Jiménez, Ana Rodríguez Quesada, Gonzalo Claros, Juan Antonio García Ranea y el organizador del *Workshop*, Miguel Ángel Medina Torres.
- Cinco colaboradores internacionales del proyecto BIO2014–56092–R (ver Figura 7): un especialista en química sintética procedente de Eslovaquia (Andrej Bohac), un especialista italiano en química médica (Daniele Passarella), un especialista en metabolismo lipídico procedente de Estados Unidos (Daniel Rodríguez–Agudo), un especialista en mastocitos (el sueco Gunnar Pejler) y un especialista en linfangiogénesis procedente del grupo belga de Agnes Noël (Nor Eddine Sounni).
- Siete compañeros de la Universidad de Málaga y/o IBIMA (ver Figura 8): la Catedrática de Biología Celular Antonia Gutiérrez (especialista en Alzheimer), los Catedráticos de Biología Animal Ramón Muñoz Chápuli y José María Pérez Pomares (especialistas en desarrollo cardiovascular y angiogénesis), el Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular José Manuel Matés (especialista

- en metabolismo tumoral), el Catedrático Pedro Valdivielso y el Dr. Manuel Macías (especialistas en metabolismo lipídico).
- Cuatro jóvenes postdoctorales que realizaron sus trabajos de Tesis Doctoral formando parte del grupo PAIDI 267 y que en el momento de sus presentaciones en el *Workshop* trabajaban en los centros de gran prestigio internacional mencionados en la Figura 9 trabajando en biomedicina de sistemas (Armando Reyes-Palomares), metabolismo lipídico (María Calderón), metabolismo de neuroblastomas (M^a Victoria Ruiz-Pérez) y metabolismo de células endoteliales en (linf)angiogénesis (Melissa García-Caballero).
 - Tres postdoctorales reincorporados a la Universidad de Málaga: Aurelio Moya García (ver Figura 4) y Beatriz Martínez Poveda, integrados al grupo PAIDI BIO 267, y Juan Antonio Guadix, incorporado al grupo de investigación liderado por José María Pérez Pomares. Beatriz y Juan Antonio (ver Figura 10) fueron, además, co-organizadores del *Workshop*, encargándose de la organización y desarrollo de la sesión de pósteres que tuvo lugar la tarde del jueves 15 de marzo de 2018 en la Sala de Rectores.



Figura 7: Los cinco ponentes representantes de 5 de los 6 grupos internacionales colaboradores del proyecto BIO2014-56092-R, bajo cuyos auspicios se organizó este *Workshop*.



Figura 8: Los cuatro postdoctorales formados en el grupo BIO 267 que actualmente trabajan fuera de la Universidad de Málaga y que participaron como ponentes en el *Workshop*.

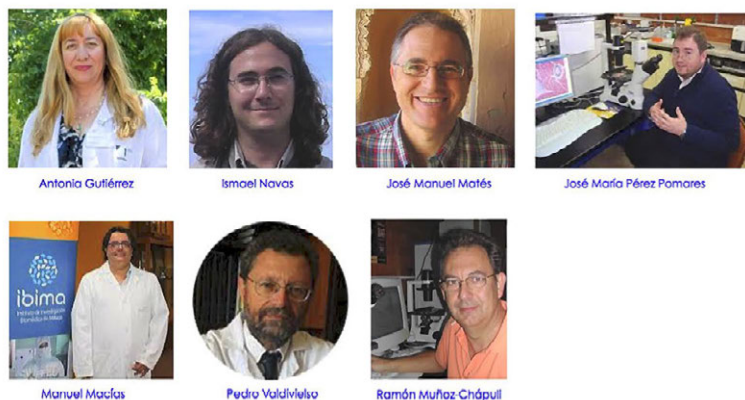


Figura 9: Los otros siete compañeros de la Universidad de Málaga y/o IBIMA y que participaron como ponentes en el Workshop.

La última actividad del Workshop consistió en una mesa redonda en la que el organizador ejerció de moderador y en la que participaron Ana Rodríguez Quesada, Ramón Muñoz Chápuli, Daniel Rodríguez Agudo, Andrej Bohac y Daniele Passarella. Se apuntaron una serie de conclusiones generales poniendo especial énfasis en enviar mensajes positivos a los alumnos inscritos acerca de la carrera investigadora y la pasión por investigar.

3.3. Una sesión de pósteres con 18 contribuciones de predoctorales con dos postdoctorales como coordinadores

Como queda dicho, la sesión de pósteres fue organizada por los postdoctorales Beatriz Martínez Poveda y Juan Antonio Guadix. En ella participaron finalmente 18 predoctorales de la Universidad de Málaga pertenecientes a los grupos de investigación de los ponentes. Los 18 pósteres permanecieron expuestos durante todo el tiempo de duración del Workshop en la Sala de Rectores, compartiendo espacio con los *coffee breaks*, de forma que durante los mismos todos los participantes pudieron revisar los contenidos de los pósteres y departir con sus autores. Los coordinadores seleccionaron 9 de los 18 pósteres para que sus autores los presentará brevemente en 5 minutos durante la sesión pública que tuvo lugar a partir de las 17.45 en la Sala de Rectores. El organizador del Workshop clausuró la sesión dedicando unas palabras a los participantes en las que resaltó el alto nivel científico de los pósteres, motivo por el cual los felicitó efusivamente.

3.4. Agradecimientos a participantes, colaboradores y financiadores

El *Workshop* concluyó con un completo éxito "de crítica y de público". Nada de ello hubiera sido posible sin la contribución de cuantos participaron de una u otra forma en el evento y a los que paso a dar mi agradecimiento:

- A los coorganizadores del evento (ver Figura 10), en sus papeles respectivos de coordinadores de la sesión de pósteres (de nuevo, gracias Beatriz y Juan Antonio) y de secretaria técnica del *Workshop* (gracias por tu excelente trabajo antes, durante y después de la celebración del evento, Carmen).



Beatriz Martínez
Poveda



Juan Antonio Guadix



Carmen González
(Proyecto Científica)

Figura 10: Los organizadores de la sesión de pósteres y la secretaria técnica del *Workshop*.

- A los invitados especiales que se ofrecieron a participar como conferenciantes invitados (Figura 6).
- A nuestros postdoctorales fuera de la Universidad de Málaga que no dudaron en aceptar la invitación a participar como ponentes (Figura 8).
- A todos los compañeros que participaron desinteresadamente como ponentes.
- A todos los predoctorales que contribuyeron con sus pósteres al alto nivel científico del evento.
- A M.^a Carmen Ocaña, José Joaquín Serrano y Ana Dácil Marreno, que participaron desinteresadamente atendiendo a los participantes e inscritos y a los dos últimos por ejercer de fotógrafos "oficiosos" del evento.
- A los estudiantes de la asignatura *Biología Molecular del Cáncer* del curso 2017-18 y a varios otros que lo fueron en el curso 2016-17, que aceptaron participar en el rol de "periodistas científicos", tomando cumplida nota de cuanto acontecía, trabajo que queda plasmado en la parte de este Libro de Actas que muestra su resumen/crónica personal del evento, sección del libro coordinada y editada por Belén Delgado.
- A la Universidad de Málaga por prestarnos tres de las instalaciones del Rectorado (Salón de Actos, Sala de Juntas y Sala de Rectores) para el desarrollo de todas las actividades científicas del Rectorado y al equipo de conserjes del edificio por todas las facilidades prestadas.
- A la Directora del Secretariado de Investigación de la Universidad de Málaga, Dra. Zaida Díaz Cabiale por ejercer de autoridad en representación del Rector en la inauguración oficial del evento en la mañana del jueves 15 de marzo.

- Y, como queda recogido de forma detallada, en la sección de *Agradecimientos* de este Libro de Actas, a las distintas fuentes de financiación que han hecho posible la celebración del *Workshop* y la publicación posterior de su Libro de Actas (ver Figura 11).



Figura 11: Patrocinadores y fuentes de financiación del el Workshop.

Agradecimientos

El trabajo científico desarrollado por nuestro grupo está apoyado por los fondos provenientes del Proyecto del Plan Estatal BIO2014-56092-R (MINECO y FEDER), el Proyecto de Excelencia P12-CTS-1507 (Junta de Andalucía y FEDER) y fondos del grupo de investigación BIO 267 (Junta de Andalucía). El CIBER de Enfermedades Raras es una iniciativa del ISCIII.

Referencias

1. Entrada "Metabolism" en <http://www.britannica.com/science/metabolism> [Última visita, el 17 de agosto de 2018].
2. Entrada "Metabolismo" en es.wikipedia.org/wiki/Metabolismo [Última visita, el 17 de agosto de 2018].
3. Entrada "Metabolism" en en.wikipedia.org/wiki/Metabolism [Última visita, el 17 de agosto de 2018].
4. Biochemical Pathways, biochemical-pathways.com [Última visita, el 17 de agosto de 2018].
5. RAVASZ E, SOMERA AL, MONGRU DA, OLTVAI ZN, BARABÁSI AL. Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*. 2001;297:1551-5.
6. WARBURG O. The metabolism of carcinoma cells. *J Cancer Res*. 1925;9:148-63.
7. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
8. REITZER LJ, WICE BM, KENNEL D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 1979; 254: 2669-76.
9. MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MÁRQUEZ J, QUESADA AR, NÚÑEZ DE CASTRO I. Relevance

- of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem* 1992; 113: 1-15.
10. MEDINA MA. Glutamine and cancer. *J Nutr* 2001; 121: 2539S-42S.
 11. MEDINA MA, NÚÑEZ DE CASTRO I. Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. *Int J Biochem* 1990; 22: 681-3.
 12. MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MÁRQUEZ J, PÉREZ-RODRÍGUEZ J, QUESADA AR, NÚÑEZ DE CASTRO I. Glutamine and glucose as energy substrates for Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem Int* 1988; 16: 339-47.
 13. LUQUE P, PAREDES S, SEGURA JA, et al. Mutual effect of glucose and glutamine on their utilization by tumour cells. *Biochem Int* 1990; 21: 9-15.
 14. SEGURA JA, MEDINA MA, ALONSO FJ, et al. Glycolysis and glutaminolysis in perfused Ehrlich ascites tumour cells. *Cell Biochem Function* 1989; 7: 7-10.
 15. KIM JW, DANG CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 2006; 66: 8927-30.
 16. CHEN Z, LU W, GARCÍA-PRIETO C, HUANG P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39: 267-74.
 17. LIBERTI MV, LOCASALE JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci* 2016; 41: 211-8.
 18. LU W, PELICANO H, HUANG P. Cancer metabolism: is glutamine sweeter than glucose? *Cancer Cell* 2010; 18: 199-200.
 19. DEBERARDINIS RJ, CHENG T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 2010; 29: 313-24.
 20. RUIZ-PÉREZ MV, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, ALONSO FJ, SEGURA JA, MÁRQUEZ J, MEDINA MA. Glutamine, glucose and other fuels for cancer. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 2557-79.
 21. HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74.
 22. MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, et al. Effect of palmitate, acetate and glucose on glutamine metabolism in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimie* 1988; 70: 833-4.
 23. MENÉNDEZ JA, VÁZQUEZ-MARTÍN A, ORTEGA FJ, FERNÁNDEZ-REAL JM. Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes and cancer. *Clin Chem* 2001; 55: 425-38.
 24. CAIRNS RA, HARRIS IS, MAK TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 85-95.
 25. SANTOS CR, SCHULZE A. Lipid metabolism in cancer. *FEBS J* 2012; 179: 2610-23.
 26. AMELIO I, CUTRUZZOLÁ F, ANTONOV A, AGOSTINI M, MELINO G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci* 2014; 39: 191-8.
 27. PÉREZ-RUIZ MV, MEDINA MA, URDIALES JL, KEINÄNEN TA. Polyamine metabolism is sensitive to glycolysis inhibition in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2015; 290: 6106-19.
 28. BELORIBI-DJEFAFLIA S, VASSEUR S, GUILLAUMOND F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 2016; 5: e189.
 29. PAVLOVA NN, THOMPSON CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab* 2016; 23: 27-47.
 30. Shaput VS. *Biochemical Aspects of Tumour Growth*. Moscow: Mir 1980.
 31. OCAÑA MC, MARTÍNEZ-POVED B, QUESADA AR, MEDINA MA. Metabolismo in the tumor microenvironment: what is known about stromal and immune cells? *Clin Immunol Endocrine Metab Drugs* 2017; 4: 33-6.
 32. QUESADA AR, MEDINA MA, MÁRQUEZ J, et al. Contribution by host tissues to circulating glutamine in mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 1988; 48: 1551-3.
 33. MÁRQUEZ J, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA, QUESADA AR, NÚÑEZ DE CASTRO I. Nitrogen metabolism in tumor bearing mice. *Arch Biochem Biophys* 1989; 268: 667-75.
 34. MEDINA MA, MÁRQUEZ J, NÚÑEZ DE CASTRO I. Interchange of amino acids between tumor and host. *Biochem Med Metabol Biol* 1992; 48: 1-7.

35. KAMPHORST JJ, GOTTLIEB E. Friendly neighbours feed tumour cells. *Nature* 2016; 536: 401-2.
36. GHESQUIÈRE B, WONG BW, KUCHNIO A, CARMELIET P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* 2014; 511: 167-76.
37. OCAÑA MC, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. Metabolism within the tumor microenvironment and its implications on cancer progression: an ongoing therapeutic target. *Med Res Rev* 2018; doi: 10.1002/mws.21511.
38. ZHANG J, PAVLOVA NM, THOMPSON CB. Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine. *EMBO J* 2017; 36: 1302-15.
39. MUIR A, DANAI LV, GUI DY, WAINGARTEN CY, LEWIS CA, VANDER HEIDEN MG. Environmental cystine drives glutamine anaplerosis and sensitizes cancer cells to glutaminase inhibition. *eLife* 2017; 6: e27713.
40. FAUBERT B, DEBERARDINIS RJ. Analyzing tumor metabolism in vivo. *Ann Rev Cancer Biol* 2017; 1: 99-117.
41. MADDOCKS ODK, ATHINEOS D, CHEUNG EC, LEE P, ZHANG T, VAN DEN BROEK NJF, MACKAY GM, LABUSCHAGNE CF, GAY D, KRUISWIJK F, BLAGIH J, VINCINET DV, CAMPBELL KJ, CETECI F, SAMSON OJ, BLYTH K, VOUSDEN KH. Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature* 2017; 544: 372-6.
42. KUNTZ EM, BAQUERO P, MICHIE AM, DUNN K, TARDITO S, HOLYOAKE TL, HELGASON GV, GOTTLIEB E. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Med* 2017; 23: 1234-40.
43. SNAEBJORNSSON MT, SCHULZE A. Non-canonical functions of enzymes facilitate crosstalk between cell metabolic and regulatory pathways. *Exp Mol Med* 2018; 50: 34.
44. DE BOCK K, GEORGIADOU M, SCHOORS S, KUCHNIO A, WONG BW, CANTELMO AR, QUAEGEBEUR A, GHESQUIÈRE B, CAUWENBERGHS S, EELEN G, PHNG LK, BETZ I, TEMBUYSER B, BREPOELS K, WELTI J, GUEDENS I, SEGURA I, CRUYS B, BIFARI F, DECIMO I, BLANCO R, WYNS S, VANGINDERTAELE J, ROCHA S, COLLINS RT, MUNCK S, DAELEMANS D, IMAMURA H, DEVILIEGER R, RIDER M, VAN VELDHOVEN PP, SCHUIT F, BARTRONS R, HOFKENS J, FRAISI A, TELANG S, DEBERARDINIS RJ, SCHOONJANS L, VINCKIER S, CHESNEY J, GERHARDT H, DEWERCHIN M, CARMELIET P. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 2013; 154: 651-63.
45. SCHOORS S, BRUNING U, MISSIAEN R, QUEIROZ KCS, BORGERS G, ELIA I, ZECCHIN A, CANTELMO AR, CHRISTEN S, GOVEIA J, HEGGERMONT W, GODDE L, VINCKIER S, VAN VELDHOVEN PP, EELEN G, SCHOONJANS L, GERHARDT H, DEWERCHIN M, BAES M, DE BOCK K, GHESQUIÈRE B, LUNT SY, FENDT SM, CARMELIET P. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature* 2015; 520: 192-7.
46. HUANG H, VANDEKEERE S, KALUCKA J, BIERHANSI L, ZECCHIN A, BRÜNING U, VISNAGRI A, YULDASHEVA N, GOVEIA J, CRUYS B, BREPOELS K, WYNS S, RAYPORT S, GHESQUIÈRE B, VINCKIER S, SCHOONJANS L, CUBON R, DEWERCHIN M, EELEN G, CARMELIET P. Role of glutamine and interlinked asparagine metabolism in vessel formation. *EMBO J* 2017; 36: 2334-52.
47. VANDEKEERE S, DUBOIS C, KALUCKA J, SULLIVAN MR, GARCÍA-CABALLERO M, GOVEIA J, CHEN R, DIEHL FF, BAR-LEV L, SOUFFREAU J, PIRCHER A, KUMAR S, VINCKIER S, HIRABAYASHI Y, FURUYA S, SCHOONJANS L, EELEN G, GHESQUIÈRE B, KESHET E, LI X, VANDER HEIDEN MG, DEWERCHIN M, CARMELIET P. Serine synthesis via PHGDH is essential for heme production in endothelial cells. *Cell Metab* 2018; 28: 1-15.
48. GHESQUIÈRE G, WONG BW, KUCHNIO A, CARMELIET P. Metabolism of stromal and immune cells in health and disease. *Nature* 2014; 511: 167-76.
49. ROMERO IL, MUKHERJEE A, KENNY HA, LITCHFIELD LM, LENGYEL E. Molecular pathways: Trafficking of metabolic resources in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 680-6.
50. MACHADO A, NÚÑEZ DE CASTRO I, MAYOR F. Isocitrate dehydrogenases and oxoglutarate dehydrogenase activities of baker's yeast

- grown in a variety of hypoxic conditions. *Mol Cell Biochem* 1975; 6: 93-100.
51. PANDA S. Circadian physiology of metabolism. *Science* 2016; 354: 317-22.
 52. ULLAH MS, DAVIES AJ, HALESTRAP AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281: 9030-7.
 53. WAKIL SJ, ABU-ELHEIGA LA. Fatty acid metabolism: Target for metabolic syndrome. *J Lipid Res* 2009; 50:S138-43.
 54. RIDER MH. Role of AMP-activated protein kinase in metabolic depression in animals. *J Comp Physiol B* 2016; 186: 1-16.
 55. SWEETLOVE LJ, BEARD KF, NUNES-NESE A, FERNIE AR, RATCLIFFE RG. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci* 2010; 15: 462-70.
 56. MEDINA MA, URDIALES JL, MATÉS JM, NÚÑEZ DE CASTRO I, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Diamines interfere with the transport of L-ornithine in Ehrlich-cell plasma-membrane vesicles. *Biochem J* 1991; 280: 825-7.
 57. MORATA P, JIMÉNEZ-MESA J, NÚÑEZ DE CASTRO I, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Vinca alkaloids enhance the half-life of tumour ornithine decarboxylase. *Cancer Lett* 1994; 81: 209-13.
 58. VIGUERA E, TRELLES O, URDIALES JL, MATÉS JM, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Mammalian L-amino acid decarboxylases producing 1,4-diamines: analogies among differences. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 318-9.
 59. MEDINA MA, GARCÍA DE VEAS R, MORATA P, LOZANO J, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Chlorpheniramine inhibits the synthesis of ornithine decarboxylase and the proliferation of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treatment* 1995; 35: 187-94.
 60. ENGEL N, OLMO MT, COLEMAN CS, MEDINA MA, PEGG AE, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Experimental evidence for structure/activity features in common between mammalian histidine and ornithine decarboxylases. *Biochem J* 1996; 320: 365-8.
 61. MEDINA MA, RAMÍREZ FJ, RUÍZ-CHICA J, CHAVARRÍA T, LÓPEZ-NAVARRETE JT, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. DNA-chlorpheniramine interaction studied by spectroscopic techniques. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1379: 129-33.
 62. OLMO MT, RODRÍGUEZ-AGUDO D, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. The PEST regions containing C-termini of mammalian ornithine decarboxylase and histidine decarboxylase play different roles in protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 269-72.
 63. OLMO MT, URDIALES JL, PEGG AE, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. In vitro study of proteolytic degradation of rat histidine decarboxylase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 1527-31.
 64. RODRÍGUEZ-AGUDO D, OLMO MT, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. Rat histidine decarboxylase is a substrate for m-calpain in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 777-781 (2000)
 65. FAJARDO I, URDIALES JL, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Effects of phorbol ester and dexamethasone treatment on histidine decarboxylase and ornithine decarboxylase in basophilic cells. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1101-6.
 66. FAJARDO I, URDIALES JL, PAZ JC, CHAVARRÍA T, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. Histamine prevents polyamine accumulation in mouse C57.1 mast cell cultures. *Eur J Biochem* 2001; 268: 768-73.
 67. RUIZ-CHICA AJ, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, RAMÍREZ FJ. Fourier Transform Raman study of the structural specificities on the interaction between DNA and biogenic polyamines. *Biophys J* 2001; 80: 443-54.
 68. DEL VALLE AE, PAZ JC, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. Agmatine uptake by cultured hamster kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 307-11.
 69. PAZ JC, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. Characterization of spermine uptake by Ehrlich tumour cells in culture. *Amino Acids* 2001; 21: 271-9.

70. OLMO MT, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA, HAYASHI H. Spectroscopic analysis of recombinant rat histidine decarboxylase. *J Biochem* 2002; 132: 433-9.
71. MEDINA MA, URDIALES JL, RODRÍGUEZ-CASO C, RAMÍREZ FJ, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Critic Rev Biochem Mol Biol* 2003; 38: 23-59.
72. RODRÍGUEZ-CASO C, RODRÍGUEZ-AGUDO D, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1760-1763.
73. RUIZ-CHICA J, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, RAMÍREZ FJ. Raman spectroscopy study of the interaction between biogenic polyamines and an alternating AT oligodeoxyribonucleotide. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1628: 11-21.
74. RODRÍGUEZ-CASO C, RODRÍGUEZ-AGUDO D, MOYA-GARCÍA AA, FAJARDO I, MEDINA MA, SUBRAMANIAM V, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Local changes in the catalytic site of mammalian histidine decarboxylase can affect its global conformation and stability. *Eur J Biochem* 2003; 270: 4376-87.
75. RUIZ-CHICA AJ, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, RAMÍREZ FJ. On the interpretation of Raman spectra of 1-aminooxy-spermine/DNA complexes. *Nucleic Acid Res* 2004; 32: 579-89.
76. FLEMING JV, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MOYA-GARCÍA AA, LANGLOIS MR, WANG T. The carboxyl-terminus of rat L-histidine decarboxylase (HDC) specifically inhibits enzymatic activity and disrupts PLP-dependent interactions with L-histidine substrate analogues. *Biochem J* 2004; 381: 769-78.
77. MOYA-GARCÍA AA, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Mammalian histidine decarboxylase: from structure to function. *BioEssays* 2005; 27: 57-63.
78. MEDINA MA, CORREA-FIZ F, RODRÍGUEZ-CASO C, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. A comprehensive view of polyamine and histamine metabolism to the light of new technologies. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 854-64.
79. TORRENT A, MORENO-DELGADO D, GÓMEZ-RAMÍREZ J, RODRÍGUEZ-AGUDO D, RODRÍGUEZ-CASO C, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, BLANCO I, ORTIZ J. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 195-203.
80. MEDINA V, CRICCO G, NUÑEZ M, MARTIN G, MOHAMAD N, CORREA-FIZ F, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, BERGOC R, RIVERA E. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 1462-71.
81. RODRÍGUEZ-CASO C, MONTAÑEZ R, CASCANTE M, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. Mathematical modeling of polyamine metabolism in mammals. *J Biol Chem* 2006; 281: 21799-812.
82. CHAVES P, CORREA-FIZ F, MELGAREJO E, URDIALES JL, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Development of an expression macroarray for amine metabolism-related genes. *Amino Acids* 2007; 33: 315-22.
83. MONTAÑEZ R, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, ALDANA-MONTES JF, MEDINA MA. Polyamines: metabolism to systems biology and beyond. *Amino Acids* 2007; 33: 283-9.
84. MEDINA V, CROCI M, CRESCENTI E, MOHAMAD N, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MASSARI N, NUNEZ M, CRICCO G, MARTIN G, BERGOC R, RIVERA E. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 28-35.
85. MOYA-GARCÍA A, RUIZ-PERNÍA J, MARTÍ S, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, TUÑÓN I. *J Biol Chem* 2008; 283: 12393-401.
86. MOYA-GARCÍA AA, PINO-ÁNGELES A, GIL-REDONDO R, MORREALE A, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 4-13.
87. GARCÍA-FAROLDI G, RODRÍGUEZ CE, URDIALES JL, PÉREZ-POMARES JM, DÁVILA JC, PEJLER G, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, FAJARDO I. *Plos ONE* 2010; 5: e15071.
88. MOYA-GARCÍA AA, RODRÍGUEZ-AGUDO D, HAYASHI H, MEDINA MA, URDIALES JL, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Analysis of mammalian histidine decarboxylase dimerization interface reveals an electrostatic hotspot important for catalytic site topology and function. *J Chem Theor Comput* 2011; 7:1935-42.
89. REYES-PALOMARES A, MONTAÑEZ R, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. A combined model of hepatic polyamine and sulfur amino acid metabolism to analyze S-adenosyl

- methionine availability. *Amino Acids* 2012; 42: 597-610.
90. RUIZ-PÉREZ MV, PINO-ÁNGELES A, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MOYA-GARCÍA AA. Structural perspective on the direct inhibition mechanism of EGCG on mammalian histidine decarboxylase and DOPA decarboxylase. *J Chem Inf Model* 2012; 52: 113-9.
 91. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, RUIZ-PÉREZ MV, URDIALES JL, MEDINA MA. Pharmacological potential of biogenic amine-polyamine interplay beyond neurotransmission. *Br J Pharmacol* 2013; 170: 4-16.
 92. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, REYES-PALOMARES A, MOYA-GARCÍA A, RANEA JAG, MEDINA MA. Biocomputational resources useful for drug discovery against compartmentalized targets. *Curr Pharm Design* 2014; 20: 293-300.
 93. RUIZ-PÉREZ MV, MEDINA MA, URDIALES JL, KEINÄNEN TA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Polyamine metabolism is sensitive to glycolysis inhibition in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2015; 290: 6106-19.
 94. ACOSTA-ANDRADE C, LAMBERTOS A, URDIALES JL, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, PEÑAFIEL R, FAJARDO I. A novel role for antizyme inhibitor 2 as a regulator of serotonin and histamine biosynthesis and content in mouse mast cells. *Amino Acids* 2016; 48: 2411-21.
 95. SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, PINO-ÁNGELES A, RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, MORALES M, URDIALES JL. Structural and functional analogies and differences between histidine decarboxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase molecular networks: biomedical implications. *Pharmacol Res* 2016; 114: 90-102.
 96. ACOSTA-ANDRADE C, ARTETXE I, LETE MG, MONASTERIO BG, RUIZ-MIRAZO K, GOÑI FM, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Polyamine-RNA-membrane interactions: From the past to the future in biology. *Colloids Surfaces B Interfaces* 2017; 155: 173-81.
 97. RANEA JAG, MORILLA I, LEES JG, REID AJ, YEATS C, CLEGG AB, SÁNCHEZ JIMÉNEZ F, ORENGO C. Finding the 'Dark Matter' in human and yeast protein network prediction and modelling. *Plos Comput Biol* 2010; 6: e1000945.
 98. MORILLA I, LEES JG, REID AJ, ORENGO C, RANEA JA. Assessment of protein domain fusions in human protein interaction networks prediction: application to the human kinetochore model. *Nat Biotechnol* 2010; 27: 755-65.
 99. MOYA-GARCÍA AA, RANEA JA. Insights into polypharmacology from drug-domain associations. *Bioinformatics* 2013; 29: 1934-7.
 100. LEES JG, HÉRICHÉ JK, MORILLA I, FERNÁNDEZ JM, ADLER P, KRALLINGER M, VILO J, VALENCIA A, ELLENBERG J, RANEA JA, ORENGO C. FUN-L: gene prioritization for RNAi screens. *Bioinformatics* 2015; 31: 2052-3.
 101. ROJANO E, RANEA JA, PERKINS JR. Characterization of non-coding genetic variation in histamine receptors using AnNCR-SNP. *Amino Acids* 2016; 48: 2433-42.
 102. BUENO A, MORILLA I, DIEZ D, MOYA-GARCIA AA, LOZANO J, RANEA JA. Exploring the interactions of the RAS family in the human protein network and their potential implications in RAS-directed therapies. *Oncotarget* 2016; 7: 75810-26.
 103. SERRANO-SOLANO B, DÍAZ RAMOS A, HÉRICHÉ JK, RANEA JAG. How can functional annotations be derived from profiles of phenotypic annotations? *BMC Bioinformatics* 2017; 18: 96.
 104. MOYA-GARCÍA A, ADEYELU T, KRUGER FA, DAWSON NL, LEES JG, OVERINGTON JP, ORENGO C, RANEA JAG. *Sci Rep* 2017; 7: 10102.
 105. ROJANO E, SEOANE P, RANEA JAG, PERKINS JR. Regulatory variants: from detection to predicting impact. *Brief Bioinform* 2018; doi: 10.1093/bib/bby039
 106. BUENO A, RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, REYES-PALOMARES A, ROJANO E, CORPAS M, NEVADO J, LAPUNZINA P, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, RANEA JAG. Phenotype-loci associations in networks of patients with rare disorders: application to assist in the diagnosis of novel clinical cases. *Eur J Hum Genet* 2018; doi: 10.1038/s41431-018-0139-x.
 107. FALGUERAS J, LARA AJ, FERNÁNDEZ-POZO N, CANTÓN FR, PÉREZ-TRABADO G, CLAROS MG. SeqTrim: a high-throughput pipeline for

- pre-processing any type of sequence read. *BMC Bioinformatics* 2010; 11: 38.
108. GUERRERO D, BAUTISTA R, VILLALOBOS DP, CANTÓN FR, CLAROS MG. *Algorithms Mol Biol* 2010; 5: 24.
109. CARMONA R, ZAFRA A, SEOANE P, CASTRO AJ, GUERRERO-FERNÁNDEZ D, CASTILLO-CAS- TILLO T, MEDINA-GARCÍA A, CÁNOVAS FM, ALDANA-MONTES JF, NAVAS-DELGADO I, ALCHÉ JDE D, CLAROS MG. ReprOlive: a data- base with linked data for the olive tree (*Olea europaea* L.) reproductive transcriptome. *Front Plant Sci* 2015; 6: 625.
110. CARMONA R, ARROYO M, JIMÉNEZ-QUESADA MJ, SEOANE P, ZAFRA A, LARROSA R, ALCHÉ JD, CLAROS MG. *Biomed Eng Online* 2017; 16: 65.
111. CARMONA R, CLAROS M, DE ALCHÉ J. Bio- informatic Prediction of S-Nitrosylation Sites in Large Protein Datasets. *Methods Mol Biol* 2018; doi: 10.1007/978-1-4939- 7695-9_19.
112. PERNAS-SUEIRAS O, ALFONSO A, VIEYTES M, ORFAO A, ESCRIBANO L, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, BOTANA L. Calcium-pH crosstalks in the human mast cell line HMC-1: intracellular alkalinization activates calcium extrusion through the plasma membrane Ca²⁺-AT- Pase. *J Cell Biochem* 2006; 99: 1397-408.
113. GARCÍA-MONTERO AC, JARA M, TEODOSIO C, SÁNCHEZ ML, NÚÑEZ R, PRADOS A, AL- DANONDO I, SÁNCHEZ L, DOMÍNGUEZ M, BOTANA L, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, SOTLAR K, ESCRIBANO L, ORFAO A. Kit mutation in mast cells and other bone marrow haematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood* 2006; 108: 2366-72.
114. MELGAREJO E, MEDINA MA PAZ JC, SÁN- CHEZ-JIMÉNEZ F, URDIALES JL. Real-time RT-PCR analysis of human histidine decar- boxylase, a new marker for several types of leukemia and cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 193-7.
115. MELGAREJO E, MEDINA MA, SÁN- CHEZ-JIMÉNEZ F, BOTANA LM, DOMÍNGUEZ M, ESCRIBANO L, ORFAO A, URDIALES JL. (-) Epigallocatechin-3-gallate interferes with mast cell adhesiveness, migration and its potential to recruit monocytes. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2690-701.
116. REYES-PALOMARES A, MONTAÑEZ R, RE- AL-CHICHARRO A, CHNIBER O, KERZAZI A, NAVAS-DELGADO I, MEDINA MA, AL- DANA-MONTES JF, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Systems Biology Metabolic Modeling As- sistant (SBMM): an ontology-based tool for the integration of metabolic data in kinetic modeling. *Bioinformatics* 2009; 25: 834-5.
117. MELGAREJO E, MEDINA MA, SÁN- CHEZ-JIMÉNEZ F, URDIALES JL. Epigallocat- echin gallate reduces human monocyte mo- bility and adhesion in vitro. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 1705-12.
118. REALL-CHICHARRO A, RUIZ-MOSTAZO I, NAVAS-DELGADO I, KERZAZI A, CHNIBER O, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA, AL- DANA-MONTES JF. Protopia: a protein-pro- tein interaction tool. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: S17.
119. NAVAS-DELGADO I, REAL-CHICHARRO A, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, AL- DANA-MONTES JF. Social pathway anno- tation: extensions of the systems biology metabolic modelling assistant. *Brief Bioin- formatics* 2010; doi:10.1093/bib/bbq061.
120. RODRÍGUEZ-CASO L, REYES-PALOMARES A, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, MEDINA MA. What is known on angiogenesis-related rare diseases? A systematic review of liter- ature. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 2872-93.
121. REYES-PALOMARES A, RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, RANEA JAG, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. Global analysis of the human patho- phenotypic similarity gene network merg- es disease module components. *Plos ONE* 2013; 8: e56653.
122. RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, REYES-PALOMARES A, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. PhenUMA: a tool for integrating the biomedical rela- tionships among genes and diseases. *BMC Bioinformatics* 2014; 15: 375.
123. GARCÍA-VILAS JA, MEDINA MA, MELO FR, PEJLER G, GARCÍA-FAROLDI G. Damnacanthal inhibits IgE receptor-mediated activation of mast cells. *Mol Immunol* 2015; 65: 86-93.

124. NAVAS-DELGADO I, GARCÍA-GODOY MJ, LÓPEZ-CAMACHO E, RYBINSKI M, REYES-PALOMARES A, MEDINA MA, ALDANA-MONTES JF. Kpath: integration of metabolic pathway linked data. Database 2015; doi: 10.1093/database/bav053.
125. REYES-PALOMARES A, BUENO A, RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, MEDINA MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, RANEA JAG. Systematic identification of phenotypically enriched loci using a patient network of genomic disorders. BMC Genomics 2016; 17: 232.
126. GARCÍA-VILAS JA, MORILLA I, BUENO A, MARTÍNEZ-POVEDA B, MEDINA MA, RANEA JAG. In silico prediction of targets for anti-angiogenesis and their in vitro evaluation confirm the involvement of SOD3 in angiogenesis. Oncotarget 2018; 9: 17349-67.
127. GARCÍA DE VEAS R, SCHWEIGERER L, MEDINA MA. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in paediatric tumour cells. Effects of tumour cell proliferation modulators on gelatinolytic activity. J Cancer Res Clin Oncol 1995; 121: 275-8.
128. GARCÍA DE VEAS R, SCHWEIGERER L, MEDINA MA. Modulation of the proteolytic balance plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor by enhanced N-myc oncogene expression or application of genistein. Eur J Cancer 1998; 34: 1736-40.
129. FAJARDO I, QUESADA AR, NÚÑEZ DE CASTRO I, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. A comparative study or the effects of genistein and 2-methoxyestradiol on the proteolytic balance and tumour cell proliferation. Br J Cancer 1999; 80: 17-24.
130. FAJARDO I, DÍEZ E, RODRÍGUEZ-NIETO S, RODRÍGUEZ-CASO C, QUESADA AR, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MEDINA MA. Effects of genistein and 2-methoxyestradiol on matrix metalloproteinases and their inhibitors secreted by Ehrlich ascites tumor cells. Anticancer Res 2000; 20: 1691-4.
131. QUESADA AR, BARBACID MM, MIRA E, ARACIL M, MÁRQUEZ G. Chemosensitization and drug accumulation assays as complementary methods for the screening of multidrug resistance reversal agents. Cancer Lett 1996; 99: 109-14.
132. QUESADA AR, CAÑEDO A, MORENO MA, FERNÁNDEZ-PUENTES JL. A microtitre plate-based assay for the screening of β -lactams. Lett Appl Microbiol 1996; 22: 303-6.
133. GARRIDO T, RIESE HH, QUEDADA AR, BARBACID MM, ARACIL M. Quantitative assay for cell invasion using the fluorogenic substrate 2' - 7' - bis - (2-carboxyethyl) - 5 - (and-6) - carboxyfluorescein acetoxymethylester. Anal Biochem 1996; 235: 234-6.
134. QUESADA AR, GRÁVALOS LG, FERNÁNDEZ-PUENTES JL. Polyaromatic alkaloids from marine invertebrates as cytotoxic compounds and inhibitors of multidrug resistance caused by pglycoprotein. Br J Cancer 1996; 74: 677-82.
135. QUESADA AR, BARBACID MM, MIRA E, FERNÁNDEZ-RESA P, MÁRQUEZ G, ARACIL M. Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. clin Exp Metast 1997; 15: 26-32.
136. MÉNDEZ-VIDAL C, QUESADA AR. Reversal of p-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro by AV200, a new ardeemin derivative. Cancer Lett 1998; 132: 45-50.
137. RODRÍGUEZ-NIETO S, GONZÁLEZ-IRIARTE M, CARMONA R, MUÑOZ-CHÁPULI R, MEDINA MA, QUESADA AR. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. FASEB J 2001; doi 10.1096/fj.01-0427fj.
138. RODRÍGUEZ-NIETO S, MEDINA MA, QUESADA AR. A re-evaluation of fumagillin selectivity towards endothelial cells. Anticancer Res 2001; 21: 3457-60.
139. RODRIGUEZ-NIETO S, CHAVARRÍA T, MARTÍNEZ-POVEDA B, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, MEDINA MA. Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2002; 293: 497-500.
140. CHAVARRÍA T, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, MEDINA MA. Homocysteine inhibits the proliferation and invasive potential of HT-1080 human fibrosarcoma cells. Biochem Biophys Res Commun 2003; 301: 540-4.

141. CHAVARRÍA T, RODRÍGUEZ-NIETO S, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, MEDINA MA. Homocysteine is a potent inhibitor of human tumor cell gelatinases. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 572-5.
142. MARTÍNEZ-POVEDA B, CHAVARRÍA T, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, MEDINA MA. An in vitro evaluation of the effects of homocysteine thiolactone on key steps of angiogenesis and tumor invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 649-53.
143. GONZÁLEZ-IRIARTE M, CARMONA R, PÉREZ-POMARES JM, MACÍAS D, MEDINA MA, QUESADA AR, MUÑOZ-CHÁPULI R. A modified chorioallantoic membrane assay allows for specific detection of endothelial apoptosis induced by antiangiogenic substances. *Angiogenesis* 2003; 6: 251-4.
144. CASTRO ME, GONZÁLEZ-IRIARTE M, BARRERO AF, FERNÁNDEZ A, MUÑOZ-CHÁPULI R, MEDINA MA, QUESADA AR. A study of puerpeneone and related compounds as inhibitors of angiogenesis. *Int J Cancer* 2004; 110: 31-8.
145. QUESADA AR, MEDINA MA, MUÑOZ-CHÁPULI R. Angiogénesis. Consejo Social de la Universidad de Málaga-Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico de la Universidad de Málaga, 2004
146. CÁRDENAS C, QUESADA AR, MEDINA MA. Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 402-8.
147. MUÑOZ-CHÁPULI R, QUESADA AR, MEDINA MA. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2224-43.
148. MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. *Eur J Pharmacol* 2005; 516: 97-103.
149. MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. Hyperforin, a bio-active compound of St. John's wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int J Cancer* 2005; 117: 775-80.
150. QUESADA AR, MUÑOZ-CHÁPULI R, MEDINA MA. Anti-angiogenic drugs: from bench to clinical trials. *Med Res Reviews* 2006; 26: 483-530.
151. CÁRDENAS C, QUESADA AR, MEDINA MA. Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 3083-9.
152. MARTÍNEZ-POVEDA B, AMORES-SÁNCHEZ MI, QUESADA AR, MEDINA MA. El hipérico: una fuente de compuestos bioactivos con un amplio espectro de acción. *Ann R Acad Nac Farm* 2006; LXXII: 583-98.
153. MEDINA MA, MARTÍNEZ-POVEDA B, AMORES-SÁNCHEZ MI, QUESADA AR. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci* 2006; 79: 105-11.
154. GONZÁLEZ FJ, QUESADA AR, SEVILLA I, BACA JJ, MEDINA MA, AMORES J, DÍAZ JM, RIUSDÍAZ F, MARQUES E, ALBA E. Prognostic value of serum angiogenic activity in colorectal cancer patients. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 120-8.
155. MEDINA MA, MUÑOZ-CHÁPULI R, QUESADA AR. Challenges of antiangiogenic cancer therapy: trials and errors, and renewed hope. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 374-82.
156. MARTÍNEZ-POVEDA B, MUÑOZ-CHÁPULI R, RODRÍGUEZ-NIETO S, QUINTELA JM, FERNÁNDEZ A, MEDINA MA, QUESADA AR. IB05204, a dichloropyridodithienotriazine, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2675-85.
157. QUESADA AR, MEDINA MA, ALBA E. Playing only one instrument may be not enough: limitations and future of the antiangiogenic treatment of cancer. *BioEssays* 2007; 29: 1159-68.
158. MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. The antiangiogenic 8-epipuerpeneone behaves as a potential antileukemic compound against HL-60 cells. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 701-6.
159. MARTÍNEZ-POVEDA B, MUÑOZ-CHÁPULI R, RIGUERA R, MEDINA MA, QUESADA AR. DTD, an antiinflammatory ditraizine, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1211-9.
160. ALBA E, QUESADA AR (eds). *Angiogénesis y Cáncer*. TACTIS MD, Barcelona, 2009.

161. MARTÍNEZ-POVEDA B, VEROTTA L, BOMBARDELLI E, QUESADA AR, MEDINA MA. Tetrahydroperforin and octahydroperforin are two new potent inhibitors of angiogenesis. *Plos ONE* 2010; 5(3): e9558.
162. QUESADA AR, MEDINA MA, MUÑOZ-CHÁPULI R, PONCE ALG. Do not say ever never more: the ins and outs of antiangiogenic therapies. *Current Pharmaceutical Design* 2010; 16: 3932-57.
163. QUESADA AR, MEDINA MA. Angiogenesis in Cancer: therapeutic targets and angiogenesis inhibitors. In *Angiogenesis & Therapeutic Targets in Cancer*, vol 1 (Chatterjee M, Rana A, Rana B, eds), pp. 45-67. Bentham Sci Pub, 2010
164. GARCÍA-CABALLERO M, MARÍ-BECCA M, MEDINA MA QUESADA AR. Dimethylfumarate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. A possible role for its antipsoriatic effect? *J Invest Dermatol* 2011; 131: 1347-55.
165. RUIZ-PÉREZ MV, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, MEDINA MA. A re-evaluation of the mitogenic effect of serotonin on vascular endothelial cells. *J Biol Reg Homeostatic Agents* 2011; 25: 13-20.
166. CÁRDENAS C, QUESADA AR, MEDINA MA. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *Plos One* 2011; 6: e23407.
167. MONTAÑEZ R, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, MEDINA MA. Exploring and challenging the network of angiogenesis. *Sci Rep* 2011; 1: 61.
168. GAZÁK R, VALENTOVÁ K, FUKSOVÁ K, MARHOL P, KUZMA M, MEDINA MA, OBORNÁ I, ULRICHOVÁ J, KREN V. Synthesis and antiangiogenic activity of new silybin galloyl esters. *J Med Chem* 2011; 54: 7397-407.
169. FORTES C, GARCÍA-VILAS JA, QUESADA AR, MEDINA MA. Evaluation of the anti-angiogenic potential of hydroxytyrosol and tyrosol, two bio-active phenolic compounds of extra virgin olive oil, in endothelial cell cultures. *Food Chem* 2012; 134: 134-40.
170. MORILLA I, MEDINA MA, RANEA JAG. Novel Angiogenic Functional Targets Predicted through "Dark Matter" Assessment in Protein Networks. In *JBI 2010* (Fretias AT, Navarro A, eds), 89-93, 2012.
171. MARTÍNEZ-POVEDA B, RODRÍGUEZ-NIETO S, GARCÍA-CABALLERO M, MEDINA MA, QUESADA AR. The antiangiogenic compound aeropylsinin-1 induces apoptosis in endothelial cells by activating the mitochondrial pathway. *Mar Drugs* 2012; 10: 2033-46.
172. LÓPEZ-JIMÉNEZ A, GARCÍA-CABALLERO M, MEDINA MA, QUESADA AR. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur J Nutr* 52: 85-95 (2013)
173. MEDINA MA. Systems biology for molecular life sciences and its impact in biomedicine. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 1035-53.
174. MARTÍNEZ-POVEDA B, GARCÍA-VILAS JA, CÁRDENAS C, MELGAREJO E, QUESADA AR, MEDINA MA. The brominated compound aeropylsinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells. *Plos ONE* 2013; 8: e55203.
175. GARCÍA-VILAS JA, QUESADA AR, MEDINA MA. 4-Methylumbelliferone inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J Agr Food Chem* 2013; 61: 4063-71.
176. GARCÍA-CABALLERO M, MARÍ-BECCA M, CAÑEDO L, MEDINA MA, QUESADA AR. Toluquinol, a marine fungus metabolite, is a new angiostatic that interferes the Akt pathway. *Biochem Pharmacol* 2013; 85: 1727-40.
177. GARCÍA-CABALLERO M, CAÑEDO L, FERNÁNDEZ-MEDARDE A, MEDINA MA, QUESADA AR. The marine fungal metabolite, AD0157, inhibits angiogenesis by targeting the Akt signaling pathway. *Mar Drugs* 2014; 12: 279-99.
178. MEDINA MA, QUESADA AR. Dietary proteins and angiogenesis. *Nutrients* 2014; 6: 371-81.
179. CÁRDENAS C, QUESADA AR, MEDINA MA. Insights on the antitumor effects of kahweol on human breast cancer: decreased survival and increased production of reactive oxygen species and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 447: 452-8.

180. CÁRDENAS C, QUESADA AR, MEDINA MA. Kahweol, a coffee diterpene with anti-inflammatory properties. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (Preedy VE, ed), pp 627-633. Academic Press, London, 2015.
181. GARCÍA-VILAS JA, QUESADA AR, MEDINA MA. Damnacanthal, a noni anthraquinone, inhibits c-Met and is a potent antitumor compound against Hep G2 human hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep* 2015; 5: 8021.
182. QUESADA AR, MARTÍNEZ-POVEDA B, RODRÍGUEZ-NIETO S, MEDINA MA. Marine sponge derived antiangiogenic compounds. In: *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin* (Kim SK ed), pp. 29-58. Springer, Cham, 2015.
183. GARCÍA-CABALLERO M, MEDINA MA, QUESADA AR. Toluquinol, a marine fungus metabolite, inhibits some of the hallmarks of cancer. In: *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin* (Kim SK ed), pp. 269-299. Springer, Cham, 2015.
184. MEDINA MA, QUESADA AR. Plantas ibéricas con compuestos inhibidores de la angiogénesis. *Quercus* 2015; 348: 47-50.
185. MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. (+)-Aeropylsinin-1 inhibits Akt and Erk pathway signaling selectively in endothelial cell. *Integr Cancer Sci Therap* 2015; 2: 181-4.
186. GARCÍA-VILAS JA, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. Aeropylsinin-1, a sponge-derived multi-targeted bioactive marine drug. *Mar Drugs* 2016; 14: 1.
187. GARCÍA-CABALLERO M, BLACHER S, PAUPERT J, QUESADA AR, MEDINA MA, NOËL A. Novel application assigned to toluquinol: inhibition of lymphangiogenesis by interfering with VEGF-C/VEGFR-3 signalling pathway *Br J Pharmacol* 2016; 173: 1966-87.
188. GARCÍA-CABALLERO M, MARTÍNEZ-POVEDA B, MEDINA MA, QUESADA AR. Targeting tumor angiogenesis for cancer prevention. In: *Molecular Targets and Strategies in Cancer Prevention* (Chatterjee M, ed), pp. 117-149. Springer, Basel, 2016.
189. GARCÍA-VILAS JA, QUESADA AR, MEDINA MA. Screening of synergistic interactions of epigallocatechin-3-gallate with antiangiogenic and antitumor compounds. *Synergy* 2016; 3: 5-13.
190. GARCÍA-VILAS JA, QUESADA AR, MEDINA MA. Hydroxytyrosol targets extracellular matrix remodeling by endothelial cells and inhibits both ex vivo and in vivo angiogenesis. *Food Chem* 2017; 221: 1741-6.
191. GARCÍA-VILAS JA, PINO-ÁNGELES, A, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. The noni anthraquinone damnacanthal is a multi-kinase inhibitor with potent anti-angiogenic effects. *Cancer Lett* 2017; 385: 1-11.
192. GARCÍA-CABALLERO M, PAUPERT J, BLACHER S, VAN DER VELDE M, QUESADA AR, MEDINA MA, NOËL A. Targeting VEGFR-3/-2 signaling pathways with AD0157: a potential strategy against tumor-associated lymphangiogenesis and lymphatic metastases. *J Hematol Oncol* 2017; 10: 122.
193. MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. Pleiotropic role of puerpehenones in biomedical research. *Mar Drugs* 2017; 15: 325.
194. GARCÍA-CABALLERO M, MARTÍNEZ-POVEDA B, MEDINA MA, QUESADA AR. The natural antiangiogenic compound AD0157 induces caspase-dependent apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Front Pharmacol* 2017; 8: 802.
195. GARCÍA-CABALLERO M, QUESADA AR, MEDINA MA, MARÍ-BECCA M. Fishing anti(lymphatic) angiogenic drugs with zebrafish. *Drug Discov Today* 2018; 23: 366-74.
196. ROMERO-SÁNCHEZ LB, MARÍ-BECCA M, CARRILLO P, MEDINA MA, DÍAZ-CUENCA A. Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an in vivo zebrafish model. *Acta Biomaterialia* 2018; 68: 272-85.
197. CHENG-SÁNCHEZ I, CARRILLO P, SÁNCHEZ-RUIZ A, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA, LÓPEZ-ROMERO JM, SARBIA F. Exploring the ring-closing metathesis for the construction of the solomonamide macrocyclic core: identification of bioactive precursors. *J Org Chem* 2018; 83: 5365-83.
198. LÓPEZ-JIMÉNEZ A, GALLARDO E, ESPARTERO JL, MADRONA A, QUESADA AR, MEDINA MA.

- Comparison of the anti-angiogenic potential of hydroxytyrosol and five derivatives. *Food Funct* 2018; 9: 4310-6.
199. DEL CASTILLO-OLIVARES A, NÚÑEZ DE CASTRO I, MEDINA MA. Dual role of plasma membrane electron transport systems in defense. *Critic Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 197-220.
200. RODRÍGUEZ-ALONSO J, MONTAÑEZ R, RODRÍGUEZ-CASO L, MEDINA MA. Homocysteine is a potent modulator of plasma membrane electron transport systems. *J Bioenerg Biomembr* 2008; 40: 45-51.
201. MEDINA MA. Targeting the metabolism of cancer cells- A foreword. *Curr Pharm Design* 2014; 20: 2555-2556 (2014)
202. DÍAZ-SANTIAGO E, RODRÍGUEZ-CASO L, CÁRDENAS C, SERRANO JJ, QUESADA AR, MEDINA MA. Homocysteine pre-treatment increases redox capacity in both endothelial and tumor cells. *Redox Rep* 2016; doi:10.1080/13510002.2016.1183348.
203. MEDINA MA. Mathematical modeling of cancer metabolism. *Crit Rev Oncol Hematol* 124: 37-40 (2018)

PROGRAM OF THE WORKSHOP

Thursday 15th March

Accreditation and welcome

Opening

Miguel Ángel Medina, *Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

Zaida Díaz Cabiale, *Director of the Research Secretariat,
Vice-Rector for Research and Transfer, University of Málaga, Spain*

Session 1 - Basic issues

Chair: José Luis Urdiales

Reprogramming metabolism. A foreword for a workshop

Miguel Ángel Medina, *Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

Energy and polyamine metabolism coordination in human neuroblastoma

Francisca Sánchez Jiménez, *Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

Session 2 - Lipid metabolism

Chair: Miguel Ángel Medina

Brown adipose tissue as therapeutical strategy against obesity-related disordersMaría Calderón Domínguez, *Facultad de Farmacia, Universidad CEU San Pablo, Madrid, Spain***Inhibition of de novo fatty acid synthesis induces neuroblastoma differentiation**Maria Victoria Ruiz Pérez, *Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC),
Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden***The cholesterol transport protein stard5 (steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfer domain containing 5) is a novel target for cancer stem cells (csc)**Daniel Rodriguez Agudo, *Department of Internal Medicine/Gastroenterology,
Virginia Commonwealth University, USA***COFFE BREAK****Session 3 - Biomedical issues**

Chairs : Francisca Sánchez Jiménez and Ignacio Fajardo

Postprandial lipemia and tissue hypoxiaPedro Valdivieso Felices, *UGC Medicine Internal, Virgen de la Victoria Hospital.
IBIMA University of Málaga. Spain***Deciphering neuronal and glial dysfunction in Alzheimer's disease:
from mechanisms to therapeutic opportunities**Antonia Gutierrez, *Department of Cell Biology, Faculty of Science, University of Málaga.
IBIMA. CIBERNED, Spain***Exosome-mediated uptake of mast cell tryptase into the nucleus of melanoma cells
regulates expression of micro-RNA, histone clipping and proliferation**Gunnar Pejler, *Department of Medical Biochemistry and Microbiology,
Uppsala University, Sweden***Regulatory landscape of endothelial cells in pulmonary arterial hypertension**Armando Reyes-Palomares, *European Molecular Biology Laboratory, SCB unit,
Heidelberg, Germany***LUNCH**

Session 4 - Bioinformatics and computational biology issues

Chair: Manuel Gonzalo Claros Díaz

Reprogramming transposon expression in cancer

Manuel Gonzalo Claros Díaz, *Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

Triple-negative breast cancer metabolism implicated in the response to neoadjuvant chemotherapy

Aurelio Moya García, *Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

Network medicine applied to the identification of genotype-phenotype associations in patients with rare genomic disorders

Juan Antonio García Ranea, *Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

Can Standards Help in Developing Metabolomics?

Ismael Navas Delgado, *Languages and Computer Systems, Department of Languages
and Computer Science, University of Málaga, Spain*

COFFE BREAK

Sesión formativa - Lección magistral (in Sala de Juntas, first floor)

Presenta: Francisca Sánchez Jiménez

El proceso de la carcinogénesis

Alberto Muñoz, *Instituto de Investigaciones Biológicas, CSIC/UAM, Madrid*

END

Friday 16 March

Session 5 - (Lymph)angiogenesis

Chair: José María Pérez Pomares

Focussing on Aeroplysinin-1: An integrated vision

Beatriz Martínez Poveda, *Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

Role of ketone body oxidation in lymph-angiogenesis: possible relevance for lymphedema?

Melissa García Caballero, *Laboratory of Angiogenesis and Vascular Metabolism VIB-KU
Leuven Center for Cancer Biology (CCB), Department of Oncology, KU Leuven, Belgium*

Metabolic adaptation of tumor to hypoxia induced by anti-angiogenic therapy

Nor Eddine Sounni, *PhD, LBTD, GIGA-Cancer, ULiege, Belgium*

INVITED KEYNOTE LECTURE

Presenter: Miguel Ángel Medina

Metabolic regulation of vascular growth and function

Michael Potente, *Max Planck Research Group Leader, Max Planck Institute for Heart
and Lung Research, Bad Nauheim, Germany*

COFFE BREAK

Session 6 - Medicinal chemistry

Chair: Ana Rodríguez Quesada

Self-assembling drug-conjugates for anti-cancer treatment

Daniele Passarella, *Department of Chemistry, Università degli Studi di Milano, Italy*

Development of kinase and PFKFB3 inhibitors

Andrej Bohac, *Department of Organic Chemistry, Comenius University in Bratislava, Slovakia*

A fruitful strategy for the search of new inhibitors of angiogenesis

Ana Rodríguez Quesada, *Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

INVITED KEYNOTE LECTURE

Presenter: Ana Rodríguez Quesada

Fuel and oil of the cancer engine

Arkaitz Carracedo, *IKERBASQUE, ERC investigator, University of the Basque Country, Spain*

LUNCH

Session 7 - Developmental and cancer issues

Chair: Ramón Muñoz Chápuli

Precision medicine addressed to the diagnosis, prognosis and prediction of the colorectal cancer associated with obesity

Manuel Macías González, *UGC Endocrinology and Nutrition of University Hospital Virgen de la Victoria. IMABIS. Málaga, Spain*

The Wilms Tumor Suppressor Gene: novel functions beyond embryonic development

Ramón Muñoz Chápuli, *Department of Animal Biology. Faculty of Science, University of Málaga, Spain*

**Embryonic basis of ventricular remodelling:
towards a cell type-specific metabolic profiling of the infarcted heart**

José María Pérez Pomares, *Department of Animal Biology, Faculty of Science,
University of Málaga, Spain*

Differentiation of hESC cells into the cardiac 'venous pole'/cardiac inflow' cell types

Juan Antonio Guadix Domínguez, *Department of Animal Biology, Faculty of Science,
University of Málaga, Spain*

Metabolic Reprogramming: Chimera or Bellerophon

José Manuel Matés Sánchez, *Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty
of Science, University of Málaga, Spain*

Session 8 - Concluding remarks

Short round table

Lead and moderator: Miguel Ángel Medina

Gunnar Pejler, Daniel Rodríguez Agudo, Andrej Bohac, Daniele Passarella,
Nur Eddine Sounni, Ana Rodríguez Quesada

END

SEGUNDA PARTE:

Resúmenes de las comunicaciones

Conferencias plenarias

INVITED KEYNOTE LECTURE

Metabolic regulation of vascular growth and function

Michael Potente

Angiogenesis & Metabolism Laboratory, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, D-61231 Bad Nauheim, Germany



Historically, angiogenesis has been viewed from the perspective of how endothelial cells coordinate migration and proliferation in response to growth factor activation. However, endothelial cells must also coordinate their metabolism and adapt metabolic fluxes to the rising energy and biomass demands of sprouting vessels. Recent studies have highlighted the importance of such metabolic regulation in the endothelium and uncovered core metabolic pathways and mechanisms of regulation that drive the angiogenic process. In this presentation, current principles of endothelial metabolic control will be discussed. Particular focus will be given to the role of forkhead box O (FOXO) transcription factors that our laboratory has recently identified as central regulators of endothelial metabolism and growth. New insights on the functional roles of FOXO family members in the endothelium will be illustrated.

Funding:

Max Planck Society, European Research Council (ERC) Starting Grant ANGIOMET (311546), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 834), the Excellence Cluster Cardiopulmonary System (EXC 147/1), the LOEWE grant Ub-Net, the DZHK (German Center for Cardiovascular Research), the Stiftung Charité, and the European Molecular Biology Organization Young Investigator Programme.

INVITED KEYNOTE LECTURE "IBIMA CONFERENCE"

Fuel and oil of the cancer engineArkaitz Carracedo^{a, b, c, d}^aCIC bioGUNE, Bizkaia Technology Park, 801^a bld., 48160 Derio, Bizkaia, Spain^bIkerbasque, Basque foundation for science, 48011 Bilbao, Spain^cBiochemistry and Molecular Biology Department, University of the Basque Country, Bilbao, Spain^dCIBERONC

acarracedo@cicbiogune.es



The products of metabolic pathways serve unexpected purposes in the process of cancer cell growth and dissemination. Despite the better understanding of the metabolic events that contribute to cancer, the field has not yet clarified (i) how these metabolic events are coordinately elicited, and, importantly, (ii) what differential metabolic cues drive cancer initiation and metastasis. In order to decipher metabolic

drivers of cancer, we envisioned a study that integrates bioinformatics screening, genetic mouse modeling and integrative metabolomics. We based our studies on the interplay between the signaling and metabolism in prostate cancer, exemplified by loss of PTEN in this tissue. We will provide an integrated perspective of the means and regulation of the metabolic switch in this disease. Specifically, we will elaborate on the distinct use of fuel for growth and the identification of metabolic pathways that serve to sustain biological processes related to growth, thus oiling the engine.

Lección magistral

FORMATIVE SESSION – LECCIÓN MAGISTRAL (IN SPANISH)

El proceso de la carcinogénesis

Alberto Muñoz

Instituto de Investigaciones Biológicas, CSIC/UAM, Madrid



El cáncer es un grupo de enfermedades multigénicas del que solo un pequeño porcentaje, variable según el tipo, es hereditario. La inestabilidad genética, cromosómica o de DNA, es la característica esencial de las células tumorales. Los estudios de secuenciación masiva de tumores usando las técnicas de nueva generación están ampliando de manera muy importante nuestro conocimiento de las mutaciones más relevantes y de las vías de señalización alteradas en cada neoplasia. Además, han mostrado la existencia de elevada heterogeneidad intra- e inter-tumoral y de variabilidad interindividual, y la existencia de procesos de hipermutación local o extensa en el genoma (*kataegis*, *chromothripsis*). Conceptos e ideas que han adquirido relevancia recientemente en oncología son la reprogramación metabólica, las *cancer stem cells*, la importancia del microambiente/estroma/nicho tumoral, los diversos tipos de migración de las células tumorales, el proceso de transición epitelio-mesénquima y la diseminación temprana de células tumorales y generación de metástasis. Respecto a la terapia anticancerosa, comentaremos los nuevos descubrimientos sobre la respuesta inmune antitumoral y los inhibidores de *immune checkpoints*, así como los conceptos de adicción oncogénica y letalidad sintética. Estos nuevos descubrimientos están cambiando el modelo clásico de la carcinogénesis a otro distinto, más heterogéneo y complejo.

Comunicaciones Orales

SESSION 1- BASIC ISSUES

Reprogramming metabolism. A foreword for a workshop

Miguel Ángel Medina

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science,
University of Malaga, Spain



When the problem of cancer is approached from the perspective of animal metabolic physiology, the first question to ask is: How is the metabolism of abnormally proliferating tissue different from the metabolism of resting tissue? This is how Otto Warburg began his research into tumor metabolism in the first half of the twentieth century. In spite of the advances made by this and other authors, mainly in relation to the energetic and respiratory metabolism in Ehrlich ascitic tumor cells and in other cellular models that later followed, the genomic era monopolized by right the second half of the last century.

It was necessary to wait until the first decade of the 21st century to resume the metabolic perspective.

The genomic and technological inheritance now reformulates the concept as “metabolic reprogramming”, understood as a process of transformation of energy, matter and transduction of information and identifies this metabolic reprogramming as one of the hallmarks of cancer. Hence, it made sense that targeting the metabolism of cancer cells could open new avenues for the treatment of cancer, as it seems to have been the case.

This communication will present a short historic overview of our grupo’s research interests.

[Our experimental work is supported by grants BIO2014-56092-R (MINECO and FEDER) and P12-CTS-1507 (Andalusian Government and FEDER) and funds from group BIO-267 (Andalusian Government). The “CIBER de Enfermedades Raras” is an initiative from the ISCIII (Spain)].

Energy and polyamine metabolism coordination in human neuroblastoma

Ruiz-Pérez, M. V.; Medina, M. Á.; Urdiales, J.L.; **Sánchez-Jiménez, F.***

* Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science, University of Malaga, IBIMA (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Málaga, ISCIII); and unit 741 of CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER, ISCIII)



Polyamines are biogenic organic polycations essential for cell proliferation, and their levels are elevated in many human tumors (Phanstiel, 2017, PMID: 29134652). The oncogene *n-myc* is known to potentiate polyamine metabolism. Ornithine decarboxylase is the key enzyme for *de novo* polyamine synthesis in mammalian cells. Its expression is regulated by N-Myc (Koomoa et al., PMID: 23440295). Neuroblastoma,

the most frequent extracranial solid tumor in children, harbors the amplification of *n-myc* oncogene in 25% of the cases, and it is associated with treatment failure and poor prognosis. We evaluated several metabolic features of the human neuroblastoma cell lines Kelly, IMR-32, and SK-N-SH. We further investigated the effects of glycolysis impairment in polyamine metabolism in these cell lines. A linkage between glycolysis impairment and polyamine reduction was unveiled. We show that glycolysis inhibition is able to trigger signaling events leading to the reduction of N-Myc protein levels and a subsequent decrease of both ornithine decarboxylase expression and polyamine levels, accompanied by a cell cycle blockade preceding cell death. New anti-tumor strategies could take advantage of the direct relationship between glucose deprivation and polyamine metabolism impairment, leading to cell death, and its apparent dependence on *n-myc*. Combined therapies targeting glucose metabolism and polyamine synthesis could be effective in the treatment of *n-myc*-expressing tumors.

SESSION 2- LIPID METABOLISM

Brown adipose tissue as therapeutical strategy against obesity-related disorders

María Calderón Domínguez

Facultad de Farmacia, Universidad CEU San Pablo, Madrid, Spain



Obesity is not only a social stigma, but a concerning matter of public health. In parallel to the increase in obesity rates, the incidence of some related diseases, such as insulin resistance, type 2 diabetes, cardiovascular disease, nonalcoholic fatty liver disease, and some forms of cancer among others. In the past decade, the pathophysiology of obesity-induced metabolic diseases has been strongly related to white adipose tissue (WAT) dysfunction. The thermogenic controlling brown adipose tissue (BAT) was given less attention since it is less abundant and since it was considered exclusive to rodents and children. However, in 2009 it was rediscovered its presence and activity in adult humans, which interestingly is significantly decreased in obese and diabetic patients. This tissue has a high potential of thermogenesis and substrate oxidation, so increasing its activity or mass would be a promising strategy to maintain body energy homeostasis. This opened a new field and highlighted BAT as a new therapeutic target to fight against obesity-related disorders.

Inhibition of *de novo* fatty acid synthesis induces neuroblastoma differentiation

Ruiz-Pérez, M. V.;^{a,b} Oliynyk, G.;^a and Arsenian-Henriksson, M.^a

^a Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Karolinska Institutet, SE-171 77 Stockholm, Sweden

^b maria.ruiz.perez@ki.se



High MYC signaling or c-MYC/MYCN amplification are strongly correlated to poor prognosis and treatment failure in neuroblastoma patients. Survival for high-risk patients remains only around 40–50%, and survivors suffer long-term side effects from treatment. Alternative approaches, as differentiation-inducing therapies, are especially interesting for high-risk patients in which resistance to conventional chemotherapy arises. We

previously demonstrated that silencing of MYCN or targeting the protein with small molecule inhibitors prompt changes in lipid metabolism due to reduced β oxidation and mitochondrial dysfunction (Zirath et al PNAS, 2013). Here our objective is to analyze the crosstalk between lipid metabolism and cell differentiation regulated by MYC(N), to identify new therapeutic targets with potential use for induction of differentiation.

Proteomic analysis of neuroblastoma cells shows that lipid metabolism and related signaling elements, as well as proteins involved in cell differentiation, are consistently affected by MYCN downregulation. Additionally, high expression of acetyl-CoA carboxylase (ACACA) and fatty acid synthase (FASN) correlates to poor survival in neuroblastoma patients, suggesting fatty acid synthesis as a promising target for treatment. Accordingly, the chemical inhibition of *de novo* fatty acid synthesis (targeting either ACACA or FASN) triggers MYC(N) protein downregulation and differentiation of both MYCN amplified and non-amplified neuroblastoma cells. Moreover, fatty acid synthesis inhibition has an impact in mitochondrial structure and function. The withdrawal of major nutrients as glucose and glutamine does not trigger neuroblastoma differentiation, while the incubation in delipidized cell culture medium induces neurite outgrowth.

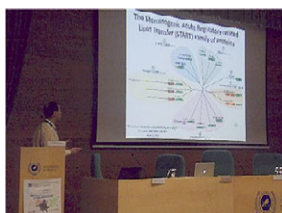
Consequently, cell membrane-permeable fatty acids prevent the phenotypes observed, suggesting a very specific relationship of lipid metabolism with induction of differentiation.

Our work aims to elucidate the impact of lipid metabolism on neuroblastoma biology, with potential implications for metabolism-targeted and differentiation-based therapies. Here we show that targeting fatty acid synthesis could be an interesting therapeutic strategy for neuroblastoma treatment, especially as a co-adjuvant in differentiation therapies.

The cholesterol transport protein stard5 (steroidogenic acute regulatory protein related lipid transfer domain containing 5) is a novel target for cancer stem cells (csc)

Daniel Rodriguez Agudo

Department of Internal Medicine/Gastroenterology, Virginia Commonwealth University, USA



Introduction: Plasma membrane (PM) cholesterol levels play a critical role in cancer growth, invasion and resistance to chemotherapy in part through membrane fluidity regulation. Fluidity changes modulate function of PM resident proteins, especially growth factor receptors, critical for CSCs self-renewal. We recently demonstrated a critical role of StarD5 in transporting cholesterol to PM. Hypothesis: StarD5 plays a role

in CSCs growth. Methods: Colon cancer (CRC) cells were grown as monolayer or CSC rich spheroids. PM fluidity was examined using LAURDAN fluorescence/phasor analysis. PM cholesterol was determined by filipin and fALOD4 staining. StarD5 knock-down (KD) HT-29 cells were obtained using shRNA. Tumor initiation frequency (TIF) was examined in NCR nude mice injected with HT-29 CSCs. Novel specific inhibitors of StarD5 were identified through in silico analysis. Normal stem cell function was assessed through organoid assays. Results: StarD5 expression was highly elevated in CSCs rich spheroids and in ~70% of human CRC tissues compared to paired normal controls. Inhibition of StarD5 attenuated CSC phenotype and resistance to FDA-approved CRC therapies in vitro and in vivo (TIF). Indeed, HT-29 StarD5-KD cells showed redistribution of free cholesterol with a significant decrease in PM cholesterol and fluidity. Additionally, we identified several small molecule inhibitors of StarD5 that significantly attenuated CSCs growth (IC_{50} =0.1-1 μ M range). More importantly, StarD5 inhibitors showed lack of toxicity on normal colon stem cells. Conclusion: StarD5 is a novel critical regulator of colon CSC phenotype and drug resistance. Novel inhibitors of StarD5 are viable therapeutic agents that target CSCs while sparing normal cells.

SESSION 3- BIOMEDICAL ISSUES

Postprandial lipemia and tissue hypoxia

Pedro Valdivieso Felice

UGC Medicine Internal, Virgen de la Victoria Hospital. IBIMA University of Malaga. Spain



Postprandial (hyper)lipidemia contributes to atherosclerosis **increasing** remnant particles. Because we live in a postprandial state, at least during the day, atherosclerosis is considered for some a postprandial phenomenon. Many common conditions such as obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes are characterized by elevated postprandial lipemia. In fact, type 2 diabetics show more postprandial particles than non diabetic subjects and was considered part of the diabetic dyslipidemia. However, we published that this abnormality was present only in type 2 diabetic patients with subclinical peripheral arterial disease, assessed by a low ankle-brachial index. We hypothesized that subclinical hypoxia induces in the cells changes that reduce the availability of lipoprotein lipase to hydrolyze triglyceride-rich lipoproteins.

Cells submitted to hypoxia upregulate the expression of hypoxia-inducible factor 1, a transcription factor that induces changes in innumerable target genes that were reviewed some time ago. Of note among these changes is the raised expression of angiopoietin-like 4 protein (Angptl4) and vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF intervenes in the processes of angiogenesis, much related with chronic ischaemia of the lower limbs and the formation of collateral vessels. Angptl4 is a potent inhibitor of LPL, the enzyme that intervenes critically in the first step of the catabolism of triglyceride-rich particles.

Deciphering neuronal and glial dysfunction in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutic opportunities

Antonia Gutierrez

Department of Cell Biology, Faculty of Science, University of Malaga. IBIMA. CIBERNED, Spain



Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder representing the most common cause of dementia in the elderly. The amyloid cascade hypothesis confers a predominant role to amyloid-beta (A β) as the initiator of all pathological phenomena leading to neuronal death and dementia. However, the continuing failure to develop an effective treatment targeting the amyloid cascade reveals a higher and still unsolved complexity for AD pathology. Emerging evidences indicate that the

neuroinflammatory response has a key role in disease pathogenesis though the exact contribution of the activated microglial and astroglial cells has not been fully dissected. In this sense, and based primarily on studies in A β producing transgenic mouse models, the actual view confers a cytotoxic role to the microglial activation in AD. Our research group is part of the *Biomedical Research Networking Centre on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED)*, an agency of the Spain Institute of Health, and we are devoted to to investigate the pathogenic mechanisms involved in synaptic and neuronal loss/dysfunction, with special interest in the neuroinflammatory response, 2) identify potential biomarkers and therapeutic targets, and 3) evaluate the effectiveness of new therapeutic strategies at the preclinical level. To address these goals we develop an integrative approach encompassing research with novel and established transgenic animal models, post mortem human tissue and, more recently, the use of cell culture for disease modelling, coupled with immunohistological, biochemical, cellular and behavioral studies. Neuronal death in our transgenic APP/PS1 model is associated with a neurotoxic inflammatory response induced by soluble oligomeric A β .

While in amyloidogenic animal models microglia activate and proliferate gradually during disease progression, our current studies in post mortem human hippocampus reveal a limited microglial activation along with a degenerative process in AD patients. Microglial dysfunction results in an aggravation of pathology including an increase in A β levels, along with synaptic and neuronal loss. Moreover, there is a patent hyperactivation of astrocytes which are highly resistant to degenerate. We have demonstrated that plaque-associated reactive astrocytes eliminate presynaptic dystrophies. This phagocytic capacity of astrocytes might result impaired during disease progression. Therefore, dysregulated glial responses might be responsible for the neurodegeneration and dementia in AD patients. Restoring glial dysfunction might be a promising novel therapeutic avenue to treat AD.

Supported by FIS PI15/00796, La Marato TV3, Junta de Andalucía and CIBERNED.

Exosome-mediated uptake of mast cell tryptase into the nucleus of melanoma cells regulates expression of micro-RNA, histone clipping and proliferation

Fabio Rabelo Melo,^a Sebastin Santosh Martin,¹ Christian Sommerhoff,^b
Gunnar Pejler^a

^aUppsala University, Department of Medical Biochemistry and Microbiology, BMC,
Box 582, 75123 Uppsala, Sweden

^bUniversity of Munich, Dept. Clinical Biochemistry, Nussbaumstr. 20,
D-80336 München, Germany



Mast cells are implicated in various malignancies but how they impact on cancer cells is not well understood. Here we addressed this issue and show that mast cells interact with melanoma cells and reduce their expansion rates. In contrast, mast lacking the expression of tryptase, a major protease localized in the mast cells secretory granules, lacked this ability.

Mechanistically, tryptase was found to interfere with the proliferation of melanoma cells after being delivered into the melanoma cell nucleus. Moreover, tryptase was found to truncate nucleosomal core histone 3 (H3) and to cause extensive alterations of the nuclear architecture of the melanoma cells. It was also demonstrated that tryptase caused major effects on the gene expression in melanoma cells, including induction and repression of several microRNAs implicated in regulation of tumor cell growth. The mechanism of tryptase uptake involved binding of tryptase to DNA-coated exosomes released from the melanoma cells, followed by dynamin-dependent endocytosis. It was also demonstrated that binding of tryptase to DNA preserved its enzymatic activity. Altogether, these findings reveal a novel mechanism for regulation of gene expression and growth of tumor cells.

Regulatory landscape of endothelial cells in pulmonary arterial hypertension

Armando Reyes-Palomares

European Molecular Biology Laboratory, SCB unit, Heidelberg, Germany



Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a cardiovascular disease characterized by high-blood pressure in lung arteries caused by changes in their smaller branches. Here we aim to study the epigenetic profiles of affected small pulmonary arterial endothelial cells (sPAECs) in a cohort of PAH-patients and healthy-controls. We will present a multi-omics' approach to integrate diverse molecular phenotypes such as histone modifications (H3K27ac, H3K4me3, H3K4me1), gene expression (RNA-Seq) and long-range chromatin interactions mediated by CTCF (ChIA-PET). The multi-level integration allowed us to uncover chromatin domains that are entirely up- or down-regulated in PAH involving the regulation of several genes related to vascular remodelling. We used those chromatin regulatory domains as the basis for building a comprehensive-gene regulatory network to understand the molecular mechanisms and pathways underlying sPAECs changes during disease progression. Our results suggest epigenetic changes in transcription factor activities and chromatin reorganization events that are sensitive for hypertension injury. Taken together, we show how chromatin marks can be used to study how different transcription factor programs activate genes that are primed to produce a PAH-differential response upon stimulation.

SESSION 4- BIOINFORMATICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY ISSUES

Reprogramming transposon expression in cancer

Manuel Gonzalo Claros Díaz

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science,
University of Malaga, Spain



Cells try to maintain transposons silenced during the lifetime, even though many patients seem to have a disease derived from a transposon-mediated gene disruption. Using clinical samples from lung cancer, particularly small-cell lung cancer and lung adenocarcinoma, we analysed changes in transposon expression using RNA-seq samples from normal and cancerous lung from the same patient. The computational analysis was automated in our workflow NearTrans. Contrary to 2010 hypothesis, transposons were not deregulated, but finely reprogrammed by downregulation as well as upregulation, in cancer cells. Moreover, transposon reprogramming seems to be cancer-specific. Since our analysis provides which transposons have been reprogrammed and their genome location, we are studying whether transposon reprogramming is driven by the gene context surrounding the transposon.

Breast cancer metabolism implicated in the response to neoadjuvant chemotherapy

Aurelio Moya García

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science,
University of Malaga, Spain



Breast cancer cells rewire their cellular metabolism to meet the demands of survival, proliferation, and invasion. These reprogrammed activities are also a component of the highly coordinated response to chemotherapy. Neoadjuvant chemotherapy (NAC), besides increasing the proportion of patients who can be treated with breastconservative therapy, is an excellent *in vivo* experiment to investigate the sensitivity and resistance to clinical treatments. In this talk I'll show the metabolic reprogramming events associated with NAC sensitivity and those triggered when breast cancer cells are exposed to chemotherapy.

Network medicine applied to the identification of genotype-phenotype associations in patients with rare genomic disorders

Juan Antonio García Ranea

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science,
University of Malaga, Spain



Alterations in different regions of the genome can affect genes that can cause the pathological phenotypes observed in patients with rare genomic disorders. The identification of association patterns between affected genomic regions and pathological phenotypes is especially difficult in rare syndromes due to the lack of clinical cases to compare. Our research group, through the study of networks, has focused on the development of association systems using information obtained from the Databases of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER), which includes genotype and phenotype information of thousands of patients with rare genomic disorders. Based on the association data obtained, we are currently developing a prediction system that helps clinicians to better associate genotype alterations to HPO phenotypes in this sort of patients.

Can Standards Help in Developing Metabolomics?

Ismael Navas Delgado

Languages and Computer Systems, Department of Languages and Computer Science,
University of Malaga, Spain



As for now there are over 300 free online databases that store biological pathway information. Some of them are partially linked through hyperlinks. There are several proposals for standardizing the access or download of such databases, and these databases are adopting some of them. However, can these standards enable advanced tools for querying or analysing such data?

SESSION 5- (LYMPH)ANGIOGENESIS

Focussing on Aeroplysinin-1: An integrated vision

Beatriz Martínez Poveda

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science,
University of Malaga, Spain



Aeroplysinin-1 (Apl-1) is a brominated compound isolated from the marine sponge *Aplysina aerophoba* that has demonstrated a broad spectre of action *in vitro* and *in vivo*. Its pleiotropic activity includes anti-tumoral, anti-angiogenic and pro-apoptotic effects, making Apl-1 a new natural compound with very promising potential therapeutic properties. Moreover, the role of Apl-1 in inflammation, another disease-related process, has been explored, showing evidences of its anti-inflammatory potential. Despite the varied and promising obtained results, the exact mechanism of action of Apl-1 has not been unravelled yet, and in order to determine it, an integrated vision of the experimental evidences is needed.

Role of ketone body oxidation in lymph-angiogenesis: possible relevance for lymphedema?

Melissa García-Caballero, Annalisa Zecchin, Joris Souffreau, Anneke Bouché, Bart

Ghesquière, An Van Nuffelen, Wesley Vermaelen, Mieke Dewerchin, Peter Carmeliet. Laboratory of Angiogenesis and Vascular Metabolism, VIB-KU Leuven Center for Cancer Biology (CCB), Department of Oncology, KU Leuven, Campus Gasthuisberg, O&N4, Herestraat 49 - B912, 3000, Leuven, Belgium. Email: melissa.garciacaballero@kuleuven.vib.be



Lymphatic vessels, lined by lymphatic endothelial cells (LECs), are indispensable for life. We recently discovered that acetyl-CoA is a central hub in mediating LEC differentiation, proliferation and sprouting. Reducing acetyl-CoA levels via fatty acid β -oxidation inhibition impairs lymphangiogenesis *in vivo*, whereas supplementation of acetate, an alternative source of acetyl-CoA, recovers the defects observed in lymphatic vessels growth. Another important source of acetyl-CoA are the ketone bodies. Here, we report that ketone bodies are present in the lymph at higher levels than the plasma. The silencing of OXCT1, the rate-controlling step of ketone body oxidation, reduces LEC proliferation, migration and vessel sprouting. Mechanistically, OXCT1 silencing impairs mitochondrial respiration and TCA cycle replenishment and decreases the expression of several lymphatic markers. Surprisingly, supplementation of 3- β hydroxybutyrate, the most abundant ketone body in the plasma, increases lymphangiogenesis *in vivo* in a cornea-injury model. High-fat, low carbohydrates ketogenic diets, currently used as metabolic therapy for various conditions, considerably elevates the levels of ketone bodies in both plasma and lymph. Interestingly, in a mouse model of microsurgical ablation of LVs in the tail, which recapitulates features of acquired lymphedema in humans, mice fed ketogenic diet showed decreased edema formation and improved lymphatic function. All together, our findings demonstrate the therapeutic potential of a novel metabolic approach to alleviate lymphatic dysfunction in lymphedema patients.

Metabolic adaptation of tumor to hypoxia induced by anti-angiogenic therapy

Nor Eddine Sounni

PhD, LBTD, GIGA-Cancer, ULiege, Belgium



Metastases, rather than primary tumors, are responsible for most cancer deaths. To prevent these deaths, improved ways to treat metastatic disease and to overcome tumor adaptation to treatment are needed. Here I will consider the metabolic adaptation of tumors to hypoxic environment induced by anti-angiogenic drugs. We recently provided evidence of metabolic reprogramming in tumors during and after anti-angiogenic therapy. Adaptation to anti-angiogenic therapy (sunitinib and sorfenib) withdrawal increases metastatic dissemination and xenograft regrowth. This was reduced with fatty acid synthase (FASN) inhibition (orlistat) or knock-down after sunitinib withdrawal. Further investigation of lipid metabolism in harsh tumor microenvironment lacking oxygen and nutrients when blood vessels are shut down with angiogenic treatment led to the identification of lipid transport and desaturation as the main drivers of tumor aggressiveness after treatment cessation. Fatty acid binding protein 4 (FABP4) and SCD1, a key Stearoyl-Coa Desaturase enzyme that inserts double bonds into acyl-CoA chains were found to be up-regulated in response to treatment and correlated with increased aggressiveness. The resulting lipid metabolism reprogramming in cancer cells and stromal cells in metabolically stressed tumor microenvironment was explored to guide for the development of powerful combination therapies using lipid metabolism and angiogenesis inhibitors.

SESSION 6- MEDICINAL CHEMISTRY

Self-assembling drug-conjugates for anti-cancer treatment

Daniele Passarella

Department of Chemistry, Università degli Studi di Milano, Italy



Our continuous interest in the field of chemical approaches to target cancer cells moved us to study the preparation of a novel classes of conjugate compounds using anticancer drugs as building blocks. In previous efforts we used squalene tail as self-assembling inducer¹ and a disulphide containing linker to secure the release of the drugs after cell internalization.²

Subsequently we demonstrated the possibility to generate hetero and fluorescent nanoparticles by mixing a paclitaxel-squalene conjugate and fluorescein-squalene conjugate.³ In the light of facing the high demanding issue of resistance⁴ we studied the formation of cycloamine-paclitaxel containing nanoparticles and we detected the internalization by confocal microscopy and super-resolution.⁵ More recently we reported doxorubicin-cycloamine hetero-nanoparticles that are able to reduce tumour growth and to decrease the toxicity of chemotherapy in mice.⁶ Our efforts are actually focused on: a) new combination of drugs to overcome drug resistance, b) new self-assembling inducers,⁷ c) new hetero-nanoparticles and d) new drug-conjugates deriving by modification of active natural products.

References:

- ¹ G. Fumagalli, D. Passarella et al. *Drug Discovery Today* 2016, 21, 1321
- ² S. Borrelli, A. D. Passarella et al. *Eur. J. Med. Chem* 2014, 85, 179
- ³ G. Fumagalli, D. Passarella et al. *ChemPlusChem* 2015, 80, 47
- ⁴ P.A. Sotiropoulou, C. Herold-Mende, D. Passarella et al. *Drug Discovery Today* 2014, 19, 1547
- ⁵ G. Fumagalli, D. Passarella et al. *ChemPlusChem* 2015, 9, 1380
- ⁶ G. Fumagalli, D. Passarella et al. *ACS Med. Chem. Lett.* 2017, 8, 953
- ⁷ G. Fumagalli, D. Passarella et al. *Org. Biomol. Chem.*, 2017, 15, 1106

Development of kinase and PFKFB3 inhibitors

Andrej Boháč,^{a, e} Peter Šramel,^a Miroslav Murár,^a Matúš Hlaváč,^a Gabriela Addová,^b Michal Zeman^c and Gilles Hanquet^d

^aDepartment of Organic Chemistry,

^bInstitute of Chemistry and

^cDepartment of Animal Physiology and Ethology Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovakia;

^dUniversité de Strasbourg, Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux (ECPM) Laboratoire de Synthèse et Catalyse (UMR CNRS 7509), 25, Rue Becquerel, F-67087 Strasbourg, France,

^eBiomagi, Ltd., Mamatyova 26, 851 04 Bratislava, Slovakia, andrej.bohac@fns.uniba.sk



In the last 5 years of our research thirty-five kinase inhibitors (VEGFR2 TK and CLK1) possessing nM anticancer enzymatic activity were developed by SBDD and organic synthesis. We are developing modulators also for other anticancer, antidiabetes and antimetabolic targets (Mer, Axl, SMO, ALR2 and PFKFB3). We are involved in kinase conformations analysis, *in situ* Click chemistry and chemistry of *N*,5(4)-diaryloxazol-2-amines too. 3PO ($IC_{50} = 22\ 900\ \text{nM}$) and PFK15 ($IC_{50} = 210\ \text{nM}$) inhibitors are known to block PFK1 activation by inhibiting PFKFB3 an important metabolic reprogramming target. Due to the lack or doubtful information about a preparation of 3PO and PFK15 in the literature, we developed their synthesis to exploit them as standards or for combined study with other modulators in biological assays. Simultaneously we are developing novel PFKFB3, ALR2 and SMO-GPCR active compounds. Some examples of the research results above will be presented in the lecture.

A fruitful strategy for the search of new inhibitors of angiogenesis

Ana R. Quesada

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Málaga, Andalucía Tech, Málaga, Spain. Unit 741 of CIBER de Enfermedades Raras, Málaga, Spain



Angiogenesis, the formation of new blood vessels from the pre-existing vasculature, is a main mechanism of vascularisation during the embryonic development, growth, regeneration, wound healing and some physiological processes such as formation of the corpus luteum and endometrium. Abnormal angiogenesis is also involved in a number of pathological processes such as tumour growth, metastasis, diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, psoriasis or arthritis, among others. For this reason angiogenesis inhibition has attracted broad attention in the field of pharmacological research.¹ Since more than fifteen years, our group has been devoted to the screening of new modulators of angiogenesis. During this time a number of experimental procedures, including in vitro assays that resemble different steps of the angiogenic process, and some assays to test the in vivo angiogenesis inhibitory activity of the compounds have been developed. As a fruit of the mentioned screening, a number of compounds with remarkable anti-angiogenic activity have been identified and characterised. Some of them are derived from marine organisms²⁻⁴ or medicinal plants,⁵⁻⁷ and others from synthetic origin.⁸⁻⁹

¹Quesada et al., *Curr Pharm Des.* 2010;16(35):3932-57.

²Rodríguez-Nieto et al., *FASEB J.* 2002;16(2):261-3.

³García-Caballero et al., *Biochem Pharmacol.* 2013;85(12):1727-40.

⁴García-Caballero et al., *Mar Drugs.* 2014;12(1):279-99.

⁵García-Caballero et al., *J Invest Dermatol.* 2011;131(6):1347-55.

⁶García-Vilas et al. *Food Chem.* 2017;221:1741-1746.

⁷García Vilas et al., *Cancer Lett.* 2017;385:1-11.

⁸Martínez-Poveda et al. *Mol Cancer Ther* 6:2675-85, 2007.

⁹Martínez-Poveda et al. *J Cell Mol Med* 12: 1211-1219, 2008

[Our experimental work is supported by grants BIO2014-56092-R (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and FEDER), and PIE P12-CTS-1507 (Andalucian Government and FEDER). CIBER de Enfermedades Raras is an initiative from the ISCIII (Spain)].

SESSION 7- DEVELOPMENTAL AND CANCER ISSUES

Precision medicine addressed to the diagnosis, prognosis and prediction of the colorectal cancer associated with obesity

Manuel Macías González

UGC Endocrinology and Nutrition of University Hospital Virgen de la Victoria. IMABIS. Málaga, Spain



Obesity, which is considered as the 21st century epidemic, is directly associated with the development of 11 different types of cancer. This increases the complexity in the approach of these pathologies whose origin is multifactorial. The prevalence of obesity is attributed to the interplay between environmental factors and obesity-associated genes. Since the first Genome Wide-Association Study (GWAS) revealed the

robust association between *FTO* (*fat mass associated obesity*) variants and obesity. There has been a dramatic increase in the number of reproducible association studies among multiple population of different countries. **An emerging concept in gene expression regulation is that a diverse set of modified nucleotides is found internally within mRNA, and these modifications constitute an epitranscriptomic code.** The discovery of *FTO* as an RNA demethylase controlling the m6A modification in nuclear RNAs showed the novel biological function of *FTO* in epigenetic regulation. **Thus, the epitranscriptome may be highly dynamic and subjected to reversible base modifications that influence mRNA function.**

All these new studies in EWAS (Epigenetic Wide Association Studies) identifies and replicates changes in DNA methylation associated with excess weight in adipose tissue, which are a consequence and not the cause of adiposity. This fact has allowed the understanding of epigenetic and epitranscriptomic factors, which play a relevant role in the search for new biomarkers in liquid biopsy for the prevention and prediction of cancer in obesity in a more precise way.

The Wilms Tumor Suppressor Gene: novel functions beyond embryonic development

Ramón Muñoz Chápuli

Department of Animal Biology. Faculty of Science, University of Málaga, Spain



The Wilms tumor suppressor gene (*Wt1*) encodes a C2H2-type zinc-finger transcription factor that can appear in mammals under different isoforms, participating in transcriptional regulation, RNA metabolism and protein-protein interactions. *Wt1* has been involved in the development of a number of organs, including kidneys and gonads, spleen, adrenals, liver, heart, lungs and diaphragm. However, more recently, some findings suggest that *Wt1* could be playing important physiological roles in adult life. In fact, systemic deletion of *Wt1* in adult mice causes a lethal multiorgan failure whose etiology is unclear (Chau et al., PLoS Genet 2011; 7(12): e1002404). *Wt1* is involved in the homeostasis of the visceral adipose tissue, its expression has been reported in a small population of bone marrow cells and we are currently investigating the role played by *Wt1* in pancreas homeostasis and regeneration. In our speech we will review these novel adult functions of *Wt1* and we will discuss their clinical significance.

Embryonic basis of ventricular remodelling: towards a cell type-specific metabolic profiling of the infarcted heart

José M. Pérez Pomares

Department of Animal Biology, IBIMA & Andalusian Center for Nanomedicine and Biotechnology



Cardiac ischemic disease is a prevalent, continuously expanding condition. Massive myocardial death after myocardial infarction (MI), which is closely associated to coronary artery disease (CAD), triggers a ventricular remodeling process (VR) that transforms the histoarchitecture of the heart walls, eventually leading to heart failure. Despite the enormous importance of this disease, it is not much what we know on the molec-

ular and cellular mechanisms that control cardiac responses to ischemic pathologic stimuli. Accordingly, MI is pharmacologically treated with standard beta-blockers, anti-arrhythmics and anti-coagulants, but no successful drugs targeting specific cell types are available to treat post-MI inflammation and tissue scarring. In this regard, although cardiac ischemic disease is considered to be an adult, acquired ailment, some studies suggest that several embryonic developmental factors could account for the early onset of this disease. We suggest that understanding the developmental basis of cardiac ischemic disease is key to the development of novel advanced therapies and the discovery of subclinical markers for this condition.

Differentiation of hESC cells into the cardiac 'venous pole'/'cardiac inflow' cell types

Juan Antonio Guadix Domínguez

Department of Animal Biology. Faculty of Science, University of Málaga, Spain



In order to study the molecular regulation of hESC differentiation into 'cardiac inflow cell types' we have used a NKX2.5-GFP hESC line, which shows endogenous reporter expression after NKX2.5 gene activation (Elliott et al., 2011). NKX2-5eGFP/w hESCs, aggregated as spin embryoid bodies (EBs), were induced to differentiate towards "proepicardial/epicardial-like" first by treatment with a cocktail of growth factors containing

Activin-A, BMP4, Stem cell factor (SCF) and a GSK-3 b inhibitor-CHIR-99021 (days 0-3 of differentiation). EBs were treated with BMP4 from day 3 to day 4 of differentiation and EBs were treated with BMP4 + RA (1 microM) from day 4 to day 9 of differentiation. We analyzed the results obtained after culturing NKX2-5eGFP/w hESCs line cells with this different and specific conditioned media. This analysis was done with immunohistochemistry (IHC), quantitative PCR (RT-qPCR) and co-culture assay. We found that after this treatment, EB hESC expressed increased levels for genes such as RALDH2, COUP-TFII, Wt1, TBX5, TBX18, PDGFRa, and E-CADHERIN (RT-qPCR assessed), as compared to regular cardiomyocyte differentiation protocols. All these markers are characteristic of the 'cardiac inflow' (venous pole) of the heart (see Pérez-Pomares & de la Pompa, 2011), so it suggests that cells have acquired a "proepicardial/epicardial-like" phenotype in vitro. But since these genes are not exclusively expressed in epicardial progenitor cells, we further confirmed the functional proepicardial-like properties of RA + BMP4 induced cells using an in vitro co-culture assay and in ovo grafting of NKX2-5eGFP/w hESCs cells into the prospective pericardial cavity of developing chick embryos. Our results showed that NKX2-5eGFP/w hESCs cells can differentiate into embryonic epicardial progenitors and display functional properties of these cells (adhesion and spreading over the myocardium) following RA+BMP4 treatment. These data demonstrate that NKX2-5eGFP/w hESCs cells can be specifically differentiated into epicardial progenitor-like lateral mesodermal cells showing transcriptional and functional properties of their in vivo counterpart.

Metabolic Reprogramming in Cancer: Chimera or Bellerophon?

José Manuel Matés Sánchez

Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Science,
University of Malaga, Spain



Cancer cells commonly exhibit a malignant metabolic phenotype, which is characterized by increased rates of glycolysis and glutaminolysis compared with normal cells. Hence, this property can be therapeutically exploited. It is essential to identify tumour-specific metabolic activities and to learn which activities are necessary for tumour-cell survival, as such pathways would be appealing therapeutic targets. Cancer cells

display a reprogramming of metabolism that facilitates growth but addicts them to key enzyme activities. So, metabolic reprogramming would be Chimera. On the other hand, imaging glucose and/or glutamine metabolism could predict both the presence of specific transforming mutations in the tumor and the targets to fight against cancer. Consequently, metabolic reprogramming might be considered a potential source of therapeutic targets, then Bellerophon. Of note, much of this reprogramming reflects the enhancement of normal metabolic activities already present in non-malignant tissue, rather than the appearance of novel activities confined to the tumor. Glutaminase catalyzes the hydrolysis of glutamine to glutamate, which is used in the citric acid cycle of cancer cells undergoing an aberrant glycolytic flux as a non-glucose-derived source for anaplerosis. There are two different subtypes of glutaminase: GLS and GLS2. The elevated expression of GLS has been observed in several types of cancer, being regulated by the proto-oncogene *c-myc*. In contrast, GLS2 is regulated by the tumor suppressor *p53* and has tumor suppressor features toward gliomas, glioblastomas, lung cancer, and hepatocarcinomas. In addition, metabolic heterogeneity of the tumor, will all have to be taken into consideration when considering therapeutic strategies.

TERCERA PARTE:

Capítulos de proyectos de investigación de predoctorales

Búsqueda y caracterización de nuevos candidatos a fármacos inhibidores de la angiogenesis



Paloma Carrillo,^a Beatriz Martínez-Poveda,^a
Miguel Ángel Medina,^{a,b} Ana R. Quesada^{a,b}

^a Universidad de Málaga, Andalucía Tech, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias e IBIMA, Málaga, ES

^b U741 (CB06/07/0046), CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), 29071 Málaga

Resumen

Esta tesis doctoral va encaminada a la identificación de nuevos compuestos con actividad antiangiogénica. Debido a que la angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso transitorio y poco frecuente en el adulto en condiciones fisiológicas mientras que se asocia a numerosas patologías, la inhibición del proceso angiogénico ha sido postulado como una buena diana terapéutica para dichas enfermedades relacionadas con la angiogénesis. Los dos objetivos de este trabajo son la identificación y caracterización de la actividad *in vitro* e *in vivo* de nuevos candidatos a fármacos inhibidores de la angiogénesis y la aproximación al estudio del mecanismo de acción molecular de dichos candidatos a fármacos. De forma complementaria, se estudiará el uso de nanodispositivos dendriméricos para la vectorización y liberación controlada de los candidatos a fármacos anti-angiogénicos y se incorporarán nuevos ensayos *in vivo* a la batería de ensayos ya establecida por este grupo de investigación, como los modelos de xenotransplante para optimizar el estudio de la angiogénesis en el compuesto tumoral y el ensayo de vascularización de la retina para el tratamiento de retinopatías.

1. Introducción

El término angiogénesis, acuñado por el cirujano escocés John Hunter en 1787¹, designa el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de un lecho vascular preexistente. Se trata de un mecanismo complejo que comprende una serie de pasos coordinados, secuenciales e interdependientes que llevan a la aparición de nuevos vasos en tejidos donde se requiere un mayor aporte sanguíneo. Estos pasos incluyen la activación y proliferación de las células del endotelio, la degradación de la matriz extracelular circundante, la migración y la diferenciación de células endoteliales, así como la morfogénesis y estabilización de los nuevos vasos.^{2,3}

La angiogénesis tiene un papel importante en el desarrollo embrionario, ya que los tejidos se están desarrollando activamente y sus necesidades de nutrición y excreción tienen que ser cubiertas. Sin embargo, en el organismo adulto es un fenómeno poco frecuente, de modo que en su gran mayoría las células endoteliales se encuentran en un estado quiescente y necesitan ser activadas para iniciar el proceso angiogénico. Así, la angiogénesis en el adulto sólo tiene lugar bajo determinadas circunstancias como la reparación de tejidos o la vascularización del endometrio y está estrechamente controlada mediante el equilibrio de una compleja red de señales reguladoras positivas y negativas secretadas tanto por las propias células endoteliales como por su entorno.^{4,5}

1.1. El proceso angiogénico

La angiogénesis consta de una serie de pasos que comprenden la activación del endotelio, la degradación de la matriz extracelular, la migración de las células endoteliales con la formación de un cordón sólido de células endoteliales y, finalmente, la formación del lumen y la estabilización de los vasos nuevos.⁶

El proceso se inicia con la activación endotelial y la degradación de la membrana basal debido al encendido del llamado "interruptor angiogénico". Esta situación tiene lugar cuando se produce el desequilibrio entre señales anti-angiogénicas y pro-angiogénicas a favor de estas últimas.

Dentro de las señales pro-angiogénicas cabe destacar el papel de la familia de factores del crecimiento del endotelio vascular (VEGFs) y de las angiopoyetinas (Ang 1/2), que mediante la unión a sus correspondientes receptores inician cascadas de señalización que llevan a la supervivencia, proliferación y migración de las células endoteliales, lo que conlleva tanto cambios en el interior de estas células con la regulación de la expresión de genes y la reorganización del citoesqueleto, así como cambios en la matriz extracelular circundante.⁵⁻⁸

Sin embargo, estas señales pro-angiogénicas se ven contrarrestadas por moléculas endógenas inhibitoras de la angiogénesis, entre las cuales destacan la angiostatina, arrestina, endostatina o las trombospondinas,⁵ y el crecimiento de nuevos capilares sólo tendrá lugar cuando el equilibrio entre ambos tipos de señales se rompa a favor de las que inducen angiogénesis.

La activación del endotelio conlleva cambios en estas células (mayoritariamente quiescentes) con la aparición de dos nuevos fenotipos morfológica y funcionalmente distintos; las células de la punta (*tip cells*) y las células del tronco (*stalk cells*).⁹ Las células de la punta son células migradoras y polarizadas que hacen las veces de guía hacia la fuente del estímulo pro-angiogénico, mientras que las células del tronco se caracterizan por ser las células proliferativas y formadoras del lumen del nuevo vaso.⁶

Durante la migración de las células endoteliales para formar los nuevos vasos, se producen cambios en los contactos entre células, activándose la expresión de determinadas moléculas de adhesión, tales como las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$.¹⁰ En estas primeras etapas de la angiogénesis, las células endoteliales degradan la matriz extracelular circundante, cuyos componentes además de actuar como soporte para la

migración, suponen una fuente de moléculas reguladoras de la angiogénesis,¹¹ de tal modo que hay moléculas pro-angiogénicas como el VEGF que se encuentran secuestradas en la matriz extracelular y moléculas anti-angiogénicas, como la angiostatina o la endostatina, que son fragmentos de componentes de la matriz extracelular.^{12, 13} Por tanto, la degradación de la matriz extracelular supone la liberación de estas señales moduladoras de la angiogénesis.

En las últimas etapas de la angiogénesis es necesario que el estímulo pro-angiogénico cese, teniendo lugar entonces la morfogénesis y la estabilización de los nuevos capilares. La exocitosis de glicoproteínas y la consecuente repulsión electrostática de sus cargas negativas llevan a la formación del lumen del capilar a partir del cordón sólido de células.^{14, 15} Además, se producen cambios en las uniones entre las células, de modo que dejan de expresar las moléculas de adhesión relacionadas con la migración y comienzan a expresar las moléculas que forman parte de los complejos de adhesión que caracterizan a las células endoteliales, sintetizando finalmente una nueva lámina basal.^{16, 17} Como último paso para la maduración del nuevo vaso, tiene lugar el reclutamiento de células perivasculares, en el que cobran gran importancia las moléculas de señalización como el factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y las angiopoyetinas (Ang 1/2).^{2, 6, 7}

1.2. Angiogénesis patológica y la terapia antiangiogénica

Mientras que en condiciones fisiológicas existe un riguroso equilibrio entre señales pro-angiogénicas y anti-angiogénicas que llevan a que la angiogénesis esté inhibida, determinadas circunstancias patológicas pueden suponer la pérdida del equilibrio fisiológico, dando lugar a un crecimiento no regulado de los vasos sanguíneos. Esta situación se asocia con diversas enfermedades como son la arteriosclerosis, la artritis reumatoide, la psoriasis, las retinopatías diabéticas y la progresión tumoral.^{2, 7}

En el ámbito de la angiogénesis patológica es importante señalar la implicación de la formación de nuevos vasos sanguíneos en la progresión de tumores sólidos siendo una de las “señas de identidad del cáncer”.^{12, 18} La angiogénesis tumoral juega un papel fundamental en el crecimiento tumoral, proporcionando oxígeno y nutrientes, así como favoreciendo la invasión y la metástasis, ya que aumenta la probabilidad de que las células tumorales pasen a circulación.^{19, 20}

Por ello, la inhibición de la formación de nuevos vasos supone una diana terapéutica en la terapia antitumoral y el desarrollo de terapias inhibitoras de la angiogénesis como una nueva estrategia para frenar la progresión tumoral ha despertado un enorme interés en los últimos años,^{21, 22} sin olvidarnos de su aplicabilidad en el tratamiento de otras enfermedades dependientes de angiogénesis.

La terapia anti-angiogénica puede ser directa, dirigida a inhibir directamente a las células endoteliales, o indirecta, bloqueando la unión de estímulos pro-angiogénicos a las células.¹¹ En ambos casos, esta terapia aplicada al cáncer presenta una serie de ventajas que incluyen su menor toxicidad intrínseca, su aplicabilidad a diferentes tipos tumorales y la menor probabilidad de aparición de resistencias al tratamiento.²³

Además presenta un menor riesgo de producir efectos secundarios debido a su mayor especificidad, ya que la angiogénesis es un proceso muy restringido en el organismo adulto y la aparición de diferentes fenotipos de células endoteliales durante el proceso angiogénico con expresión de marcadores característicos proporciona dianas más específicas.² Finalmente, es una terapia muy efectiva, ya que cada vaso del tumor provee de nutrientes y oxígeno a numerosas células tumorales.^{24,25}

En los últimos años la introducción de la nanotecnología ha tomado gran importancia en el desarrollo de nuevas terapias frente a diversas patologías, sobre todo en el ámbito de la liberación controlada de fármacos y la terapia génica.²⁶

Los dendrímeros son estructuras nanométricas formadas por un núcleo y una serie de ramificaciones con grupos funcionales terminales que permite la unión de muchas moléculas de diversa naturaleza.²⁷⁻²⁹ Presentan ciertas características que les hacen idóneos para la liberación dirigida de fármacos,³⁰⁻³² por ejemplo, son partículas monodispersivas resistentes al metabolismo,³³⁻³⁶ solubles en agua,³⁷ disminuyen los efectos secundarios asociados a los fármacos³⁷ y no son inmunogénicas.^{36,37} Este tipo de nanodispositivos se pueden utilizar tanto en estudios *in vitro*³¹ como *in vivo*,^{30,38,39} incluso se ha visto que algunos tipos de dendrímeros tienen capacidad intrínseca de producir efectos anti-angiogénicos *in vitro* e *in vivo* sin la necesidad de unirles fármacos.⁴⁰

Los dendrímeros se clasifican en diferentes generaciones según su tamaño, de modo que aumentando sus "capas" de ramificaciones aumentan de generación. Con el aumento de generación aumenta el número de grupos terminales funcionales y su capacidad de unir otras moléculas, pero también su toxicidad.³⁹ La toxicidad depende sobre todo del tamaño del dendrímero y de la carga, de modo que los de mayor generación y los catiónicos son más tóxicos.^{30,31,41-44}

Para dirigirlo a células endoteliales, se utiliza una estrategia que consiste en conjugar el dendrímero con el péptido RGD (Arg-Gly-Asp) que se une selectivamente a integrinas $\alpha\beta_3$, moléculas expresadas de forma específica por el endotelio activado y no en condiciones normales.⁴⁵ Además de dirigir el dendrímero específicamente al endotelio activado, la conjugación con RGD reduce la toxicidad del nanodispositivo.³⁰

2. Objetivos de la Tesis Doctoral

En este contexto, definimos una serie de objetivos para la realización de la Tesis Doctoral.

- **Objetivo 1:** Identificación y caracterización de la actividad *in vitro* e *in vivo* de nuevos candidatos a fármacos inhibidores de la angiogénesis o de sus nanoconjugados dendriméricos.

Con este primer objetivo pretendemos identificar nuevos compuestos candidatos a fármacos para el tratamiento de aquellas patologías en que la angiogénesis está anormalmente activada.

Estos compuestos pueden proceder de fuentes naturales o ser sintetizados químicamente, normalmente a partir de compuestos naturales cuya actividad anti-angiogénica y/o anti-tumoral ya es conocida, y cuya modificación química

puede suponer una mejora de su actividad. Adicionalmente, estudiaremos el uso de nanodispositivos dendriméricos para la vectorización de los candidatos a fármacos anti-angiogénicos.

- **Objetivo 2:** Aproximación al estudio del mecanismo de acción molecular de los candidatos a fármacos previamente identificados por nuestro grupo de investigación o como fruto del Objetivo 1.

Así, una vez realizada la identificación de las moléculas candidatas y descritas sus propiedades anti-angiogénicas y/o anti-tumorales *in vitro* e *in vivo*, pasaremos a identificar el mecanismo de acción a través del cual dichos compuestos ejercen su efecto.

3. Metodología y organización del trabajo

El abordaje experimental de esta Tesis Doctoral lo podemos agrupar en función de los objetivos anteriormente mencionados.

3.1. Metodología planteada para la identificación y caracterización de la actividad *in vitro* e *in vivo* de nuevos candidatos a fármacos inhibidores de la angiogénesis o de sus nanoconjugados dendriméricos

En relación al primer objetivo, emplearemos una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* puesta a punto en este grupo de investigación para evaluar el potencial anti-angiogénico de compuestos candidatos a fármacos que nos serán proporcionados por parte de empresas y grupos de química colaboradores.

Los ensayos *in vitro* ponen de manifiesto si los compuestos objeto de estudio ejercen un efecto modulador de la angiogénesis y en qué paso o pasos de dicho proceso el efecto tiene lugar, ya que cada ensayo mimetiza una de las diferentes etapas de la angiogénesis.

Como modelo de estudio *in vitro* utilizaremos principalmente células endoteliales de aorta bovina (BAE) y células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVE) aisladas en nuestro laboratorio. También utilizaremos células tumorales en determinados casos con el fin de comparar el efecto que tienen los compuestos candidatos a fármacos sobre los distintos tipos celulares.

Dentro de esta caracterización del potencial anti-angiogénico *in vitro* realizaremos un rastreo primario (“screening”) para identificar qué compuestos presentan actividad inhibidora de angiogénesis, para posteriormente seguir con una caracterización más exhaustiva que nos revele en qué etapa(s) del proceso angiogénico están actuando dichos compuestos (rastreo secundario).

Dentro del rastreo primario, y como primera aproximación al efecto de los compuestos sobre células en cultivo, estudiaremos la viabilidad celular y la toxicidad de los compuestos mediante el ensayo de proliferación celular con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol),⁴⁶⁻⁵⁸ que nos permite determinar la concentración inhibidora 50 (IC₅₀) o dosis a la que el compuesto es capaz de inhibir el crecimiento

de la población celular en un 50%. El segundo ensayo que realizaremos en el rastreo primario será el ensayo de morfogénesis y diferenciación de células endoteliales sobre Matrigel⁴⁶⁻⁵⁴ mediante el cual podemos analizar la capacidad de los compuestos estudiados de interferir en la formación de estructuras tubulares *in vitro*.

Con los compuestos que muestren actividad en los ensayos que componen el rastreo primario, procederemos a realizar el rastreo secundario. Para ello realizaremos primeramente estudios de ciclo celular, con los cuales analizaremos *in vitro* cómo afectan dichos compuestos a la proporción de células del total de la población que se encuentra en cada una de las diferentes fases del ciclo celular. Con estos ensayos podemos observar mediante citometría de flujo si los compuestos producen una parada en alguna de las fases del ciclo celular impidiendo así el crecimiento de la población, e incluso identificar si existe un efecto pro-apoptótico sobre las células.⁵⁵⁻⁵⁸

Por otro lado, evaluaremos los posibles efectos de los compuestos estudiados sobre la capacidad migratoria de las células endoteliales mediante el ensayo *in vitro* de cicatrización de la herida ("wound healing"),⁵²⁻⁵⁴ así como con los ensayos de migración e invasión en cámara de Boyden.⁵⁹⁻⁶¹ En relación a la invasión, estudiaremos la capacidad de los compuestos para interferir en la degradación de la matriz extracelular, analizando su efecto sobre la secreción y actividad de enzimas clave para la degradación durante la angiogénesis, como son las metaloproteinasas de matriz extracelular MMP-2 y MMP-9⁴⁷⁻⁵ y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA).⁶¹ Para ello llevaremos a cabo zimografías de gelatina y de plasminógeno.

Finalmente, en función de los resultados que obtengamos con un determinado compuesto, realizaremos otros ensayos adicionales *in vitro* que permitan completar la caracterización del compuesto, como pueden ser ensayos de adhesión celular a diferentes sustratos,^{46,52} estudios de apoptosis,^{58,60} ensayos de inmunodetección de componentes del citoesqueleto u otras estructuras celulares,⁶² etc.

Para completar el rastreo secundario realizaremos ensayos *in vivo* que nos van a permitir confirmar los resultados obtenidos *in vitro* y nos aproximan a la situación real de una potencial intervención terapéutica, además de evidenciar en su caso posibles efectos secundarios derivados del tratamiento con los compuestos. Así, comprobaremos el efecto que los compuestos seleccionados ejercen sobre el crecimiento fisiológico de vasos sanguíneos durante el desarrollo normal de la membrana corioalantoidea del huevo de pollo.⁴⁹⁻⁵³ También utilizaremos como modelo *in vivo* de angiogénesis al pez cebra (*Danio rerio*), estudiando el efecto de los compuestos sobre la formación de los vasos intersegmentales en embriones de la línea transgénica Tg (*fli-1a: EGFP*)y¹, que permite la visualización directa de los vasos sanguíneos mediante la expresión de la proteína fluorescente en las células endoteliales,^{52,53,57,63} y sobre la formación de vasos sanguíneos durante la regeneración de la aleta caudal en peces adultos.⁵⁷ Además, procederemos a la puesta a punto de un modelo de xenotransplante ("xenograft") en este modelo animal^{64,65} para estudiar la angiogénesis en el contexto del tumor.

Dentro del Objetivo 1 también se contempla la optimización de las propiedades de los compuestos anti-angiogénicos mediante el uso de nanovectores, que serán generados en colaboración con el Laboratorio de Dendrímeros Biomiméticos y Fotónica de la Universidad de Málaga. En concreto trabajaremos con estructu-

ras dendriméricas portadoras del péptido Arg-Gly-Asp (RGD) y de un marcaje fluorescente que nos permitirá su seguimiento. El péptido RGD es reconocido por las integrinas $\alpha\beta 3$ que expresan de forma característica las células del endotelio activado, lo que nos permitirá direccionar los compuestos de forma específica a las células endoteliales que estén en ese momento involucradas en la formación de nuevos vasos.⁴⁵

Inicialmente realizaremos ensayos para comprobar su biocompatibilidad, es decir, que estos vectores no produzcan toxicidad por sí mismos. Posteriormente, el marcaje fluorescente nos permitirá hacer un seguimiento del vector, con lo que podremos realizar el estudio de la internalización (“uptake”) por parte de las células endoteliales mediante citometría de flujo y de localización celular mediante microscopía confocal. Una vez esté puesto a punto el estudio *in vitro*, pasaremos al estudio *in vivo*, en el cual evaluaremos el efecto de los dendrímeros en sí sobre la vasculatura en embriones de pez cebra. Finalmente, cuando se determinen las condiciones óptimas de uso de estos dendrímeros, se procederá a la incorporación de compuestos caracterizados como anti-angiogénicos durante el progreso de esta tesis o con anterioridad por nuestro grupo de investigación. Esta aproximación nos permitirá evaluar la correcta direccionalización y liberación controlada del compuesto y si se mantienen los efectos del mismo.

3.2. Metodología planteada para la aproximación al estudio del mecanismo de acción molecular de los candidatos a fármacos previamente identificados por nuestro grupo o como fruto del Objetivo 1

Para el estudio del mecanismo de acción de los compuestos candidatos a fármacos emplearemos técnicas de biología molecular y celular que nos permitirán identificar las rutas de bioseñalización concretas sobre las cuales están actuando dichos compuestos.

Los diferentes eventos que tienen lugar en el proceso angiogénico, tales como la proliferación, migración o diferenciación, son producto de la activación de diferentes cascadas de señalización que se inician gracias a la unión de moléculas pro-angiogénicas a receptores de las células endoteliales. Estas moléculas pro-angiogénicas son principalmente factores de secreción paracrinos o componentes de la matriz extracelular.⁸

Dentro de los receptores expresados por las células endoteliales y responsables de la activación de estas cascadas de señalización, destacan los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), especialmente el VEGFR2. La activación de dicho receptor por fosforilación es necesaria para que comience el proceso de formación de nuevos vasos, de modo que activa rutas de señalización involucradas en la proliferación y supervivencia de las células endoteliales.^{5,8} Entre estas rutas de señalización se encuentran la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos ERK/MAPK y la ruta de señalización PI3K/Akt.⁸ Además de estar involucrado en la proliferación y supervivencia, la activación de VEGFR2 también lleva a la formación y extensión de filopodios en la migración de las células endoteliales.⁶

Por su parte, la activación del receptor Tie-2 por la unión de la angiopoyetina Ang-1 también activa la ruta de supervivencia mediada por Akt y, además, interviene en el mantenimiento de vasos maduros.⁵

En la actualidad, un gran número de fármacos anti-angiogénicos son inhibidores de la señalización mediada por VEGF, entre ellos, agentes que tienen como diana VEGFR,^{4,8} y otros inhiben las cascadas de señalización por MAPK, como el resveratrol.⁸

Por todo ello, y con el fin de encontrar cuál es el mecanismo de acción de los candidatos a fármacos anti-angiogénicos, estudiaremos el perfil de expresión de diversos genes implicados en la modulación de la angiogénesis mediante qPCR^{48,66} y la posible inhibición de la fosforilación de receptores de factores pro-angiogénicos y otras proteínas involucradas en vías de señalización de relevancia en la angiogénesis mediante *Western blot*,^{47,48,66,57} como lo son el receptor VEGFR2, las quinasas implicadas en rutas de supervivencia celular (ERK/MAPK o Akt) o la quinasa asociada a adhesiones focales (FAK).⁵

4. Estado actual de la Tesis Doctoral

En relación al Objetivo 1, se ha realizado el rastreo primario de varios grupos de compuestos sintetizados por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Francisco Sarabia García del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Málaga, entre ellos una serie de compuestos derivados de la síntesis de la solomonamida.⁶⁷

Por otra parte, se han realizado los rastreos primario y secundario de un compuesto sintético derivado de una hormona vegetal mediante los cuales se ha comprobado su potencial anti-angiogénico *in vitro* e *in vivo*. Los resultados indican que dicho compuesto afecta a diferentes etapas del proceso angiogénico como son la proliferación, migración, diferenciación y capacidad de degradación de la matriz extracelular de las células endoteliales, presentando además una potente actividad anti-angiogénica sobre la vascularización de la membrana corioalantoidea del huevo de pollo y sobre la formación de los vasos sanguíneos intersegmentales en embriones transgénicos de pez cebra. Actualmente se está caracterizando su mecanismo de acción a nivel molecular dentro del marco del Objetivo 2.

Además, los resultados derivados de esta Tesis Doctoral se verán reforzados mediante la estancia que se va a realizar de forma inminente en el grupo de investigación del Prof. Marco Presta, del Departamento de Medicina Molecular y Translacional de la Escuela de Medicina de la Universidad de Brescia (Italia). En el transcurso de esta estancia optimizaremos el uso del modelo del pez cebra para testar fármacos anti-angiogénicos, permitiendo además incluir nuevos ensayos *in vivo* en pez cebra a nuestro grupo de investigación, como son los modelos de xenotransplante para la evaluación de los efectos de los compuestos sobre la angiogénesis tumoral^{65,68} y los ensayos de angiogénesis en la retina de *D. Rerio*.^{69,70} Esto nos permitirá ampliar el ámbito de aplicación de nuestros compuestos a otras patologías.

Financiación

Este trabajo está financiado por fondos asociados a los proyectos P12-CTS-1507 (Junta de Andalucía y FEDER) y BIO2014-56092-R (MINECO y FEDER), y por fondos del grupo BIO-267 (Junta de Andalucía). Paloma Carrillo disfruta de una beca predoctoral con cargo al proyecto P12-CTS-1507 (Junta de Andalucía y FEDER).

Bibliografía

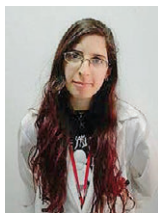
1. LENZI P, BOCCI G, NATALE G. John Hunter and the origin of the term “angiogenesis.” *Angiogenesis*. 2016;19(2):255-6.
2. QUESADA AR, MEDINA MÁ, MUÑOZ-CHÁPULI R. *Angiogénesis*. Málaga: Servicio de Publicaciones Universidad de Málaga; 2004.
3. KHOSRAVI SHAHI P, SORIA LOVELLE A, PÉREZ MANGA G. Tumoral angiogenesis and breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2009;11(3):138-42.
4. CARMELIET P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-6.
5. TONINI T, ROSSI F, CLAUDIO PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 2003; 22:6549-56.
6. RIBATTI D, CRIVELLATO E. “Sprouting angiogenesis”, a reappraisal. *Dev Biol*. 2012;372(2): 157-65.
7. CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003 Jun 1;9:653.
8. MUÑOZ-CHÁPULI R, QUESADA AR, MEDINA MÁ. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(17):2224-43.
9. GERHARDT H, GOLDING M, FRUTTIGER M, RUHRBERG C, LUNDKVIST A, ABRAMSSON A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;615(6):21-9525.
10. FAN T-P, YEH J-C, LEUNG KW, YUE PYK, WONG RNS. Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(6): 297-309.
11. FOLKMAN J. Fundamental Concepts of the Angiogenic Process. *Curr Mol Med*. 2003;3(7):643-51.
12. HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-74.
13. KESSENBROCK K, PLAKS V, WERB Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67.
14. MARTIN-BELMONTE F, GASSAMA A, DATTA A, YU W, RESCHER U, GERKE V, et al. PTEN-Mediated Apical Segregation of Phosphoinositides Controls Epithelial Morphogenesis through Cdc42. *Cell*. 2007;128(2):383-97.
15. FERRARI A, VELIGODSKIY A, BERGE U, LUCAS MS, KROSCHEWSKI R. ROCK-mediated contractility, tight junctions and channels contribute to the conversion of a preapical patch into apical surface during isochoric lumen initiation. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 21):3649-63.
16. DEJANA E. Perspectives Series: Cell Adhesion in Vascular Biology Endothelial Adherens Junctions: Implications in the Control of Vascular Permeability and Angiogenesis. *J Clin Invest*. 1996;98(9):1949-53.
17. IRUELA-ARISPE ML, DAVIS GE. Developmental Cell Cellular and Molecular Mechanisms of Vascular Lumen Formation. *Dev Cell*. 2009; 16:222-31.
18. HANAHAN D, WEINBERG RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
19. EICHHORN ME, STRIETH S, DELLIAN M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. *Drug Resist Updat*. 2004;7:125-38.
20. ELLIS LM, FIDLER IJ. Angiogenesis and Metastasis. 1996;32(14):2451-60.

21. FOLKMAN J. Anti-Angiogenesis: New Concept for Therapy of Solid Tumors. *Ann Surg.* 1972; 175(3): 409-416.
22. FOLKMAN J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med.* 1971; 285(21):1182-6.
23. MEDINA MÁ, MUÑOZ-CHÁPULI R, QUESADA AR. Challenges of antiangiogenic cancer therapy: trials and errors, and renewed hope. *J Cell Mol Med.* 2007;11(3):374-82.
24. AL-HUSEIN B, ABDALLA M, TREPTE M, DEREMER DL, SOMANATH PR. Anti-angiogenic therapy for cancer: An update. *Pharmacotherapy.* 2012; 32(12):1095-1111.
25. KUBOTA Y. Tumor Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy. *Keio J Med.* 2012;61(2):47-56.
26. PRASAD M, LAMBE UP, BRAR B, SHAH I, JM, RANJAN K, RAO R, KUMAR S, MAHANT S, KHURANA SK, IQBAL HMN, DHAMA K, MISRI J, PRASAD G. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:1521-1537.
27. PIGNATELLO R, MUSUMECI T, IMPALLOMENI G, CARNEMOLLA GM, PUGLISI G, BALLISTRERI A. Poly (3-hydroxybutyrate-co- ϵ -caprolactone) copolymers and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co- ϵ -caprolactone) terpolymers as novel materials for colloidal drug delivery systems. *Eur J Pharm Sci.* 2009;37(3), 451-462.
28. ULASZEWSKA MM, HERNANDO MD, MORENO AU, GARCÍA AV, CALVO EG, FERNÁNDEZ-ALBA AR. Identification and quantification of poly(amidoamine) PAMAM dendrimers of generations 0 to 3 by liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in aqueous medium. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013;27(7):747-762.
29. FRECHET JM. Dendrimers and supramolecular chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):4782-4787.
30. KING HEIDEN TC, DENGLER E, KAO WJ, HEIDEMAN W, PETERSON RE. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 225(1), 70-79.
31. BODEWEIN L, SCHMELTER F, DI FIORE S, HOLLERTE H, FISCHER R, FENSKE M (2016). Differences in toxicity of anionic and cationic PAMAM and PPI dendrimers in zebrafish embryos and cancer cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;305, 83-92.
32. TOMALIA DA, REYNA LA, SVENSON S. Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(1), 61-67.
33. SPETZLER JC, TAM JP. Unprotected peptides as building blocks for branched peptides and peptide dendrimers. *Int J Pept Protein Res.* 1995; 45(1), 78-85.
34. KIM Y, ZIMMERMAN SC. Applications of dendrimers in bio-organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol.* 1998; 2(6), 733-742.
35. SADLER K, TAM JP. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Rev Mol Biotechnol.* 2002; 90(3), 195-229.
36. BRACCI L, FALCIANI C, LELLI B, LOZZI L, RUNCY Y, PINI A, DE MONTIS MG, TAGLIAMONTE A, NERI P. Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J Biol Chem.* 2003; 278, 46590-46595.
37. SHUKLA R, THOMAS TP, PETERS J, KOTLYAR A, MYC A, BAKER JR JR. Tumor angiogenic vasculature targeting with PAMAM dendrimer-RGD conjugates. *Chem Commun (Camb).* 2005;(46):5739-41.
38. OLIVEIRA E, CASADO M, FARIA M, SOARES AM, NAVAS JM, BARATA C, PIÑA B. Transcriptomic response of zebrafish embryos to polyamidoamine (PAMAM) dendrimers. *Nanotoxicology.* 2014; 8(sup1), 92-99.
39. PRYOR JB, HARPER BJ, HARPER SL. Comparative toxicological assessment of PAMAM and thiophosphoryl dendrimers using embryonic zebrafish. *Int J Nanomed.* 2014; 9, 1947-1956.
40. AL-JAMAL KT, AL-JAMAL WT, AKERMAN S, PODESTA JE, YILMAZER A, TURTON JA, BIANCO A, VARGESSON N, KANTHOU C, FLORENCE AT, TOZER GM, KOSTARELOS K. Systemic antiangiogenic activity of cationic poly-L-lysine dendrimer delays tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(9):3966-71.
41. ROBERTS JC, BHALGAT MK, ZERA RT. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine

- (PAMAM) Starburst™ dendrimers. *J Biomed Mater Res.* 1996; 30(1), 53-65.
42. SHAH N, STEPTOE RJ, PAREKH HS. Low-generation asymmetric dendrimers exhibit minimal toxicity and effectively complex DNA. *J Pept Sci.* 2011; 17(6):470-478.
 43. NAHA PC, DAVOREN M, CASEY A, BYRNE HJ. An ecotoxicological study of poly(ami-doamine) dendrimers-toward quantitative structure activity relationships. *Environ Sci Technol.* 2009;43(17):6864-6869.
 44. NAHA PC, BYRNE HJ. Generation of intracellular reactive oxygen species and genotoxicity effect to exposure of nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimers in PLHC-1 cells in vitro. *Aquat Toxicol.* 2013; 132-133:61-72.
 45. BROOKS PC, CLARK RA, CHERESH DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 1994;264(5158): 569-71.
 46. GARCÍA-VILAS JA, QUESADA AR, MEDINA MÁ. 4-Methylumbelliferone Inhibits Angiogenesis in Vitro and in Vivo. *J Agric Food Chem.* 2013;61(17):4063-71.
 47. GARCÍA-CABALLERO M, CAÑEDO L, FERNÁNDEZ-MEDARDE A, MEDINA MÁ, QUESADA AR. The Marine Fungal Metabolite, ADO157, Inhibits Angiogenesis by Targeting the Akt Signaling Pathway. *Mar Drugs.* 2014;12(1): 279-99.
 48. MARTÍNEZ-POVEDA B, GARCÍA-VILAS JA, CÁRDENAS C, MELGAREJO E, QUESADA AR, MEDINA MA. The Brominated Compound Aeropysinin-1 Inhibits Proliferation and the Expression of Key Pro- Inflammatory Molecules in Human Endothelial and Monocyte Cells. *PLoS One.* 2013;8(1):1-10.
 49. CÁRDENAS C, QUESADA AR, MEDINA MA. Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cell Mol Life Sci C.* 2006; 63(24):3083-9.
 50. LÓPEZ-JIMÉNEZ A, GARCÍA-CABALLERO M, MEDINA MÁ, QUESADA AR. Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur J Nutr.* 2013;52(1):85-95.
 51. CASTRO ME, GONZÁLEZ-IRIARTE M, BARRERO AF, SALVADOR-TORMO N, MUÑOZ-CHÁPULI R, MEDINA MÁ, et al. Study of puerpeneone and related compounds as inhibitors of angiogenesis. *Int J Cancer.* 2004;110(1):31-8.
 52. GARCÍA-VILAS JA, PINO-ÁNGELES A, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MÁ. The noni anthraquinone damnacanthal is a multi-kinase inhibitor with potent anti-angiogenic effects. *Cancer Lett.* 2017;385:1-11.
 53. GARCÍA-CABALLERO M, MARÍ-BECCA M, MEDINA MÁ, QUESADA AR. Dimethylfumarate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo: A possible role for its antipsoriatic effect. *J Invest Dermatol.* 2011;131(6):1347-55.
 54. MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MÁ. Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2005;516(2):97-103.
 55. CÁRDENAS C, QUESADA AR, MEDINA MA. Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene. McCormick DL, editor. *PLoS One.* 2011;6(8):e23407.
 56. MARTÍNEZ-POVEDA B, MUÑOZ-CHÁPULI R, RODRÍGUEZ-NIETO S, QUINTELA JM, FERNÁNDEZ A, MEDINA M-Á, et al. IB05204, a dichloropyridodithienotriazine, inhibits angiogenesis in vitro in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(10):2675 LP-2685.
 57. GARCÍA-CABALLERO M, MARÍ-BECCA M, CAÑEDO L, MEDINA MÁ, QUESADA AR. Toluquinol, a marine fungus metabolite, is a new angi-suppressor that interferes the Akt pathway. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(12):1727-40.
 58. MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA. The anti-angiogenic 8-epipuupehedione behaves as a potential anti-leukaemic compound against HL-60 cells. *J Cell Mol Med.* 2008;12(2):701-6.
 59. MARTÍNEZ-POVEDA B, CHAVARRÍA T, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, QUESADA AR, MEDINA MÁ. An in vitro evaluation of the effects of homocysteine thiolactone on key steps of angiogenesis and tumor invasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311(3):649-53.
 60. RODRIGUEZ-NIETO S, CHAVARRÍA T, MARTÍNEZ POVEDA B, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, RODRÍGUEZ QUESADA A, MEDINA M. Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293:497-500.

61. RODRÍGUEZ-NIETO S, GONZÁLEZ-IRIARTE M, CARMONA R, MUÑOZ-CHÁPULI R, MEDINA MA, QUESADA AR. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge. *FASEB J*. 2002;16(2):261-3.
62. KAMATH K, SMİYUN G, WILSON L, JORDAN MA. Mechanisms of inhibition of endothelial cell migration by taxanes. *Cytoskeleton*. 2014; 71(1):46-60.
63. LAWSON ND, WEINSTEIN BM. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol*. 2002;248(2): 307-18.
64. CHENG J, GU Y-J, WANG Y, HAN CHENG S, WONG W-T. Nanotherapeutics in angiogenesis: synthesis and in vivo assessment of drug efficacy and biocompatibility in zebrafish embryos. *Int J Nanomedicine*. 2011;(6):2007-21.
65. TOBIA C, DE SENA G, PRESTA M. Zebrafish embryo, a tool to study tumor angiogenesis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):505-9.
66. GARCÍA-VILAS JA, MEDINA MA, MELO FR, PEJLER G, GARCIA-FAROLDI G. Damnacanthal inhibits IgE receptor-mediated activation of mast cells. *Mol Immunol*. 2015;65(1):86-93.
67. CHENG-SÁNCHEZ I, CARRILLO P, SÁNCHEZ-RUIZ A, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MA, et al. Exploring the Ring-Closing Metathesis for the Construction of the Solomonamide Macrocyclic Core: Identification of Bioactive Precursors. *J Org Chem*. 2018;83(10): 5365-83.
68. TOBIA C, GARIANO G, DE SENA G, PRESTA M. Zebrafish embryo as a tool to study tumor/ endothelial cell cross-talk. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis*. 2013;1832(9):1371-7.
69. REZZOLA S, BELLERI M, GARIANO G, RIBATTI D, COSTAGLIOLA C, SEMERARO F, PRESTA M. In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. *Angiogenesis*. 2014;17(3):429-42.
70. Rezzola S, Paganini G, Semeraro F, Presta M, Tobia C. Zebrafish (*Danio rerio*) embryo as a platform for the identification of novel angiogenesis inhibitors of retinal vascular diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2016; 1862(7):1291-6.

Estudios del metabolismo endotelial y tumoral y su relación con la angiogénesis



M.ª Carmen Ocaña,^a Miguel Ángel Medina^{a, b}

^a Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, and IBIMA (Biomedical Research Institute of Málaga), Andalucía Tech, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

^b CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Málaga, Spain

Resumen

La reprogramación metabólica se considera una de las señales distintivas del cáncer. Por ello, el estudio del metabolismo tumoral vuelve a estar en el punto de mira de la investigación. Sin embargo, las células tumorales no están solas, sino que se encuentran en lo que se conoce como el microambiente tumoral, dentro del cual las distintas células interactúan entre sí. Además, la exacerbación patológica de la angiogénesis también es considerada una de las señales distintivas del cáncer, aunque también se da en otro tipo de enfermedades. Por tanto, conocer el metabolismo de las células endoteliales, encargadas de llevar a cabo el proceso angiogénico, es fundamental para poder dilucidar nuevas dianas para terapia anti-angiogénica. El objetivo de la tesis doctoral que aquí se describe es estudiar el metabolismo de células tumorales y endoteliales, así como su posible relación con la angiogénesis y su tratamiento apuntando a dianas tanto de rutas metabólicas como de la base molecular de la angiogénesis.

1. Introducción

El estudio del metabolismo tumoral empezó a cobrar interés en los años 20, cuando Otto Warburg comenzó a interesarse por la producción de ácido láctico en tumores.¹ 30 años más tarde, propuso lo que ahora conocemos como “efecto Warburg”, un claro ejemplo de reprogramación metabólica por el cual los tumores son capaces de seguir la fermentación láctica en presencia de oxígeno en lugar de destinar la glucosa a su oxidación a través del ciclo de Krebs para la obtención de energía.² A pesar de ser menos eficiente por su aparente menor ganancia energética en forma de ATP, este proceso, que en inglés se conoce como *aerobic glycolysis*, permite a las células tumorales (y, en general, a las células con una alta tasa de proliferación) obtener finalmente más energía en menos tiempo, así como obtener grandes cantidades de poder reductor y los esqueletos necesarios para la biosíntesis de nuevas moléculas.³

Sin embargo, la glucosa no es el único sustrato metabólico de importancia para los tumores. La glutamina también tiene un papel fundamental en el metabolismo tumoral, llegando a ser el combustible de preferencia para algunos tumores.⁴⁻⁶ De hecho, la glutamina se considera un aminoácido esencial para las células tumorales.⁷ Por otra parte, se ha visto que células tumorales altamente proliferativas tienen una gran avidez por los ácidos grasos.⁸ Otras moléculas son igualmente esenciales para el metabolismo tumoral, tales como la asparragina, la serina, la glicina, el óxido nítrico (NO) o las poliaminas, entre otros.⁹⁻¹²

En los últimos años, no sólo el metabolismo de las células tumorales ha recobrado importancia tras una época de abandono, sino que el estudio del metabolismo de otras células del microambiente tumoral también está en auge. Entre estas células del microentorno se encuentran las células endoteliales, responsables de llevar a cabo el proceso angiogénico. La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes.¹³ Este proceso se encuentra exacerbado de forma patológica en varias enfermedades, incluidas las retinopatías, la artritis y el cáncer. Diversos factores pro- y anti-angiogénicos liberados por distintas células del microambiente tumoral controlan esta activación patológica de la angiogénesis en cáncer.¹⁴

El metabolismo de las células endoteliales ya se había estudiado en el siglo pasado. Sin embargo, había discrepancias entre distintos trabajos. En 1991 Spolarics y colaboradores determinaron que hasta un 45% del ATP total generado por células endoteliales de hígado de rata procedía de la oxidación del palmitato, y hasta un 26% de la glutamina.¹⁵ Otros encontraron una actividad glutaminasa unas 20 veces mayor en células endoteliales pulmonares bovinas en comparación con linfocitos de rata, así como una alta expresión del enzima carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a), indicando una gran importancia del metabolismo de la glutamina y los ácidos grasos. Sin embargo, también midieron una gran actividad de enzimas glucolíticas.¹⁶ De hecho, varios grupos determinaron, utilizando distintos modelos de células endoteliales, que este tipo celular es preferentemente fermentativo incluso en presencia de oxígeno.¹⁷⁻¹⁹ A raíz de estos resultados, se propuso que las células endoteliales dependen del metabolismo de glutamina y ácidos grasos cuando disminuye la glucosa disponible.²⁰ Recientemente, otros grupos han confirmado la alta tasa fermentativa de las células endoteliales utilizando diferentes aproximaciones metodológicas.^{21,22} Alterar el metabolismo de estas células afecta, en consecuencia, al correcto desarrollo de la angiogénesis. Por ejemplo, la inhibición de la enzima fosfofructokinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3 (PFKFB3) afecta negativamente al proceso angiogénico y normaliza la formación de vasos en tumores.^{23,24} Además de la importancia de la glucosa en el metabolismo endotelial, también se ha visto que la oxidación de ácidos grasos es esencial para la angiogénesis, ya que promueve la síntesis *de novo* de nucleótidos, facilitando la proliferación de las células endoteliales. De hecho, la inhibición de CPT1a afecta a la formación de tubos en células endoteliales en cultivo.²⁵ En cuanto a la glutamina, este aminoácido es necesario para la proliferación de las células endoteliales sin tener ningún efecto en su migración.²⁶

2. Objetivos de la tesis doctoral

La tesis doctoral en la que se centra este capítulo tiene como título «*Estudios de metabolismo en el microambiente angiogénico como potencial diana para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades dependientes de angiogénesis*». Como se puede deducir del mismo, esta tesis tiene dos objetivos fundamentales: por un lado, conocer mejor el metabolismo de las células del microambiente angiogénico, y, por otro lado, caracterizar dianas metabólicas que tengan un efecto sobre la angiogénesis en el contexto tumoral y/o de otras enfermedades. Concretamente, los objetivos se formularon originalmente como sigue:

- **Objetivo 1:** Contribuir al conocimiento del metabolismo lipídico y nitrogenado en células endoteliales y otros tipos celulares presentes en los microambientes angiogénicos.
- **Objetivo 2:** Valorar en células presentes en los microambientes angiogénicos los efectos de compuestos moduladores de la angiogénesis, la inflamación y el metabolismo y buscar combinaciones sinérgicas de fármacos anti-angiogénicos y moduladores del metabolismo.

Como se puede observar, el primer objetivo se centra preferentemente en el metabolismo de lípidos y compuestos nitrogenados, ya que el metabolismo glucídico está más estudiado en células endoteliales y otras células del microentorno. En cuanto al segundo objetivo, abarca no solo el efecto de compuestos sobre el metabolismo y la angiogénesis, sino también sobre la inflamación. Esto es debido a que muchos compuestos caracterizados como anti-angiogénicos presentan también actividad anti-inflamatoria.^{27,28} Además, la combinación de al menos dos compuestos que modulen el metabolismo y/o la angiogénesis podría potenciar su efecto sobre la inhibición de los distintos pasos del proceso angiogénico.^{29,30}

3. Diseño experimental

3.1. En relación con el objetivo 1

Se plantea cubrir el primero de los objetivos a través de dos tareas:

- Tarea 1.1: Estudio de dianas de control metabólico en células endoteliales y otros tipos celulares de los microambientes angiogénicos.
- Tarea 1.2: Estudio del uso de glutamina y ácidos grasos como sustratos alternativos a la glucosa en células endoteliales y otros tipos celulares de los microambientes angiogénicos.

El metabolismo de las células endoteliales es una diana potencial para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis.^{31,32} Por tanto, conocer los puntos de control metabólico de las mismas puede ser importante para establecer nuevas dianas para el tratamiento de enfermedades dependientes del metabolismo endotelial y, por tanto, dependientes de angiogénesis. Para cumplir con la primera

tarea, nos propusimos, pues, estudiar distintos puntos de control metabólico y actividades de enzimas reguladoras de distintas rutas metabólicas en células endoteliales y otras células del microambiente angiogénico en distintas condiciones de cultivo, como normoxia/hipoxia, quiescencia/proliferación o presencia/ausencia de medios acondicionados de células tumorales. Para ello, se analizarían los niveles de expresión génica y de proteína mediante PCR cuantitativa (qPCR), *Western blot* y se medirían distintas actividades enzimáticas.

Como ya se ha indicado previamente, el metabolismo glucídico, por lo general, está más estudiado en células en cultivo que el de otros sustratos metabólicos igualmente importantes, como la glutamina o el de los ácidos grasos. Uno de los objetivos de esta tesis consiste precisamente en establecer la preferencia por sustrato metabólico de células endoteliales y otras células del microambiente, así como la influencia de unos sustratos metabólicos en la utilización y/o incorporación de los otros. El uso de tecnologías más recientes, como la detección de moléculas fluorescentes por citometría de flujo, el analizador de flujo extracelular *Seahorse* o la espectrometría de masas, en combinación con técnicas radiométricas y ensayos enzimáticos permitiría responder a las preguntas planteadas en esta tarea.

3.2. En relación con el objetivo 2

Se plantea cumplir el segundo objetivo de esta tesis doctoral mediante la realización de tres tareas:

- Tarea 2.1: Estudio de la capacidad anti-inflamatoria y moduladora del metabolismo de compuestos previamente descritos por el grupo como anti-angiogénicos.
- Tarea 2.2: Estudio de los efectos sobre la angiogénesis de compuestos moduladores del metabolismo.
- Tarea 2.3: Búsqueda de combinaciones sinérgicas de compuestos anti-angiogénicos y moduladores del metabolismo.

Como se mencionó anteriormente, es común que compuestos con un carácter anti-angiogénico posean también capacidad anti-inflamatoria.^{27,28} Además, dada la clara relación entre el metabolismo endotelial y la angiogénesis, compuestos anti-angiogénicos podrían ser candidatos a afectar a alguna característica del metabolismo de células endoteliales. De hecho, para multitud de compuestos conocidos como moduladores de distintas rutas del metabolismo se ha encontrado que también poseen potencial como anti-angiogénicos.^{21,33-36} Para comprobar la capacidad anti-inflamatoria de estos compuestos, se medirían los niveles de expresión génica y de proteínas mediante *Western blot*, así como hacer *arrays* de citoquinas y otros ensayos convenientes en función de los resultados obtenidos. Respecto a la capacidad moduladora del metabolismo, se utilizarían los mismos tipos de aproximación experimental que en las tareas 1.1 y 1.2, con la diferencia de añadir los compuestos anti-angiogénicos correspondientes.

En la tarea 2.2 se tiene en cuenta la misma base teórica que para la tarea 2.1. Compuestos moduladores del metabolismo podrían ser compuestos con potencial carácter anti-angiogénico, tal y como se especificó anteriormente. Por tanto, para el cumplimiento de esta tarea se estudiarían los efectos de la modulación de puntos reguladores del metabolismo, sea esta modulación farmacológica o génica, sobre la angiogénesis, utilizando ensayos *in vitro* (ensayos de proliferación, migración, invasión, tubulogénesis, etc) e *in vivo* descritos en la bibliografía.^{13,37}

Anteriormente en nuestro grupo se ha estudiado el efecto combinado de compuestos anti-angiogénicos y anti-tumorales sobre los distintos pasos del proceso angiogénico, como puede ser la proliferación celular endotelial y tumoral, mostrando un efecto sinérgico.³⁸ Por tanto, la última tarea de la tesis doctoral que aquí se presenta consistiría en estudiar el posible efecto sinérgico sobre los distintos pasos de la angiogénesis de un compuesto caracterizado como anti-angiogénico y un modulador del metabolismo para el cual hubiéramos comprobado previamente que presenta actividad anti-angiogénica. Para la realización de esta tarea, se emplearía la misma metodología que para la tarea 2.2.

4. Estado actual del desarrollo de la tesis doctoral

A fecha de la escritura de este capítulo, la tesis doctoral en la que se centra este capítulo presenta avances para ambos objetivos de la misma.

4.1. Estado del objetivo 1

En cuanto al primero de los objetivos, se han estudiado distintas características del metabolismo de dos líneas celulares en cultivo: la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 y la línea de endotelio microvascular HMEC, ambas de origen humano. Para ello, se han utilizado, hasta el momento, distintas aproximaciones metodológicas, como el analizador de flujo extracelular Seahorse, la incorporación de análogos fluorescentes de sustratos metabólicos por citometría de flujo y ensayos radiométricos, así como medidas de expresión génica y de proteínas mediante qPCR y *Western blot*, en condiciones de normoxia/hipoxia. Además de esto, se está colaborando actualmente con el grupo de la Dra. Marta Cascante de la Universidad de Barcelona, que posee una amplia experiencia en estudios de metabolómica.^{39,40} También se ha establecido colaboración con el grupo del Dr. Ralph DeBerardinis de la UT Southwestern en Dallas, EEUU, para lo cual la doctoranda va a realizar una estancia de tres meses en su laboratorio para aprovechar la experiencia y metodología allí disponibles para la realización de experimentos de metabolómica, fluxómica y edición génica.^{41,42} Adicionalmente, se pretende establecer una colaboración con el grupo de la Dra. Sonia Osorio de la Universidad de Málaga, quien tiene experiencia en ensayos de metabolómica en modelos vegetales, brindando la oportunidad de aplicar sus conocimientos y metodología a nuestros modelos en células humanas.^{43,44}

4.2. Estado del objetivo 2

Para el segundo y más diverso de los objetivos se ha avanzado a distintos niveles para cada una de las tareas correspondientes.

Respecto al estudio de la capacidad anti-inflamatoria de compuestos descritos como anti-angiogénicos por el grupo, en primer lugar se realizó un barrido inicial utilizando un *array* para distintas citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento, utilizando distintas líneas celulares y compuestos anti-angiogénicos. Fruto de este primer barrido, se seleccionaron dos compuestos con un potencial carácter anti-inflamatorio. Más concretamente, uno de ellos fue seleccionado como un candidato a modular la capacidad de quimioatracción celular. A partir de los resultados obtenidos, se pretenden realizar experimentos adicionales de medidas de expresión génica, así como repeticiones de los ensayos ELISA correspondientes y aquellos ensayos de quimioatracción pertinentes en función de los resultados que se obtengan.

En relación con la angiogénesis y el metabolismo, se propusieron dos tareas. Por una parte, la caracterización de nuevos compuestos anti-angiogénicos con un conocido efecto sobre el metabolismo. A este respecto, tras estudiar la bibliografía y hacer una serie de pruebas, se ha seleccionado un compuesto que finalmente ha presentado capacidad anti-angiogénica *in vitro* e *in vivo* en nuestro laboratorio y que podrá dar lugar a un artículo de investigación original. Por otra parte, el estudio de la capacidad para modular el metabolismo de compuestos previamente descritos por el grupo ha abierto un frente con un compuesto prometedor, para el cual ya se han realizado varios ensayos, incluyendo uno en colaboración con el grupo de la Dra. Marta Cascante, en varias líneas celulares tumorales y endoteliales.

En cuanto a los estudios de sinergias entre compuestos anti-angiogénicos y moduladores del metabolismo, se pretende comenzar esta tarea en los últimos meses de la tesis doctoral, una vez se complementen más experimentos y se tengan más resultados para las tareas anteriores, que permitirán decisiones más selectas acerca de cómo abarcar esta tarea.

4.3. Producción adicional

Además de los resultados experimentales obtenidos, en el marco de la realización de esta tesis doctoral se han elaborado un artículo de mini-revisión y un artículo de revisión, ambos acerca del metabolismo en el microambiente tumoral.^{45, 46}

Financiación

M^a Carmen Ocaña posee una ayuda predoctoral FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. El trabajo descrito en este capítulo está financiado por los proyectos BIO2014-56092-R (MINECO y FEDER), P12-CTS-1507 (Junta de Andalucía y FEDER), y financiación del grupo BIO-267 (Junta de Andalucía). El CIBER de Enfermedades Raras es una iniciativa del ISCIII (España). Los financiadores no

intervinieron en el diseño del estudio, la recogida y análisis de datos, la decisión de publicar, o la preparación del manuscrito.

Bibliografía

1. WARBURG O. The metabolism of carcinoma cells. *J Cancer Res.* 1925;9:148–63.
2. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309–14.
3. VANDER HEIDEN MG, CANTLEY L, THOMPSON C. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029–33.
4. DEBERARDINIS RJ, MANCUSO A, DAIKHIN E, NISSIM I, YUDKOFF M, WEHRLI S, et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(49):19345–50.
5. DEBERARDINIS RJ, CHENG T. Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 2010;29(3):313–24.
6. REITZER LJ, WICE BM, KENNEL D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979;254(8):2669–76.
7. MEDINA MÁ, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, MÁRQUEZ J, QUESADA AR, NÚÑEZ DE CASTRO I. Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem.* 1992;113:1–15.
8. BELORIBI-DJEFLAIA S, VASSEUR S, GUILLAUMOND F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis.* 2016;5:e189.
9. ZHANG J, FAN J, VENNETI S, CROSS JR, TAKAGI T, BHINDER B, et al. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. *Mol Cell.* 2014;56:205–18.
10. AMELIO I, CUTRUZZOLÁ F, ANTONOV A, AGOSTINI M, MELINO G. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(4):191–8.
11. BERCHNER-PFANNSCHMIDT U, YAMAC H, TRINIDAD B, FANDREY J. Nitric oxide modulates oxygen sensing by hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of prolyl hydroxylase 2. *J Biol Chem.* 2007;282(3):1788–96.
12. RUSSELL D, SNYDER SH. Amine synthesis in rapidly growing tissues: Ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 1968;60(4):1420–7.
13. QUESADA AR, MEDINA MÁ, MUÑOZ-CHÁPULI R. Angiogénesis. Consejo Social y Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga. 2004.
14. CARMELIET P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407:249–57.
15. SPOLARIC Z, LANG CH, BAGBY GJ, SPITZER JJ. Glutamine and fatty acid oxidation are the main sources of energy for Kupffer and endothelial cells. *Am J Physiol.* 1991;261(2):G185–90.
16. LEIGHTON B, CURI R, HUSSEIN A, NEWSHOLME EA. Maximum activities of some key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, Krebs cycle and fatty acid utilization in bovine pulmonary endothelial cells. *FEBS Lett.* 1987;225(1–2):93–6.
17. DOBRINA A, ROSSI F. Metabolic properties of freshly isolated bovine endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1983;762:295–301.
18. KRÜTZFELDT A, SPAHR R, MERTENS S, SIEGMUND B, PIPER HM. Metabolism of exogenous substrates by coronary endothelial cells in culture. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22:1393–404.
19. PETERS K, KAMP G, BERZ A, UNGER RE, BARTH S, SALAMON A, et al. Changes in human endothelial cell energy metabolic capacities during in vitro cultivation. The role of aerobic glycolysis and proliferation. *Cell Physiol Biochem.* 2009;24:483–92.

20. HARJES U, BENSAD K, HARRIS A. Endothelial cell metabolism and implications for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2012;107:1207–12.
21. DE BOCK K, GEORGIADOU M, SCHOORS S, KUCHNIO A, WONG BW, CANTELMO AR, et al. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*. 2013;154:651–63.
22. VAN HÉE VF, PÉREZ-ESCUREDO J, CACACE A, COPETTI T, SONVEAUX P. Lactate does not activate NF- κ B in oxidative tumor cells. *Front Pharmacol*. 2015;6.
23. DE BOCK K, GEORGIADOU M, CARMELIET P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab*. 2013;18(5):634–47.
24. CANTELMO AR, CONRADI L-C, BRAJIC A, GOVEIA J, KALUCKA J, PIRCHER A, et al. Inhibition of the glycolytic activator PFKFB3 in endothelium induces tumor vessel normalization, impairs metastasis, and improves chemotherapy. *Cancer Cell*. 2016;30:1–18.
25. SCHOORS S, BRUNING U, MISSIAEN R, QUEIROZ KCS. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature*. 2015;520(7546):192–7.
26. KIM B, LI J, JANG C, ARANY Z. Glutamine fuels proliferation but not migration of endothelial cells. *EMBO J*. 2017;36:2321–33.
27. CÁRDENAS C, QUESADA AR, MEDINA MÁ. Anti-angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *PLoS One*. 2011;6(8):e23407.
28. MARTÍNEZ-POVEDA B, GARCÍA-VILAS JA, CÁRDENAS C, MELGAREJO E, QUESADA AR, MEDINA MÁ. The brominated compound aeropylinin-1 inhibits proliferation and the expression of key pro-inflammatory molecules in human endothelial and monocyte cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e55203.
29. QUESADA AR, MEDINA MÁ, ALBA E. Playing only one instrument may be not enough: Limitations and future of the anti-angiogenic treatment of cancer. *BioEssays*. 2007;29:1159–68.
30. LEHÁR J, KRUEGER AS, AVERY W, HEILBUT AM, JOHANSEN LM, PRICE ER, et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. *Nat Biotechnol*. 2009;27(7):659–66.
31. GOVEIA J, STAPOR P, CARMELIET P. Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease. *EMBO Mol Med*. 2014;6(9):1105–20.
32. MISSIAEN R, RODRIGUEZ FM, EELEN G, CARMELIET P. Targeting endothelial metabolism for anti-angiogenesis therapy: A pharmacological perspective. *Vascul Pharmacol*. 2017;90:8–18.
33. EL SAYED SM, ABOU EL-MAGD RM, SHISHIDO Y, YORITA K, CHUNG SP, TRAN DH, et al. D-Amino acid oxidase-induced oxidative stress, 3-bromopyruvate and citrate inhibit angiogenesis, exhibiting potent anticancer effects. *J Bioenerg Biomembr*. 2012;44:513–23.
34. ABDEL-AZIZ AK, SHOUMAN S, EL-DEMERDASH E, ELGENDY M, ABDEL-NAIM AB. Chloroquine synergizes sunitinib cytotoxicity via modulating autophagic, apoptotic and angiogenic machineries. *Chem Biol Interact*. 2014;217:28–40.
35. CHUANG IC, YANG CM, SONG TY, YANG NC, HU ML. The anti-angiogenic action of 2-deoxyglucose involves attenuation of VEGFR2 signaling and MMP-2 expression in HUVECs. *Life Sci*. 2015;139:52–61.
36. JASNIS MA, KLEIN S, MONTE M, DAVEL L, DE LUSTIG ES, ALGRANATI ID. Polyamines prevent DFMO-mediated inhibition of angiogenesis. *Cancer Lett*. 1994;79:39–43.
37. GARCÍA-VILAS JA, PINO-ÁNGELES A, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MÁ. The noni anthraquinone damnacanthal is a multi-kinase inhibitor with potent anti-angiogenic effects. *Cancer Lett*. 2017;385:1–11.
38. GARCÍA-VILAS JA, QUESADA AR, MEDINA MÁ. Screening of synergistic interactions of epigallocatechin-3-gallate with antiangiogenic and antitumor compounds. *Synergy*. 2016;3:5–13.
39. JAYARAMAN A, KUMAR P, MARIN S, DE ATAURI P, MATEO F, THOMSON TM, et al. Untargeted metabolomics reveals distinct metabolic reprogramming in endothelial cells co-cultured with CSC and non-CSC prostate cancer cell subpopulations. *PLoS One*. 2018;13(2):e012175.

40. MARÍN DE MAS I, AGUILAR E, ZODDA E, BALCELLS C, MARIN S, DALLMANN G, et al. Model-driven discovery of long-chain fatty acid metabolic reprogramming in heterogeneous prostate cancer cells. *PLoS Comput Biol.* 2018;14(1):e1005914.
41. SHI X, TASDOGAN A, HUANG F, HU Z, MORRISON SJ, DEBERARDINIS RJ. The abundance of metabolites related to protein methylation correlates with the metastatic capacity of human melanoma xenografts. *Sci Adv.* 2017;3(11):eaao5268.
42. FAUBERT B, LI KY, CAI L, HENSLEY CT, KIM J, ZACHARIAS LG, et al. Lactate metabolism in human lung tumors. *Cell.* 2017;171(2):358–71.
43. RU L, OSORIO S, WANG L, FERNIE AR, PATRICK JW, RUAN YL. Transcriptomic and metabolomics responses to elevated cell wall invertase activity during tomato fruit set. *J Exp Bot.* 2017;68(15):4263–79.
44. ANTONIO C, MUSTAFA NR, OSORIO S, TOHGE T, GIAVALISCO P, WILLMITZER L, et al. Analysis of the interface between primary and secondary metabolism in *Catharanthus roseus* cell cultures using ¹³C-stable isotope feeding and coupled mass spectrometry. *Mol Plant.* 2013;6(2):581–4.
45. OCAÑA MC, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MÁ. Metabolism in the tumor microenvironment: What is known about stromal and immune cells? *Clin Immunol Endocr Metab Drugs.* 2017;4.
46. OCAÑA MC, MARTÍNEZ-POVEDA B, QUESADA AR, MEDINA MÁ. Metabolism within the tumor microenvironment and its implication on cancer progression: An ongoing therapeutic target. *Med Res Rev.* 2018;1–44.

Isoforma glutaminasa GLS2 en cáncer: Localización subcelular y su implicación en la reversión del cáncer

Marina García Frutos,^{* a, b} David Carro Vázquez,^{* a, b} Mercedes Martín-Rufián,^{a, b, c} Ana Peñalver,^{a, b} María C. Gómez-García,^{a, b} Laura Castilla^{a, b} y Javier Márquez^{a, b}

*Los dos autores han contribuido de forma similar a la escritura de este capítulo

^a Laboratorio Canceromics, Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071, Málaga, España.

^b Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Málaga, España.

^c Unidad de Proteómica, Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI), Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071, Málaga, España.

Resumen

La enzima glutaminasa [GA] cataliza el primer paso de la glutaminólisis mitocondrial, ejerciendo un papel clave en la reprogramación metabólica del cáncer. Hay dos tipos de isoformas GA en humanos, denominadas GLS y GLS2, con marcadas diferencias en su expresión y regulación. En tumorigénesis, las isoenzimas GA han sido relacionadas con acciones completamente opuestas; así, mientras que las isoformas GLS se asocian a crecimiento y proliferación celular, la función de GLS2 parece estar asociada a diferenciación y supresión tumoral, aunque los mecanismos moleculares que subyacen a estos procesos aún deben ser elucidados. En este trabajo pretendemos iniciar una caracterización de isoformas GLS2 en líneas celulares de cáncer humano, incluyendo el estudio de su localización subcelular y el análisis de los cambios asociados a su sobreexpresión que se producen en el ciclo celular y en perfilados proteómicos nucleares. Los estudios realizados se centrarán en la isoforma GLS2 denominada GAB, considerada como el transcrito canónico del gen *GLS2*.

1. Introducción

Las enzimas GA en mamíferos catalizan la desamidación hidrolítica de la Gln a Glu e iones amonio. Existen dos genes parálogos situados en cromosomas separados que codifican para los distintos miembros de esta familia de enzimas.¹ En humanos, el gen *GLS*, localizado en el cromosoma 2, codifica las isoenzimas clásicamente denominadas como tipo K (“kidney”), mientras que el gen *GLS2*, en el cromosoma 12, codifica las isoenzimas tipo L (“liver”).²

Hasta ahora se han identificado dos isoformas GA derivadas de cada uno de los dos genes. El gen humano *GLS*, con una longitud de 82 kb, codifica para dos transcritos diferentes conocidos como KGA y GAC, mediante un mecanismo de *splicing* alternativo.^{3,4}

En cuanto al gen humano *GLS2*, presenta una longitud de 18 kb aproximadamente y han sido identificados dos transcritos: la forma larga canónica GAB y el transcrito corto LGA.⁵ Éste último se produce por un mecanismo de regulación empleando sitio de inicio de la transcripción y promotor alternativos a los de GAB.⁶

Las distintas isoenzimas GA difieren en sus patrones de expresión en tejidos y células de mamífero, además de en sus propiedades moleculares, cinéticas y reguladoras.^{7,8} La abundancia de una especie mRNA de GA particular puede cambiar significativamente dependiendo del tipo de tejido y el estado metabólico o del desarrollo; por tanto, cada transcrito podría representar una diana específica para diferentes estímulos, de manera que la expresión global de GA sería posiblemente el resultado de un balance entre ellos.^{9,10} Además, las diferencias más importantes entre las distintas secuencias proteicas GA se encuentran en regiones relacionadas con el direccionamiento a orgánulos y la interacción proteína-proteína, lo cual podría ayudar a explicar su función y regulación diferencial.^{2,11,12}

El patrón de expresión de las isoenzimas GA en células tumorales ha sido investigado para dilucidar su papel en la transformación maligna, ya que muchos tumores muestran una actividad GA incrementada que correlaciona positivamente con su malignidad. La GA y la glutaminólisis juegan papeles esenciales en la tumorigénesis que no solo están relacionados con la producción de energía, sino también con el aporte de nitrógeno y esqueletos carbonados para la biosíntesis de macromoléculas.¹³ De este modo, la inhibición por RNA antisentido de la expresión de *Gls* (isoforma KGA) induce la reversión del fenotipo de células de cáncer mamario de ratón a un estado más diferenciado y menos maligno.¹⁴

En los últimos años se está comenzando a revelar la expresión diferencial de isoenzimas GA en cáncer, junto con su regulación por oncogenes y genes supresores de tumores. Se ha demostrado que el oncogén *c-Myc* activa la expresión de *GLS* en varios tipos de células tumorales¹⁵ y que las isoformas *GLS* también están reguladas positivamente por otras vías de señalización oncogénicas, como las *Rho GTPasas*.¹⁶ Por tanto, la relación entre las isoformas *GLS* y la transformación neoplásica está apoyada por evidencias en varios tipos de cánceres humanos como gliomas y tumores de hígado y de pulmón.¹⁷ Además, la expresión de *GLS* ha mostrado ser un biomarcador sensible y específico para el diagnóstico y pronóstico del carcinoma hepatocelular (HCC).¹⁸

Mientras que la sobre-expresión de las isoformas *GLS* se ha correlacionado con estados proliferativos y malignidad, el papel de las isoenzimas *GLS2* en las células tumorales es bastante más desconocido. La coexpresión de transcritos *GLS* y *GLS2* se ha reportado en líneas de hepatoma, leucemia, cáncer de colon y de mama, pero los datos de expresión proteica sugieren que las isoformas *GLS* representan la mayor parte de la actividad GA en estas células.^{19,20} Basándose en sus patrones de expresión relativa²⁰, se ha propuesto un rol completamente diferente para las isoformas *GLS* y *GLS2*: el proceso de transformación maligna cambia el patrón de expresión de GA de tal manera que activa *GLS* mientras que *GLS2* es frecuentemente reprimida. Por ejemplo, células hepáticas transformadas tales como HepG2 regresan a un fenotipo similar al fetal, caracterizado por una alta velocidad de proliferación y una prevalencia de isoformas *GLS* frente a las *GLS2*, que son las predominantes en hepatocitos

normales no proliferantes. De hecho, la expresión de GLS2 está regulada a la baja en uno de los tipos de glioblastoma más malignos²¹, así como en cáncer hepático, de colon y de pulmón.²²⁻²⁵

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la sobreexpresión de isoformas GLS correlaciona con mayores tasas de proliferación, mientras que la prevalencia de isoformas GLS2 parece estar asociada a estados celulares de diferenciación y quiescencia.¹⁷ Así, se han propuesto estrategias antitumorales basadas en la sobreexpresión de GLS2 y el bloqueo de GLS.²⁶⁻²⁸ Sin embargo, este patrón no puede ser asumido como universal, debido a la heterogeneidad de perfiles metabólicos existentes en los tumores, que dependen probablemente de sus distintos genotipos y tejidos de origen.²⁹

Además, GLS2 ha sido confirmado como un gen diana del supresor tumoral p53, tanto en células tumorales como en células no transformadas. La expresión de GLS2 incrementada por p53 ha sido asociada a una función antitumoral y una reducción del crecimiento celular y la capacidad de formación de colonias.^{22,23} Recientemente también se ha demostrado que GLS2 puede ser regulado por TAp63, un factor de transcripción perteneciente a la familia de p53, que aumenta la expresión de GLS2 durante la diferenciación de queratinocitos humanos.³⁰ Por tanto, parece existir un patrón sorprendentemente diferente para las isoformas GLS2 en la biología del cáncer. Complicando aún más su patrón de expresión, se han descubierto nuevas localizaciones subcelulares para GLS2, además de la mitocondria. En cerebro de mamíferos se ha demostrado que GLS2 (GAB/LGA) localiza en núcleos de neuronas y astrocitos, en contraste con la localización exclusivamente mitocondrial de KGA.^{31,32} También es destacable que en sistemas de expresión por baculovirus, la GAB humana recombinante era dirigida tanto a mitocondria como a núcleo en células Sf9, siendo catalíticamente activa en ambas localizaciones.³³ El papel nuclear de esta GA todavía no ha sido determinado, pero esta nueva localización ha sido relacionada con una potencial función reguladora de la expresión génica.

Se ha planteado que GLS2 puede funcionar como un corregulador transcripcional asociado a diferenciación,^{7,31,34} teniendo en cuenta los estudios en cáncer señalados anteriormente que relacionan esta isoforma GA con estados celulares quiescentes y diferenciados.^{26,35} Además, se ha demostrado que GLS2 está bajo control de TAp73 (otro factor perteneciente a la familia de p53) particularmente en neuronas, durante la diferenciación de células de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por ácido retinoico.³⁶ Sin embargo, estos autores no consiguieron probar la presencia de proteínas GLS2 en el núcleo celular. Otra posible función nuclear que se ha planteado podría ser la modulación de los niveles de Gln/Glu,³¹ teniendo en cuenta que la Gln es una molécula señal involucrada en la expresión génica.^{37,38} Así, la GA en núcleo podría actuar controlando *in situ* los niveles de Gln en el nucleoplasma, modulando la expresión de genes regulados por Gln o Glu. Esta hipótesis se refuerza por la presencia de actividad GA en fracciones nucleares de cerebro de rata.³¹

Aunque las isoformas GLS2 no presentan señales de localización nuclear discernibles, se han propuesto otros mecanismos para su importe al núcleo. Por ejemplo, mediante aproximaciones proteómicas se han descubierto proteínas que interactúan con GLS2 en cerebro que podrían permitir dirigirla a diferentes localizaciones subcelulares. Así, se han identificado dos proteínas que contienen dominios PDZ e

interactúan con la isoforma GAB: GIP (*Glutaminase-Interacting Protein*) y α 1-sintrofina (SNT).¹² Las proteínas PDZ constituyen "scaffolds" para el ensamblaje de complejos multiproteicos y dirigen proteínas a diferentes destinos subcelulares, entre ellos el núcleo³⁹; por ello, se cree que la interacción de GAB con proteínas PDZ podría sugerir un mecanismo de translocación nuclear.⁷ Además, las proteínas GLS2 contienen un motivo consenso de interacción con receptores nucleares en su exón 2 (LXXLL), que también está presente en coactivadores de receptores nucleares.⁴⁰ Tampoco se deben olvidar las repeticiones de ankirina situadas en el extremo C-terminal, que han sido descritas también en factores de transcripción y reguladores transcripcionales.^{41,42} Todos estos motivos de secuencia e interacciones proteicas parecen apoyar un posible rol nuclear para GLS2.

2. Objetivos y métodos

En este trabajo, partiendo de los hallazgos previos de una expresión nuclear de GLS2 en neuronas y astrocitos, trataremos de dilucidar si estas isoformas localizan tanto en núcleo como en mitocondrias de células humanas de cáncer. La función nuclear de GLS2 podría estar asociada a un programa transcripcional de diferenciación y detención de la proliferación celular, por lo que el estudio de los efectos de su sobreexpresión podría tener gran interés como estrategia terapéutica en ciertos tipos de cáncer.

De acuerdo con la información presentada en la introducción y en consonancia con una de las líneas de investigación del grupo Canceromics, orientada a definir el papel de las isoenzimas GA en cáncer, en este trabajo se han planteado los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Estudiar la relación entre el aumento de GLS2 y cambios en el ciclo celular y en perfilados proteómicos nucleares de líneas celulares de cáncer humano.

Para cumplir este objetivo se utilizarán dos modelos celulares, ambos con una expresión aumentada de GAB. Por un lado, la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratada con PMA (miristato acetato de forbol), ya que se ha demostrado que el tratamiento con ésteres de forbol induce su diferenciación.⁴³ Por otro lado, la línea de glioblastoma humano T98G-GAB, caracterizada por sobreexpresar la proteína GAB. Esta línea celular fue obtenida por transfección estable de T98G (*wildtype*, wt) con el cDNA codificante de GAB, según un procedimiento análogo al empleado por Szeliga *et al.* (2009)²⁶, quienes ya demostraron una asociación entre la sobreexpresión de GLS2 y un descenso en la supervivencia, migración y proliferación celular.

Además de observar los cambios fenotípicos a consecuencia del aumento de esta proteína, se recurrirá a la detección y cuantificación de poblaciones celulares específicas mediante citometría de flujo, a diferentes tiempos de tratamiento con PMA (en el caso de SHSY-5Y) o de crecimiento (en el caso de T98G-GAB). En cada experimento se incluirán controles con el vehículo (DMSO) o las líneas celulares parentales (T98G-wt y T98G-pcDNA), respectivamente.

De la misma forma, en estas líneas se llevará a cabo el subfraccionamiento de muestras celulares y posteriormente se realizarán perfilados proteómicos a partir de los extractos proteicos nucleares obtenidos. En el fraccionamiento subcelular es

destacable la importancia de obtener extractos nucleares libres de contaminación mitocondrial, ya que las proteínas GA son mayoritarias en la mitocondria y presumiblemente minoritarias en el compartimento nuclear. Por ello, de manera rutinaria se comprobará que el rendimiento de los subfraccionamientos es adecuado mediante inmunotransferencias Western con anticuerpos anti-COXIV, para verificar que este marcador mitocondrial esté ausente en los extractos nucleares. A continuación, las muestras nucleares se emplearán para la obtención de los perfilados proteicos mediante SELDI-TOF MS. Este método representa un nuevo enfoque para el descubrimiento de biomarcadores que combina dos potentes técnicas: la cromatografía y la espectrometría de masas⁴⁴, con el que se pueden identificar diferencias en los perfiles de expresión de proteínas de dos o más muestras distintas.

Este estudio se realizará principalmente con dos ProteinChips de intercambio iónico: CM10 y QM10, con superficies cromatográficas funcionalizadas en las que se unen reversiblemente moléculas cargadas. La matriz ProteinChip Q10 actúa como un intercambiador de aniones fuerte, al unirse a péptidos y proteínas que se cargan negativamente a un pH dado. El intercambiador catiónico ProteinChip CM10 se puede utilizar de forma similar para analizar las moléculas con una carga positiva en la superficie. Tras cargar las muestras de extractos nucleares en la superficie de estas matrices, variando el pH mediante la adición de distintos tampones, se consigue la desunión de los péptidos con un determinado punto isoeléctrico. De esta manera, las proteínas que permanecen unidas a la superficie son analizadas aplicando una matriz de absorción de energía (EAM) y colocándolas en un espectrómetro de masas (MS-TOF), con el que se irradian por láser las muestras para ionizarlas y volatilizarlas. Así, se liberan iones gaseosos de las matrices ProteinChip. Estos iones gaseosos entran en la región MS-TOF del instrumento, y las proteínas detectadas se muestran como una serie de picos.⁴⁴ La salida generada a partir del análisis MS-TOF de las muestras es una traza que muestra la abundancia relativa frente a las masas moleculares de las proteínas detectadas.

Objetivo 2. Determinar la presencia de isoformas GLS2 en el núcleo de líneas celulares de cáncer humano.

Aunque se ha reportado una localización nucleocitoplasmática para la proteína GAB en células del cerebro, la localización subcelular de GAB en células de cáncer aún no ha sido elucidada. En nuestro caso, para complementar estudios preliminares del grupo basados en técnicas inmunocitoquímicas e inmunotransferencias Western con anticuerpos anti-GAB en ciertas líneas celulares tumorales, trataremos de demostrar el importe nuclear mediante metodologías ortogonales que no dependan del reconocimiento por anticuerpos anti-GLS2. Para ello, se llevarán a cabo la expresión ectópica de proteínas GLS2 fusionadas a diferentes etiquetas ("tags") como la proteína verde fluorescente (EGFP) o al epítipo c-myc.

Distintas líneas celulares de cáncer humano serán transfectadas de manera transitoria con varias construcciones conteniendo el marco abierto de lectura de GAB/LGA fusionado a EGFP o c-myc. Las células transfectadas serán analizadas por microscopía confocal fluorescente o bien por inmunotransferencias Western con anticuerpos anti-tag tras subfraccionamiento celular y aislamiento de las fracciones

citoplásmica y nuclear. Como controles de los experimentos se utilizarán células sin transfectar cultivadas en las mismas condiciones. Al igual que en los experimentos anteriores, tras el subfraccionamiento celular se comprobará la ausencia de contaminación mitocondrial en las fracciones nucleares mediante detección por inmunotransferencia Western de la proteína COXIV.

3. Conclusiones y futuras líneas

Tanto los análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo como los perfilados proteómicos obtenidos mediante SELDI-TOF MS permitirán comprender mejor el papel de GLS2, observando si se producen cambios que podrían asociar las isoformas GLS2 con un papel antiproliferativo relevante en la reversión del cáncer. Si además se confirmara la nueva localización subcelular que se ha planteado, esto apoyaría la idea de que GLS2 podría desempeñar funciones nucleares en respuestas relacionadas con la diferenciación neuronal, la detención de la proliferación o la supresión tumoral. En tal caso, GLS2 (GAB) podría estar implicada en múltiples funciones, además de la producción de Glu a partir de Gln, y se incluiría dentro de las denominadas proteínas *moonlighting* (proteínas que desempeñan más de una función), realizando otras funciones alternativas a su papel metabólico.

Sin embargo, puesto que ésta se trata de una caracterización inicial de las isoformas GLS2, las futuras líneas de trabajo irían encaminadas a elucidar los mecanismos moleculares que relacionarían a GAB con estas respuestas. El estudio del interactoma de GLS2 (que ya había sido iniciado por el grupo Canceromics) y su relación con otros genes implicados en la reprogramación metabólica tumoral o cascadas de señalización (c-Myc, N-Myc, p53, p63, p73, GIP, PI3K/AKT, ERKs, mTORC1)¹⁷ permitirían esclarecer dichos mecanismos. Si se llegara a confirmar una localización nuclear, los estudios futuros también deberían elucidar si GLS2 podría ejercer una acción directa sobre la regulación de la expresión génica, o indirecta a través de la modulación de los niveles de Gln/Glu gracias a su actividad enzimática. Por otro lado, tampoco se debe olvidar que la otra isoforma, LGA, representa una incógnita aún mayor en el contexto del cáncer, ya que no ha podido ser caracterizada al mismo nivel.

Identificar por completo el funcionamiento de cada isoenzima será esencial para entender el papel de la GA en cáncer, puesto que se desconoce cómo dos isoformas de la misma enzima pueden llevar a cabo funciones tan diferentes, opuestas, en la biología tumoral. También debemos recordar que existen algunos tipos de cáncer (neuroblastoma con amplificación de N-MYC y carcinoma cervical) donde GLS2 está sobreexpresada y se correlaciona con peores pronósticos.⁴⁵ Por ello resultaría imprescindible estudiar si los fenómenos observados son dependientes del contexto, según factores como señales ambientales, el tipo de célula o tejido, el estado de desarrollo, la fase del ciclo celular, etc. Los requerimientos metabólicos cambian según el tipo de cáncer específico, y esto podría dictar la función de las isoenzimas GA.

Así, entender la regulación de GLS2 y cómo depende del contexto celular podría ayudar a explicar los diferentes fenotipos observados en distintos tipos de cáncer,

y permitiría “modelar” en cierta manera el comportamiento de estos tumores. Es por eso que en este trabajo se ha intentado trabajar con varias líneas celulares de diverso origen (neuroblastomas con y sin amplificación de N-MYC, glioblastoma, HCC), constituyendo un modelo experimental amplio, ya que lo más probable es que no exista un modelo unificado para explicar la alteración del metabolismo que ocurre en el cáncer. Puede existir una gran diversidad de estrategias de reprogramación metabólica en células tumorales específicas, y entender esa heterogeneidad mejoraría nuestra capacidad de predecir su comportamiento. Para ello, posiblemente sea útil recurrir a modelos experimentales más complejos que las células transformadas cultivadas *in vitro*; actualmente, las alteraciones en el metabolismo de la Gln se están comenzando a estudiar en el contexto sistémico de tumores completos.⁴⁶

En definitiva, las futuras líneas de trabajo probablemente incluirán la identificación de biomarcadores tumorales relacionados con el entorno metabólico o de señalización de las isoformas GA, presumiblemente de una manera específica en cada tipo de cáncer o paciente. Para ello, se requerirá la caracterización de estas dianas moleculares por aproximaciones genómicas y proteómicas. Esto brindaría nuevas oportunidades para el diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de cánceres específicos, en el campo de la medicina personalizada. Un ejemplo de ello serían terapias anticáncer basadas en la inhibición de GLS y la activación de GLS2.

Financiación

Este trabajo está financiado por fondos asociados al proyecto SAF2015-64501-R (Ministerio Español de Economía y Competitividad).

Referencias

1. PÉREZ-GÓMEZ C, MATÉS JM, GÓMEZ-FABRE PM, DEL CASTILLO-OLIVARES A, ALONSO FJ, MÁRQUEZ J. Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene. *Biochem J*. 2003;370(3):771-84.
2. ALEDO JC, GÓMEZ-FABRE PM, OLALLA L, MÁRQUEZ J. Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mamm Genome*. 2000;11(12):1107-10.
3. ELGADI KM, MEGUID R A, QIAN M, SOUBA WW, ABCOUWER SF. Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiol Genomics*. 1999;1(2):51-62.
4. PORTER LD, IBRAHIM H, TAYLOR L, CURTHOYS NP. Complexity and species variation of the kidney-type glutaminase gene. *Physiol Genomics*. 2002;9(3):157-66.
5. SMITH EM, WATFORD M. Molecular cloning of a cDNA for rat hepatic glutaminase: Sequence similarity to kidney-type glutaminase. *J Biol Chem*. 1990;265(18):10631-6.
6. MARTÍN-RUFÍAN M, TOSINA M, CAMPOS-SAN-DOVAL JA, MANZANARES E, LOBO C, SEGURA JA, et al. Mammalian glutaminase Gls2 gene encodes two functional alternative transcripts by a surrogate promoter usage mechanism. *PLoS One*. 2012;7(6):e38380.
7. MÁRQUEZ J, LÓPEZ DE LA OLIVA AR, MATÉS JM, SEGURA JA, ALONSO FJ. Glutaminase: A multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochem Int*. 2006;48(6):465-71.

8. MÁRQUEZ J, MARTÍN-RUFIÁN M, SEGURA JA, MATÉS JM, CAMPOS-SANDOVAL JA, ALONSO FJ. Brain glutaminases. *Biomolecular Concepts*. 2010. p. 133–71.
9. MARQUEZ J, MATÉS JM, CAMPOS-SANDOVAL JA. Glutaminases. In: Schousboe A. US, editor. *The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle*. 2016th ed. Switzerland: Springer International Publishing; 2016. p. 133–71.
10. MÁRQUEZ J, CARDONA C, CAMPOS-SANDOVAL JA, PEÑALVER A, TOSINA M, MATÉS JM, et al. Mammalian glutaminase isozymes in brain. *Metab Brain Dis*. 2013;28(2):133–7.
11. SHAPIRO RA, FARRELL L, SRINIVASAN M, CURTHOYS NP. Isolation, characterization, and in vitro expression of a cDNA that encodes the kidney isoenzyme of the mitochondrial glutaminase. *J Biol Chem*. 1991;266(28):18792–6.
12. OLALLA L, ALEDO JC, BANNENBERG G, MÁRQUEZ J. The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Lett*. 2001;488(3):116–22.
13. DEBERARDINIS RJ, MANCUSO A, DAIKHIN E, NISSIM I, YUDKOFF M, WEHRLI S, et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(49):19345–50.
14. LOBO C, RUIZ-BELLIDO M A, ALEDO JC, MÁRQUEZ J, NÚÑEZ DE CASTRO I, ALONSO FJ. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochem J*. 2000;348(2):257–61.
15. GAO P, TCHERNYSHYOV I, CHANG TC, LEE YS, KITA K, OCHI T, et al. C-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009;458(7239):762–5.
16. WANG J BIN, ERICKSON JW, FUJI R, RAMACHANDRAN S, GAO P, DINAVAH I, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010;18(3):207–19.
17. MÁRQUEZ J, MATÉS JM, ALONSO FJ, MARTÍN-RUFIÁN M, LOBO C, CAMPOS-SANDOVAL JA. Canceromics studies unravel tumor's glutamine addiction after metabolic reprogramming. In: *Tumor Cell Metabolism: Pathways, Regulation and Biology*. 2015. p. 257–86.
18. YU D, SHI X, MENG G, CHEN J, YAN C, JIANG Y, et al. Kidney-type glutaminase (GLS1) is a biomarker for pathologic diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(10):7619–31.
19. TURNER A, MCGIVAN JD. Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *Biochem J*. 2003;370(2):403–8.
20. PÉREZ-GÓMEZ C, CAMPOS-SANDOVAL JA, ALONSO FJ, SEGURA JA, MANZANARES E, RUIZ-SÁNCHEZ P, et al. Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *Biochem J*. 2005;386(3):535–42.
21. SZELIGA M, SIDORYK M, MATYJA E, KOWALCZYK P, ALBRECHT J. Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neurosci Lett*. 2005;374(3):171–3.
22. HU W, ZHANG C, WU R, SUN Y, LEVINE A, FENG Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(16):7455–60.
23. SUZUKI S, TANAKA T, POYUROVSKY M V., NAGANO H, MAYAMA T, OHKUBO S, et al. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(16):7461–6.
24. ZHANG J, WANG C, CHEN M, CAO J, ZHONG Y, CHEN L, et al. Epigenetic silencing of glutaminase 2 in human liver and colon cancers. *BMC Cancer*. 2013;13(1):601.
25. LIU J, ZHANG C, LIN M, ZHU W, LIANG Y, HONG X, et al. Glutaminase 2 negatively regulates the PI3K/AKT signaling and shows tumor suppression activity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5(9):2365.
26. SZELIGA M, OBARA-MICHELWSKA M, MATYJA E, LAZARCZYK M, LOBO C, HILGIER W, et al. Transfection with liver-type glutaminase cDNA alters gene expression and reduces survival, migration and proliferation of T98G glioma cells. *Glia*. 2009;57(9):1014–23.
27. SZELIGA M, BOGACIŃSKA-KARAŚ M, RÓZYCKA A, HILGIER W, MARQUEZ J, ALBRECHT

- J. Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumor Biol.* 2014;35(3):1855–62.
28. MARTÍN-RUFÍAN M, NASCIMENTO-GOMES R, HIGUERO A, CRISMA AR, CAMPOS-SANDOVAL JA, GÓMEZ-GARCÍA MC, et al. Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *J Mol Med.* 2014;92(3):277–90.
29. YUNEVA MO, FAN TWM, ALLEN TD, HIGASHI RM, FERRARIS D V., TSUKAMOTO T, et al. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. *Cell Metab.* 2012;15(2):157–70.
30. GIACOBBE A, BONGIORNO-BORBONE L, BERNASSOLA F, TERRINONI A, MARKERT EK, LEVINE AJ, et al. P63 regulates glutaminase 2 expression. *Cell Cycle.* 2013;12(9):1395–405.
31. OLALLA L, GUTIÉRREZ A, CAMPOS JA, KHAN ZU, ALONSO FJ, SEGURA JA, et al. Nuclear localization of L-type glutaminase in mammalian brain. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38939–44.
32. CARDONA C, SÁNCHEZ-MEJÍAS E, DÁVILA JC, MARTÍN-RUFÍAN M, CAMPOS-SANDOVAL JA, VITORICA J, et al. Expression of Glis and Glis2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia.* 2015;63(3):365–82.
33. CAMPOS-SANDOVAL JA, LÓPEZ DE LA OLIVA AR, LOBO C, SEGURA JA, MATÉS JM, ALONSO FJ, et al. Expression of functional human glutaminase in baculovirus system: Affinity purification, kinetic and molecular characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):765–73.
34. SZELIGA M, MATYJA E, OBARA M, GRAJKOWSKA W, CZERNICKI T, ALBRECHT J. Relative expression of mRNAs coding for glutaminase isoforms in CNS tissues and CNS tumors. *Neurochem Res.* 2008;33(5):808–13.
35. LINDER-HOROWITZ M, KNOX WE, MORRIS HP. Glutaminase Activities and Growth Rates of Rat Hepatomas. *Cancer Res.* 1969;29(6):1195–9.
36. VELLETRI T, ROMEO F, TUCCI P, PESCHIAROLI A, ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI M, NIKLISON-CHIROU MV, et al. GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation. *Cell Cycle.* 2013;12(22):3564–73.
37. BUNGARD CI, MCGIVAN JD. Glutamine availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cells and stimulates the ASCT2 promoter. *Biochem J.* 2004;382(1):27–32.
38. HÄUSSINGER D. Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front Biosci.* 2007;12(1):371.
39. KAUSALYA P., PHUA D., HUNZIKER W. Association of ARVCF with zonula occludens ZO-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5503–15.
40. HEERY DM, KALKHOVEN E, HOARE S, PARKER MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 1997;387(6634):733–6.
41. SEDGWICK SG, SMERDON SJ. The ankyrin repeat: A diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(8):311–6.
42. ZHANG A, YEUNG PL, LI CW, TSAI SC, DINH GK, WU X, et al. Identification of a novel family of ankyrin repeats containing cofactors for p160 nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem.* 2004;279(32):33799–805.
43. SÖDERHOLM H, OLSSON A, LAVENIUS E, RÖNNSTRAND L, NÄNBERG E. Activation of Ras, Raf-1 and protein kinase C in differentiating human neuroblastoma cells after treatment with phorbol ester and NGF. *Cell Signal.* 2001;13(2):95–104.
44. ISSAQ HJ, VEENSTRA TD, CONRADS TP, FELSCHOW D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: Protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292(3):587–92.
45. XIAO D, REN P, SU H, YUE M, XIU R, HU Y, et al. Myc promotes glutaminolysis in human neuroblastoma through direct activation of glutaminase 2. *Oncotarget.* 2015;6(38):40655.
46. YANG L, VENNETI S, NAGRATH D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng.* 2017;19:163–94.

La proteína Fsp1/S100A4 especifica distintas poblaciones cardíacas



Sara Cano-Ballesteros,^a Juan Antonio Guadix,^{a,b}
José M. Pérez-Pomares^{a,b}

^a Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, University of Málaga, Instituto Malagueño de Biomedicina (IBIMA), Campus de Teatinos s/n, 29080 Málaga (Spain).

^b BIONAND, Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (Junta de Andalucía, Universidad de Málaga), c/ Severo Ochoa n°25, 29590 Campanillas (Málaga), Spain.

Resumen

El objetivo principal de este proyecto es estudiar el desarrollo embrionario y la diferenciación de los progenitores fibroblásticos del corazón, así como analizar la regulación celular y molecular de la fibrosis durante la enfermedad cardíaca. Este trabajo se centra en las funciones de la proteína FSP1/S100A4, tradicionalmente considerada como un marcador de células fibroblásticas. Gracias al uso de líneas transgénicas de ratón hemos observado que Fsp1 se expresa también en otros tipos celulares vinculados con la función cardíaca. Tanto las relaciones de linaje entre todos estos tipos celulares como la función específica de estas proteínas siguen siendo desconocidas. Esperamos que nuestro trabajo sirva para generar nuevo conocimiento en este ámbito.

1. Introducción

1.1. Cardiogénesis

El corazón de los vertebrados es el primer órgano funcional durante el desarrollo embrionario. En ratón, aproximadamente en el día embrionario (E) 7.5, una población mesodérmica de progenitores cardíacos converge en la línea media ventral del embrión para generar el creciente cardíaco. Este creciente de aspecto semilunar adquiere una forma tubular lineal, con un polo venoso posterior y un polo arterial anterior. Este primer estadio se forma gracias a la contribución organizada de dos poblaciones celulares conocidas como campo cardíaco primario (First Heart Field, FHF) y campo cardíaco secundario (Second Heart Field, SHF) que se diferenciarán en dominios discretos del corazón adulto. El FHF contribuye a la formación del ventrículo izquierdo en el corazón adulto, mientras que los progenitores del SHF dan lugar al tracto de entrada (*inflow tract*, *IFT*) y al tracto de salida (*outflow tract*,

OFT). Las otras poblaciones cardíacas, el ventrículo derecho y ambos atrios, derecho e izquierdo, derivan de ambos campos cardíacos.^{1,2}

1.2. Crecimiento y septación del primordio cardíaco

El corazón tubular se curva en un proceso conocido como torsión (*looping*), que permite la realineación de los territorios del primordio cardíaco que es necesaria para el posterior desarrollo del corazón tetracameral adulto.^{3,4} A partir de este momento, el crecimiento del corazón embrionario se produce por la proliferación de los cardiomiocitos atriales y ventriculares en la curvatura externa del primordio, un proceso conocido como *ballooning*.⁵

El desarrollo de los cojines endocárdicos y la formación de los septos que separarán la cavidad cardíaca en cuatro cámaras dan lugar a la morfología del corazón adulto. Estos procesos comienzan aproximadamente en E10.5, con la formación del septo primario atrial y con la activación de los mecanismos de transición epitelio-mesénquima (EMT) del endocardio atrioventricular y conal. Esta conversión fenotípica local del endocardio genera una población de células mesenquimales valvuloseptales. Estas células mesenquimales son las progenitoras de las válvulas mitral y tricúspide, y de la porción membranosa del septo ventricular.⁶

1.3. Vascularización del corazón embrionario

A lo largo de este desarrollo, las paredes ventriculares se van engrosando, por lo que la difusión simple de gases desde el lumen cardíaco no es suficiente para proveer de oxígeno al miocardio. Desde una perspectiva evolutiva, se admite que el aumento en grosor del ventrículo favoreció la aparición de un sistema vascular coronario.⁷ A través de mecanismos de angiogénesis y vasculogénesis, progenitores endoteliales de diferente origen se organizan para formar los vasos coronarios de distinto calibre⁸, que son remodelados antes del nacimiento en un sistema vascular funcional.^{9,10}

Se han descrito dos tipos diferentes de sistemas vasculares en mamíferos, la vasculatura sanguínea y la vasculatura linfática. Estos vasos se encuentran estrechamente interconectados entre sí en un ciclo continuo en el cual la sangre transporta oxígeno y nutrientes a los tejidos, mientras la linfa transporta fluidos y macromoléculas desde los tejidos hacia a la circulación sanguínea. Durante el desarrollo temprano, la vasculatura linfática se desarrolla a partir de las células endoteliales de las venas¹¹, una diferenciación que se caracteriza por la expresión de factores como el receptor vascular VEGFR-3 (*vascular endothelial growth factor receptor-3*), el receptor linfático Lyve-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*) y la proteína Prox1 (*prospero-related protein 1*).

Las principales diferencias entre ambos tipos de vasculatura ha sido ampliamente estudiada en los capilares. Los capilares linfáticos son vasos de paredes finas compuestos exclusivamente por una única capa de células linfáticas endoteliales (*lymphatic endothelial cells*, LECs), que difieren en muchos aspectos de las células

endoteliales de la vasculatura sanguínea (*blood vascular endothelial cells*, BECs).¹² La principal diferencia es que los capilares linfáticos no presentan pericitos, unas células que sí envuelven a los capilares sanguíneos.¹³ Las uniones entre células también son diferentes en ambos tipos de capilares. Las BECs están comunicadas por uniones tipo “cremallera” mientras que las LECs presentan discontinuidades que permiten el traspaso de fluidos y de ciertos leucocitos.^{14,15}

Otra diferencia fundamental entre ambos tipos de vasculatura es la circulación del fluido por su interior. Por un lado, la circulación de la sangre en los organismos adultos está impulsada por el latido del corazón, mientras que el retorno de la linfa está facilitado por la contracción de los músculos esqueléticos¹⁶ o la pulsación arterial.¹⁷ Las válvulas linfáticas son fundamentales para facilitar el retorno eficiente desde las extremidades inferiores, donde las fuerzas gravitacionales son más fuertes.^{18,19}

En la vasculatura linfática, existen diferentes formas de permitir el flujo. Los vasos linfáticos pueden bombear la linfa con la ayuda de compresiones externas, como por ejemplo la contracción del músculo esquelético, o pueden hacerlo por contracciones del propio vaso linfático. La capacidad intrínseca de contracción no está presente en todos los vasos linfáticos, y estos vasos no contráctiles son los que pueden presentar válvulas primarias (situadas en la unión entre las LECs) y válvulas secundarias (en el lumen de los vasos linfáticos), para permitir el flujo unidireccional del fluido.¹⁸ Tanto las válvulas linfáticas como las válvulas venosas suelen ser bicúspides y actúan como moduladores de flujo para permitir el movimiento unidireccional del fluido.²⁰ El desarrollo morfogenético de las válvulas venosas y linfáticas ocurre de manera similar, y está regulado por mecanismos moleculares que implican a las proteínas integrina alfa-9, efrina-B2 y efrina-B4.²¹⁻²⁴

1.4. Coordinación de la contracción cardíaca

El corazón necesita tener un latido rítmico y sincronizado entre atrios y ventrículos, una función controlada en el corazón adulto por el sistema de conducción cardíaco (SCC).²⁵ El SCC incluye al nodo sinoatrial (NSA) que genera el impulso eléctrico de conducción, al nodo atrioventricular (NAV) que retrasa el impulso y permite la contracción acompasada de atrios y ventrículos, junto a las ramificaciones izquierda y derecha del Haz de His y de las fibras de Purkinje, cuya acción sincrónica transmite rápidamente el impulso hacia los ventrículos.

El sistema de conducción se desarrolla a partir de cardiomiocitos que derivan de un progenitor miocárdico común, ya presente en el corazón tubular embrionario.^{26,27} De hecho, existen dos modelos de formación del sistema de conducción cardíaco, el modelo de reclutamiento y el modelo de especificación temprana. El primero de ellos sugiere que el sistema de conducción cardíaco se desarrolla por un progresivo reclutamiento de cardiomiocitos multipotentes.²⁷ Por el contrario, el segundo modelo propone que una subpoblación de miocitos embrionarios está destinada a diferenciarse lentamente y proliferar hasta formar los componentes del sistema de conducción, mientras que otra subpoblación se diferencia y prolifera más rápidamente dando lugar al miocardio contráctil.²⁸⁻³ El desarrollo cardiovascular y

en concreto la especificación de los cardiomiocitos, es un proceso complejo que implica la interacción de numerosas proteínas. Entre ellas, TGF β 2³², BMP2³³, FGF³⁴, YAP³⁵, Nkx2.5 y Islet 1.³⁶

1.5. Interacción celular durante el desarrollo cardíaco

La señalización entre diferentes linajes celulares es esencial para el correcto desarrollo de los diferentes tejidos que forman el corazón, como se ha descrito por ejemplo entre epicardio y miocardio³⁷, endocardio y miocardio³⁸ o fibroblastos y endocardio⁴⁰. Un tipo celular del que todavía se sabe poco pero que juega un papel fundamental en esta señalización cruzada entre tejidos cardíacos es el fibroblasto cardíaco.

Los fibroblastos cardíacos son las células más abundantes del corazón y sintetizan una amplia variedad de los componentes de la matriz extracelular. Durante años se ha pensado que eran simples células estructurales del tejido conectivo pero actualmente se sabe que juegan numerosas e importantes funciones durante el desarrollo cardíaco y su remodelación después de sufrir un daño tisular.

Los fibroblastos cardíacos se pueden identificar por su expresión de marcadores tales como, DDR-2⁴¹, cadherina 11⁴², vimentina⁴³, fibronectina⁴⁵, periostina^{46,47} o Fsp1.⁴⁸

1.6. La proteína FSP1/S100A4

Fsp1 (*Fibroblasts specific protein 1*), pertenece a la familia de proteínas de unión a calcio S100⁴⁹, una familia de proteínas pequeñas (10-12 kDa), que no tienen actividad enzimática^{50,51} y que pueden ser secretadas al espacio extracelular en algunos casos.⁵² Esta proteína fue descubierta por primera vez por el grupo del Dr. Ebradize en 1989 y fue nombrada como metastasina-1⁵³, actualmente también es conocida como S100A4, p9KA, pEL-98, 18^a2, CAPL y calvasculina.⁵⁴

Como ya hemos indicado, la proteína Fsp1 se encuentra en fibroblastos cardíacos y en fibroblastos del tejido conectivo que se encuentra en distintos órganos y se ha sugerido como un marcador específico de este tipo celular, tanto en cultivo *in-vitro*⁴⁸ como en modelos experimentales *in-vivo*.⁵⁵ En condiciones normales los fibroblastos son las células que secretan la mayor parte de los componentes de la matriz extracelular. Su activación en condiciones patológicas implica una síntesis masiva de matriz extracelular que es esencial en el desarrollo de respuestas fibróticas.

En el corazón, la fibrosis es una respuesta patológica común que puede activarse tras un daño tisular prolongado o una inflamación crónica, que produce el reclutamiento y diferenciación de los fibroblastos hacia miofibroblastos. Los miofibroblastos (fibroblastos cardíacos activados) sintetizan altos niveles de colágeno en cortos periodos de tiempo, mientras que los fibroblastos quiescentes sintetizan bajos niveles de dicha proteína en largos periodos de tiempo. El perfil de expresión proteica también varía entre estos dos tipos celulares, de hecho, algunos miofibroblastos pueden ser identificados por la expresión de alfa actina de musculatura lisa, vimentina o fibronectina. Sin embargo, ninguno de ellos es un marcador específico de miofibroblastos.

La deposición excesiva de colágeno en la matriz extracelular puede separar, física y eléctricamente, a los cardiomiocitos adyacentes, un proceso conocido como fibrosis intersticial reactiva, o puede reemplazar completamente el espacio dejado tras la muerte de cardiomiocitos, un proceso conocido como fibrosis reparativa.⁵⁶

La fibrosis reparativa inicial es crucial para prevenir la ruptura de la pared ventricular, pero una respuesta fibrótica excesiva y la fibrosis reactiva que se produce alrededor del área dañada son perjudiciales porque producen una pérdida progresiva de la capacidad contráctil del corazón y pueden desembocar en un fallo cardíaco.⁵⁷ Además de la acumulación excesiva de matriz extracelular, la fibrosis reactiva también se caracteriza por la proliferación y la diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos.⁵⁸ Tras la reparación del daño, los miofibroblastos generalmente sufren apoptosis^{59,60} o se inactivan.⁶¹⁻⁶⁴

1.7. Fsp1 en otros tejidos cardíacos

A pesar del uso de Fsp1 como un marcador recurrente específico de fibroblastos en el estudio de la fibrosis^{55,65,66}, cada vez más evidencias cuestionan la especificidad de Fsp1 como un marcador fibroblástico, sugiriendo que otros tipos celulares tales como los macrófagos⁶⁷, las células dendríticas⁶⁸, los linfocitos⁶⁹, las células musculares lisas de la vasculatura⁷⁰ y las células endoteliales⁷¹ presentan dicho marcador. Resultados aún no publicados de nuestro grupo de investigación indican que esta proteína se expresa en subpoblaciones de la vasculatura y del sistema de conducción cardíaco.

2. Objetivos

El objetivo principal de proyecto de investigación es estudiar el desarrollo embrionario y la diferenciación de los progenitores fibroblásticos del corazón, así como analizar la regulación celular y molecular de la fibrosis durante la enfermedad cardíaca en relación con el origen celular. También se estudiarán las funciones de la proteína FSP1/S100A4, tradicionalmente considerada como un marcador de células fibroblásticas, en otros tejidos cardíacos.

3. Abordaje experimental

Para llevar a cabo este proyecto se están utilizando múltiples líneas transgénicas en el ratón. Por un lado, uno de los transgénicos presenta el gen de la proteína verde fluorescente GFP bajo el promotor del gen Fsp1. Esta construcción génica nos permite trazar las células que expresan Fsp1 gracias a la proteína GFP. Gracias a esto, se está analizando la expresión de Fsp1 en el corazón desde etapas tempranas del desarrollo hasta el tejido adulto. La expresión conjunta de Fsp1 y otras moléculas relacionadas con los fenotipos fibroblástico (Ddr-2), vasculares (Cd31, Prox1, endomucina) o

del tejido de conducción cardíaco (Contactina-2, HCN4) ha sido también evaluada mediante inmunohistoquímica. Para ello, se han extraído embriones de diferentes estadios, se han analizado corazones de ratones neonatos y adultos.

Para estudiar la función de la proteína Fsp1 en diferentes tejidos, están previstos experimentos en los que vamos a utilizar el transgénico Fsp1-Flox. La tecnología Cre-LoxP nos permite analizar el efecto de una delección condicional, específica de tejido. En nuestro caso, vamos a deleccionar Fsp1 en distintos tejidos cardíacos mediante el cruce de Fsp1-Flox con diferentes líneas que expresan la proteína Cre bajo el control de los genes Wt1, Troponina-1 y Tie2. Con estos cruces vamos a deleccionar Fsp1 en las células epicárdicas y derivadas de epicardio, en células miocárdicas, y en células endoteliales, respectivamente.

Durante el desarrollo de nuestro trabajo, hemos identificado dos poblaciones celulares que expresan Fsp1. Una de ellas es de naturaleza endotelial y la otra es de tipo miocárdico que por su posición corresponde a progenitores de las porciones más distales del sistema de conducción. Actualmente, se están caracterizando ambas poblaciones y se está estudiando la función de la proteína Fsp1 en los tejidos de interés.

Financiación

Ministerio de Economía (MINECO) de España, BFU2015-65783-R y SAF2015-71863 (J.M. Pérez-Pomares; Instituto de Salud Carlos III [MINECO-ISCIII]), RD16/0011/0030-TERCEL (J.M. Pérez-Pomares); I Plan Propio-Universidad de Málaga (J.A. Guadix); Beca de formación de doctores FPU14/01444 (S. Cano-Ballesteros).

Referencias

1. MEILHAC SM, ESNER M, KELLY RG, NICOLAS JF, BUCKINGHAM ME. The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Dev Cell*. 2004;6:685-98.
2. BUCKINGHAM M, MEILHAC S, ZAFFRAN S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. 2005;6:826-35.
3. TABER LA. Biophysical mechanisms of cardiac looping. *Int J Dev Biol*. 2006;50:323-32.
4. HAMADA H, TAM PPL. Mechanisms of left-right asymmetry and patterning: driver, mediator and responder. *F1000Prime Rep*. 2014;9:1-9.
5. MOORMAN AFM, CHRISTOFFELS VM. Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution. *Physiol Rev*. 2003;83:1223-67.
6. ANDERSON RH, RAZAVI R, TAYLOR AM. Cardiac anatomy revisited. *J Anat*. 2004;205:159-77.
7. TOMANEK RJ, ZHENG W. Role of growth factors in coronary morphogenesis. *Texas Hear Inst J*. 2002;29:250-4.
8. SWIFT MR, WEINSTEIN BM. Arterial-venous specification during development. *Circ Res*. 2009;104:576-88.
9. ADAMS RH, ALITALO K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:464-78.

10. POTENTE M, GERHARDT H, CARMELIET P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146:873–87.
11. SABIN FR. On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig. *Am J Anat*. 1904;3:183–95.
12. SCHULTE-MERKER S, SABINE A, PETROVA TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*. 2011;193:607–18.
13. PFLICKE H, SIXT M. Preformed portals facilitate dendritic cell entry into afferent lymphatic vessels. *J Exp Med*. 2009;206:2925–35.
14. PFEIFFER F, KUMAR V, BUTZ S, VESTWEBER D, IMHOF BA, STEIN J V, et al. Distinct molecular composition of blood and lymphatic vascular endothelial cell junctions establishes specific functional barriers within the peripheral lymph node. *Eur J Immunol*. 2008;38:2142–55.
15. DEJANA E, TOURNIER-LASSERVE E, WEINSTEIN BM. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Dev Cell*. 2009;16:209–21.
16. ALIMI YS, BARTHELEMY P, JUHAN C. Venous pump of the calf: A study of venous and muscular pressures. *J Vasc Surg*. 1994;20:728–35.
17. KUGLER C, STRUNK M, RUDOFKY G. Venous pressure dynamics of the healthy human leg. *J Vasc Res*. 2001;38:20–9.
18. SCHMID-SCHÖNBEIN GW. The Second Valve System in Lymphatics. *Lymphat Res Biol*. 2003;1:25–31.
19. BAZIGOU E, MAKINEN T. Flow control in our vessels: Vascular valves make sure there is no way back. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:1055–66.
20. HARVEY W. *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus: being a facsimile of the 1628 Francofurti edition, together with the Keynes English translation of 1928* [Internet]. Birmingham, Ala.: Classics of Medicine Library; 1978. p. 72, xiv, 126 p., [2] leaves of plates. (De motu cordis.English & Latin).
21. MÄKINEN T, ADAMS RH, BAILEY J, LU Q, ZIEMIECKI A, ALITALO K, et al. PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev*. 2005;19:397–410.
22. BAZIGOU E, LYONS OTA, SMITH A, VENN GE, COPE C, BROWN NA, et al. Genes regulating lymphangiogenesis control venous valve formation and maintenance in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:2984–92.
23. DANUSSI C, DEL BEL BELLUZ L, PIVETTA E, MODICA TME, MURO A, WASSERMANN B, et al. EMILIN1/α9β1 Integrin Interaction Is Crucial in Lymphatic Valve Formation and Maintenance. *Mol Cell Biol*. 2013;33:4381–94.
24. ZHANG S EN, SU Y XIONG, ZHENG G SEN, LIANG Y JIE, LIAO G QING. Reinnervated nerves contribute to the secretion function and regeneration of denervated submandibular glands in rabbits. *Eur J Oral Sci*. 2014;122:372–81.
25. MIKAWA T, HURTADO R. Development of the cardiac conduction system. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18:90–100.
26. GOURDIE RG, MIMA T, THOMPSON RP, MIKAWA T. Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development*. 1995;121:1423–31.
27. CHENG G, LITCHENBERG WH, COLE GJ, MIKAWA T, Thompson RP, Gourdie RG. Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development*. 1999;126:5041–9.
28. HABETS PEMH, MOORMAN AFM, CLOUT DEW, VAN ROON MA, LINGBEEK M, VAN LOHUIZEN M, et al. Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: Implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev*. 2002;16:1234–46.
29. CHRISTOFFELS VM, HOOGAARS WMH, TESSARI A, CLOUT DEW, MOORMAN AFM, CAMPIONE M. T-Box Transcription Factor Tbx2 Represses Differentiation and Formation of the Cardiac Chambers. *Dev Dyn*. 2004;229:763–70.
30. HOOGAARS WMH, TESSARI A, MOORMAN AFM, DE BOER PAJ, HAGOORT J, SOUFAN AT,

- et al.* The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res.* 2004;62:489–99.
31. HOOGAARS WMH, ENGEL A, BRONS JF, VERKERK AO, DE LANGE FJ, WONG LYE, *et al.* Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev.* 2007;21:1098–112.
 32. DICKSON MC, SLAGER HG, DUFFIE E, MUMMERY CL, AKHURST RJ. RNA and protein localisations of TGF beta 2 in the early mouse embryo suggest an involvement in cardiac development. *Development.* 1993;117:625–39.
 33. ZHANG H, BRADLEY A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development.* 1996;122:2977–86.
 34. LINCOLN J, ALFIERI CM, YUTZEY KE. BMP and FGF regulatory pathways control cell lineage diversification of heart valve precursor cells. *Dev Biol.* 2006;292:290–302.
 35. WANG Y, HU G, LIU F, WANG X, WU M, SCHWARZ JJ, *et al.* Deletion of YAP Specifically in Cardiac and Vascular Smooth Muscle Cells Reveals a Crucial Role for YAP in Mouse Cardiovascular Development Conclusions—YAP plays a critical role in cardiac/smooth muscle cell proliferation during cardiovascular development. *Circ Res March.* 2014;14:957–65.
 36. ZHOU B, VON GISE A, MA Q, RIVERA-FELICIANO J, PU WT. Nkx2.5 and Islet1 expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. *Biochem Biophys Res Comm.* 2008;375:450–3.
 37. MAHTAB EAF, WIJFFELS MCEF, VAN DEN AKKER NMS, HAHURIJ ND, LIE-VENEMA H, WISSE LJ, *et al.* Cardiac malformations and myocardial abnormalities in Podoplanin knockout mouse embryos: Correlation with abnormal epicardial development. *Dev Dyn.* 2008;237:847–57.
 38. BRESSAN M, YANG PB, LOUIE JD, NAVETTA AM, GARRIOCK RJ, MIKAWA T. Reciprocal myocardial-endocardial interactions pattern the delay in atrioventricular junction conduction. *Development.* 2014;141:4149–57.
 39. IEDA M, TSUCHIHASHI T, IVEY KN, ROSS RS, HONG TT, SHAW RM, *et al.* Cardiac Fibroblasts Regulate Myocardial Proliferation through β 1 Integrin Signaling. *Dev Cell.* 2009;16:233–44.
 40. KURUVILLA L, NAIR RR, UMASHANKAR PR, LAL AV, KARTHA CC. Endocardial endothelial cells stimulate proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts. *Cell Biochem Biophys.* 2007;47:65–72.
 41. GOLDSMITH EC, HOFFMAN A, MORALES MO, POTTS JD, PRICE RL, MCFADDEN A, *et al.* Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn.* 2004;230:787–94.
 42. SIMONNEAU L, KITAGAWA M, SUZUKI S, THIERY JP. Cadherin 11 expression marks the mesenchymal phenotype: Towards new functions for cadherins?? *Cell Commun Adhes.* 1995;3:115–30.
 43. WANG J, CHEN H, SETH A, MCCULLOCH CA. Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H1871–81.
 44. LIU S, XU S, BLUMBACH K, EASTWOOD M, DENTON CP, ECKES B, *et al.* Expression of integrin beta1 by fibroblasts is required for tissue repair in vivo. *J Cell Sci.* 2010;123:3674–82.
 45. CONNOR NS, AUBIN JE, SODEK J. Independent expression of type I collagen and fibronectin by normal fibroblast-like cells. *J Cell Sci.* 1983;63:233–44.
 46. KRUYNSKA-FREJTAG A, MACHNICKI M, ROGERS R, MARKWALD RR, CONWAY SJ. Periostin (an osteoblast-specific factor) is expressed within the embryonic mouse heart during valve formation. *Mech Dev.* 2001;103:183–8.
 47. NORRIS RA, POTTS JD, YOST MJ, JUNOR L, BROOKS T, TAN H, *et al.* Periostin promotes a fibroblastic lineage pathway in atrioventricular valve progenitor cells. *Dev Dyn.* 2009;238:1052–63.
 48. STRUTZ F. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol.* 1995;130:393–405.
 49. MOORE BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19:739–44.

50. SANTAMARIA-KISIEL L, RINTALA-DEMPSEY AC, SHAW GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J*. 2006;396:201–14.
51. DONATO R, R. CANNON B, SORCI G, RIUZZI F, HSU K, J. WEBER D, et al. Functions of S100 Proteins. *Curr Mol Med*. 2013;13:24–57.
52. SCHÄFER BW, HEIZMANN CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. *Trends Biochem Sci*. 1996;21:134–40.
53. EBRALIDZE A, TULCHINSKY E, GRIGORIAN M, AFANASYEVA A, SENIN V, REVAZOVA E, et al. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev*. 1989;3:1086–93.
54. WATANABE Y, USUDA N, TSUGANE S, KOBAYASHI R, HIDAHA H. Calvasculin, an encoded protein from mRNA termed pEL-98, 18A2, 42A, or p9Ka, is secreted by smooth muscle cells in culture and exhibits Ca²⁺-dependent binding to 36-kDa microfibril-associated glycoprotein. *J Biol Chem*. 1992;267:17136–40.
55. LAWSON WE, POLOSUKHIN V V., ZOIA O, STATHOPOULOS GT, HAN W, PLIETH D, et al. Characterization of fibroblast-specific protein 1 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:899–907.
56. SILVER MA, PICK R, BRILLA CG, JALIL JE, JANICKI JS, WEBER KT. Reactive and reparative fibrillar collagen remodelling in the hypertrophied rat left ventricle: Two experimental models of myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*. 1990;24:741–7.
57. TALMAN V, RUSKOAHO H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*. 2016;365:563–81.
58. KENDALL RT, FEGHALI-BOSTWICK CA. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. *Front Pharmacol*. 2014;5 MAY:1–13.
59. DESMOULIÈRE A, REDARD M, DARBY I, GABBIANI G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995;146:56–66.
60. ABE M, YOKOYAMA Y, ISHIKAWA O. A possible mechanism of basic fibroblast growth factor-promoted scarless wound healing: The induction of myofibroblast apoptosis. *Eur J Dermatology*. 2012;22:46–53.
61. HECKER L, JAGIRDAR R, JIN T, THANNICKAL VJ. Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD. *Exp Cell Res*. 2011;317:1914–21.
62. KISSELEVA T, CONG M, PAIK Y, SCHOLTEN D, JIANG C, BENNER C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:9448–53.
63. TROEGER JS, MEDERACKE I, GWAK G, DAPITO DH. Deactivation of Hepatic Stellate Cells during Liver Fibrosis Resolution in Mice. *NIH Public Access*. 2012;143:1–17.
64. TALELE NP, FRADETTE J, DAVIES JE, KAPUS A, HINZ B. Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4:1016–30.
65. ZEISBERG EM, POTENTA SE, SUGIMOTO H, ZEISBERG M, KALLURI R. Fibroblasts in Kidney Fibrosis Emerge via Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:2282–7.
66. PASCU EI, PISOSCHI CG, ANDREI AM, MUNTEANU MC, RAUTEN AM, SCRIECIU M, et al. Heterogeneity of collagen secreting cells in gingival fibrosis—an immunohistochemical assessment and a review of the literature. *Rom J Morphol Embryol*. 2015;56:49–61.
67. OSTERREICHER CH, PENZ-OSTERREICHER M, GRIVENNIKOV SI, GUMA M, KOLTSOVA EK, DATZ C, et al. Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:308–13.
68. BOOMERSHINE CS, CHAMBERLAIN A, KENDALL P, AFSHAR-SHARIF AR, HUANG H, WASHINGTON MK, et al. Autoimmune pancreatitis results from loss of TGF β signalling in S100A4-positive dendritic cells. *Gut*. 2009;58:1267–74.
69. LE HIR M, HEGYI I, CUENI-LOFFING D, LOFFING J, KAISLING B. Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys. *Histochem Cell Biol*. 2005;123:335–66.

70. BRISSET AC, HAO H, CAMENZIND E, BACCHETTA M, GEINOZ A, SANCHEZ JC, *et al.* Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro. *Circ Res.* 2007;100:1055–62.
71. SEMOV A, MORENO MJ, ONICHTCHENKO A, ABULROB A, BALL M, EKIEL I, *et al.* Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem.* 2005;280:20833–41.

El papel de los derivados epicárdicos en el desarrollo cardíaco, en el origen de enfermedades congénitas y en la respuesta al daño durante la embriogénesis



Paul Palmquist Gomes,^{a, b} Juan Antonio Guadix,^{a, b}
José María Pérez-Pomares^{a, b}

^a Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, Instituto Malagueño de Biomedicina (IBIMA),
Campus de Teatinos s/n, 29080 Málaga (España).

^b BIONAND, Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología
(Junta de Andalucía, Universidad de Málaga), c/ Severo Ochoa n°25,
29590 Campanillas (Málaga), España.

Resumen

En este capítulo se tratarán distintos aspectos relacionados con cuestiones relativas al estudio del corazón embrionario, abarcando desde el desarrollo del sistema coronario y su asociación con algunas enfermedades congénitas cardíacas hasta la respuesta del ventrículo a un daño experimental. Este proyecto de investigación se centra en el estudio de los mecanismos que regulan la diferenciación de células cardíacas en este contexto, utilizando embriones de ratón y de ave como modelos experimentales complementarios.

1. Introducción

1.1. El desarrollo del corazón y el infarto de miocardio

El corazón es un órgano cuyo desarrollo comienza en estadios tempranos de la embriogénesis a partir de un conjunto de células de origen mesodérmico. Los progenitores cardíacos se organizan para formar un primordio tubular hueco cuyo latido permite la circulación sanguínea embrionaria. Este primordio cardíaco se organiza en el espacio mediante un proceso llamado “looping”¹ que es esencial para el correcto alineamiento de las futuras cámaras características del corazón adulto (dos atrios y dos ventrículos). Una alta tasa de proliferación en las células que forman el miocardio, denominadas cardiomiocitos, así como la contribución de células de múltiples orígenes permiten el crecimiento y la morfogénesis del órgano.²

A pesar de esta alta tasa de proliferación embrionaria, los cardiomiocitos del corazón adulto apenas proliferan.³ Esta peculiaridad está generalmente relacionada con la limitada capacidad de este órgano para regenerar un daño ventricular. En el corazón humano, hay varios eventos que pueden provocar un daño ventricular, siendo el más común el infarto de miocardio (IM). El IM consiste en la muerte masiva

de la musculatura miocárdica frecuentemente asociada con procesos de isquemia causados por anomalías en el flujo coronario. Esta muerte por isquemia activa una serie de mecanismos reparativos en el ventrículo que generan una cicatriz fibrosa no funcional que se expande de forma crónica.⁴ El crecimiento continuo de esta cicatriz conlleva a la pérdida de las propiedades contráctiles del corazón, la hipertrofia del órgano y la insuficiencia cardíaca.

En otros casos, el origen de esta insuficiencia puede estar asociado a malformaciones congénitas cardíacas. La importancia en el estudio del origen y la formación del corazón durante la embriogénesis reside en que la mayor parte de estas enfermedades congénitas tienen un origen desconocido.

1.2. Origen y formación de la vasculatura coronaria

El corazón está esencialmente formado por tres capas concéntricas de tejido: la más externa se denomina epicardio, seguida por el miocardio y en la cara interna se encuentra el endocardio. El epicardio y las células derivadas de epicardio han sido extensamente estudiadas debido al papel fundamental que este tipo celular ejerce durante el desarrollo embrionario, contribuyendo a la vascularización y compactación del miocardio.⁵ Las células que forman el miocardio, denominadas cardiomiocitos, presentan una demanda de oxígeno elevada para poder llevar a cabo sus funciones vitales. En las primeras etapas del desarrollo cardíaco, estas células adquieren fácilmente oxígeno de su entorno por difusión, pero la progresiva compactación del miocardio requiere una irrigación adecuada que proporcione oxígeno a estas células. El aporte de oxígeno y nutrientes en el miocardio se lleva a cabo gracias a la irrigación del tejido por parte de la vasculatura coronaria.

El sistema vascular coronario es una red compleja de arterias, capilares y venas que permite la circulación sanguínea en el corazón. A pesar de la importancia de los vasos coronarios, aspectos fundamentales del origen embrionario de estas estructuras, así como los mecanismos celulares y moleculares que regulan el patrón arterio-venoso coronario no se conocen en detalle.

El origen embrionario de las células endoteliales coronarias se ha discutido ampliamente utilizando cepas de ratones transgénicos, donde diferentes estudios proponen que el endotelio coronario se forma a partir de tan solo una población de células.^{6,7} Sin embargo, estudios recientes sugieren que el endotelio coronario embrionario puede derivar de la contribución sincrónica de varias fuentes celulares.⁸⁻¹²

En este trabajo, las características del embrión de ave como modelo de estudio nos permiten estudiar los mecanismos del desarrollo implicados en la formación de los vasos coronarios mediante técnicas experimentales que no son posibles de realizar en el embrión de ratón. Gracias a los datos obtenidos sugerimos que el desarrollo coronario requiere la contribución de múltiples linajes celulares de diferentes orígenes.¹³

1.3. El embrión de ave como modelo de estudio

A pesar de que el uso de modelos transgénicos en embriones de ratón se ha convertido en una herramienta muy útil para el estudio de la contribución de linajes celulares durante el desarrollo, en este trabajo utilizamos el embrión de ave como modelo complementario en el estudio del desarrollo cardiovascular embrionario.

Al contrario que en el caso del ratón, este modelo nos permite abarcar el problema desde una vía alternativa gracias a la fácil manipulación *in ovo* del embrión. Gracias a esta característica, hemos desarrollado un protocolo que nos permite generar un daño experimental en tejidos embrionarios usando una sonda metálica enfriada con nitrógeno líquido.¹⁴ Este protocolo combinado con el uso de una cepa de ratón transgénica nos ha permitido describir el posible origen de una cardiopatía congénita rara, la fístula de la arteria coronaria.

1.4. Malformaciones congénitas coronarias de origen desconocido: fístula de la arteria coronaria

Las anomalías coronarias están generalmente asociadas a enfermedades congénitas del corazón que afectan alrededor del 1% de los recién nacidos.¹⁵ Estas malformaciones pueden afectar a la salud del individuo poco tiempo después de nacer, o bien se pueden manifestar durante la vida adulta a modo de enfermedades cardíacas congénitas adultas.^{16,17} A pesar de la baja incidencia de estas enfermedades, algunos ejemplos como la no compactación ventricular¹⁸ y anomalías en los vasos coronarios¹⁹ pueden afectar a la función del órgano, resultando en una insuficiencia cardíaca y la consecuente muerte del individuo.

En el caso de las anomalías asociadas a los vasos coronarios, estas pueden tener un origen adquirido a lo largo de la vida del individuo o bien pueden tener un origen congénito. En el primer caso, se ha descrito que pacientes que se han sometido a técnicas invasivas de imagen cardíaca pueden desarrollar anomalías coronarias, entre las cuales se encuentra la fístula de la arteria coronaria.²⁰ Sin embargo, el origen congénito de esta anomalía es desconocido. Esta patología consiste en una comunicación anómala entre el lumen de una arteria coronaria y, o bien otro vaso sanguíneo, o bien el interior de alguna cámara del corazón como el ventrículo.^{21,22} La fístula arterio-ventricular es el tipo de fístula más común, siendo más fácil de encontrar en el ventrículo derecho respecto al izquierdo.²³

Aunque las fístulas de la arteria coronaria pueden ser asintomáticas, suelen provocar a largo plazo variaciones en la hemodinámica sistémica debido al arresto de parte de la circulación sanguínea por dicha estructura. Desde una perspectiva clínica, se recomienda la monitorización de pequeñas fístulas asintomáticas debido a que estas pequeñas estructuras en niños pueden aumentar en tamaño con la edad y llevar a complicaciones como la hipertrofia miocárdica, la endocarditis, la dilatación ventricular y el fallo cardíaco.^{21,22,24}

1.5. El infarto de miocardio

Como hemos visto previamente, las enfermedades congénitas cardíacas pueden desembocar en muerte súbita. Según la organización mundial de la salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo occidental (<http://www.who.int/classifications/icd>), siendo el infarto de miocardio asociado a enfermedad coronaria la más frecuente y la que conlleva una mayor mortalidad y morbilidad.²⁵

Desde una perspectiva fisiopatológica, el infarto de miocardio consiste en la pérdida significativa de musculatura cardíaca como consecuencia de episodios sostenidos de isquemia asociados a anomalías en el flujo coronario. En respuesta a la muerte masiva del tejido miocárdico, el corazón activa una respuesta reparativa basada en la expansión de las poblaciones de fibroblastos cardíacos residentes²⁶ que sintetizan grandes cantidades de matriz extracelular, formando una cicatriz fibrosa que sustituye al músculo muerto y, a largo plazo, altera gravemente la función cardíaca.

Hoy en día, tanto el continuo aumento de los casos de infarto de miocardio en todo el mundo como la cronificación de la enfermedad y su tendencia natural hacia la insuficiencia cardíaca ponen de manifiesto la necesidad del desarrollo de terapias alternativas para el tratamiento de la enfermedad. Esta necesidad es especialmente urgente si se tienen en cuenta el limitado número de corazones disponibles para el trasplante,²⁷ la única solución clínica a la insuficiencia cardíaca realmente viable a largo plazo.

1.6. Reparación vs regeneración

Desde una perspectiva biológica, la sustitución de un tejido determinado por otro con propiedades distintas recibe el nombre de reparación.²⁸ Este proceso es el predominante en el caso del corazón humano tras la muerte masiva de musculatura miocárdica. El término reparación es usado en muchos contextos, erróneamente, como sinónimo de regeneración. Es evidente que la regeneración, es decir, la reposición de un tejido muerto o no funcional por otro celular y funcionalmente idéntico al original, implica a mecanismos celulares y moleculares distintos a los de la reparación.^{29,30} Saber distinguir entre estas dos respuestas y entender la biología de los tipos celulares implicados es fundamental para el desarrollo de cualquier aproximación novedosa en el tratamiento del infarto de miocardio.

1.7. Modelos animales para el estudio de la regeneración cardíaca

Los procesos de regeneración tisular se encuentran ampliamente representados en los diferentes phyla que componen el Reino de los Metazoos (Animales),^{31,32} aunque en un mismo taxón supraespecífico pueden encontrarse organismos con capacidad regenerativa y otros que carecen de ella.³³ Por ejemplo, mientras que algunas especies de peces teleosteos son capaces de regenerar buena parte del ventrículo tras un

daño³⁴⁻³⁶ otros grupos de vertebrados como los mamíferos presentan un potencial muy limitado a la hora de regenerar ciertos tejidos.^{28, 37-39} Debido a la existencia de mecanismos regenerativos en ciertos modelos animales, la investigación preclínica en estos modelos resulta imperativa para conocer las respuestas biológicas que intervienen en los procesos regenerativos y reparativos en tejidos dañados.

Sin embargo, estudios recientes muestran que la regeneración cardíaca es un concepto difuso, que no sólo depende del organismo y que puede estar presente en unas especies y ausente en otras dentro de un mismo grupo. Así se ha estudiado que factores como el ambiente,⁴⁰ el tipo y tamaño de la herida o la edad del individuo influyen en su capacidad regenerativa.⁴¹

Dentro del grupo de los anfibios existe una gran controversia en este tema. Por ejemplo, mientras algunos anfibios como el ajolote⁴² o el tritón⁴³ regeneran el ventrículo tras una resección apical, en otros anfibios existe una mayor controversia ya que se han descrito respuestas tisulares diferentes en especies pertenecientes a un mismo género. Así, mientras que la respuesta prevalente a una resección ventricular en *Xenopus laevis* es la reparación fibrótica,⁴⁴ en *Xenopus tropicalis* se han descrito fenómenos de regeneración cardíaca tras el mismo proceso.⁴⁵

Debido a estas discrepancias, la especie de vertebrado anamniota más estudiada en el ámbito de la regeneración cardíaca sigue siendo el pez cebra. En este modelo, se ha descrito que la formación de una estructura de tipo blastema⁴⁶ y la proliferación de cardiomiocitos de-diferenciados en la zona trabecular del corazón⁴⁷ hace viable la regeneración miocárdica. Sin embargo, no todos los peces presentan la alta capacidad regenerativa del ventrículo del pez cebra, ya que hay especies como el pez medaka que no es capaz de regenerar el ventrículo tras un daño experimental.⁴⁸

A pesar de que la amputación de una pequeña parte del ventrículo es el tipo de daño experimental más común, no es el más reproducible. Hay otros métodos como la cauterización que permiten generar heridas altamente reproducibles y comparables al proceso isquémico consecuente al infarto de miocardio. Usando la cauterización con frío o criodaño se ha estudiado que el pez cebra también es capaz de regenerar este tipo de daño,⁴⁹ mientras que las especies de mamífero a las que se les ha sometido a criodaño ventricular han respondido de manera similar a un infarto de miocardio.³⁷⁻³⁹

Este método de criodaño ha permitido poner en duda la capacidad regenerativa del ratón en los primeros días de vida. Mientras que la regeneración miocárdica es un evento descrito en los ratones neonatos tras una resección ventricular apical,^{50,51} este modelo no muestra síntomas de regeneración ventricular tras un criodaño de tipo transmural (es decir, un daño que afecta a todo el grosor de la pared del ventrículo) más semejante al infarto de miocardio adulto.⁵²

De todos modos, en algunos mamíferos se ha observado que algunos tejidos ajenos al corazón muestran cierto potencial regenerativo durante los primeros días de vida,⁵³⁻⁵⁵ potencial que se pierde en la vida adulta. Además, se ha comprobado que las propiedades regenerativas de todos los tejidos se reducen con la edad, probablemente debido al envejecimiento del componente celular del que dependen los procesos regenerativos en dichos tejidos.⁵⁶ Estos datos sugieren que la capacidad regenerativa de los tejidos es mayor a estadios tempranos del desarrollo y se va perdiendo progresivamente. Se ha estudiado que el embrión de ratón sí es capaz de regenerar órganos

como la glándula submandibular en cultivo,⁵⁷ presentando un potencial regenerativo ausente en el órgano adulto.

A pesar de la imposibilidad de generar un daño *in vivo* en el corazón embrionario del mamífero, este procedimiento se puede llevar a cabo en el embrión de ave gracias a su fácil manipulación y re-incubación. Un protocolo de criodaño con nitrógeno líquido desarrollado en nuestro grupo permite dañar el corazón del embrión,¹⁴ facilitando el estudio *in vivo* de la respuesta a daño cardíaco en tejido embrionario.

2. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo analizar: 1) los fenómenos celulares y moleculares que regulan la migración y la diferenciación de las células proepicárdicas durante la embriogénesis, incluida su contribución clave al epicardio y a la formación de vasos sanguíneos coronarios y 2) el papel de estas células en las respuestas embrionarias al daño cardíaco experimental.

3. Abordaje experimental

Este trabajo se centra en el papel que los derivados del epicardio juegan en el desarrollo de anomalías congénitas y en la respuesta cardíaca a daño experimental durante el desarrollo. Estos estudios se están llevando a cabo mediante el uso combinado de embriones de mamífero (ratón) y de ave (pollo y codorniz).

El uso de líneas transgénicas en el caso del embrión de ratón nos permite estudiar cómo la ausencia de ciertos factores afecta al desarrollo cardíaco, mientras que el uso alternativo del embrión de ave nos permite analizar cómo la ablación o alteración *in ovo* de ciertos tejidos afecta al desarrollo del corazón.

3.1. Origen y desarrollo del endotelio coronario

La investigación de la vascularización cardíaca por el endotelio coronario durante el desarrollo embrionario ha sido un reto debido al número reducido de herramientas moleculares disponibles para la identificación y trazado de poblaciones endoteliales específicas.¹⁹ Una dificultad adicional que limita el análisis del crecimiento y migración de progenitores endoteliales es la elevada velocidad con la que estos tipos celulares se diferencian y se ensamblan para formar estructuras vasculares primitivas.⁵⁸⁻⁶⁰

La mayor controversia en este tema está basada en la asunción de que todo el endotelio coronario deriva de un mismo progenitor celular.^{7,19,61} Esta interpretación se respalda de resultados obtenidos a partir del trazado de linajes celulares en el modelo murino^{10,62} gracias al uso de animales transgénicos. La mayor desventaja en el estudio de estos modelos es la incapacidad de discriminar múltiples linajes celulares independientes que contribuyen de manera conjunta en el desarrollo basándonos en la expresión de un solo marcador molecular.⁶³

A pesar del bajo número de cepas transgénicas de aves, este modelo permite el uso de técnicas experimentales imposibles de realizar en embriones de mamífero, que pueden arrojar luz a ciertos procesos del desarrollo. Por ejemplo, el uso combinado de técnicas como la inyección intravenosa de lectinas fluorescentes, el desarrollo de quimeras codorniz-pollo (Figura 1, A) y el marcaje celular con colorantes vitales (por ejemplo, DiO) han permitido diseccionar el origen ontogenético de la vasculatura coronaria.¹³

Nuestros resultados muestran que células endoteliales/endocárdicas de al menos tres orígenes diferentes contribuyen de manera conjunta en la formación de la vasculatura coronaria del embrión. Esta conclusión está basada en varios experimentos. Por un lado, la inyección intravascular de lectinas fluorescentes LC-FITC a diferentes estadios del desarrollo nos permite distinguir dos grupos de vasos coronarios en formación. Uno de ellos corresponde con los derivados de las proyecciones dorsales del seno venoso, que invaden la cara dorsal del ventrículo. Estudios recientes sugieren al factor VEGF como la principal señal que guía el crecimiento de estos vasos coronarios en formación.⁶⁴⁻⁶⁶

Además del seno venoso, estudios previos muestran que angioblastos derivados del proepicardio migran hacia el miocardio ventricular.⁶⁷ La quimerización codorniz-pollo combinada con la inyección intravascular de lectinas nos ha permitido evaluar la contribución de estos angioblastos al desarrollo coronario.^{13,68} Por un lado, en estadios tempranos del desarrollo coronario, las células endoteliales derivadas del proepicardio se asocian e incorporan a la vasculatura coronaria derivada del seno venoso, formando parte de las venas prospectivas. Por otro lado, en estadios posteriores, estos derivados epicárdicos migran a través del ventrículo y forman vasos coronarios que ocupan una posición intramiocárdica, que permanecen desconectados del flujo de sangre venoso durante la primera mitad del desarrollo. Estos resultados sugieren que estas células endoteliales no están predestinadas a formar parte de un destino arterial o venoso, sino que la contribución de estos progenitores al endotelio vascular es equitativa, como se ha descrito previamente en la formación de vasos extraembrionarios.⁶⁹

Además de la contribución del seno venoso y del proepicardio, estudios en el embrión de ratón han identificado al endocardio ventricular como una tercera fuente de progenitores endoteliales vasculares.^{9,70} El trasplante de pequeñas piezas de ventrículo embrionario de codorniz a pollo nos ha permitido revelar que el endocardio del donante migra hasta formar parte del endocardio ventricular del hospedador. Gracias al uso de marcadores específicos de endotelio de codorniz, podemos trazar el destino de estas células que se han incorporado al endocardio del pollo, viendo que las células endocárdicas forman vasos coronarios en la pared del ventrículo. Estos resultados confirman el potencial del endocardio embrionario para contribuir al endotelio de vasos coronarios en el desarrollo del embrión de ave.

Por último, combinando el uso de técnicas de marcaje celular (DiO) con la quimerización codorniz-pollo desvelamos el posible origen de la vasculatura coronaria que irriga a las arterias aorta y pulmonar del corazón adulto. En los experimentos anteriormente descritos, confirmamos que esta vasculatura no procede de ninguna de las fuentes celulares ya mencionadas. En este trabajo observamos que dicha

vasculatura se forma gracias a la migración de precursores vasculares alojados en la región distal del tracto de salida cardíaco.

En resumen, este trabajo muestra que la formación de la vasculatura coronaria en el embrión requiere el reclutamiento y ensamblaje de progenitores endoteliales procedentes del endocardio del seno venoso, del endocardio ventricular, del proepicardio y de la parte distal del tracto de salida del corazón.

3.2. El origen de la fístula arterio-ventricular

Un trabajo que se está llevando a cabo gracias al uso simultáneo de embriones de ave y de ratón es el análisis del origen de una enfermedad congénita rara denominada fístula de la arteria coronaria.²¹ En este proyecto combinamos el uso del protocolo de criodañado previamente descrito en el embrión de ave¹⁴ (Figura 1, B-D) con el análisis de una línea transgénica murina que se caracteriza por el desarrollo incorrecto del epicardio mediante la delección génica de una proteína de tipo integrina en progenitores epicárdicos. En este trabajo, la ablación génica de los progenitores epicárdicos interrumpe el desarrollo del epicardio, lo que genera discontinuidades ventriculares debido a una disminución en la proliferación de los cardiomiocitos que forman la capa compacta del miocardio, generando protrusiones endocárdicas y la muerte del embrión. En este estudio, técnicas de secuenciación nos han permitido identificar cambios de expresión génica asociados a la presencia de esta enfermedad congénita, lo que nos permite comparar esta patología con casos previamente descritos en los humanos.

Por otro lado, la micromanipulación del embrión de ave nos proporciona información complementaria en este estudio. El protocolo de criodañado (Figura 1, B-D) permite generar una discontinuidad ventricular local en el corazón en desarrollo, lo que conlleva a una extrusión endocárdica como se describió previamente en el modelo transgénico murino (Figura 1, E). Como en este caso la formación de epicardio no se ve alterada, las células epicárdicas cubren completamente el endocardio extruido y se diferencian en células similares a fibroblastos que secretan grandes cantidades de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno. Como se ha descrito anteriormente, las células derivadas del epicardio tienen el potencial de formar parte de la vasculatura coronaria. En este caso, el origen ontogenético de esta patología no es la unión anómala entre una arteria coronaria y el lumen del ventrículo, sino la formación de una estructura semejante a una arteria coronaria a partir de una extrusión endocárdica. Dicha extrusión podría estar provocada por problemas de compactación ventricular, generando una patología congénita equivalente a la del corazón humano.

3.3. Regeneración cardíaca en el embrión

El protocolo de criodañado del corazón embrionario también nos permite estudiar la respuesta a daño miocárdico durante el desarrollo embrionario. La ventaja de trabajar con este modelo es la gran similitud existente entre el corazón en desarrollo de las aves y de los mamíferos. Además, combinando este método con el uso de otras

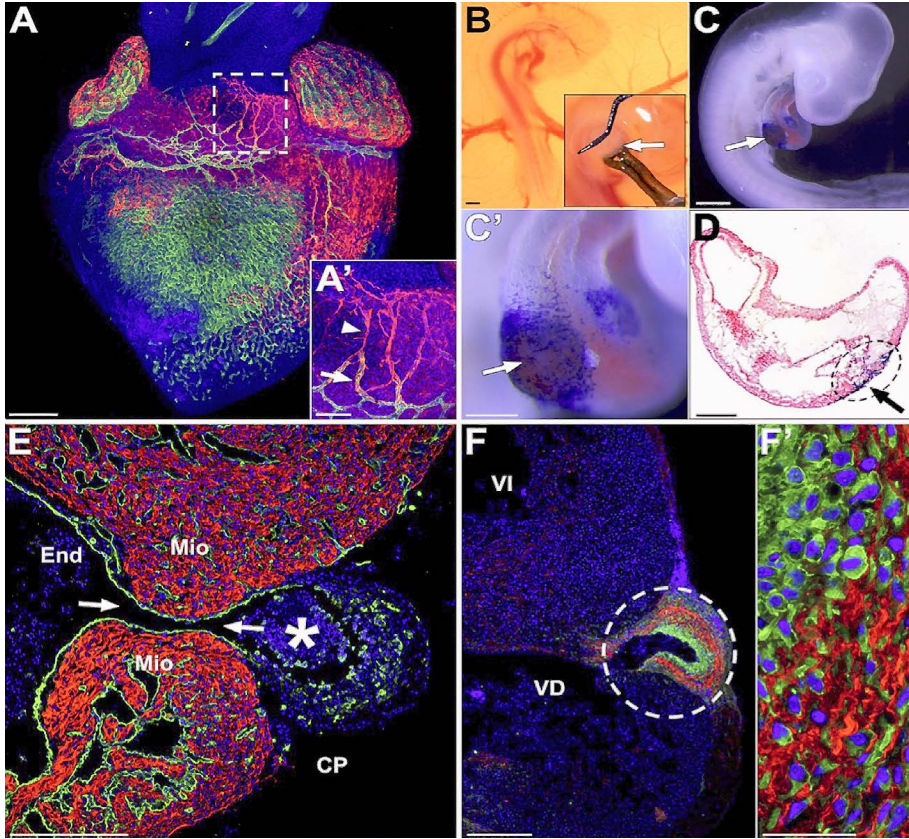


Figura 1. El embrión de pollo como modelo de estudio. El trasplante de células proepicárdicas de codorniz a corazones de pollo (A) permite trazar el destino de las células del donante usando el anticuerpo QH1 (A, señal roja). La inyección intravascular de lectina de *Lens culinaris* conjugadas con fluoresceína (LC-FITC) permite el marcaje de la vasculatura coronaria con flujo sanguíneo sistémico (A, Señal verde). Gracias a la combinación de estas dos técnicas podemos estudiar si los vasos coronarios derivados de epicardio (A, señal roja) se encuentran conectados (A', flecha) o desconectados (A', cabeza de flecha) a la circulación sanguínea coronaria. El protocolo de criodaño aplicado a embriones de pollo a un estadio HH16-17 (alrededor de 60 horas de incubación) (B) permite generar un daño ventricular *in ovo* gracias a un filamento de cobre enfriado en nitrógeno líquido (B, flecha). En la región cauterizada se observan células muertas marcadas con azul tripano (C-D, flecha). La discontinuidad ventricular generada (E, flechas) conlleva a la extrusión del endocardio hacia la cavidad pericárdica del embrión, formando una estructura globosa semejante a una fístula arterio-ventricular (E, asterisco). Cuatro días tras la cauterización, los embriones presentan grandes cantidades de alfa actina de musculatura lisa (F, señal verde) y colágeno de tipo 1 (F, señal roja) en el área dañada (F, línea discontinua). En esta zona, la proteína alfa actina de musculatura lisa está presente en el citoplasma de células de tipo fibroblástico (F', señal verde) mientras que el colágeno de tipo 1 se encuentra secretado en la matriz extracelular (F', señal roja). A: atrio; CP: cavidad pericárdica; End: endocardio; Mio: miocardio; TS: tracto de salida; V: ventrículo; VD: ventrículo derecho, VI: ventrículo izquierdo. Barras de escala: A: 300µm; A': 100µm; B,C: 500µm; C', D, E, F: 200µm; F': 25µm.

técnicas como la quimerización interespecífica es posible analizar el comportamiento de ciertos linajes celulares, como el epicardio, tras un daño miocárdico. El objetivo de este trabajo es identificar los programas endógenos del tejido cardíaco embrionario que se activan tras un daño que simula un infarto de miocardio.

Debido a que el objetivo final de esta tesis doctoral es identificar los programas cardíacos endógenos que se activan en respuesta a un daño experimental, esta investigación es relevante para el estudio de los mecanismos y las limitaciones naturales en los eventos de regeneración cardíaca en vertebrados. Aunque la proliferación de células miocárdicas es clave para comprender la regeneración cardíaca en otros modelos como el pez cebra⁷¹, nuestros resultados más recientes muestran que la alta capacidad proliferativa del ventrículo embrionario no es suficiente para sustentar un proceso regenerativo, siendo la reparación fibrótica (incluida la síntesis y depósito de colágeno) la respuesta predominante del corazón embrionario a un daño de tipo transmural (Figura 1, F-F').

Financiación

Ministerio de Economía (MINECO) de España, BFU2015-65783-R y SAF2015-71863 (J.M. Pérez-Pomares; Instituto de Salud Carlos III [MINECO-ISCIII]), RD16/0011/0030-TERCEL (J.M. Pérez-Pomares); I Plan Propio-Universidad de Málaga (J.A. Guadix).

Referencias

1. PATTEN BM. The formation of the cardiac loop in the chick. *Am J Anat.* 1922;30:373-97.
2. MEILHAC SM. Cardiac growth I : Cardiomyocyte proliferation. *ESC Textb Cardiovasc Dev.* 2018;75-85.
3. BERGMANN O, BHARDWAJ RD, BERNARD S, ZDUNEK S, WALSH S, ZUPICICH J, et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science (80-).* 2009;324:98-102.
4. JESSUP M, BROZENA S. Heart Failure. *N Engl J Med.* 2003;348:2007-18.
5. SMITS AM, DRONKERS E, GOUMANS M-J. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate. *Pharmacol Res.* 2018;127:129-40.
6. RED-HORSE K, UENO H, WEISSMAN IL, KRASNOW MA. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature.* 2010;464:549-53.
7. TIAN X, PU WT, ZHOU B. Cellular origin and developmental program of coronary angiogenesis. Vol. 116, *Circulation Research.* 2015. p. 515-30.
8. KATZ TC, SINGH MK, DEGENHARDT K, RIVERA-FELICIANO J, JOHNSON RL, EPSTEIN JA, et al. Distinct Compartments of the Proepicardial Organ Give Rise to Coronary Vascular Endothelial Cells. *Dev Cell.* 2012;22:639-50.
9. WU B, ZHANG Z, LUI W, CHEN X, WANG Y, CHAMBERLAIN AA, et al. Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. *Cell.* 2012;151:1083-96.
10. CANO E, CARMONA R, RUIZ-VILLALBA A, ROJAS A, CHAU Y-Y, WAGNER KD, et al. Extracardiac septum transversum/proepicardial endothelial cells pattern embryonic coronary arterio-venous connections. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113:656-61.

11. THÉVENIAU-RUISSY M, PÉREZ-POMARES JM, PARISOT P, BALDINI A, MIQUEROL L, KELLY RG. Coronary stem development in wild-type and *Tbx1* null mouse hearts. *Dev Dyn*. 2016;245:445–59.
12. ZHANG H, PU W, LI G, HUANG X, HE L, TIAN X, et al. Endocardium Minimally Contributes to Coronary Endothelium in the Embryonic Ventricular Free Walls. *Circ Res*. 2016;118:1880–93.
13. PALMQUIST-GOMES P, GUADIX JA, PÉREZ-POMARES JM. Avian embryonic coronary arterio-venous patterning involves the contribution of different endothelial and endocardial cell populations. *Dev Dyn*. 2018;247:686–98.
14. PALMQUIST-GOMES P, GUADIX JA, PÉREZ-POMARES JM. A chick embryo cryoinjury model for the study of embryonic organ development and repair. *Differentiation*. 2016;91:72–7.
15. VAN DER LINDE D, KONINGS EEM, SLAGER MA, WITSENBURG M, HELBING WA, TAKKENBERG JJM, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:2241–7.
16. ÁVILA P, MERCIER L-A, DORE A, MARCOTTE F, MONGEON F-P, IBRAHIM R, et al. Adult Congenital Heart Disease: A Growing Epidemic. *Can J Cardiol*. 2014;30:S410–9.
17. NTLIOUDI D, GIANNAKOULAS G, PARCHARIDOU D, PANAGIOTIDIS T, GATZOULIS MA, KARVOUNIS H. Adult congenital heart disease: A paradigm of epidemiological change. *Int J Cardiol*. 2016;218:269–74.
18. TOWBIN JA, LORTS A, JEFFERIES JL. Left ventricular non-compaction cardiomyopathy. *Lancet*. 2015;386:813–25.
19. PÉREZ-POMARES JM, DE LA POMPA JL, FRANCO D, HENDERSON D, HO SY, HOUYEL L, et al. Congenital coronary artery anomalies: A bridge from embryology to anatomy and pathophysiology—a position statement of the development, anatomy and pathology ESC Working Group. *Cardiovasc Res*. 2016;109:204–16.
20. RAJU MG, GOYAL SK, PUNNAM SR, SHAH DO, SMITH GF, ABELA GS. Coronary artery fistula: A case series with review of the literature. *J Cardiol*. 2009;53:467–72.
21. MANGUKIA C V. Coronary Artery Fistula. *Ann Thorac Surg*. 2012;93:2084–92.
22. GHANDOUR A, RAJIAH P. Unusual fistulas and connections in the cardiovascular system: A pictorial review. *World J Radiol*. 2014;6:169–76.
23. CIESLINSKI G, RAPPRICH B, KOBER G. Coronary anomalies: Incidence and importance. *Clin Cardiol*. 1993;16:711–5.
24. SAID SAM, THIADENS AAHJ, FIEREN MJCH, MEIJBOOM EJ, WERF T VAN DER, Bennink GBWE. Coronary artery fistulas. 2002;10.
25. MOZAFFARIAN D, BENJAMIN EJ, GO AS, ARNETT DK, BLAHA MJ, CUSHMAN M, et al. Heart disease and stroke statistics—2016 update a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133:e38–48.
26. RUIZ-VILLALBA A, SIMÓN AM, POGONTKE C, CASTILLO MI, ABIZANDA G, PELACHO B, et al. Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:2057–66.
27. TAYLOR DO, EDWARDS LB, BOUCEK MM, TRULOCK EP, AURORA P, CHRISTIE J, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-fourth Official Adult Heart Transplant Report—2007. *J Hear Lung Transplant*. 2007;26:769–81.
28. GALLIOT B, CRESCENZI M, JACINTO A, TAJBAKSH S. Trends in tissue repair and regeneration. *Development*. 2017;144:357–64.
29. SÁNCHEZ ALVARADO A. Regeneration and the need for simpler model organisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359:759–63.
30. GALLIOT B, GHILA L. Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Mol Reprod Dev*. 2010;77:837–55.
31. SANCHEZ-ALVARADO A. Regeneration in the metazoans: Why does it happen? *BioEssays*. 2000;22:578–90.

32. DURÁN I. Modelos de regeneración. Encuentros en la Biol. 2009;2:13-4.
33. LAI AG, ABOOBAKER AA. EvoRegen in animals: Time to uncover deep conservation or convergence of adult stem cell evolution and regenerative processes. Dev Biol. 2017;433:118-31.
34. POSS KD, WILSON LG, KEATING MT. Heart regeneration in zebrafish. Science (80-). 2002;298:2188-90.
35. JOPLING C, SLEEP E, RAYA M, MARTÍ M, RAYA A, BELMONTE JCI. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. Nature. 2010;464:606-9.
36. GRIVAS J, HAAG M, JOHNSON A, MANALO T, ROELL J, DAS TL, et al. Cardiac repair and regenerative potential in the goldfish (*Carrasius auratus*) heart. Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol. 2014;163:14-23.
37. JENSEN JA, KOSEK JC, HUNT TK, GOODSON WH, MILLER DC. Cardiac cryolesions as an experimental model of myocardial wound healing. Ann Surg. 1987;206:798-803.
38. CIULLA MM, PALIOTTI R, FERRERO S, BRAIDOTTI P, ESPOSITO A, GIANELLI U, et al. Left ventricular remodeling after experimental myocardial cryoinjury in rats. J Surg Res. 2004;116:91-7.
39. VAN DEN BOS EJ, MEES BME, DE WAARD MC, DE CROM R, DUNCKER DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;289:H1291-300.
40. SALLIN P, JAŻWIŃSKA A. Acute stress is detrimental to heart regeneration in zebrafish. Open Biol. 2016;6:160012-.
41. LIAO S, DONG W, ZHAO H, HUANG R, QI X, CAI D. Cardiac regeneration in *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis*: discrepancies and problems. Cell Biosci. 2018;8:32.
42. VARGAS-GONZÁLEZ A, PRADO-ZAYAGO E, LEÓN-OLEA M, GUARNER-LANS V, CANO-MARTÍNEZ A. Regeneración miocárdica en *Ambystoma mexicanum* después de lesión quirúrgica. Arch Cardiol Mex. 2005;75:21-9.
43. WITMAN N, MURTUZA B, DAVIS B, ARNER A, MORRISON JI. Recapitulation of developmental cardiogenesis governs the morphological and functional regeneration of adult newt hearts following injury. Dev Biol. 2011;354:67-76.
44. MARSHALL L, VIVIEN C, GIRARDOT F, PÉRICARD L, DEMENEIX BA, COEN L, et al. Persistent fibrosis, hypertrophy and sarcomere disorganisation after endoscopyguided heart resection in adult *Xenopus*. PLoS One. 2017;12:1-24.
45. LIAO S, DONG W, LV L, GUO H, YANG J, ZHAO H, et al. Heart regeneration in adult *Xenopus tropicalis* after apical resection. Cell Biosci. 2017;7:1-16.
46. SALLIN P, DE PREUX CHARLES AS, DURUZ V, PFEFFERLI C, JAŻWIŃSKA A. A dual epimorphic and compensatory mode of heart regeneration in zebrafish. Dev Biol. 2015;399:27-40.
47. SÁNCHEZ-IRANZO H, GALARDI-CASTILLA M, MINGUILLÓN C, SANZ-MOREJÓN A, GONZÁLEZ-ROSA JM, FELKER A, et al. Tbx5a lineage tracing shows cardiomyocyte plasticity during zebrafish heart regeneration. Nat Commun. 2018;9:428.
48. ITO K, MORIOKA M, KIMURA S, TASAKI M, INOHAYA K, KUDO A. Differential reparative phenotypes between zebrafish and medaka after cardiac injury. Dev Dyn. 2014;243:1106-15.
49. GONZÁLEZ-ROSA JM, MERCADER N. Cryoinjury as a myocardial infarction model for the study of cardiac regeneration in the zebrafish. Nat Protoc. 2012;7:782-8.
50. PORRELLO ER, MAHMOUD AI, SIMPSON E, HILL JA, RICHARDSON JA, OLSON EN, et al. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. Science (80-). 2011;331:1078-80.
51. PORRELLO ER, OLSON EN. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. Stem Cell Res. 2014;13:556-70.
52. DAREHZERESHKI A, RUBIN N, GAMBA L, KIM J, FRASER J, HUANG Y, et al. Differential regenerative capacity of neonatal mouse hearts after cryoinjury. Dev Biol. 2015;399:91-9.
53. ILLINGWORTH CM. Trapped fingers and amputated finger tips in children. J Pediatr Surg. 1974;9:853-8.

54. BORGENS RB. Mice regrow the tips of their foretoes. *Sci (New York, NY)*. 1982;217:747–50.
55. CHADWICK RB, BU L, YU H, HU Y, WERGEDAL JE, MOHAN S, et al. Digit tip regrowth and differential gene expression in MRL/Mpj, DBA/2, and C57BL/6 mice. *Wound Repair Regen*. 2007;15:275–84.
56. SOUSOUNIS K, BADDOUR JA, TSONIS PA. Aging and Regeneration in Vertebrates [Internet]. 1st ed. Vol. 108, Current Topics in Developmental Biology. Elsevier Inc.; 2014. 217–246 p.
57. KNOX SM, LOMBAERT IM A, HADDOX CL, ABRAMS SR, WILSON AJ, HOFFMAN MP. Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nat Commun*. 2013;4:1–14.
58. FLAMME I, BREIER G, RISAU W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. Vol. 169, *Developmental Biology*. 1995. p. 699–712.
59. DRAKE CJ, BRANDT SJ, TRUSK TC, LITTLE CD. TAL1 / SCL Is Expressed in Endothelial Progenitor Cells / Angioblasts and Defines a Dorsal-to-Ventral Gradient of Vasculogenesis. *Image Process*. 1997;30:17–30.
60. DRAKE CJ, FLEMING PA. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood*. 2000;95:1671–9.
61. ZHANG B, PU WT. The mysterious origins of coronary vessels. *Cell Res*. 2013;23:1063–4.
62. WU B, ZHANG Z, LUI W, CHEN X, WANG Y, CHAMBERLAIN AA, et al. Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. *Cell*. 2012;151:1083–96.
63. ZHOU B, PU WT. Genetic Cre-loxP Assessment of Epicardial Cell Fate Using Wt1-Driven Cre Alleles. *Circ Res*. 2012;111:e276–80.
64. TOMANEK RJ, HANSEN HK, DEDKOV EI. Vascular patterning of the quail coronary system during development. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288:989–99.
65. LIU H, YANG Q, RADHAKRISHNAN K, WHITFIELD DE, EVERHART CLM, PARSONS-WINGERTER P, et al. Role of VEGF and tissue hypoxia in patterning of neural and vascular cells recruited to the embryonic heart. *Dev Dyn*. 2009;238:2760–9.
66. TOMANEK RJ, CHRISTENSEN LP, SIMONS M, MURAKAMI M, ZHENG W, SCHATTEMAN GC. Embryonic coronary vasculogenesis and angiogenesis are regulated by interactions between multiple FGFs and VEGF and are influenced by mesenchymal stem cells. *Dev Dyn*. 2010;239:3182–91.
67. KATTAN J, DETTMAN RW, BRISTOW J. Formation and Remodeling of the Coronary Vascular Bed the Embryonic Avian Heart. *Dev Dyn*. 2004;230:34–43.
68. PALMQUIST-GOMES P, PÉREZ-POMARES JM, GUADIX JA. Proepicardial Origin of Developing Coronary Vessels. *Rev Española Cardiol (English Ed)*. 2018;5857.
69. LE NOBLE F. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development*. 2003;131:361–75.
70. ZHANG Z, ZHOU B. Accelerated Coronary Angiogenesis by Vegfr1-Knockout Endocardial Cells. *PLoS One*. 2013;8:1–11.
71. JOPLING C, SLEEP E, RAYA M, MARTÍ M, RAYA A, BELMONTE JCI. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010;464:606–9.

Respuestas celulares del nicho pericoronario a daño cardíaco: reclutamiento de progenitores e interacción neurovascular



Cristina Pogontke,^{a, b} Juan A. Guadix,^{a, b} José M. Pérez-Pomares^{a, b}

^a Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Instituto Malagueño de Biomedicina (IBIMA), Campus de Teatinos s/n, 29080 Málaga (España).

^b BIONAND, Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología (Junta de Andalucía, Universidad de Málaga), Severo Ochoa nº25, 29590 Campanillas, Málaga (España).

Resumen

Durante los últimos 15 años, diferentes laboratorios han descrito la existencia de células multipotentes residentes en el intersticio cardíaco, células capaces de originar distintos tipos celulares cardiovasculares como células endoteliales, células musculares lisas y cardiomiocitos. Estas poblaciones, además, se caracterizan por su variabilidad, por lo que a pesar de su posible importancia regenerativa aún se desconoce si constituyen un único linaje con varios estados de diferenciación, o por el contrario suponen varias poblaciones de distinto origen. Además, las verdaderas células madre se encuentran en un nicho, un microambiente específico donde son capaces de mantener sus propiedades singulares, pero en este caso el nicho aún no ha sido descrito ni caracterizado. Si el intersticio cardíaco actúa como un auténtico nicho para estas células, los vasos sanguíneos coronarios y los nervios periféricos cardíacos serían posibles candidatos para actuar como estructuras de soporte, dada su intensa señalización cruzada mediante neurotrofinas y endotelinas.

1. Introducción

1.1. Capacidad regenerativa en el corazón de mamíferos

Durante muchos años el corazón adulto de mamíferos ha sido considerado un órgano postmitótico, ya que poco después del nacimiento se produce la transición desde una fase de crecimiento hiperplásico (crecimiento por proliferación de cardiomiocitos) a una fase de crecimiento hipertrófico en el que no aumenta el número de cardiomiocitos sino su tamaño. Esta transición está correlacionada con la maduración de los cardiomiocitos, consistente en la duplicación del material genético sin citocinesis, el incremento en la densidad de microfibrillas y la aparición de discos intercalares maduros.^{1,2} En muchos casos se ha considerado que este cambio marcaba la pérdida

de las propiedades regenerativas en favor de los mecanismos reparativos del órgano (fibrosis y cicatrización). De hecho, en ratones neonatos de 1 día, la resección del ápex supone la formación primaria de un coágulo de sangre que es sustituido progresivamente por matriz extracelular y células musculares gracias a la proliferación de los cardiomiocitos existentes, mientras que en neonatos de 7 días se produce una fibrosis similar a la de un organismo adulto con pérdida de masa miocárdica y ausencia de regeneración real.³

Sin embargo, durante los últimos quince años se ha descubierto que en circunstancias normales el miocardio adulto de los mamíferos se renueva lenta pero constantemente.⁴ Esta renovación se ha atribuido tanto a pequeñas poblaciones de cardiomiocitos inmaduros y proliferativos⁵ como a diferentes tipos de células cardíacas residentes con perfil de células madre o progenitores, denominadas por algunos investigadores células madre cardíacas (CSC, del inglés *Cardiac Stem Cell*). Estas células se caracterizan por su capacidad de autorrenovación, formación de cardiosferas y diferenciación clonal en diferentes tipos celulares cardiovasculares (células endoteliales, células musculares lisas, cardiomiocitos y fibroblastos).⁶ Algunas de estas células también expresan diversos marcadores como c-Kit,⁷ Bmi-1⁸ o Sca-1,^{9,10} asociados a la condición troncal.

1.2. Células madre cardíacas: origen y caracterización

El origen de estas CSC es muy discutido. De hecho, aún se desconoce si los marcadores moleculares mencionados anteriormente identifican a linajes ontogenéticos diferentes o a distintos estados fisiológicos o de diferenciación de un mismo linaje.¹¹ Esta cuestión es de gran importancia, ya que el origen embrionario de estas células podría determinar, en gran medida, su respuesta a señales moleculares y estímulos diversos (patológicos o no).

Numerosos investigadores consideran a los progenitores epicárdicos embrionarios, contenidos en el proepicardio, como un posible origen de CSC. El proepicardio, un grupo de células de origen celómico no incluido en el creciente cardíaco y situado en la región caudal del corazón en desarrollo, da lugar a un epicardio primitivo cuando las células proepicárdicas se adhieren a la superficie miocárdica mediante vellosidades y cubren el miocardio formando un epitelio monoestratificado. Inmediatamente este epicardio primitivo experimenta una transición epitelio-mesénquima, con lo que algunas células epiteliales sufren un cambio fenotípico profundo y se transforman en células mesenquimáticas que reciben el nombre de EPDC (del inglés, *Epicardial-Derived Cell*), que migrarán hacia el subepicardio primero (matriz extracelular situada entre el epicardio y el miocardio) y posteriormente hacia el miocardio, donde contribuyen al sistema de vasos que irriga el corazón y que conocemos como sistema vascular coronario (Figura 1). Por lo tanto, el epicardio se genera de forma independiente con respecto al miocardio y al otro epitelio cardíaco, el endocardio (ambos derivados del campo cardíaco primario y secundario).¹²⁻¹⁴ La médula ósea también ha sido considerada posible fuente de CSC. Durante las últimas fases del desarrollo embrionario de ratón y la vida adulta se produce la incorporación de

células derivadas de médula ósea a las paredes cardíacas, especialmente alrededor de las arterias coronarias (Figura 1).¹⁵ En algunas ocasiones se ha observado que estas células, caracterizadas por la expresión de CD45 o CD34, también expresan algunos de los marcadores mencionados anteriormente como c-Kit y Sca-1.¹⁶⁻¹⁸

Dentro de las células con fenotipo de CSC, las células c-Kit⁺ son las mejor caracterizadas desde su descubrimiento a principios de siglo.⁷ Con excepción de Sultana et al. 2015,¹⁹ la mayoría de los estudios han establecido un número muy bajo de estas células en el corazón adulto, de las cuáles una proporción variable expresan CD45 y por tanto son derivadas de médula ósea.^{17,20} Las células c-Kit⁺/CD45⁻ se caracterizan por una expresión elevada de marcadores mesenquimales (CD90 y CD166), marcadores de diferenciación a cardiomiocitos (Nkx2.5 y GATA4) y de otros marcadores de células madre o progenitoras como Bmi-1, Flk-1 o MDR1. Sin embargo, son negativas para Isl-1 o Sca-1.^{7,17,20} *In vitro* se comportan como células clonogénicas con capacidad de autorenovación y multipotencia, ya que pueden formar cardiosferas y dar lugar a células endoteliales, de musculatura lisa o cardiomiocitos con un fenotipo inmaduro,^{7,17,21} pero se ha demostrado que *in vivo* su capacidad para originar cardiomiocitos es muy limitada, tanto en condiciones de homeostasis²² como tras un daño isquémico.^{21,23}

Sca-1, otra de las moléculas asociadas a las CSC, se expresa en el 14-17% de la fracción no miocítica adulta, en células localizadas junto a la lámina basal de los vasos coronarios o asociadas a cardiomiocitos.^{9,18} Un elevado porcentaje no expresa otros marcadores de células madre como c-Kit, Flt-1 o Flk-1,^{9,10,18} pero sí marcadores relacionados con la diferenciación endotelial^{9,18,24,25} o cardiomiocítica.^{9,10} La proporción de células Sca-1⁺/CD45⁺ del total de células Sca-1⁺ varía según el estudio, caracterizándose la población Sca-1⁺/CD45⁻ por ser capaz en cultivo de diferenciarse en los tres linajes principales con un fenotipo en la mayoría de los casos inmaduro.¹⁰ *In vivo* tienen una escasa capacidad para formar cardiomiocitos, tanto en homeostasis como después de un daño.^{9,18}

Algunas células Sca-1⁺ destacan por su capacidad intrínseca para expulsar el colorante Hoechst gracias a que poseen transportadores de tipo ATP, como el transportador Abcg2. Esta población, denominada *Side Population* (SP), disminuye con la edad del animal^{16,26} y se caracteriza por no expresar marcadores de células derivadas de médula ósea (CD45, CD34), pero sí expresar en un porcentaje variable marcadores de linaje endotelial (CD31 o Tie2) o de linaje cardiomiocítico (Nkx2.5, GATA4, α SMA).²⁷⁻²⁹ En cocultivo con cardiomiocitos maduros son capaces de originar cardiomiocitos MEF2C⁺, GATA4⁺, α -actinina⁺ y Troponina T⁺.^{26,27} Se ha observado que tras un infarto de miocardio su número disminuye rápidamente por diferenciación a células endoteliales CD31⁺ y vWF⁺, pero poco después la población original se recupera por división celular de la población remanente.^{16,28,29}

Las células cardíacas Bmi1⁺ también parecen constituir otra subpoblación de células Sca-1⁺/CD31⁺ localizadas perivascularamente o en el intersticio entre cardiomiocitos. Tanto *in vitro* como *in vivo* (homeostasis e infarto de miocardio) pueden diferenciarse en endotelio, musculatura lisa y cardiomiocitos.^{8,30}

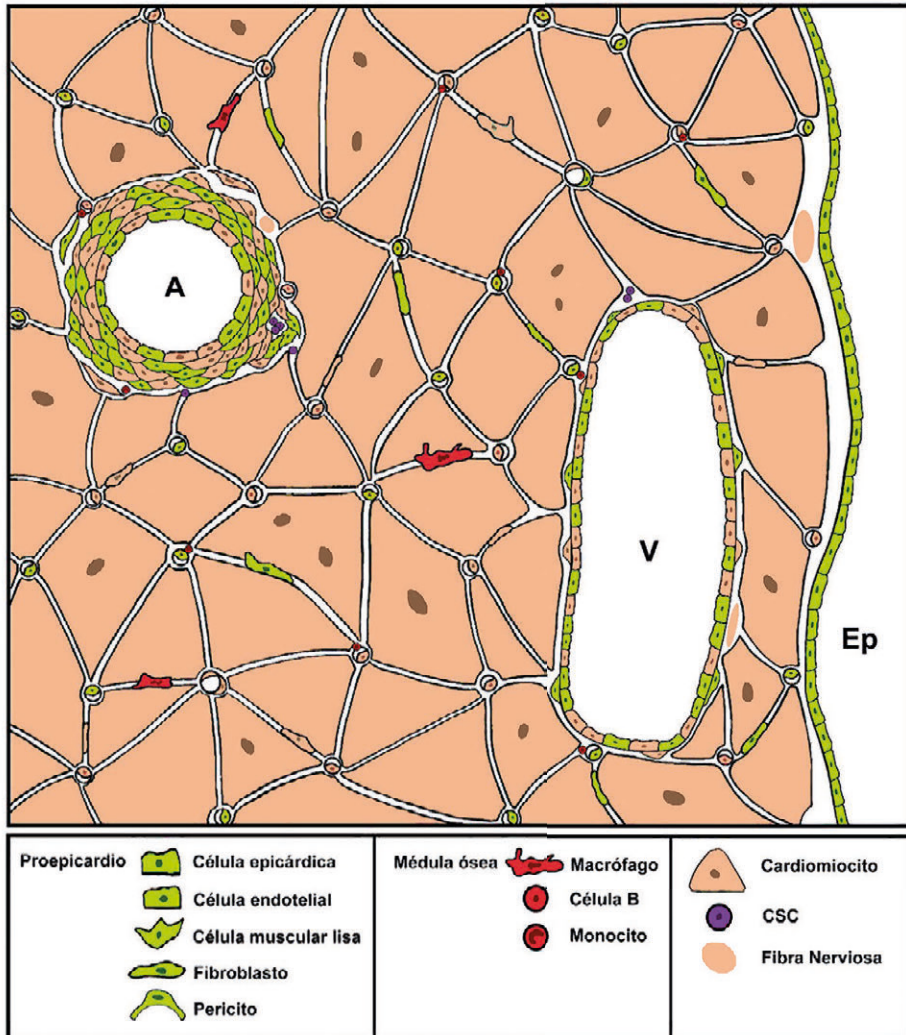


Figura 1. En el dibujo se representan los principales elementos del intersticio cardíaco, destacando la contribución del proepicardio (EPDCs, verde) y de la médula ósea (BMDCs, rojo) en la formación de este intersticio. También se muestra la localización en el tejido cardíaco de las llamadas células madre cardíacas (CSCs, morado), cuyo origen aún no ha sido establecido. Abreviaciones: A, Arteria; V, Vena; Ep, Epicardio.

1.3. El concepto de nicho. Nervios y vasos

Las verdaderas células madre se localizan en nichos. Un nicho de células madre se define como el microambiente específico en el que estas células mantienen sus propiedades singulares, incluyendo su potencial de desarrollo y habilidad para la

auto-renovación.³¹ Los nichos de células madre están normalmente formados por: 1) células madre, 2) células derivadas de células madre en diferenciación, 3) células de soporte que regulan el comportamiento de las células madre mediante señalización endocrina y paracrina, 4) matriz extracelular característica, y 5) moléculas señalizadoras que modulan las propiedades de las células madre.³² En el corazón, algunas de las funciones del nicho pueden ser realizadas por cardiomiocitos y células con apariencia fibroblástica, una idea que es respaldada por la existencia de complejos de unión entre las células intersticiales de fenotipo fibroblástico y las CSC.^{33,34}

Si el intersticio cardíaco actúa como un nicho real, es muy posible que las estructuras vasculares participen en su organización, como ocurre en otros órganos que albergan células madre como el hígado, el cerebro, el bazo o el hueso.^{35,36} De acuerdo con esto, otro dominio cardíaco extensivamente vascularizado como el epicardio ha sido también considerado como nicho cardíaco.^{20,23,37} Un posible elemento adicional en el establecimiento del nicho cardíaco podría ser el sistema nervioso simpático, dada su asociación con los vasos sanguíneos en numerosos órganos.³⁸ En el corazón de ratón, la inervación simpática comienza a 13,5dpc junto a las venas de gran diámetro (EfrinaB4⁺) situadas entre el epicardio y la superficie del miocardio (el subepicardio). Posteriormente, estas fibras invaden el miocardio donde se desarrollan las arterias coronarias (endotelio EfrinaB2⁺)³⁹⁻⁴¹ (Figura 1). Esta relación entre los dos tejidos depende de una señalización cruzada dependiente de neurotrofinas⁴² y endotelinas.⁴³

1.4. Neurotrofinas

Descrita por primera vez en el sistema nervioso, la familia de neurotrofinas está formada por cuatro polipéptidos muy relacionados en mamíferos: factor de crecimiento nervioso (en inglés *nerve growth factor*, NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (en inglés *brain derived neurotrophic factor*, BDNF), NT-3 y NT4/5. Todas estas formas son sintetizadas como proteínas precursoras que son procesadas intracelularmente por furinas o extracelularmente por metaloproteinasas dando lugar a neurotrofinas maduras que se asocian como homodímeros.^{44,45} Las formas maduras de neurotrofinas son reconocidas por receptores del tipo tirosina quinasa, concretamente por los miembros de la familia Trk: TrkA, TrkB y TrkC y sus respectivas isoformas truncadas. Estos receptores, que actúan como homodímeros, se caracterizan por su elevada homología en el dominio intracelular difiriendo en la fracción extracelular responsable del reconocimiento de la neurotrofina. Así, TrkA actúa como receptor de NGF, ambos BDNF y NT4/5 activan a TrkB y NT-3 es el principal ligando de TrkC, aunque también pueden asociarse a TrkA y TrkB con menor eficiencia⁴⁴. En ausencia de receptores TrkB las neurotrofinas también pueden interactuar con el receptor p75^{NTR}, implicado en la apoptosis y muerte celular.⁴⁶

Aunque el estudio de las neurotrofinas y sus receptores en el corazón de mamíferos aún se encuentra en un estado poco desarrollado, la información existente refleja la gran importancia que estas moléculas poseen tanto en el desarrollo como en mantenimiento de la homeostasis adulta.

Una de las neurotrofinas mejor caracterizadas en la actualidad es NGF, dada su importancia en la formación del sistema nervioso simpático cardíaco. En ratones, NGF comienza a expresarse a partir de 15,5dpc en la musculatura lisa de los vasos coronarios, ejerciendo una señalización paracrina sobre los nervios simpáticos procedentes del ganglio estrellado que acaban de contactar con la superficie del corazón. Esto tiene como resultado que los nervios simpáticos se extiendan sobre los vasos coronarios según el patrón mencionado anteriormente. Posteriormente, la señalización ejercida por las células musculares lisas disminuye, pero su expresión aumenta en los cardiomiocitos adultos donde parece ejercer una señalización autocrina importante para la supervivencia y homeostasis de éstos.⁴⁷⁻⁴⁹

La expresión de BDNF y TrkB también comienza en el endotelio y musculatura lisa de los vasos coronarios, durante la embriogénesis tardía. Esta localización, así como los experimentos de inhibición realizados, sugieren que BDNF actúa de forma autocrina sobre las células endoteliales promoviendo su supervivencia y de forma paracrina sobre pericitos y células musculares lisas promoviendo su reclutamiento hacia los vasos y la producción de matriz extracelular.^{50,51} TrkB también se expresa en los cardiomiocitos adultos, aunque su importancia en la actividad miocárdica no está demostrada.⁵²

NT-3, por el contrario, es una neurotrofina con una función significativa en la proliferación temprana de los cardiomiocitos inmaduros durante las primeras fases del desarrollo del corazón, limitándose posteriormente su expresión a los vasos coronarios durante el estadio adulto.^{53,54} Dada la ausencia de TrkC en arterias y venas coronarias, es posible que NT-3 ejerza su función a través de TrkB.

2. Hipótesis y Objetivos

La hipótesis básica de este trabajo es que el espacio intersticial, especialmente el espacio intersticial pericoronario, determina un auténtico nicho para diversos tipos de CSC, de forma tal que la modulación de las propiedades del nicho podría permitir activar una respuesta regenerativa endógena en el corazón dañado. Los objetivos científicos concretos se detallan a continuación:

- Objetivo 1: Analizar la ontogenia de diversas poblaciones de células madre cardíacas o progenitores cardíacos (c-Kit, Sca-1, y Bmi-1).
- Objetivo 2: Estudiar la localización de las diversas células madre cardíacas en el corazón fetal, postnatal y adulto, especialmente en relación a los vasos sanguíneos del sistema coronario y a los nervios cardíacos.
- Objetivo 3: Definir las señales moleculares implicadas en el mantenimiento de un posible nicho de células madre cardíacas con un énfasis especial en el papel de las neurotrofinas y de las señales derivadas del endotelio y de la pared muscular de los vasos.
- Objetivo 4: Identificar la dinámica y la respuesta específica de las células madre y progenitores residentes en el corazón infartado.

3. Plan de investigación

Los experimentos previstos se muestran en relación con los objetivos científicos descritos anteriormente.

Objetivo 1:

Tarea 1: Analizar la relación ontogenética de los progenitores cardiovasculares c-Kit, Sca-1, Bmi1 e Islet-1 con los linajes celulares epicárdicos mediante el uso de trazado genético Cre/LoxP. Se usarán líneas de ratones transgénicos (Wt1^{Cre} y G2GATA4^{Cre}) que tras su cruzamiento con la línea reporter^{ROSA26}YFP permite el trazado permanente de las células del linaje epicárdico (células Wt1^{Cre}YFP⁺ y G2GATA4^{Cre}YFP⁺) tanto en el corazón embrionario como en el corazón adulto. Se estudiará la relación que los progenitores cardiovasculares identificados en el corazón mantienen con el linaje epicárdico. Se emplearán anticuerpos específicos para identificar a las células c-Kit⁺, Sca-1⁺, o Bmi-1⁺ mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo procedentes de corazones embrionarios (E9,5-18,5), neonatos y adultos y se determinará el porcentaje de CSC/progenitores derivadas de epicardio (YFP⁺) que expresan los marcadores c-Kit, Sca-1 o Bmi-1.

Tarea 2: Estudiar la relación ontogenética de los progenitores cardiovasculares c-Kit, Sca-1, y Bmi-1 con los linajes celulares derivados de la médula ósea mediante el uso de trasplante de médula de donantes transgénicos. Se emplearán como receptores ratones de linaje C57BL/6 así como ratones procedentes del cruce de las líneas Wt1^{Cre} y ^{ROSA26}YFP, que serán convenientemente irradiados con rayos X. Ambos tipos de receptores serán trasplantados con médula ósea procedente de ratones donantes que expresan de forma constitutiva la proteína fluorescente roja (RFP). En el caso de los trasplantes en receptores postnatales, los individuos habrán sido sometidos a mieloablación mediante un tratamiento con busulfán. Se emplearán anticuerpos específicos y técnicas de inmunohistoquímica y citometría de flujo para identificar a las células que co-expresen RFP y cualquiera de los marcadores de CSC/progenitores descritos en la tarea 1 (c-Kit⁺, Sca-1⁺ o Bmi-1⁺).

Objetivo 2:

Tarea 3. Generar un mapa de la localización de los diversos tipos de CSC/progenitores cardíacos en el corazón fetal, postnatal y adulto, especialmente en relación con los vasos coronarios y los nervios cardíacos, con el fin de caracterizar los componentes celulares de un hipotético nicho pericoronario. Se usarán los modelos experimentales anteriormente descritos para analizar mediante inmunohistoquímica corazones embrionarios (E9,5-18,5), neonatos y adultos y caracterizar la distribución de las células c-Kit⁺, Sca-1⁺, Bmi-1⁺ respecto a los vasos coronarios de origen epicárdico (YFP⁺). Se prestará especial atención a la localización de estas células

en la íntima endotelial (CD31⁺, lectina), la media muscular (α SMA⁺) o la adventicia fibrosa (Ddr2⁺). También se estudiará la localización de estas células respecto a los nervios cardíacos (β III-tubulina⁺).

Objetivo 3:

Tarea 4. Definir las señales moleculares (neurotrofinas) implicadas en el mantenimiento de un posible nicho de células madre cardíacas en el ratón adulto.

Utilizando de forma combinada técnicas de inmunohistoquímica, citometría de flujo, hibridación *in situ* y qRT-PCR se analizarán corazones adultos de una línea de ratones control (C57BL/6) y en ratones Wt1^{CreROSA26YFP} para determinar la expresión de diversas neurotrofinas (NGF, BDNF y NT-3) y receptores de neurotrofinas (TrkA, TrkB y TrkC) en los vasos coronarios y las CSC/progenitores cardíacos.

Tarea 5. Determinar *in vitro* las capacidades clonogénicas, de renovación y de diferenciación de las diferentes poblaciones de CSC, así como la influencia de las neurotrofinas sobre estas características.

Se usarán técnicas de formación de cardiosferas para obtener células formadoras de cardiosferas a partir de corazones adultos de ratón (tanto normales como transgénicas, en este último caso con la intención de marcar genéticamente los linajes celulares epicárdicos y derivados de la médula ósea). Las cardiosferas serán caracterizadas según su expresión c-Kit, Sca-1 y Bmi-1 y posteriormente cultivadas con el fin de estudiar su potencial clonogénico y de diferenciación. Además, en este medio se añadirán neurotrofinas o inhibidores de neurotrofinas con el fin de determinar su efecto sobre la capacidad para formar cardiosferas. También mediante técnicas de separación celular se aislarán células c-Kit⁺, Sca-1⁺ o Bmi1⁺ a partir de corazones adultos de ratón y se cultivarán en medios condicionados con neurotrofinas o inhibidores de neurotrofinas para el posterior análisis de su expresión génica (qRT-PCR/RNAseq) y de proteínas (inmunohistoquímica).

Objetivo 4:

Tarea 6. Identificar la dinámica y la respuesta específica de las CSC/progenitores cardíacos de diferentes orígenes al daño por isquemia.

En los ratones trasplantados con médula ósea RFP se va a realizar una ligadura en la arteria coronaria izquierda descendente anterior (LAD), un modelo experimental en animal pequeño para el infarto de miocardio. Una vez analizada mediante inmunohistoquímica la distribución de distintos tipos de CSC/progenitores cardiovasculares en diferentes momentos de la remodelación ventricular (1, 7 y 30 días post-infarto), estudiaremos fenómenos de activación (p.ej. proliferación y expresión de factores de transcripción cardiogénicos como Nkx2.5 o Mef2c). En el caso de las CSC con origen en la médula ósea estudiaremos la expresión de marcadores pro-miocárdicos pero también su potencial para formar colonias hematopoyéticas *in vitro* (methocult). En este último

caso, sí los resultados fuesen positivos, se intentaría reconstituir con estas células el sistema hematopoyético de ratones irradiados (inmunodeficientes).

4. Estado actual de la investigación

En el momento actual el análisis de la ontogenia y la localización de las células $c\text{-Kit}^+$, Sca-1^+ y Bmi-1^+ en los modelos $\text{Wt1}^{\text{CreYFP}}$ y BMRFP (Objetivos 1 y 2) se ha completado prácticamente, aunque aún no se he realizado ningún análisis estadístico mediante citometría de flujo. Esto se debe a que la técnica empleada en la obtención de la fracción no miocítica de corazones neonatos y adultos, así como la lisis de eritrocitos, ha estado ajustándose para alcanzar la máxima eficiencia. Se ha comenzado la caracterización del modelo $\text{G2GATA}^{\text{CreYFP}}$ y se han realizado trasplantes de médula ósea procedente de ratones RFP^+ constitutivos en neonatos $\text{Wt1}^{\text{CreYFP}}$ tratados prenatalmente con busulfán, con resultados negativos debido a problemas asociados con la expresión de RFP en el donante.

La expresión de neurotrofinas y receptores de neurotrofinas (Objetivo 3) ha sido analizada únicamente en el caso de TrkB , debido a la dificultad para encontrar anticuerpos específicos de neurotrofinas que funcionen eficazmente en muestras de corazón adulto. Actualmente se están testando anticuerpos que reconocen BDNF y ProBDNF usando médula espinal como control positivo.

Se ha optimizado el protocolo de obtención de células formadoras de cardiosferas a partir de corazones adultos C57/Bl6 y Wt1CreYFP , añadiéndose Wt1GFP (expresión Wt1 a tiempo real) y $\text{Wt1}^{\text{CREERT2YFP}^{\text{flox/flox}}}$ (inducible por tamoxifeno) como otros posibles modelos para analizar el origen ontogenético de estas células. También se ha comenzado su caracterización usando los marcadores descritos anteriormente, aunque el escaso número celular obtenido en cada réplica dificulta el análisis.

En relación con el objetivo 4, por motivos económicos aún no se han obtenido todos los elementos necesarios para realizar el procedimiento de ligadura en la arteria descendente anterior (LAD), pero se espera poder comenzar próximamente esta serie de experimentos próximamente. Dado que utilizando este modelo se esperan realizar cultivos en medio formador de colonia hematopoyéticas (Methocult), se ha puesto a punto esta técnica utilizando médula ósea.

Financiación

Este proyecto está siendo financiado por MINECO-Plan Nacional de I+D+i (código BFU2015-65783-R y SAF2015-71863), MINECO-ISCI (código RD16/0011/0030-TER-CEL) (J.M. Pérez-Pomares); Proyecto del I Plan Propio Universidad de Málaga (J.A. Guadix) y Beca de formación de doctores FPU15/03846 (C. Pogontke).

Referencias

- LI F, WANG X, CAPASSO JM, GERDES AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(8):1737–46.
- PASUMARTHI KBS, FIELD LJ. Cardiomycocyte cell cycle regulation. *Circ Res.* 2002;90(10):1044–54.
- PORRELLO ER, MAHMOUD AI, SIMPSON E, HILL JA, JAMES A, OLSON EN, et al. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science.* 2011;331(6020):1078–80.
- BERGMANN O, ZDUNEK S, FELKER A, SALEHPOUR M, ALKASS K, BERNARD S, et al. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell.* 2015;1566–75.
- SENYO SE, STEINHAUSER ML, PIZZIMENTI CL, YANG VK, CAI L, WANG M, et al. Mammalian Heart Renewed by Preexisting Cardiomyocytes. *Nature.* 2013;493(7432):433–6.
- ANVERSA P, KAJSTURA J, LERI A, BOLLI R. Life and death of cardiac stem cells: A paradigm shift in cardiac biology. *Circulation.* 2006;113(11):1451–63.
- BELTRAMI AP, BARLUCCHI L, TORELLA D, BAKER M, LIMANA F, CHIMENTI S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114(6):763–76.
- VALIENTE-ALANDI I, ALBO-CASTELLANOS C, HERRERO D, SANCHEZ I, BERNAD A. Bmi1 + cardiac progenitor cells contribute to myocardial repair following acute injury. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):100.
- OH H, BRADFUTE SB, GALLARDO TD, NAKAMURA T, GAUSSIN V, MISHINA Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(21):12313–8.
- MATSUURA K, NAGAI T, NISHIGAKI N, OYAMA T, NISHI J, WADA H, et al. Adult Cardiac Sca-1-positive Cells Differentiate into Beating Cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(12):11384–91.
- TORELLA D, ELLISON GM, NADAL-GINARD B, INDOLFI C. Cardiac stem and progenitor cell biology for regenerative medicine. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15(6):229–36.
- MUÑOZ-CHÁPULI R, MACÍAS D, GONZÁLEZ-IRIARTE M, CARMONA R, ATENCIA G, PÉREZ-POMARES JM. The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55(10):1070–82.
- CARMONA R, GUADIX JA, CANO E, RUIZ-VILLALBA A, PORTILLO-SÁNCHEZ V, PÉREZ-POMARES JM, et al. The embryonic epicardium: An essential element of cardiac development. *J Cell Mol Med.* 2010;14:2066–72.
- RUIZ-VILLALBA A, PÉREZ-POMARES JM. The expanding role of the epicardium and epicardial-derived cells in cardiac development and disease. *Curr Opin Pediatr.* 2012;24:569–76.
- RUIZ-VILLALBA A, SIMÓN AM, POGONTKE C, CASTILLO MI, ABIZANDA G, PELACHO B, et al. Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(19):2057–66
- OYAMA T, NAGAI T, WADA H, NAITO AT, MATSUURA K, IWANAGA K, et al. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol.* 2007;176(3):329–41.
- ELLISON GM, TORELLA D, DELLEGROTTAGLIE S, PEREZ-MARTINEZ C, PEREZ DE PRADO A, VICINANZA C, et al. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(9):977–86.
- UCHIDA S, DE GASPARI P, KOSTIN S, JENNICHES K, KILIC A, IZUMIYA Y, et al. Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Reports.* 2013;1(5):397–410.

19. SULTANA N, ZHANG L, YAN J, CHEN J, CAI W, RAZZAQUE S, et al. Resident c-kit⁺ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun.* 2015;6:1–10.
20. LIMANA F, ZACHEO A, MOCINI D, MANGONI A, BORSELLINO G, DIAMANTINI A, et al. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res.* 2007;101(12):1255–65.
21. TALLINI YN, GREENE KS, CRAVEN M, SPEALMAN A, BREITBACH M, SMITH J, et al. C-Kit Expression Identifies Cardiovascular Precursors in the Neonatal Heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1808–13.
22. VAN BERLO JH, KANISICAK O, MAILLET M, VAGNOZZI RJ, KARCH J, LIN SCJ, et al. c-kit⁺ Cells Minimally Contribute Cardiomyocytes to the Heart. *Nature.* 2014;509(7500):337–41.
23. CASTALDO C, DI MEGLIO F, NURZYNSKA D, ROMANO G, MAIELLO C, BANCONE C, et al. CD117-positive cells in adult human heart are localized in the subepicardium, and their activation is associated with laminin-1 and alpha6 integrin expression. *Stem Cells.* 2008;26:1723–31.
24. FIORET BA., HEIMFELD JD, PAIK DT, HATZOPOULOS AK. Endothelial cells contribute to generation of adult ventricular myocytes during cardiac homeostasis. *Cell Rep.* 2014;8(1):229–41.
25. NOSEDA M, HARADA M, MCSWEENEY S, LEJA T, BELIAN E, STUCKEY DJ, et al. PDGFR α demarcates the cardiogenic clonogenic Sca1⁺ stem/progenitor cell in adult murine myocardium. *Nat Commun.* 2015;6(May):6930.
26. HIERLIHY AM, SEALE P, LOBE CG, RUDNICKI MA., MEGENEY LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett.* 2002;530(1–3):239–43.
27. PFISTER O, MOUQUET F, JAIN M, SUMMER R, HELMES M, FINE A, et al. CD31⁺ but not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res.* 2005;97(1):52–61.
28. MOUQUET F, PFISTER O, JAIN M, OIKONOMOPOULOS A, NGOY S, SUMMER R, et al. Restoration of cardiac progenitor cells after myocardial infarction by self-proliferation and selective homing of bone marrow-derived stem cells. *Circ Res.* 2005;97:1090–2.
29. LIANG SX, TAN TYL, GAUDRY L, CHONG B. Differentiation and migration of Sca1⁺/CD31⁺ cardiac side population cells in a murine myocardial ischemic model. *Int J Cardiol.* 2010;138(1):40–9.
30. VALIENTE-ALANDI I, ALBO-CASTELLANOS C, HERRERO D, ARZA E, GARCIA-GOMEZ M, SEGOVIA JC, et al. Cardiac Bmi1 (+) cells contribute to myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:205.
31. JONES DL, WAGERS AJ. No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):11–21.
32. SPRADLING AC, DRUMMOND-BARBOSA D, KAI T. Stem cells find their niche. *Nature.* 2001;414(6859):98–104.
33. URBANEK K, CSELLI D, ROTA M, NASCIMBENE A, DE ANGELIS A, HOSODA T, et al. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(24):9226–31.
34. BEARZI C, LERI A, LO MONACO F, ROTA M, GONZALEZ A, HOSODA T, et al. Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(37):15885–90.
35. SHI S, GRONTHOS S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18(4):696–704.
36. SHEN Q, GODERIE SK, JIN L, KARANTH N, SUN Y, ABRAMOVA N, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 2004;304(5675):1338–40.
37. MEGLIO F DI, CASTALDO C, NURZYNSKA D, MIRAGLIA R, ROMANO V, RUSSOLILLO V, et al. Localization and origin of cardiac CD117-positive cells: Identification of a population of epicardially-derived cells in adult human heart. *Ital J Anat Embryol.* 2010;115(1–2):71–8.
38. LARRIVÉE B, FREITAS C, SUCHTING S, BRUNET I, EICHMANN A. Guidance of vascular development: Lessons from the nervous system. *Circ Res.* 2009;104(4):428–41.

39. RATAJSKA A, CISZEK B, SOWINSKA A. Embryonic development of coronary vasculature in rats: Corrosion casting studies. *Anat Rec.* 2003;270A(2):109–16.
40. LAVINE KJ, LONG F, CHOI K, SMITH C, ORNITZ DM. Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. 2008;135(18):3161–71.
41. RED–HORSE K, UENO H, WEISSMAN IL, KASNOW M. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature.* 2010;464(7288):549–53.
42. KURUVILLA R, ZWEIFEL LS, GLEBOVA NO, LONZE BE, VALDEZ G, YE H, et al. A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of TrkA trafficking and retrograde signaling. *Cell.* 2004;118(2):243–55.
43. MAKITA T, SUCOV HM, GARIPEY CE, YANAGISAWA M, GINTY DD. Endothelins are vascular–derived axonal guidance cues for developing sympathetic neurons. *Nature.* 2008;452(7188):759–63.
44. KIRSTEIN M, FARIÑAS I. Sensing life: Regulation of sensory neuron survival by neurotrophins. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(11):1787–802.
45. ALLEN SJ, DAWBARN D. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci.* 2006;110(2):175–91.
46. KAPLAN DR, MILLER FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2000;10(3):381–91.
47. HASSANKHANI A, STEINHELPER ME, SOONPAA MH, KATZ EB, TAYLOR DA, ANDRADE–ROZENTAL A, et al. Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement, and hyperplasia of ectopic cells. *Developmental biology.* 1995;169:309–21.
48. CAPORALI A, SALA–NEWBY GB, MELONI M, GRAIANI G, PANI E, CRISTOFARO B, et al. Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes. *Cell Death Differ.* 2008;15(2):299–311.
49. NAM J, ONITSUKA I, HATCH J, UCHIDA Y, RAY S, HUANG S, et al. Coronary veins determine the pattern of sympathetic innervation in the developing heart. *Development.* 2013;140:1475–85.
50. DONOVAN MJ, LIN MI, WIEGN P, RINGSTEDT T, KRAEMER R, HAHN R, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development.* 2000;127:4531–40.
51. ANASTASIA A, DEINHARDT K, WANG S, MARTIN L, NICHOL D, IRMADY K, et al. TrkB signaling in pericytes is required for cardiac microvessel stabilization. *PLoS One.* 2014;9(1):1–11.
52. FENG N, HUKU S, ZHU G, TOCCHETTI CG, SHI S, AIBA T, et al. Constitutive BDNF/TrkB signaling is required for normal cardiac contraction and relaxation. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112:1880–5.
53. LIN MI, DAS I, SCHWARTZ GM, TSOUFAS P, MIKAWA T, HEMPSTEAD BL. Trk C Receptor Signaling Regulates Cardiac Myocyte Proliferation during Early Heart Development in Vivo. *Dev Biol.* 2000;226(2):180–91.
54. KAWAGUCHI–MANABE H, IEDA M, KIMURA K, MANABE T, MIYATAKE S, KANAZAWA H, et al. A novel cardiac hypertrophic factor, neurotrophin–3, is paradoxically down–regulated in cardiac hypertrophy. *Life Sci.* 2007;81(5):385–92.

Aproximación bioinformática para investigar las bases genéticas de enfermedades metabólicas



E. Rojano,^a P. Seoane,^a JR. Perkins^b and JAG. Ranea^{a,c}

^a Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, 29010 Málaga (España)

^b Laboratorio de Investigación, IBIMA, Hospital Regional Universitario de Málaga, 29009 Málaga (España)

^c CIBER de Enfermedades Raras, ISCIII, 28029 Madrid (España)

Resumen

Las enfermedades metabólicas engloban a todas aquellas que impactan directamente sobre alguna de las vías del metabolismo. Pueden tener lugar por alteraciones en el genoma que alteren la conformación estructural de proteínas reguladoras o los niveles de expresión de genes clave. El pronóstico de estas enfermedades dependerá de dónde se produzca el bloqueo en la vía metabólica. Aquellos pasos que sean más específicos y que no cuenten con un modulador intermediario que pueda suplir la función del elemento dañado pueden causar mayores estragos en el organismo. Para que se pueda ajustar un tratamiento acorde a las necesidades del paciente, es necesario realizar un completo diagnóstico de la enfermedad, incluyendo por un lado su caracterización fenotípica con el uso de herramientas de diagnóstico tanto clínico como genético. Sin embargo, existen complicaciones a la hora de caracterizar pacientes con cuadros fenotípicos complejos. Además, secuenciar el genoma completo de todos ellos actualmente es económicamente inasequible. Para solucionar estos inconvenientes, se están desarrollando nuevas aproximaciones que permiten detectar las regiones genómicas que con más probabilidad son responsables de fenotipos patológicos, mediante el estudio de redes de asociación. Estas asociaciones fenotipo-genotipo pueden emplearse para el desarrollo de herramientas predictivas que sirvan como apoyo al diagnóstico genético de enfermedades metabólicas, facilitando la caracterización genotípica del paciente en base a su perfil fenotípico. En este capítulo describimos un posible predictor que facilite el conocimiento de las regiones genómicas que potencialmente sean la causa de los fenotipos patológicos de un paciente.

1. El trasfondo de las enfermedades metabólicas

Los errores congénitos del metabolismo se deben a alteraciones en regiones funcionales del genoma, que pueden suponer cambios en la estructura de enzimas,

impidiendo que realicen correctamente su función, o alteraciones en su nivel de expresión, que ante determinadas circunstancias pueden provocar desregulaciones en ciertos pasos de las rutas metabólicas. Actualmente, a nivel clínico se está haciendo uso de las nuevas tecnologías de secuenciación como herramienta de diagnóstico,¹⁻³ permitiendo la detección de variaciones genéticas que puedan ser la causa de las distintas patologías. Estas variantes pueden comprometer la correcta función biológica del organismo al poder afectar a elementos codificantes y reguladores del genoma, dando lugar a los fenotipos o rasgos patológicos clínicamente observables en los pacientes. Un ejemplo conocido de estas enfermedades metabólicas es la fenilcetonuria, cuyos pacientes presentan bajos niveles de la enzima fenilalanina hidroxilasa, produciendo graves trastornos mentales si no se diagnostica y trata a tiempo.⁴ Otro ejemplo menos conocido es el síndrome de Allan-Herndon-Dudley, cuyos pacientes presentan deleciones en la región donde se encuentra el gen *SLC16A2*, que codifica para el transportador de monocarboxilato 8, el cual transporta la hormona tiroidea T3 y cuyas modificaciones resultan en retraso mental, convulsiones, y otros problemas neurológicos derivados.^{5,6} Más ejemplos de enfermedades metabólicas están resumidos en la Tabla 1.

Estas enfermedades metabólicas con una escasa prevalencia en la población son conocidas como enfermedades raras, en el caso de la Unión Europea están dentro de este grupo aquellas que tienen una prevalencia de menos de cinco casos por cada 10 000 individuos en la población. El 80% de estas enfermedades raras tienen base genética y su diagnóstico suele ser complicado, llegando a tardar una media de seis años en completarse.¹⁵ Esta complicación es el resultado de no contar con un tamaño de muestra significativo como para establecer unas pautas de reconocimiento de signos clínicos y así poder diseñar un tratamiento rápido y efectivo. Por lo tanto, para solucionar este problema es necesario que los pacientes que han sido diagnosticados con una enfermedad rara compartan su información clínica con el fin de ayudar a otros pacientes que aún no han sido diagnosticados. Esa información puede incluir tanto los rasgos o fenotipos patológicos del paciente, así como las variaciones genéticas responsables de los mismos y su modo de herencia. La información se almacena en bases de datos de acceso restringido que pueden ser empleadas por científicos con acceso a las mismas. Usando estos datos, se pueden realizar estudios en red que relacionen los fenotipos patológicos de los distintos pacientes con las regiones del genoma afectadas, estableciendo asociaciones fenotipo-genotipo que pueden ayudar a conocer las causas genéticas de los rasgos clínicos de la enfermedad.

Existen diversos proyectos que se encargan de recopilar información clínica y genética de pacientes con enfermedades raras a lo largo del mundo.¹⁶ Uno de ellos es DECIPHER (*DatabasE of genomiC variation and Phenotype in Humans using ENSEMBL Resources*),¹⁷ que incluye una base de datos con información fenotípica y genotípica de pacientes recogida a lo largo de todo el mundo. La información genotípica mayoritariamente engloba variaciones en el número de copias (CNV, del inglés *Copy-Number Variation*) a través del uso de arrays de hibridación genómica comparativa (*arrays-CGH*), incluyendo deleciones y duplicaciones en regiones concretas del genoma. Por otra parte, también se incluye información acerca del

Tabla 1. Ejemplos de algunas enfermedades metabólicas. Información obtenida a partir de información almacenada en Orphanet y OMIM.

Nombre	Descripción	Síntomas	Prevalencia	Genes	Locus
Enfermedad de Fabry ⁷	Alteraciones en el gen que codifica la enzima α -galactosidasa, que produce alteraciones del metabolismo de la globotriosilceramida, la cual se acumula en los lisosomas	Daños en distintos órganos que producen disfunciones renales, cardíacas, gastrointestinales y trastornos mentales	1/3.000	GLA	Xq22.1
Fenilcetonuria ⁸	Ausencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa que afecta al correcto metabolismo de la fenilalanina	Retraso mental y del desarrollo motor, con anomalías del tono muscular	1/10.000	PAH	12q23.2
Enfermedad de Andersen (glucogenosis tipo IV) ⁹	Deficiencia de la enzima glucano transferasa que produce la acumulación de polisacáridos poco ramificados	Trastornos hepáticos que pueden derivar en cirrosis y causar muerte prematura, insuficiencia cardíaca y degeneración muscular	1/20.000	GBE1	3p12.2
Síndrome de Wilson ¹⁰	Deficiencia de la ATPasa2 cotransportadora de cobre, alterando el correcto transporte de iones de cobre en tejido hepático, ocasionando su acumulación	Trastornos hepáticos, neurológicos y/o psiquiátricos	1/25.000	ATP7B	13q14.3
Galactosemia ¹¹	Deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa que afecta al correcto metabolismo de la galactosa y produciendo su acúmulo en sangre	Trastornos digestivos, hepáticos y del sistema nervioso	1/50.000	GALT	9p13
Síndrome de Hurler ¹²	Deficiencia de la enzima alfa-L-iduronidasa que produce un acúmulo excesivo de mucopolisacáridos en determinados tejidos	Retraso mental y del desarrollo motor, así como anomalías en estructuras óseas	1/100.000	IDUA	4p16.3
Enfermedad de Gaucher ¹³	Deficiencia de la enzima beta-glucocerebrosidasa que produce el acúmulo intracelular de esfingolípidos	Trastornos hepáticos, neurológicos y osteopatías	1:100.000	GBA	1q21
Lipogranulomatosis de Farber ¹⁴	Deficiencia de la enzima ceramidasa ácida, que participa en la hidrólisis de las ceramidas, produciendo su acúmulo en lisosomas	Trastornos hepáticos, respiratorios, digestivos y motores	1/1.000.000	ASAH1	8p22
Síndrome de Allan-Herndon-Dudley ⁵	Deficiencia del transportador MCT8, específico de hormonas tiroideas	Alteraciones de los niveles de hormonas tiroideas, hipotonía y trastornos cognitivos	Desconocida	SLC16A2	Xq13.2

tipo de herencia: si las mutaciones son *de novo*, heredadas del padre, de la madre o de ambos. En cuanto a la información fenotípica, cabe destacar que todos los rasgos de los pacientes vienen anotados usando el mismo sistema jerárquico de términos clínicos dentro de la ontología conocida como la *Human Phenotype Ontology* (HPO).¹⁸ El uso de una ontología de términos posibilita que los datos de dos pacientes con rasgos semejantes puedan ser comparados.

Estos datos han sido utilizados para establecer un modelo de red que asocie las regiones genómicas mutadas de los pacientes con los fenotipos patológicos que presentan.¹⁹ Mediante el estudio del modelo de red, se han podido calcular los valores de asociación de las distintas asociaciones fenotipo-genotipo establecidas.²⁰ Estas asociaciones pueden servir para la predicción de regiones genómicas afectadas en nuevos pacientes. El software de predicción que proponemos a continuación serviría como herramienta de apoyo al análisis clínico de pacientes con diagnóstico no cerrado, cuya patología sea de origen genético. En base al perfil fenotípico de un paciente dado, que incluya los rasgos más característicos observables, así como resultados de análisis y otras pruebas diagnósticas, el predictor ordena las posibles regiones genómicas que con mayor probabilidad sean la causa de dichos rasgos. De esta manera y con análisis posteriores, se podrían determinar los elementos funcionales responsables de los fenotipos patológicos del paciente.

El desarrollo de una página web que incluyera todas las funcionalidades del predictor facilitaría su uso por la comunidad científica. Estas funcionalidades incluirían: (i) un sistema de ayuda a la traducción de términos patológicos al sistema HPO, (ii) un control de calidad para escoger fenotipos específicos (cuanto más específico sea un término patológico, más precisa será la predicción de la región genómica causante del fenotipo) y (iii) una tabla que muestre las regiones candidatas y sus correspondientes fenotipos patológicos, ordenadas por el valor significativo. Del mismo modo, implementar un módulo de anotación que localice los elementos funcionales del genoma en base a las regiones predichas, serviría de apoyo a la investigación del origen genético de las enfermedades metabólicas.

2. Descripción y aplicabilidad

2.1. Creación y análisis de redes de asociación fenotipo-genotipo

En contextos de datos escasos o muy complejos, la integración a gran escala y la comparación sistemática de datos clínicos y genéticos heterogéneos es fundamental. Por ello, los estudios basados en redes para la identificación de nuevas relaciones significativas entre las mutaciones y las enfermedades están a la vanguardia. Para crear la red de asociaciones fenotipo-genotipo que empleamos en este estudio, partimos con información de pacientes almacenada en la base de datos DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>),¹⁷ la cual incluye información de más de 22 000 pacientes recopilada a lo largo de todo el mundo (datos de enero 2017, versión v9.12). DECIPHER ofrece información de la región mutada, siendo la gran mayoría variaciones en el número de copias, así como los fenotipos patológicos clínicamente

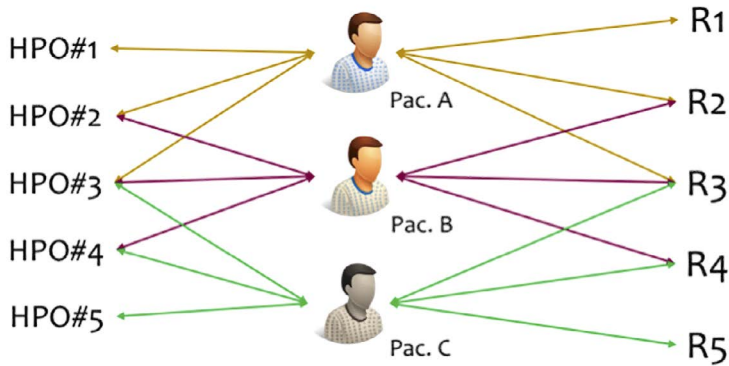


Figura 1. En base a la información de pacientes disponible en la base de datos de DECIPHER, creamos redes que relacionen fenotipos patológicos (HPO#₁₋₅) con regiones mutadas (R₁₋₅) a través de la información de los pacientes (Pac. A, B, C) para el cálculo de las asociaciones entre fenotipos y genotipos usando el programa NetAnalyzer.

observados que manifiesta el paciente, anotados como términos de un vocabulario estandarizado y jerárquicamente organizados, conocido como Human Phenotype Ontology (HPO).^{18, 21} Con esta información, se establece un modelo de red tripartita que relaciona fenotipos patológicos, a través de los pacientes, con sus regiones genómicas mutadas (Figura 1).

A continuación, se asocian los fenotipos patológicos y los genotipos con una herramienta, **NetAnalyzer** (<https://rubygems.org/gems/NetAnalyzer/versions/0.1.2>), diseñada para el análisis de red y cálculo de valores de asociación. Emplea distintos índices de similitud (Jaccard, Simpson, geométrico y coseno) y métodos probabilísticos (coeficiente de correlación de Pearson e hipergeométrico).²⁰ Para escoger el método que mejor se ajusta a nuestro modelo de red, se realiza una validación cruzada sobre el modelo de red, escogiendo un 10% de la misma como control positivo (set de validación, que incluye relaciones fenotipo-genotipo directas), y el 90% restante de la red para calcular los valores de asociación (set de entrenamiento). Los resultados obtenidos por el set de entrenamiento se comparan con el set de validación y se calculan los valores de Precision-Recall (PR), aplicando el método desarrollado por.²² En este caso, se selecciona el método hipergeométrico, ya que en comparación con el resto de métodos, se ha demostrado que es el que mejor se ajusta al modelo de red propuesto.^{20, 23}

2.2. Desarrollo de software de predicción de regiones genómicas

El predictor tiene como finalidad predecir que regiones genómicas pueden, potencialmente, causar los fenotipos patológicos de un paciente. Para poder realizar las predicciones, se necesita por un lado el perfil de fenotipos patológicos clínicamente observados de un paciente y catalogados por la HPO, así como las asociaciones fenotipo-genotipo.

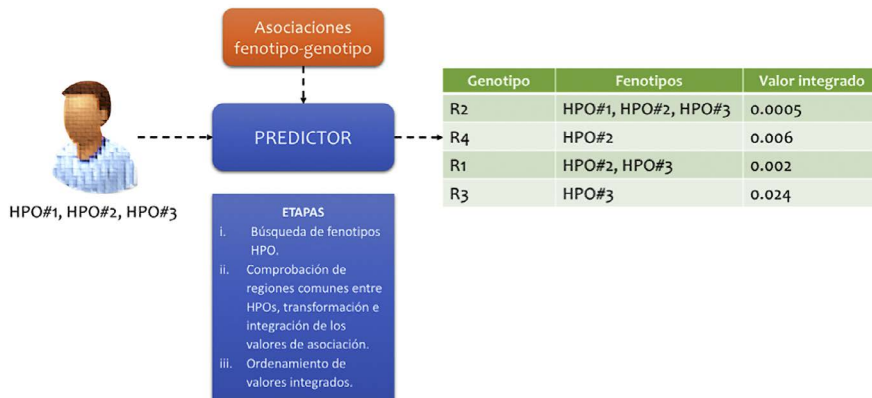


Figura 2. Esquematización del proceso de predicción de regiones potencialmente afectadas en base al perfil fenotípico de un paciente.

tipo-genotipo calculadas por el método anteriormente descrito. Con más detalle por etapas (figura 2), el predictor: (i) se encarga de la búsqueda de los fenotipos del paciente dentro de las asociaciones. Puede suceder que haya fenotipos muy específicos que el predictor no localice debido a que no se encuentren en el conjunto de datos a partir del cual construimos nuestras asociaciones. Una vez que se localizan estos fenotipos, (ii) el predictor comprueba cuáles comparten regiones genómicas. Hay que considerar que cada fenotipo por separado tendrá un valor de asociación determinado con la región predicha. Por lo tanto, para obtener un valor único que relacione todos los fenotipos patológicos encontrados en la región predicha, se utiliza un método que los combine. Finalmente, (iii) el predictor devuelve una lista con las regiones genómicas predichas, los fenotipos patológicos localizados en ellas y los valores.

2.3. Validación de los resultados

Con el fin de confirmar la validez de los resultados de nuestro sistema de predicción, se utiliza un conjunto externo de relaciones entre fenotipos-genotipos, experimentalmente validadas y publicadas. Para ello, se emplean los fenotipos del conjunto de datos a modo de “perfil fenotípico” para predecir las regiones genómicas que son la causa de los mismos. Se comparan las regiones genómicas predichas con las relacionadas a los fenotipos en el conjunto de datos y se determina la tasa de fallos y aciertos del sistema.

3. Posibles aplicaciones

Este modelo de predictor podría facilitar la caracterización de pacientes sin un diagnóstico cerrado, ayudar a la determinación de zonas potencialmente afectadas en

base al cuadro fenotípico presentado por el paciente y precisar la zona afectada para comprobar experimentalmente las alteraciones en el genoma del paciente. Mediante colaboraciones con otros grupos de investigación clínica, se podrían predecir las regiones que con mayor probabilidad se asocien al cuadro fenotípico de pacientes que son complicados de diagnosticar, ofreciendo una primera respuesta sobre las posibles causas genéticas de esta enfermedad. Esta información genotípica predicha se podría analizar mediante herramientas de anotación de elementos funcionales del genoma para localizar aquellos que se encuentren implicados en la aparición de los fenotipos patológicos del paciente.

Del mismo modo, este predictor se podría emplear para descifrar las causas genéticas de otras enfermedades metabólicas cuyo origen aún es incierto. Se podrán predecir las regiones genéticas que con mayor probabilidad sean la causa de un perfil fenotípico para proceder con la caracterización genotípica de esas regiones de forma experimental, empleando arrays-CGH o paneles génicos que abarquen las zonas predichas, confirmando si existen mutaciones en las mismas. A su vez, mediante el uso de herramientas de análisis de variantes como GenomeCAT²⁴, se pueden analizar los CNV caracterizados y determinar qué genes u otros elementos funcionales están afectados.

Agradecimientos

Queremos agradecer al Centro de Supercomputación y Bioinnovación del Parque Tecnológico de Andalucía por su apoyo técnico. Este estudio hace uso de los datos generados por la comunidad DECIPHER. Una lista completa de los centros que contribuyeron a la generación de los datos está disponible en <http://decipher.sanger.ac.uk> y por correo electrónico en decipher@sanger.ac.uk. La financiación para el proyecto fue proporcionada por el Wellcome Trust.

Financiación

Este trabajo fue apoyado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España con el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (SAF2016-78041-C2-1-R), la Junta de Andalucía con el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (CTS-486) y el Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Economía y Competitividad (subvenciones cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, FEDER: PI12 / 00900, PI12 / 02247, PI12 / 02481, PI12 / 02529, Red de Reacciones Adversas a Alérgenos y Fármacos RD12 / 0013/0001). El CIBERER es una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III. Elena Rojano es investigadora del Plan de Formación de Personal Investigador (FPI) con el apoyo de la Junta de Andalucía. James Richard Perkins es investigador del Programa Sara Borrell (CD14 / 00242) del Instituto Nacional de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad de España (becas cofinanciadas por el Fondo Social Europeo (FSE): CP14/00034 y CP15/00103, respectivamente).

Referencias

- SHANKS ME, DOWNES SM, COPLEY RR, LISE S, BROXHOLME J, HUDSPITH KA, et al. Next-generation sequencing (NGS) as a diagnostic tool for retinal degeneration reveals a much higher detection rate in early-onset disease. *Eur J Hum Genet.* 2012;(July 2012):274–80.
- VRIJENHOEK T, KRAAIJEVELD K, ELFERINK M, DE LIGT J, KRANENDONK E, SANTEN G, et al. Next-generation sequencing-based genome diagnostics across clinical genetics centers: implementation choices and their effects. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(10):1142–50.
- MELDRUM C, DOYLE M A, TOTHILL RW. Next-Generation Sequencing for Cancer Diagnostics: a Practical Perspective. *Clin Biochem Rev [Internet].* 2011;32(4):177–95. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219767/%5Cn-http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219767/pdf/cbr_32_4_177.pdf
- CLEARY MA. PHENYLKETONURIA. *Paediatr Child Health (Oxford) [Internet].* 2015;25(3):108–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751722214002054>
- SCHWARTZ CE, STEVENSON RE. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. Vol. 21, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2007. p. 307–21.
- GROENEWEG S, PEETERS RP, VISSER TJ, VISSER WE. Diagnostic and therapeutic challenges in the allan-herndon-dudley syndrome. Vol. 12, *US Endocrinology.* 2016. p. 90–3.
- TOYOOKA K. Fabry disease. Vol. 24, *Current Opinion in Neurology.* 2011. p. 463–8.
- FERNANDA SCHUCK P, MALGARIN F, HENRIQUE CARARO J, CARDOSO F, LUIZ STRECK E, COSTA FERREIRA G. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging Dis [Internet].* 2015;6(5):390. Available from: <http://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2015.0827>
- BRUNO C, VAN DIGGELEN OP, CASSANDRINI D, GIMPELEV M, GIUFFRÈ B, DONATI MA, et al. Clinical and genetic heterogeneity of branching enzyme deficiency (glycogenosis type IV). *Neurology.* 2004;63(6):1053–8.
- BANDMANN O, WEISS KH, KALER SG. Wilson's disease and other neurological copper disorders. Vol. 14, *The Lancet Neurology.* 2015. p. 103–13.
- BROOMFIELD AA, BRAIN C, GRUNEWALD S. Galactosaemia an update. Vol. 21, *Paediatrics and Child Health.* 2011. p. 65–70.
- UMA MAHESWARI TN, GNANASUNDARAM N. Hurler syndrome. *Biomedicine.* 2008;28(4):313–4.
- BUTTERS TD. Gaucher disease. Vol. 11, *Current Opinion in Chemical Biology.* 2007. p. 412–8.
- SANDS MS. Farber disease: Understanding a fatal childhood disorder and dissecting ceramide biology. *EMBO Mol Med.* 2013;5(6):799–801.
- BLÖSS S, KLEMMANN C, ROTHER AK, MEHMECKE S, SCHUMACHER U, MÜCKE U, et al. Diagnostic needs for rare diseases and shared prediagnostic phenomena: Results of a German-wide expert Delphi survey. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172532.
- BOYCOTT KM, RATH A, CHONG JX, HARTLEY T, ALKURAYA FS, BAYNAM G, et al. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. Vol. 100, *American Journal of Human Genetics.* 2017. p. 695–705.
- CORPAS M, BRAGIN E, CLAYTON S, BEVAN P, FIRTH H V., RICHARDS SM, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Curr Protoc Hum Genet [Internet].* 2009;84(January):1–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929709001074>
- ROBINSON PNP, MUNDLOS S. The Human Phenotype Ontology [Internet]. *Clinical Genetics Blackwell Publishing Ltd;* Jun, 2010. p. 525–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0004.2010.01436.x>
- REYES-PALOMARES A, BUENO A, RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, MEDINA MÁ, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F, CORPAS M, et al. Systematic

- identification of phenotypically enriched loci using a patient network of genomic disorders. *BMC Genomics* [Internet]. 2016;17(1):232. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/17/232>
20. ROJANO E, SEOANE P, BUENO-AMOROS A, PERKINS JR, GARCIA-RANEA JA. Revealing the Relationship Between Human Genome Regions and Pathological Phenotypes Through Network Analysis. In: Rojas I, Ortuño F, editors. *Bioinformatics and Biomedical Engineering: 5th International Work-Conference, IWBBIO 2017, Granada, Spain, April 26-28, 2017, Proceedings, Part I* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 197-207. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-56148-6_17
 21. KÖHLER S, VASILEVSKY NA, ENGELSTAD M, FOSTER E, MCMURRY J, AYMÉ S, et al. The Human Phenotype Ontology in 2017. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016;gkw1039. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899602>
 22. PANDEY G, STEINBACH M, GUPTA R, GARG T, KUMAR V. Association analysis-based transformations for protein interaction networks: A function prediction case study. *Proc ACM SIGKDD Int Conf Knowl Discov Data Min* [Internet]. 2007;540-9. Available from: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-36849041067&partnerID=7tDmEqzL&rel=3.0.0&md5=0c-8c0838a4762bae5f9095cb14f315f7>
 23. BUENO A, RODRÍGUEZ-LÓPEZ R, REYES-PALOMARES A, ROJANO E, CORPAS M, NEVADO J, et al. Phenotype-loci associations in networks of patients with rare disorders: application to assist in the diagnosis of novel clinical cases. *Eur J Hum Genet*. 2018;
 24. TEBEL K, BOLDT V, STEININGER A, PORT M, EBERT G, ULLMANN R. GenomeCAT: A versatile tool for the analysis and integrative visualization of DNA copy number variants. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):19.

Algoritmos bioinspirados para resolver el problema de alineamiento múltiple de secuencias



Antonio Benítez-Hidalgo,^a Antonio J. Nebro,^a
Ismael Navas Delgado^a

^a Khaos Research, Universidad de Málaga, Málaga, España

Resumen

El alineamiento múltiple de secuencias juega un papel fundamental en inferencia filogenética, predicción de estructuras proteicas o predicción funcional. Su objetivo es comparar secuencias de ADN, ARN o proteínas con la finalidad de identificar regiones conservadas entre ellas. Encontrar un alineamiento óptimo es un proceso cuya complejidad crece exponencialmente con el número de secuencias y su longitud, por lo que se han propuesto algoritmos bioinspirados para su resolución. Este capítulo se centra en el uso de algoritmos evolutivos multiobjetivo de optimización para resolver el problema del alineamiento múltiple de secuencias. A partir de diversos criterios para medir la calidad de los alineamientos, se propone una herramienta que, mediante un algoritmo evolutivo, sea capaz de obtener un conjunto de soluciones de compromiso que tengan en cuenta dos o más criterios de forma simultánea. De este modo, el usuario puede elegir el alineamiento que considere más adecuado según su experiencia o preferencias.

1. Introducción

El alineamiento múltiple de secuencias¹ (MSA, por sus siglas en inglés) consiste en encontrar el alineamiento óptimo de dos o más secuencias de nucleótidos (ADN, ARN) o aminoácidos (proteínas) con la finalidad de identificar zonas conservadas entre ellas. Es un problema ampliamente estudiado en biología computacional, pues sirve de apoyo para múltiples técnicas como la predicción de estructuras proteicas, análisis filogenético, homología por secuencia, anotación funcional, etcétera.

La figura 1 muestra un ejemplo en el que podemos ver un alineamiento múltiple de cuatro secuencias pertenecientes a las subunidades delta, beta y gamma del gen HBA1. En la cadena inferior, o *cadena consenso*, se muestra información sobre la conservación de éstas, lo que nos permite identificar regiones conservadas y teorizar sobre relaciones evolutivas entre nuestras secuencias.

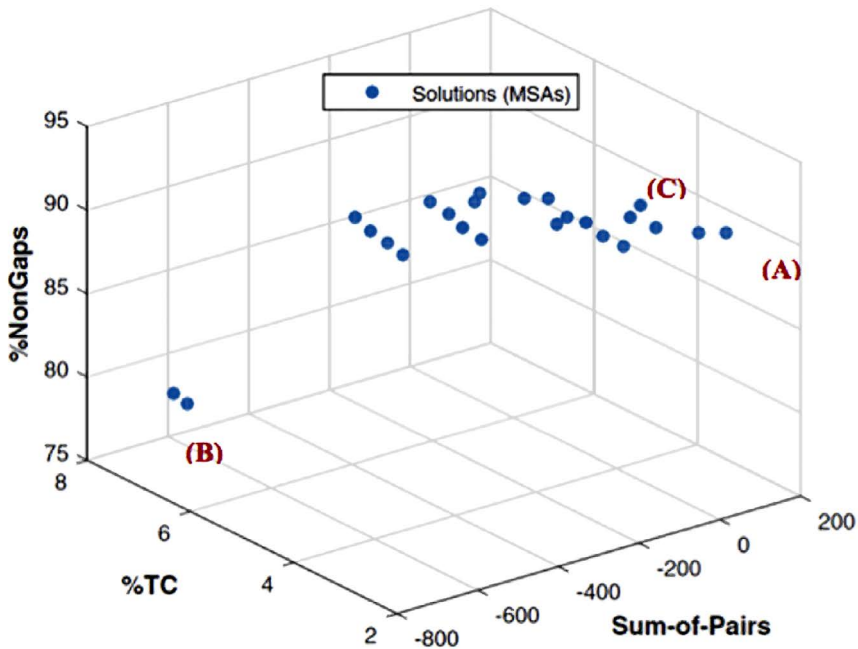


Figura 2. Ejemplo de visualización del frente de Pareto usando tres objetivos.

gran tamaño mediante la aplicación de técnicas de paralelismo escalable, y facilitar el análisis de los resultados por parte de los usuarios finales mediante componentes gráficos que han de permitir seleccionar soluciones concretas del conjunto que devuelve la herramienta y visualizar los alineamientos. El resultado es un proyecto software denominado pyM²SA, que está en desarrollo pero que ya es usable en su estado actual.

2. Fundamento bioinformático

La información genética de todo organismo vivo está codificada en su ADN. El ADN, que a simple vista es un polímero con forma de doble hélice, está formado por cuatro tipos de moléculas denominadas nucleótidos. Una secuencia de estos nucleótidos, denominada *hebra*, es emparejada con otra (en base a ciertas restricciones) para formar la doble hélice. Sin embargo, no es el ADN quien cumple la función reguladora en el organismo, sino las proteínas.

Para llegar a ellas, es necesario *transcribir* nuestra secuencia de ADN a ARN y, posteriormente, *traducir* esta información para formar aminoácidos. Este paso se lleva a cabo leyendo tres moléculas de ARN cada vez, denominadas *códones*. En teoría, somos capaces de obtener 64 aminoácidos diferentes con esas 3 combinaciones de nucleótidos ($4^3=64$). Sin embargo, el código genético está degenerado: varios

Tabla 1. Nucleótidos (a) y aminoácidos (b)

Nucleótidos	Let	Clase
Adenina	A	Purina
Citosina	C	Pirimidina
Guanina	G	Purina
Timina	T	Pirimidina
Uracilo	U	Pirimidina

(a) 4 nucleótidos del ADN.
La Timina es reemplazada por Uracilo en el ARN

Aminoácido	Abreviatura	Aminoácido	Abreviatura
Alanina	Ala	Valina	Val
Prolina	Pro	Leucina	Leu
Glicina	Gly	Isoleucina	Ile
Serina	Ser	Treonina	Thr
Tirosina	Tyr	Metionina	Met
Cisteína	Cys	Lisina	Lys
Asparagina	Asn	Fenilalanina	Phe
Glutamina	Gln	Triptófano	Trp
Aspartato	Asp	Histidina	His
Glutamato	Glu	Arginina*	Arg

(b) 20 aminoácidos diferentes: no esenciales (izquierda) y esenciales (derecha).

* La Arginina solo es considerada esencial en época de crecimiento.

códones pueden traducir al mismo aminoácido y existen varios códenes de inicio y fin de la traducción. Este proceso (que pasa desde el ADN hasta la formación de la estructura primaria de una proteína) es denominado **dogma central de la biología molecular**⁽⁷⁾ y está ilustrado en la figura 3.

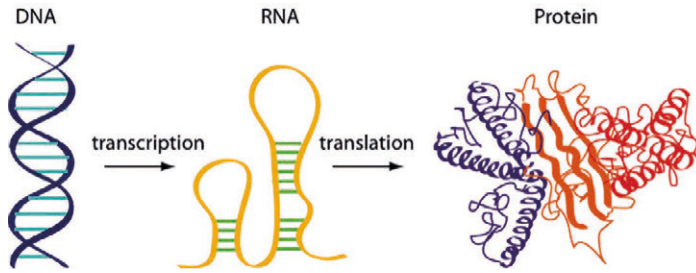


Figura 3. Dogma central de la biología molecular.

2.1. Tipos de alineamientos

Un alineamiento de secuencias de puede realizarse de forma global o local. La diferencia radica en que, en el alineamiento global, la totalidad de las secuencias son alineadas las unas con las otras. Mientras que el primero nos informa sobre el parecido de las mismas y son más útiles cuando tenemos secuencias de tamaño semejante, el segundo nos ayuda a identificar sitios activos. Independientemente del tipo, el alineamiento se efectúa plasmando las secuencias (representadas por letras, ya sean aminoácidos o nucleótidos) en filas de una matriz, en las que insertaremos los gaps para que las zonas con idéntica o similar estructura se alineen. La figura 4 pretende ilustrar estos conceptos.



Figura 4. Tipos de alineamiento de secuencias.

El procedimiento clásico para alinear un conjunto de secuencias consiste en insertar espacios o gaps en posiciones determinadas de la secuencia. Su localización y número dentro del alineamiento determinará la calidad de este. Sin pérdida de generalidad, de ahora en adelante nos centraremos en el alineamiento global de secuencias.

2.2. Criterios para la evaluación de alineamientos múltiples

Aunque no haya un consenso claro sobre cuál es la mejor métrica para evaluar un MSA, existen diferentes tipos de funciones para este fin. Por un lado, tenemos funciones que se basan únicamente en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos. Por otro lado, tenemos funciones que emplean matrices de sustitución (tales como PAM

o Blosum) y, por último, funciones que se basan en información complementaria (e.g., estructura proteica). Nuestra propuesta incluye una gran variedad de funciones perteneciente a las tres clases: porcentaje de columnas totalmente conservadas (TC) y porcentaje de no-gaps (NonGaps), que usan información de la secuencia; suma de pares (SOP) y entropía mínima, que emplean matrices de sustitución; y STRIKE, que se apoya en la estructura de las proteínas.

El porcentaje de columnas totalmente conservadas, por ejemplo, calcula el número de columnas compuestas por el mismo carácter, cuyo valor debe ser maximizado para asegurar la mayor cantidad de regiones conservadas dentro del alineamiento, y no requiere más información que la propia secuencia.

En el caso de la suma de pares y entropía mínima, debemos proporcionar una matriz de sustitución. Esto se debe a que, cuando trabajamos con secuencias de nucleótidos, determinar de un solo vistazo la calidad del alineamiento producido es un proceso trivial, pues dos nucleótidos pueden ser o no iguales. Por el contrario, cuando trabajamos con secuencias de proteínas dos aminoácidos pueden ser iguales, diferentes o parecidos. Es fácil de ver si pensamos que un aminoácido neutro será más parecido a otro neutro (aunque sean diferentes) que a uno ácido. Para cuantificar el parecido, se recurre a estudiar la posición de los aminoácidos en secuencias homólogas. Diremos que dos aminoácidos son más parecidos si suelen aparecer en la misma posición. De esta forma, generamos matrices de puntuación o sustitución que nos dan un valor numérico para cada par de aminoácidos.

2.3. Formatos de alineamientos múltiples

En cualquier experimento de secuenciación masiva, el alineamiento producido será almacenado en un fichero con una estructura particular. Existen varios formatos usados para representar alineamientos de secuencias de nucleótidos o aminoácidos (representados con un solo símbolo). Entre ellos, los más conocidos son FASTA y FASTAQ.

FASTA. Para definir una secuencia en formato FASTA, incluiremos una única línea de cabecera (cuya primera columna siempre contiene el símbolo ">") seguida por líneas de datos de secuencia.

FASTAQ. El formato FASTAQ nos permite, en contraposición al formato FASTA, almacenar información respecto a la calidad de las secuencias. Cada secuencia consta de cuatro líneas. La primera (cuya primera columna siempre contiene el símbolo "@") guarda información como el nombre de la secuencia. La segunda guarda la secuencia y la cuarta la calidad de esta codificada.

3. Algoritmos evolutivos para optimización de problemas con varios objetivos

Las metaheurísticas son técnicas estocásticas no exactas que nos ayudan a obtener soluciones óptimas o *quasi*-óptimas de cualquier problema de optimización combinatorial.

Existen numerosas formas de clasificar los algoritmos metaheurísticos⁽⁸⁾. Los algoritmos propuestos para la resolución de problemas de optimización, en general, y alineamiento múltiple de secuencias, en particular, se pueden clasificar en dos familias: exactos o exhaustivos y no exactos o aproximados. Los algoritmos exactos nos garantizan encontrar la solución óptima a nuestro problema a cambio de tiempo de cómputo y recursos. Los algoritmos aproximados, por otro lado, no nos garantizan encontrar la mejor solución, pero sí encontrar buenas soluciones en significativamente menos tiempo. Por ese motivo, y debido a que encontrar el alineamiento óptimo ha demostrado ser un problema de optimización complejo⁽⁹⁾ que crece al aumentar el número de secuencias y su longitud, se han propuesto *metaheurísticas de optimización* para su resolución.

Estos algoritmos producen en cada etapa de su ejecución un conjunto de soluciones (denominada población). La característica principal de estos algoritmos se basa en el uso de **operadores genéticos**. Siguiendo la terminología usada anteriormente, cada solución al problema se denomina **individuo** (o partícula). Para lograr diversidad biológica dentro de nuestra población se emplean operadores de mutación, selección y cruce para producir un cambio aleatorio en un individuo (fundamental para preservar la diversidad genética de la población), elegir bajo un criterio a los individuos con mayor índice de supervivencia o mezclar información de varios individuos, respectivamente. Cada iteración de nuestro algoritmo producirá, como indicamos anteriormente, un conjunto de soluciones o población.

El problema de alineamiento múltiple de secuencias puede ser formulado como un problema de optimización multi-objetivo (MOP) donde cada objetivo es una función de evaluación del MSA, por lo que es posible usar metaheurísticas de optimización para su resolución.

La figura 5 representa el flujo de trabajo seguido por el algoritmo metaheurístico NSGA-II. En primer lugar, una población de individuos es creada. En términos de MSA, cada individuo es una solución del alineamiento múltiple. Esa población inicial es evaluada usando funciones de evaluación propias de alineamientos múltiples (por ejemplo, suma de pares o porcentaje de columnas totalmente conservadas).

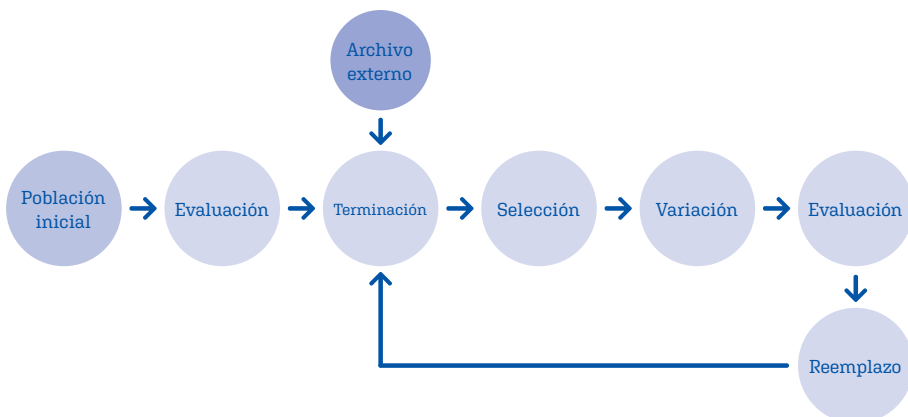


Figura 5. Flujo de trabajo.

A continuación, se entra en un ciclo que consta de las siguientes fases: los mejores alineamientos son seleccionados para generar una población de descendientes usando una estrategia de reproducción. Esta población es evaluada y se aplica una estrategia de reemplazo para seleccionar la población de la siguiente generación. Cuando se han llevado a cabo un número determinado de iteraciones del ciclo, el algoritmo finaliza y la población final de soluciones se guarda en un archivo externo.

Como se ha descrito anteriormente, la estrategia de reproducción consiste en la aplicación de operadores genéticos (mutación y cruce, principalmente). Éstos son altamente dependientes del problema al que nos enfrentemos. A continuación, describiremos algunos ejemplos de operadores para el problema de alineamiento múltiple de secuencias.

3.1. Operador de cruce

Multitud de operadores de cruce han sido desarrollados para afrontar el problema de alineamiento múltiple de secuencia⁽¹⁰⁾. El método de cruce de un solo punto está ilustrado en la figura 6. En primer lugar, se selecciona un punto de cruce aleatorio en el alineamiento A, cortándolo en dos bloques. A continuación, se corta el alineamiento B acorde a las posiciones del primer padre. El hijo C será, por tanto, la mezcla del primer bloque del alineamiento A más el segundo bloque del alineamiento B. El hijo D será la mezcla del primer bloque del alineamiento B más el segundo bloque del alineamiento A.

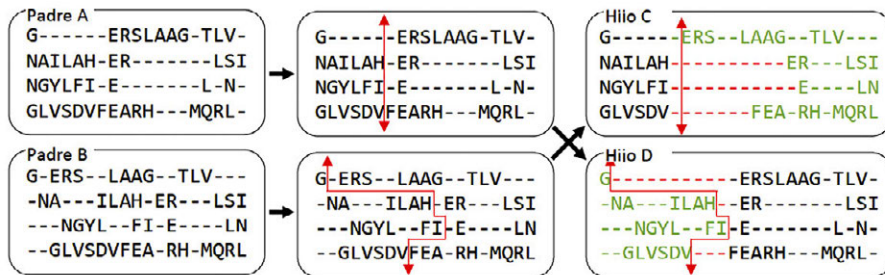


Figura 6. Operador de selección de un solo punto.

3.2. Operador de mutación

Un operador de mutación clásico se basa en seleccionar un grupo de gaps aleatorio y fusionarlo con el grupo contiguo más cercano. Este proceso queda ilustrado en la siguiente figura:



Figura 7. Operador de mutación.

En cualquier caso, tras aplicar el operador de mutación seleccionado se eliminarán las columnas conformadas únicamente con gaps.

4. Conclusiones

En este capítulo se ha hecho una breve introducción sobre los MSAs desde un punto de vista biológico, antes de pasar a su resolución con el uso de algoritmos bioinspirados. Nuestra propuesta algorítmica, denominada pyM^2SA , extiende el framework de optimización $jMetalPy$, que, a través del uso de operadores genéticos y estrategias evolutivas, maneja una población de individuos (en nuestro caso, alineamientos múltiples) con el fin de obtener un conjunto de soluciones de compromiso.

Las principales contribuciones esperadas de este proyecto pueden ser resumidas como sigue:

- **Extensión de funcionalidad del framework de optimización $jMetalPy$.** $jMetalPy$ es la base sobre la que se edificará este proyecto, por lo que requiere un alto grado de desarrollo hasta generar un framework funcional. Esto incluirá, entre otras cosas: la implementación de dos algoritmos evolutivos del estado del arte (NSGA-II y SMPSO) y una variante de SMPSO para incluir la búsqueda en el frente guiado por puntos de referencia (denominada SMPSO/RP); una forma de visualizar el frente de Pareto con dos objetivos; y un indicador de calidad del frente (hipervolumen).
- **Desarrollo del framework para la evaluación de alineamientos múltiples.** Hasta ahora, ningún otro paquete en Python proveía de múltiples métricas de evaluación de alineamientos múltiples. Nuestra propuesta, $pyMSA$, incluye cinco funciones diferentes divididas en tres categorías: aquellas que usan solo información de la secuencia, que usan matrices de sustitución y que usan información estructural. Los alineamientos pueden ser leídos de ficheros en formato FASTA para aplicar cualquiera de las funciones. Esta herramienta ya está disponible.
- **Implementación del algoritmo $M2Align$ en el framework de optimización $jMetalPy$.** A partir de la versión en Java, se ha implementado en Python el algoritmo $M2Align$, que usa una codificación particular de los alineamientos para facilitar la aplicación de los operadores genéticos. Esta herramienta, denominada pyM^2SA , está en desarrollo.

4.1. Futuras líneas de trabajo

Fruto de su temprana etapa de desarrollo, pyM²SA, aún siendo capaz de ofrecer una visualización del frente de Pareto usando dos objetivos, no puede visualizar MSAs con tres o más objetivos. Esta funcionalidad es esencial pues permite de forma fácil e intuitiva determinar la calidad de la población generada (a través de la diversidad –cómo de esparcidas están las soluciones– y convergencia –cómo de cerca están de una referencia– del frente de soluciones).

Financiación

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto TIN2017-86049-R y TIN2014-58304-R (Ministerio de Educación y Ciencia de España) y P12-TIC-1519 (Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación).

Bibliografía

1. CATES S. Multiple sequence alignment. *Connexions* [Internet]. 2007;191(2):153–61. Available from: <http://cnx.org/content/m11036/2.11/>
2. DURILLO JJ, NEBRO AJ. JMetal: A Java framework for multi-objective optimization. *Adv Eng Softw* [Internet]. 2011;42(10):760–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.advengsoft.2011.05.014>
3. ZAMBRANO-VEGA C, NEBRO AJ, GARCÍA-NIETO J, ALDANA-MONTES JF. M2Align: Parallel multiple sequence alignment with a multi-objective metaheuristic. *Bioinformatics* [Internet]. 2017;33(19):3011–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx338>
4. ZAMBRANO-VEGA C, NEBRO AJ, DURILLO JJ, GARCÍA-NIETO J, ALDANA-MONTES JF. Multiple Sequence Alignment with Multiobjective Metaheuristics. A Comparative Study. *Int J Intell Syst* [Internet]. 2017;32(8):843–61. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/int.21892>
5. ORTUÑO FM, VALENZUELA O, ROJAS F, POMARES H, FLORIDO JP, URQUIZA JM, et al. Optimizing multiple sequence alignments using a genetic algorithm based on three objectives: structural information, non gaps percentage and totally conserved columns. *Bioinformatics*. 2017;29:1–14.
6. DEB K, PRATAP A, AGARWAL S, MEYARIVAN T.A fast and elitist multiobjective genetic algorithm: NSGA-II. *IEEE Trans Evol Comput*. 2002;6(2):182–97.
7. CRICK F. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* [Internet]. 1970 Aug 8; 227(5258): 561–3. Available from: <http://www.nature.com/articles/227561a0>
8. BLUM C, ROLI A. Metaheuristics in combinatorial optimization: overview and conceptual comparison. *ACM Comput Surv*. 2003;35(3):189–213.
9. WANG L, JIANG T. On the Complexity of Multiple Sequence Alignment. *J Comput Biol* [Internet]. 1994;1(4):337–48. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/cmb.1994.1.337>
10. NAZIN F, SARKER R, ESSAM D. Vertical decomposition with Genetic Algorithm for Multiple Sequence Alignment. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2011;12(1):353. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/353>

Reprogramación de transposones en el cáncer de pulmón



Macarena Arroyo-Varela,^{a, b} Carmen María López-Rodríguez,^c Rocío Bautista,^d, Rafael Larrosa-Jiménez,^{d, e} Manuel Cobo-Dols,^f and M. Gonzalo Claros^c

^a U.G.C. Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias, Hospital Regional Universitario de Málaga

^b Tutora clínica, Universidad de Málaga

^c Dpto. Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga

^d Plataforma Andaluza de Bioinformática-SCBI, Universidad de Málaga

^e Dpto. de Arquitecturas de Computadores, Universidad de Málaga

^f U.G.C de Oncología, Hospital Regional Universitario de Málaga

Correspondencia: Macarena Arroyo Varela, macarrojo@uma.es

Resumen

En el presente trabajo se ha desarrollado un flujo de trabajo automatizado para el estudio de la expresión diferencial de los elementos móviles en cáncer, y se ha aplicado al cáncer de pulmón. Para ello se han conseguido secuencias de ARN total del tejido tumoral y sano adyacente tanto de las bases de datos existentes como realizando la secuenciación de pacientes del Hospital Regional de Málaga. A continuación se ha realizado un flujo de trabajo para analizar las secuencias obtenidas, que conlleva el preprocesamiento de las secuencias, el alineamiento al genoma humano de referencia, la medición de la expresión de los elementos móviles en cada una de las muestras, y finalmente el cálculo de la expresión diferencial de cada uno de estos elementos, con el fin de averiguar cuáles de ellos se expresan de forma significativa. El proceso de análisis realizado a las distintas poblaciones muestra que no hay ninguna desregulación de la expresión de los transposones cuando las células pulmonares sufren una transformación neoplásica. Además se han encontrado una serie de elementos móviles con un perfil de expresión significativamente distintos entre tejido tumoral y tejido sano.

1. Introducción

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte en la actualidad (~16%), a pesar de los avances del tratamiento quimioterápico, radioterápico y quirúrgico.¹⁶ Entre las causas de estos malos resultados está el diagnóstico tardío de la enfermedad, ya que en la mayoría de los casos no presentan síntomas hasta que se encuentra avanzado o se diagnostica por los síntomas de las metástasis. Esto limita las opciones terapéuticas y hace aumentar aún más la tasa de mortalidad.¹⁸ El tratamiento actual tiende a ser lo más agresivo posible con el tumor, y lo menos con el resto del organismo, con lo que se prefieren, siempre que sea posible, los tratamientos

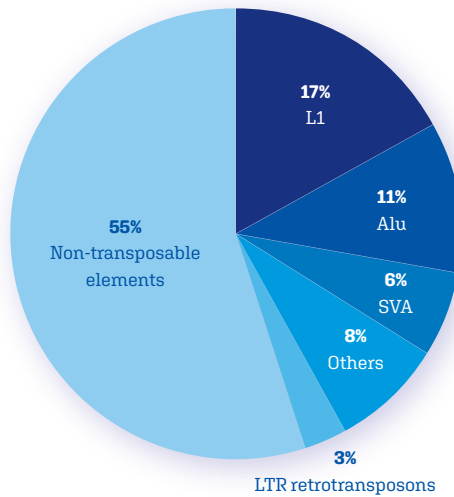


Figura 1. Composición del genoma humano: los transposones representan el 45%, que se distribuye en retrotransposones (clase I) (~42%) donde se incluyen los LTR, LINE (L1) y SINE (Alu y SVA) y otros, y el resto (~3%) son transposones de DNA (clase II). Tomado de Cordaux et al. 2009².

dirigidos. No obstante, la gran mayoría siguen tratándose con primeras y segundas líneas de quimioterapia, y únicamente una pequeña proporción (del 5 al 7%) reciben tratamientos personalizados. Otro problema adicional es que no se ha conseguido eliminar la resistencia a estos tratamientos, por lo que hay que seguir buscando nuevas opciones terapéuticas, a ser posible basadas en nuevos mecanismos implicados en el desarrollo del cáncer. Hasta ahora, los tratamientos personalizados se han basado principalmente en genes que codifican proteínas, que no son ni el 2% del genoma humano, mientras que el 45% está formado por transposones² (figura 1).

Los transposones, o elementos móviles, son secuencias de DNA con la capacidad de moverse de una posición a otra del genoma. Un 3 % del genoma humano son transposones de DNA (clase II), que no aumentan la cantidad del genoma al moverse por un mecanismo de «cortar y pegar». El resto son transposones de RNA (clase I) que sí incrementan tamaño del genoma al desplazarse por un mecanismo de «copiar y pegar» con la ayuda de una retrotranscriptasa y un RNA intermedio. Los transposones de RNA que tienen origen retroviral se denominan retrotransposones y se caracterizan por la presencia de repeticiones terminales largas denominadas LTR (*Long Terminal Repeats*). Un ejemplo bien conocido son la familia de retrovirus endógenos (ERV, del inglés *Endogenous RetroVirus*).⁷ Otros transposones de RNA carecen de secuencias LTR, como son los SINE (*Short INterspersed Elements*: elementos dispersos cortos) y los LINE (*Long INterspersed Elements*: elementos dispersos largos).¹³ Tanto los LTR como los LINE codifican la retrotranscriptasa necesaria para su transposición, mientras que los demás elementos móviles no son autónomos por carecer de retrotranscriptasa, con lo que su movimiento depende de los LTR y de los LINE.¹⁴

Se sabe que el movimiento de los transposones provoca cambios en el genoma, como, por ejemplo, la alteración de la cantidad de DNA, la inducción de un gen cercano, la interrupción de genes o incluso traslocaciones cromosómicas. Por una parte, estos cambios se piensa que son la base de la evolución del genoma,^{4,19} pero también se sabe que muchas enfermedades, entre ellas muchos tipos de cáncer, son consecuencia del movimiento de los transposones.⁶ Se ha propuesto que la expresión de los retrotransposones era más elevada en los tejidos tumorales, en comparación con el tejido normal¹⁵ debido a la gran cantidad de proteínas codificadas por los LINE que se detectaban en muchos tumores. A esto se le añadía que las alteraciones genómicas producidas por la retrotransposición cuadraban con la típica inestabilidad genómica de los tumores,¹³ y que esta inestabilidad probablemente ayudara a generar mutaciones conductoras (*driver*) o resistencias.

Es, pues, evidente que merece la pena estudiar más a fondo qué ocurre con la transposición en el tejido tumoral con respecto al normal, por si encontramos pistas que nos expliquen la progresión de la enfermedad (antes o después de un tratamiento quimioterápico o una intervención quirúrgica), o a encontrar biomarcadores diagnósticos. Para ello, en este trabajo queremos valorar si existe desregulación global, reprogramación global o reprogramación específica de transposón entre el tejido sano y el tumoral. Como modelo de cáncer, utilizaremos distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón, con la novedad de que las muestras de tejido sano y tumoral deberán ser del mismo paciente para poderlas comparar directamente y descartar rápidamente las diferencias debidas al contexto genómico del paciente.

2. Metodología

2.1. Selección de muestras

Se han buscado datos públicos de secuenciación por RNA-seq a partir de muestras que cumplan los siguientes requisitos:

1. Que no se haya secuenciado tejido parafinado sino crionizado.
2. Que para su conservación se haya utilizado un protocolo que proteja el RNA total contenido en los tejidos.
3. Que la secuenciación sea de RNA total.
4. Que se haya secuenciado el tejido sano y el tumoral del mismo paciente.

En la base de datos EGA (European Genome-phenome Archive) se encontró un estudio con lecturas pareadas 2×75 nt de 17 pacientes con carcinoma microcítico de pulmón¹² realizadas en un HiSeq2000 de Illumina. En la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information) se encontró un experimento con lecturas pareadas 2×100 nt de 50 pacientes con adenocarcinoma de pulmón¹⁰ secuenciadas también en un HiSeq2000. Tras solicitar los permisos pertinentes, se descargaron los proyectos EGA y NCBI, EGAS00001000334 y ERP001058, respectivamente.

Para completar el estudio, se han solicitado al Biobanco de Andalucía el RNA total de tejido tumoral y sano de 8 pacientes de adenocarcinoma de pulmón y otros 8 de cáncer de pulmón epidermoide intervenidos en el Hospital Regional de Málaga.

2.2. Análisis bioinformático

Los datos de secuenciación que se obtengan se analizarán mediante un flujo de trabajo automatizado basado en herramientas bioinformáticas consolidadas, que comprenderá:

- Preparación de las lecturas: control de calidad de las lecturas brutas para quedarnos solo con las lecturas útiles que posteriormente se mapearán sobre el genoma humano.
- Cuantificación de la expresión: se determinará el nivel de expresión de cada transposón en tejido sano y tumoral de cada paciente
- Expresión diferencial: se determinará la reprogramación específica de los transposones con paquetes de R.

A continuación se detalla cada uno de estos procedimientos, siempre teniendo en cuenta que el flujo de trabajo estará preparado para analizar cualquier tipo de lecturas de ultrasecuenciación de muestras emparejadas.

2.2.1. Preparación de las lecturas

De las lecturas brutas obtenidas de la secuenciación de RNA de cada muestra se retirarán las secuencias contaminantes, los posibles adaptadores, las regiones de mala calidad, etc., mediante el programa *SeqTrimNext*⁵, diseñado en nuestro grupo de investigación, con los parámetros estándares para las muestras de secuenciación pareada con Illumina. Esto es necesario para que la posterior cuantificación de la expresión no se vea falseada por artefactos de secuenciación.

Las lecturas depuradas resultantes de cada muestra se mapearán sobre el genoma humano de referencia hg38.p1 (GCA_000001405.16) con el programa *Bowtie1*⁸ con el siguiente comando:

```
bowtie hg38 -p 16 --chunkmbs 400 -m 1 -S --max  
SAMPLE_multimap.fastq -S -1 $file1 -2 $file2
```

en el que *hg38* indica el directorio donde está el índice de *bowtie* del genoma humano de referencia, *-p 16 -chunkmbs 400* indica el número de procesos paralelos a usar y evita que dé un error de memoria si no se hubiera reservado suficiente memoria, *-m 1* hace que cuando una secuencia se alinea en más de una posición se ignore en el fichero de alineamiento de salida y pase a ser escrita en el fichero de lecturas con múltiples alineamientos que se especifica en *--max SAMPLE_multimap.fastq*; *-S* se utiliza para que la salida sea en formato SAM (*Sequence*

Alignment Format), y finalmente, `-1 $file1` y `-2 $file2` indican los ficheros de entrada (dos, al ser lecturas pareadas en todos los casos).

Para convertir las lecturas mapeadas en datos de expresión, se utilizarán programas del paquete *SAMtools*⁹ con los siguientes comandos:

```
samtools view -bS - > SAMPLE_unique.bam
samtools sort SAMPLE_unique.bam SAMPLE_unique_sorted
samtools index SAMPLE_unique_sorted.bam
```

con los que se consigue que el fichero SAM que contiene el mapeo del genoma de referencia con las lecturas de cada muestra (*SAMPLE*) que alinean una única vez en él se convierta en un fichero BAM (*Binary-SAM*) ordenado e indizado para tener un acceso más rápido a su contenido.

2.2.2. Cuantificación de la expresión

Para cuantificar la expresión de los transposones, se utilizarán como referencia las secuencias repetidas que contienen, tal y como se hace con el programa bioinformático *RepEnrich*.³ La base de datos estándar de las repeticiones es *RepBase*¹⁷, que contiene 15 478 elementos repetitivos en 5 622 519 posiciones del genoma humano. Estas repeticiones de filtran para que queden solamente las 1 267 secuencias de transposones humanos repartidas en 4 713 583 posiciones del genoma. Una gran ventaja de utilizar *RepBase* es que clasifica las secuencias repetitivas de los transposones según familias, clases y elementos individuales, por lo que posteriormente podremos cuantificar las secuencias mapeadas por familias, clases y elementos, respectivamente.

Ahora ya se puede ejecutar *RepEnrich* para cada muestra con los siguientes datos de entrada:

- los ficheros en formato FastQ con las lecturas pareadas útiles que mapean más de una vez sobre el genoma humano;
- el fichero BAM ordenado e indizado con las lecturas que mapean una única vez sobre el genoma humano;
- la secuencia del genoma humano hg38.1 en el formato apropiado;
- las 1 267 repeticiones de transposones, en el formato apropiado.

lo que devuelve, como resultado, tres ficheros por cada muestra: uno con el nivel de expresión de cada elemento móvil, otro con el nivel de expresión por clase de elementos, y otro con el nivel de expresión por la familia de elementos.

Estos datos de salida hay que adaptarlos a las necesidades de los programas de análisis de expresión diferencial que vendrán a continuación. Primero se eliminan de cada muestra los datos correspondientes a snRNA, rRNA y tRNA, dado que estos elementos pueden marcar diferencias espurias simplemente debidas a la manera en que cada laboratorio extrae el RNA a secuenciar. Como resultado de este filtro, quedan 1 190 elementos móviles a analizar. A continuación, se aplica otro filtro para retirar los transposones que se expresan poco, o sea, que presentan menos de 10 cuentas por millón en al menos 2/3 de las muestras. Finalmente, se reunirán en una

sola matriz bidimensional los datos de la expresión de los transposones que han superado los filtros en todas las muestras que reúnen la calidad necesaria. Con esta matriz se obtiene otra en la que las filas contienen las clases de transposones, y una tercera matriz en la que las filas son las familias de transposones. De esta forma, se podrán procesar todas las muestras por separado para obtener la expresión diferencial correspondiente de transposón, clase y familia.

2.2.3. Expresión diferencial

Cada una de las matrices de expresión obtenida en el apartado anterior se analizará de dos formas. Por un lado, se calculará el cambio de expresión del transposón por paciente para saber cómo se comporta este transposón entre los pacientes. Por otro lado, se calcularán cuáles son los cambios de expresión estadísticamente significativos, que orientarán sobre la posible reprogramación de los transposones. Todos estos análisis se realizarán en el entorno de R (<https://www.r-project.org>) con las librerías correspondientes.

Para conocer el comportamiento del transposón entre los pacientes, se calcula el nivel de expresión de cada elemento móvil teniendo en cuenta que las muestras están emparejadas por paciente (tumoral/sano). Para ello se utilizará la función `cpm` de `edgeR`¹¹ con el siguiente comando:

```
logcpm <- cpm(y, log=TRUE, lib.size=libsize)
```

donde `y` es la matriz generada a partir de los ficheros de salida de `RepEnrich` en el apartado anterior, `libsize` es el tamaño de la librería de lecturas de cada paciente (que sirve para normalizar), que no es más que la suma de todas las lecturas mapeadas en cada columna de `y`, y el parámetro `log=TRUE` indica que el resultado estará expresado de forma logarítmica en base 2 para que la inducción y represión sean valores simétricos en torno a cero. La matriz resultante `logcpm` contendrá el nivel de expresión de cada transposón; dado que se tienen los datos emparejados, el cambio de expresión de cada pareja de datos tumoral/sano se calcula restando a cada `logcpm` de tejido tumoral el `logcpm` del tejido sano del mismo paciente, según la fórmula:

$$\logFC \leftarrow \logcpm_{\text{tumoral}} - \logcpm_{\text{normal}}$$

que devuelve la matriz `logFC` en la que cada fila corresponde al logaritmo en base 2 de las veces que cambia la expresión de cada transposón, y en las columnas aparece cada uno de los pacientes analizados.

El análisis para determinar si el cambio de expresión es significativo o no se basa en el ajuste de los datos de `y` al modelo típico de la RNA-seq (binomial negativo lineal) con la función `glmFit` de la librería `edgeR`:

```
yfit <- glmFit(y, design)
```


donde `design` contendrá la información no solo del diseño del experimento (qué muestras son de tumor y cuáles de tejido sano), sino también información sobre las parejas de muestras sano/tumor que proceden de la misma persona. Esto permitirá calcular la significación estadística del cambio con `glmLRT` (generalized linear model likelihood ratio test) del siguiente modo:

```
lrt <- glmLRT(yfit)
```

en donde `lrt` contiene, entre otros datos, el cambio de expresión promedio de cada transposón entre pulmón sano y tumoral, y la probabilidad de que este cambio sea al azar o debido a la malignidad del tejido. Se considera que el cambio de expresión de un transposón es significativo cuando cumpla dos condiciones:

1. que el cambio de expresión sea de al menos el doble ($|\log FC| > 1$), y
2. que supere el filtrado de falsos negativos para las pruebas múltiples ($FDR < 0,05$).

Se utiliza la FDR en vez de la P debido a que es el ajuste estándar para minimizar los falsos positivos que se obtendrían con los valores originales de la P sin ajustar cuando se realizan comparaciones múltiples simultáneas.¹¹

El flujo de trabajo terminará con una serie de representaciones gráficas de los datos analizados que se almacenan en varios PDF por comodidad. Se determinará el nivel de expresión de los transposones de forma global entre en tejido sano y tumoral, y también se comparará la reprogramación de los transposones en cada tipo de cáncer y cada población, así como la presencia de algún transposón que pueda ser común a todos los cánceres de pulmón analizados.

3. Principales hallazgos

Gracias al flujo de trabajo automático que se acaba de describir, se ha visto que no hay ninguna desregulación de la expresión de los transposones cuando las células pulmonares sufren una transformación neoplásica, en concordancia con lo ya avanzado por Clayton y colaboradores.¹ Es más, los resultados que se van obteniendo apoyan la hipótesis de que la célula tumoral sigue manteniendo bajo un estrecho control a los transposones.

Lo más interesante es que se están detectado transposones cuya expresión se reprograma con claridad cuando el tejido pulmonar sano pasa a ser tumoral. Llama la atención que algunos de ellos sean de tipo retrovirus endógeno (ERV), cuando hasta ahora se pensaba que los LINE1 eran casi los únicos capaces de inducirse en las células tumorales.^{1,3} Esto supone un gran hallazgo que abriría la puerta al diseño de biomarcadores específicos de adenocarcinoma, carcinoma microcítico y carcinoma epidermoide de pulmón, y podría ser un punto de partida a la hora de personalizar los tratamientos de precisión y mejorar las técnicas diagnósticas y pronósticas.

Todos estos resultados están pendientes de publicación.

Agradecimientos

Quisiéramos agradecer a la Plataforma Bioinformática de Andalucía y al Servicio de Ultrasecuenciación, ambos de la Universidad de Málaga, el apoyo que han prestado para el desarrollo de este proyecto. Un agradecimiento especial a Neumosur por su apoyo, ya que sin las becas 12/2015, 14/2016 y 5/2017, esta investigación no se podría estar desarrollando.

Bibliografía

1. EVAN A. CLAYTON, LU WANG, LAVANYA RISHISHWAR, JIANRONG WANG, JOHN F. McDONALD, AND I. KING JORDAN. Patterns of Transposable Element Expression and Insertion in Cancer. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3, 2016.
2. RICHARD CORDAUX AND MARK A BATZER. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature reviews. Genetics*, 10(10):691–703, 2009.
3. STEVEN W CRISCIONE, YUE ZHANG, WILLIAM THOMPSON, JOHN M SEDIVY, AND NICOLA NERETTI. Transcriptional landscape of repetitive elements in normal and cancer human cells. *BMC genomics*, 15(583):1–17, 2014.
4. REYAD A ELBARBARY, BRONWYN A LUCAS, AND LYNNE E MAQUAT. Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science*, 351(6274):aac7247, Feb 2016.
5. JUAN FALGUERAS, ANTONIO J LARA, NOE FERNANDEZ-POZO, FRANCISCO R. CANTON, GUILLERMO PEREZ-TRABADO, AND M. GONZALO CLAROS. SeqTrim: a high-throughput pipeline for preprocessing any type of sequence reads. *BMC Bioinformatics*, 11(1):38, 2010.
6. DUSTIN C. HANCKS AND HAIG H. KAZAZIAN. Active human retrotransposons: Variation and disease, 2012.
7. ALEXANDER HAYWARD. Origin of the retroviruses: when, where, and how? *Current Opinion in Virology*, 25:23–27, 2017.
8. BEN LANGMEAD. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current Protocols in Bioinformatics*, (SUPP.32), 2010.
9. HENG LI, BOB HANDSAKER, ALEC WYSOKER, TIM FENNELL, JUE RUAN, NILS HOMER, GABOR MARTH, GONCALO ABECASIS, AND RICHARD DURBIN. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16):2078–2079, 2009.
10. SHANCHENG REN, ZHIYU PENG, JIAN-HUA MAO, YONGWEI YU, CHANGJUN YIN, XIN GAO, ZILIAN CUI, JIBIN ZHANG, KANG YI, WEIDONG XU, CHAO CHEN, FUBO WANG, XINWU GUO, JI LU, JUN YANG, MIN WEI, ZHIJIAN TIAN, YINGHUI GUAN, LIANG TANG, CHUANLIANG XU, LINHUI WANG, XU GAO, WEI TIAN, JIAN WANG, HUANMING YANG, JUN WANG, AND YINGHAO SUN. RNA-seq analysis of prostate cancer in the Chinese population identifies recurrent gene fusions, cancer-associated long noncoding RNAs and aberrant alternative splicings. *Cell research*, 22(5):806–21, 2012.
11. MARK D ROBINSON, DAVIS J MCCARTHY, AND GORDON K SMYTH. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1):139–40, 2010.
12. CHARLES M RUDIN, STEFFEN DURINCK, ERIC W STAWISKI, JOHN T POIRIER, ZORA MODRUSAN, DAVID S SHAMES, EMILY A BERGBOWER, YINGHUI GUAN, JAMES SHIN, JOSEPH GUIL-LORY, CELINA SANCHEZ RIVERS, CATHERINE K FOO, DEEPALI BHATT, JEREMY STINSON, FLORIAN GNAD, PETER M HAVERTY, ROBERT GENTLEMAN, SUBHRA CHAUDHURI, VASANTHARAJAN JANAKIRAMAN, BIJAY S JAISWAL, CHAITALI PARIKH, WENLIN YUAN, ZEMIN ZHANG, HARTMUT KOEPPEN, THOMAS D WU, HOWARD M STERN, ROBERT L YAUCH, KENNETH E HUFFMAN, DIEGO D PASKULIN, PETER B ILLEI, MARILEILA VARELLA-GARCIA, ADI F GAZDAR, FREDERIC J DE SAUVAGE, RICHARD BOURGON, JOHN D MINNA, MALCOLM V BROCK, AND SOMASEKAR SESHAGIRI.

- Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nature Genetics*, 44(10):1111–1116, 2012.
13. ILARIA SCIAMANNA, ALBERTO GUALTIERI, PIER VINCENZO PIAZZA, AND CORRADO SPADAFORA. Regulatory roles of LINE-1-encoded reverse transcriptase in cancer onset and progression. *Oncotarget*, 5(18):8039–8051, 2014.
 14. ILARIA SCIAMANNA, MATTEO LANDRISCI-NA, CARMINE PITTOGGI, MICHELA QUIRINO, CRISTINA MEARELLI, ROSANNA BERARDI, ELISABETTA MATTEI, ANNALUCIA SERAFINO, ALESSANDRA CASSANO, PAOLA SINIBALDI-VALLEBONA, ENRICO GARACI, CARLO BARONE, AND CORRADO SPADAFORA. Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene*, 24(24):3923–31, 2005.
 15. REUT SHALGI, YITZHAK PILPEL, AND MOSHE OREN. Repression of transposable-elements - a microRNA anti-cancer defense mechanism? *Trends Genet*, 26(6):253–9, Jun 2010.
 16. REBECCA L. SIEGEL, KIMBERLY D. MILLER, AND AHMEDIN JEMAL. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1):7–30, 2016.
 17. AFA SMIT, R HUBLEY, AND P GREEN. Repeat-Masker Open-4.0. 2013–2015 ., 2013.
 18. BERNARD W. STEWART AND CHRISTOPHER P. WILD, EDITORS. *World Cancer Report 2014*. IARC Publications, Lyon, France, 2014.
 19. JULIA VOGT, KATHRIN BENGESSER, KATHLEEN B M CLAES, KATHARINA WIMMER, VICTOR-FELIX MAUTNER, RICK VAN MINKELN, ERIC LEGIUS, HILDE BREMS, MEENA UPADHYAYA, JOSEF HÖGEL, CONXI LAZARO, THORSTEN ROSENBAUM, SIMONE BAMMERT, LUDWINE MESSIAEN, DAVID N COOPER, AND HILDEGARD KEHRER-SAWATZKI. SVA retrotransposon insertion-associated deletion represents a novel mutational mechanism underlying large genomic copy number changes with non-recurrent breakpoints. *Genome biology*, 15(6):R80, 2014.

Identificando los mecanismos implicados en la degeneración microglial presente en la enfermedad de Alzheimer



Juan Antonio García-León,^{a, b, *, §} Francisco Ruíz-Contreras,^{a, *}
Javier Vitorica^{b, c, d} y Antonia Gutiérrez^{a, b, §}

^a Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Málaga, España.

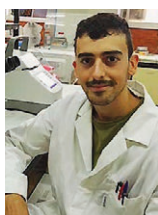
^b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, España.

^c Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

^d Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, CSIC, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

* Ambos autores han contribuido por igual.

§ Autores de correspondencia: jgarleon@uma.es; agutierrez@uma.es



Resumen

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo crónico e irreversible que conduce a graves deficiencias cognitivas, siendo la principal causa de demencia. Actualmente no existe un tratamiento farmacológico efectivo contra la enfermedad, lo que evidencia la necesidad de una mejor comprensión de su patogénesis. En este sentido, estudios recientes han señalado a la microglía como actor principal en dicho proceso. En base a los resultados obtenidos en modelos amiloidogénicos, se le ha otorgado a la activación microglial un papel citotóxico y perjudicial en el desarrollo de la enfermedad, aunque se desconoce en gran medida lo que acontece en pacientes con AD. Es de destacar que nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente una marcada degeneración microglial en el hipocampo de los pacientes en estadios avanzados de AD, a diferencia de lo observado en modelos animales, y previamente asumido para los pacientes. Nuestro objetivo es dilucidar los mecanismos moleculares que conducen a esta degeneración/disfunción microglial en los pacientes con AD. En primer lugar, interrogaremos las vías específicas relacionadas con la microglía y asociadas con la degeneración microglial, mediante la generación de knock-outs de genes específicos, usando el sistema CRISPR-Cas9. En dichos mutantes, valoraremos la funcionalidad de las células mediante ensayos *in vitro* (fagocitosis, respuesta inmune, muerte celular,...). Estas técnicas nos permitirán identificar las principales rutas moleculares implicadas en la degeneración microglial, que se validarán *in vivo* en nuevos modelos animales y muestras *post mortem* de pacientes con AD, y permitirán la identificación de potenciales dianas terapéuticas.

1. Introducción

1.1. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible que conduce a un deterioro de las funciones cognitivas como la memoria, el aprendizaje o la capacidad de expresarse y comunicarse de forma adecuada¹, por lo que los pacientes se vuelven completamente dependientes y falleciendo en promedio 9 años después del diagnóstico.² La AD es considerada la principal causa de demencia en el mundo, afectando actualmente a 35 millones de personas en todo el mundo, y dicho número se espera que aumente a 115 millones para el año 2050, representando un gran impacto a nivel económico y, sobretodo, en la sociedad. El número total de nuevos casos de demencia cada año es de casi 7,7 millones en todo el mundo, lo que implica un nuevo caso cada cuatro segundos.³ Se han descritos varios factores asociados a la enfermedad, destacando entre todos ellos la edad como el principal factor de riesgo.⁴ En torno al 10% de las personas mayores de 60 años padecen AD, incrementándose este porcentaje hasta casi el 50% en las personas mayores de 85 años, incidencia que seguirá en aumento para los próximos años debido al progresivo envejecimiento de la población y de la esperanza de vida.⁵

La AD es considerada una proteinopatía, ya que durante el transcurso de la enfermedad se produce la acumulación de proteínas en conformaciones aberrantes que inducen toxicidad neuronal, distinguiéndose a nivel histológico la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares. Las placas extracelulares presentes en el parénquima cerebral están compuestas predominantemente por péptidos de la proteína beta-amiloide (Ab), derivados de la proteína precursora amiloide (APP). Los ovillos neurofibrilares consisten en depósitos intracelulares de proteína TAU agregada e hiperfosforilada dentro de las neuronas. Las placas de Ab comienzan a desarrollarse durante las fases preclínicas, y la patología TAU surge más tarde y se disemina a diferentes regiones del telencéfalo.^{6,7}

En la actualidad, se distinguen dos tipos de Alzheimer: el Alzheimer esporádico o de inicio tardío y el Alzheimer familiar o de inicio temprano. El Alzheimer esporádico se suele producir en personas mayores de 65 años y es el tipo de Alzheimer más común. Esta variante posee una etiología multifactorial aún desconocida, donde intervienen distintos factores ambientales (edad, niveles de colesterol, tener diabetes u otras comorbilidades, género, traumatismos craneales, estrés...), y además existen una veintena de variantes genéticas que contribuyen al riesgo de padecer la enfermedad⁸. Entre dichas variantes genéticas, la variante APOE4 es la más frecuente y la que aumenta en mayor grado el riesgo de padecer la AD.⁸ Otras variantes están localizadas en el gen *TREM2* (del inglés *triggering receptor expressed by myeloid cells 2*), las cuales aumentan 3-4 veces el riesgo de padecer la AD.⁹ Por otra parte, el Alzheimer familiar se manifiesta en edades más tempranas (normalmente 35-40 años) y afecta al <5% de los casos. Es causada por mutaciones en alguno de estos tres genes: *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, todos ellos implicados en la producción de Ab.¹⁰

La hipótesis de la cascada amiloide confiere un papel predominante a Ab como el iniciador de todos los fenómenos patológicos que conducen a la atrofia cerebral y

la demencia.¹¹ Sin embargo, la progresión de la patología de la AD no se correlaciona directamente con el depósito de Ab, sino más bien con la patología TAU, la cual se correlaciona mucho más estrechamente con la pérdida neuronal y el deterioro cognitivo, tanto espacial como temporalmente, que las placas amiloides.¹² Además, un número importante de compuestos identificados que se dirigen a la cascada de Ab han fracasado en ensayos clínicos¹³, lo que revela una complejidad mayor y aún desconocida de la patología de la AD. Esto imposibilita la existencia de un diagnóstico temprano de la enfermedad, siendo el diagnóstico definitivo *post mortem*, lo cual se combina con la inexistencia de algún tratamiento capaz de ralentizar el curso de la enfermedad.

1.2. Neuroinflamación y microglía

En los últimos años, han emergido un importante número de evidencias que indican que la inflamación tiene un papel clave en la patogénesis de la AD.¹⁴⁻¹⁶ En un principio, se pensaba que la neuroinflamación era sólo un mecanismo pasivo resultado de la acumulación de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, pero ahora se le atribuye a la neuroinflamación un papel primordial en la patogénesis de la AD.¹⁵ En este sentido, la inflamación mediada por las células gliales parece ser el factor clave que orquesta la patogénesis y la progresión de la enfermedad.¹⁷ Entre los distintos integrantes, el actor principal que contribuye a la neuroinflamación es la microglía, que es el componente celular principal del sistema inmune innato en el cerebro, y que comprende el ~10% de las células del sistema nervioso central (SNC).¹⁸

La microglía son fagocitos mononucleares que se origina de progenitores mieloides que migran durante el desarrollo desde el saco vitelino hacia el parénquima cerebral¹⁸, siendo esenciales para mantener la homeostasis del SNC, ya que son los únicos componentes celulares del sistema inmune residentes en el cerebro. Durante el desarrollo del SNC, la microglía contribuye activamente a la formación de redes neuronales maduras eliminando el exceso de neuronas y sinapsis formadas y promoviendo la vascularización de las conexiones establecidas.¹⁹ En condiciones de homeostasis, la microglía vigila el parénquima cerebral y neutraliza posibles daños o eventos patogénicos, los cuales son monitorizados a través de una gran variedad de receptores moleculares que reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).²⁰ Esta inspección del parénquima cerebral es un proceso muy dinámico donde la densidad microglial parece ser estocástica, la cual, sin embargo, sufre un proceso de rápida expansión clonal y activación ante la presencia de una alteración del tejido nervioso.^{21,22} Cuando la microglía es activada por desencadenantes patológicos como pueden ser la muerte neuronal o agregados de proteínas, ésta migra al sitio donde se está produciendo la lesión para iniciar una respuesta inmune innata.

La activación de las células microgliales ocurre desde los estadios iniciales en varias afecciones como la obesidad, la inflamación sistémica, la lesión cerebral aguda, las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento.²³ Tras su activación, la microglía sufre cambios fenotípicos (cuerpo celular más grande con procesos más

cortos y gruesos y menos ramificados) y regulación al alza de citoquinas pro y antiinflamatorias, dependiendo del microambiente donde se encuentre.²⁴ En la AD, la microglía activada se acumula alrededor y fagocita las placas de Ab²⁵, pero también libera citoquinas y quimiocinas proinflamatorias y neurotoxinas¹⁵. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria presente en el cerebro de los pacientes con AD probablemente no sea exclusivamente perjudicial o beneficiosa, lo cual debe depender del estado de la patología y curso de la enfermedad.²⁶

En un intento por conseguir una mejor comprensión de la compleja patología de la AD, Zhang y cols. hallaron a nivel transcriptómico que las vías específicas relacionadas con la inmunidad y la microglía se expresaban predominantemente entre los pacientes con AD de inicio tardío, con el gen *TYROBP* específico de microglía (que codifica para la proteína adaptadora DAP12) como nodo central¹⁷, lo que evidencia el papel clave que la microglía tiene en la patogénesis de la enfermedad. Además, estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado varios polimorfismos implicados en la respuesta inmune microglial asociados al riesgo de padecer AD. La variante más firmemente establecida, R47H, se encuentra en el gen *TREM2*, asociándose a un mayor riesgo de padecer Alzheimer esporádico.⁹ *TREM2* es un receptor lipídico implicado en la regulación de la fagocitosis, la inhibición de la señalización inflamatoria y la promoción de la supervivencia celular.²⁷ Existe una amplia literatura incipiente acerca del papel que desempeña *TREM2* en la AD. Aunque existen muchos resultados contradictorios, en líneas generales se acepta que *TREM2* es esencial para mantener un estado reactivo de la microglía y su interacción con las placas de Ab.²⁸ En ausencia de *TREM2*, la activación microglial se ve afectada, mostrando un fenotipo menos proliferativo y apoptótico, produciendo una reducción de la carga microglial total, además de una menor compactación de las placas de Ab y un mayor daño neurítico.^{29,30} En otro estudio, se observó una disminución de la microgliosis asociada a placa tanto en modelos de ratones *Trem2* knock-out como en portadores humanos de R47H, lo que respalda la hipótesis de que la variante R47H afecta a la función de *TREM2*.³¹ Por lo tanto, una respuesta microglial deficiente en lugar de hiperactiva podría estar asociada con el desarrollo de la AD.³²

En resumen, la visión clásica otorga un papel neurotóxico a la activación microglial, visión que se encuentra basada en la respuesta microglial neurotóxica típica de modelos transgénicos amiloidogénicos, mientras que el escenario real presente en pacientes con AD es menos conocido. En estudios recientes, se ha visto que al igual que una gran activación por parte de la microglía puede crear una respuesta hiperactiva que favorezca la AD, una respuesta microglial deficiente o muy baja podría estar asociada al desarrollo de la enfermedad. El papel de la microglía y de su respuesta ha sido ampliamente estudiado en áreas del cerebro que contienen un contenido en Ab relativamente alto o en modelos animales transgénicos basados en el desarrollo de placas de Ab. Sin embargo, poco se sabe de regiones tan importantes para el desarrollo de la AD como son el hipocampo, estrechamente relacionado con la memoria.

En relación a esto último, nuestro grupo ha descrito recientemente por primera vez una marcada degeneración microglial en el hipocampo de pacientes con AD, en claro contraste por lo descrito en modelos animales y asumido con anterioridad

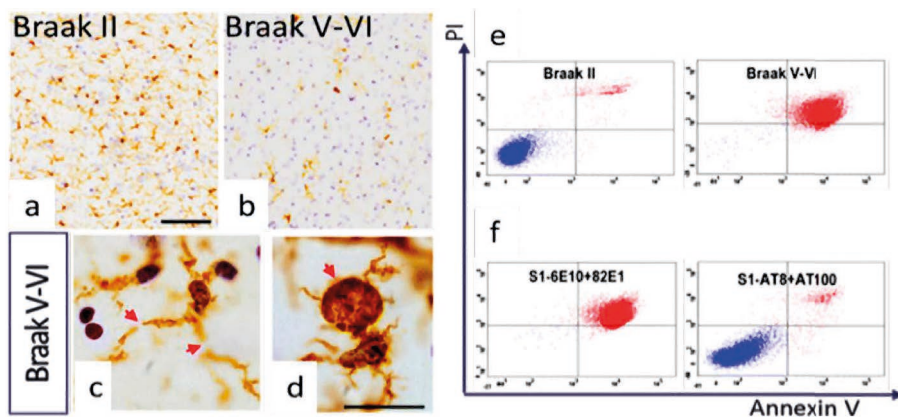


Figura 1. Degeneración microglial presente en los pacientes con AD con patología TAU avanzada (Braak V-VI). Reducción de la densidad numérica de la microglía en el hipocampo de pacientes Braak V-VI (b) vs. Braak II (a). Además, la microglía presente mostró anomalías fenotípicas tal y como fragmentación (c), acortamiento y procesos distróficos (d, flechas), consistentes con un estado degenerativo. La incubación de la microglía *in vitro* con extractos cerebrales de Braak V-VI (o de modelos murinos mutantes de TAU), pero no de Braak II, indujo muerte celular de la microglía (e), proceso que se vio bloqueado cuando se eliminaron del extracto cerebral las formas de p-TAU pero no cuando se eliminó el Ab (f), lo que sugiere que p-TAU es el agente causante de la muerte celular. Adaptado de Mejías et al. 2016³³.

también para los pacientes³³ (Figura 1). Esta degeneración microglial presente en el hipocampo de los pacientes con la AD resulta en una drástica disminución del área del parénquima cerebral vigilada por la microglía, lo que podría comprometer la protección inmunológica y, por tanto, la supervivencia neuronal. Consecuentemente, estas regiones se hacen más vulnerables y susceptibles a depósitos de Ab y formación de placas. Dentro del propio hipocampo hay zonas que se ven más perjudicadas y en las que la degeneración microglial es más severa, como son la región hilar del giro dentado y la región CA3. Experimentos *in vitro* demostraron que la presencia de TAU fosforilado (p-TAU) es el agente tóxico causante de la degeneración microglial, aunque los mecanismos moleculares que conducen a dicha degeneración microglial son desconocidos, lo que limita nuestra comprensión del proceso e impide la identificación de dianas terapéuticas y desarrollo de nuevos tratamientos.

Se ha descrito, además, que durante el envejecimiento, la microglía es susceptible de degeneración debido a la conjunción de dos procesos. Por una parte, ocurre una mayor predominancia de sustancias aberrantes en el parénquima cerebral debido a la formación de agregados proteicos y a la degeneración neuronal, resultando en la presencia de fragmentos mielínicos que son procesados por la microglía y se acumulan en su citoplasma en forma de gránulos lisosomales citotóxicos.³⁴ Por otra parte, además, la función microglial degenera con el envejecimiento, por lo que la conjunción de ambos fenómenos contribuyen a la senescencia microglial y la disfunción inmune en el envejecimiento.³⁴

2. Hipótesis y Objetivos

Nuestra hipótesis de partida, basada en resultados previos de nuestro grupo de investigación, es que la microglía ejerce un papel clave en la patogénesis de la AD. La degeneración microglial observada en el hipocampo de los pacientes con AD nos hace presuponer que dicha disfunción de la microglía contribuye directamente a la progresión de la enfermedad, y que la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes sería de suma importancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

El objetivo principal de este trabajo, enmarcado en la línea de investigación del grupo, es dilucidar los mecanismos moleculares que conducen a la degeneración microglial presente en los pacientes con AD usando modelos celulares microgliales, lo cual conducirá a la identificación de dianas terapéuticas susceptibles de ser moduladas.

3. Metodología

En base a los objetivos planteados, es necesario emplear modelos que permitan modificar las vías moleculares candidatas de manera rápida y eficiente. Por ello, es necesario el uso de modelos celulares microgliales que permitan un estudio *in vitro* de los principales mecanismos moleculares implicados en el proceso degenerativo de estas células. El empleo de distintos análisis biológicos posteriores permitirá comprobar si dichos genes están implicados o relacionados con el proceso de degeneración microglial.

3.1. Modelos celulares: líneas celulares (BV2) vs. microglía primaria

La microglía primaria es aquella aislada a partir del cerebro. Ante la casi imposibilidad de ser aisladas de cerebro humano, la microglía de origen murino es la que se emplea mayoritariamente para investigación. A pesar de su extendido uso, la experimentación con microglía primaria posee una serie de limitaciones como son la necesidad de sacrificar un número considerable de animales, un bajo rendimiento en el número de células microgliales obtenidas, es necesario cultivar las células durante largos periodos de tiempo (>20 días) para poder aislar la microglía y la limitada capacidad de expansión y mantenimiento en cultivo. Ante estos inconvenientes, el empleo de líneas microgliales, como las células BV2, representa una alternativa viable. Esta línea posee la inexorable ventaja de un rápido y prácticamente inagotable crecimiento celular (lo que permite el uso de técnicas de edición génica, tal y como se explica más abajo), a la vez que mantiene características propias microgliales tales como la capacidad de fagocitosis y la respuesta inmune frente a estímulos patógenos³⁵.

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares que conducen a la degeneración microglial presente en los pacientes con AD, hemos identificado una serie de genes/vías de señalización potencialmente implicadas. Nos centraremos en los genes que intervienen en la activación de la microglía: *Cd68*, *Cx3cr1*, *Itgam*

(CD11b), *Itgb2* (CD18), *Pu.1*, *P2ry12*, *Siglec-H*, *Gpr56*, *Tmem119*, *Tal1*, *Ifi16*, *Ait1* (IBA1), *Zfp36*; así como aquellos genes que codifican para receptores o vías implicadas en la AD: *Trem2*, *Tyrobp* (DAP12), *Siglec3* (CD33), *Cr1* y *Abca7*.³⁶ Para ello, las BV2 se cultivarán con los distintos extractos cerebrales y los cambios en la expresión de dichos genes se evaluarán mediante qPCR durante las primeras 24 horas, lo que nos proporcionará una idea acerca de los genes implicados en este proceso. Para confirmar el efecto de esos genes, generaremos *knock-outs* (KO) específicos para los genes más prometedores, usando para ello el sistema de CRISPR-Cas9:

3.2. CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR-Cas9 (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, que se traduce como *Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y regularmente interespaciadas*, y *CRISPR-associated protein 9*) es una herramienta molecular generada con la finalidad de poder modificar el genoma de las células eucariotas, optimizada en las últimas versiones para células de mamíferos en particular.^{37,38}

El sistema CRISPR fue descubierto a raíz del descubrimiento de que algunas bacterias eran capaces de utilizar este sistema como mecanismo de defensa contra la infección por bacteriófagos. Estas bacterias son capaces de distinguir entre el material genético propio y el extraño, de forma que dicho ADN exógeno es reconocido por el sistema CRISPR, el cual lo corta en fragmentos que inducen a la degradación de dicho material genético, actuando este sistema como una especie de sistema inmune innato bacteriano.³⁹ Además, las proteínas Cas tienen la capacidad de tomar una pequeña parte del ADN viral, modificarlo e integrarlo dentro del conjunto de secuencias CRISPR.

Las bases moleculares tardaron en conocerse unos años hasta que comenzaron a mapearse los genomas de bacterias con este sistema, lo cual permitió localizar una zona concreta del genoma de muchos microorganismos que estaba repleta de repeticiones palindrómicas. Esas repeticiones no parecían tener ninguna función aparente, además se vio que estaban separadas entre sí por unas secuencias a las que se les denominó “espaciador”. Justo por delante de las repeticiones palindrómicas y los espaciadores se describió una secuencia llamada líder.³⁹ A estas secuencias que acabamos de describir del genoma de algunos microorganismos son las que se dieron a conocer como CRISPR.⁴⁰ No mucho más lejos de las CRISPR se localizaron también un agrupamiento de genes que codifican para un tipo de nucleasas, son los genes Cas.

En 2012 se esclareció el mecanismo básico de CRISPR-Cas9 derivado de *Streptococcus pyogenes*.^{37,38,41} CRISPR-Cas9 es un sistema de endonucleasa de ADN guiada por ARN en el que la endonucleasa Cas9 forma un complejo con dos especies de ARN de origen natural, el ARN CRISPR (ARNcr) y el ARN CRISPR transactivador (ARNtracr). Este complejo se dirige a secuencias de ADN específicas complementarias a la secuencia de 20nt (nucleótidos) que reside en el extremo 5' del ARNcr.³⁷ De manera conveniente, el ARNcr y el ARNtracr se pueden unir mediante una secuencia de bucle-tallo (del inglés: *stem loop*) arbitraria para generar

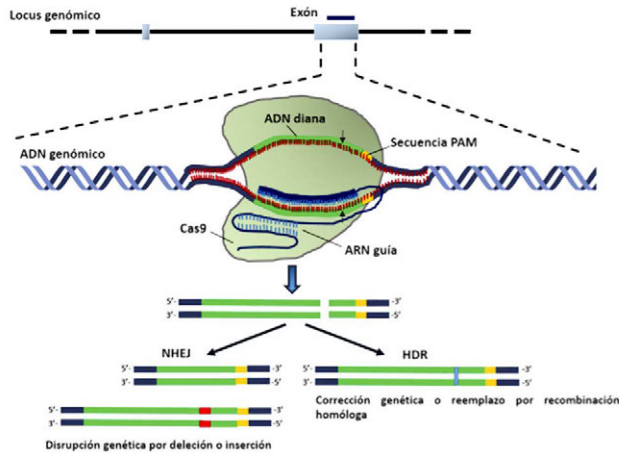


Figura 2. Sistema CRISPR-Cas9 y su uso en edición génica.

un ARN guía sintético de cadena simple (ARNg). Aunque se trata de un mecanismo inmunológico bacteriano, se consiguió la adaptación de dicho sistema para su uso como herramienta molecular para la edición génica en células de mamífero.⁴²

Este sistema permite ser personalizado, modificando una secuencia de 20 nt localizada en la región 5' en el ARNg para que sea complementaria a la secuencia genómica objetivo, permitiendo que el complejo Cas9-ARNg se pueda dirigir al locus genómico específico y produciendo la ruptura del ADN bicatenario.⁴³ Esta fragmentación del ADN puede repararse a través de dos mecanismos: reparación de unión no homóloga (NHEJ) o la vía de reparación dirigida por homología (HDR). La reparación NHEJ a menudo conduce a pequeñas inserciones o delecciones (*indels*) en el sitio objetivo, mientras que la vía HDR conduce a una reparación perfecta o una modificación genética precisa. La reparación a través de NHEJ produce en alta frecuencia cambios en el marco abierto de lectura, dando lugar a mutaciones nulas sin expresión proteica. Por otra parte, el sistema de reparación HDR permite introducir secuencias en el genoma de distinta índole (por ejemplo sistemas de selección celular mediados por resistencia a antibióticos), siempre y cuando la secuencia "molde" posea una región con alta homología al ADN celular.⁴⁴ Otra gran ventaja del sistema CRISPR es la facilidad de la multiplexación, donde múltiples genes pueden mutarse simultáneamente simplemente mediante el uso de múltiples ARNg cada uno dirigido a un gen diferente. Además, cuando se utilizan dos ARNg flanqueando una región genómica, la región intermedia puede eliminarse o invertirse.^{37,45}

En nuestro sistema experimental, vamos a emplear el sistema CRISPR-Cas9 para modificar genéticamente las células BV2, generando "knock-outs" (KO) específicos para los genes más prometedores implicados en la degeneración microglial, tras y como se describió más arriba. Concretamente, para ello se empleará un par de complejos CRISPR-Cas9, dirigidos contra distintos exones del mismo gen, con el objetivo de que una vez que ambos complejos actúen y corten el genoma, se

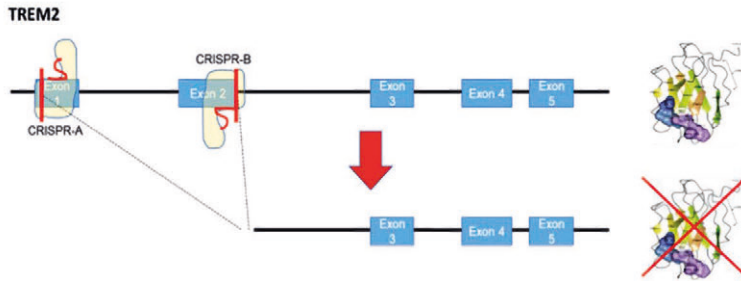


Figura 3. Ejemplificación para el gen Trem2 de la delección causada usando dos complejos CRISPR-Cas9, dando como resultado la delección de los exones 1 y 2 y la no expresión proteica.

produzca una reparación génica de forma que la secuencia flanqueada se escinda o se invierta, dando lugar a una considerable delección del gen en cuestión, evitando la expresión proteica y, por tanto, su funcionalidad.^{37,45}

Para la introducción de ambos complejos CRISPR-Cas9 en las células, se usará un constructo derivado del plásmido pSpCas9-Puro Px459⁴², en el cual hemos introducido ambos RNAs, cuya expresión se induce por sendos promotores U6, optimizados para la expresión de dichas secuencias en mamíferos:

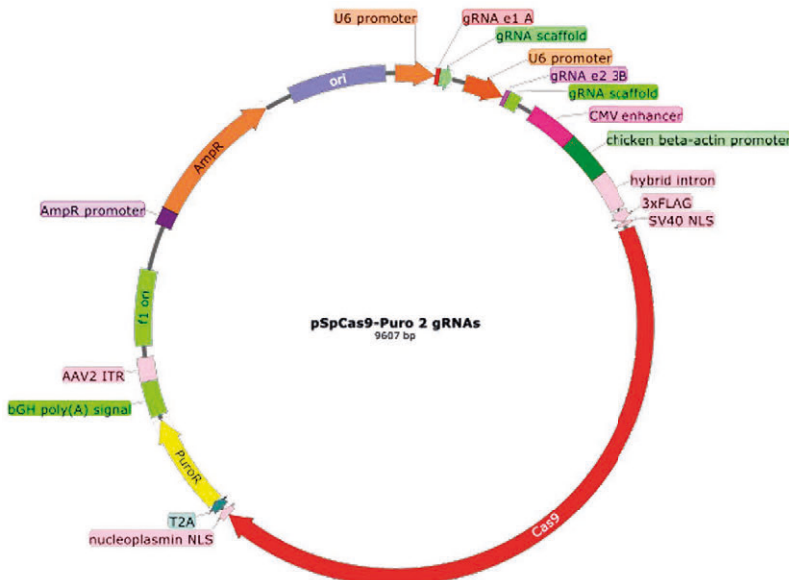


Figura 4. Esquema del plásmido usado para la transfección de las células BV2, portando dos RNAs dirigidos contra regiones diferentes del gen en cuestión, con la intención de deleccionar una importante región del mismo

Una vez realizada la clonación de los RNAs específicos diseñados para un gen concreto, las células BV2 se transfectarán (con lipofectamine 3000) con dicho plásmido, se seleccionarán durante 2-3 días en presencia de 50 µg/mL de puro-micina y se generarán cultivos clonales mediante la siembra de las células a muy baja concentración (8 células/cm²). Se seleccionarán 10-20 colonias por cada gen delecionado, en las cuales se determinará la presencia de la deleción requerida mediante PCR. En los clones seleccionados para los KOs de cada gen, se realizarán ensayos funcionales (fagocitosis y capacidad inmunogénica) para dilucidar cuáles de los genes modificados están implicados en la degeneración microglial.

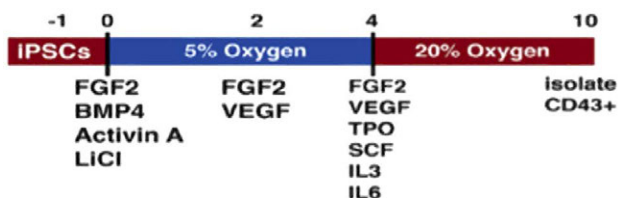
3.3. Células microgliales derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)

Los resultados obtenidos usando como modelo las células BV2 serán validados en células microgliales derivadas de iPSCs, las cuales representan un modelo mucho más fidedigno de la microglía endógena, son de origen humano, y se pueden derivar de pacientes con AD portadores de ciertas mutaciones que contribuyen al riesgo de padecer AD.

Adquiriremos células iPSCs ya derivadas y caracterizadas de individuos controles (sin afectación neurológica), de pacientes con AD esporádicos y familiares, así como de pacientes con deterioro cognitivo leve (3-4 líneas celulares por grupo), de los repositorios UCIMiND (USA), NINDS (USA) y EBiSC (UK). Estas iPSCs ya derivadas y caracterizadas nos permitirá ahorrar el tiempo y dinero que supondría su generación.

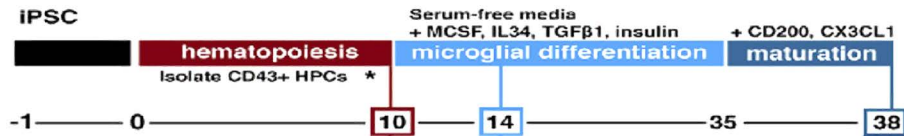
En el último año se han descrito varios protocolos para la generación de células microgliales a partir de iPSCs humanas.⁴⁶⁻⁴⁹ Nos basaremos en el protocolo del Prof. Blurton-Jones⁴⁸, ya que cuenta con las siguientes ventajas: 1) Diferenciación en medio definido sin co-cultivo (minimiza variabilidad), 2) Protocolo corto (40 días) y eficiente (x40 microglía pura a partir n° iPSCs inicial), 3) Microglía funcional para el modelaje de AD (microglía expresa genes asociados a EA, fagocita sinaptosomas y genera respuesta inmunológica).

Las iPSCs, una vez expandidas y establecidas se diferenciarán a microglía. Para ello primero se diferenciarán hacia precursores hematopoyéticos durante 10 días en las siguientes condiciones:



Tras este tiempo, se purificarán mediante FACS-sorting los precursores hematopoyéticos CD43⁺, comprobando la expresión de otros marcadores hematopoyéticos (CD235a y CD41). Si la pureza es <80%, se procederá a la optimización de esta pri-

mera etapa incluyendo o no ciertas citoquinas a distintos tiempos. Posteriormente, estos precursores CD43⁺ se inducirán hacia microglía en presencia de MCSF, IL-34, TGFβ1 e insulina durante 25-30 días:



Cada 5 días, el grado de conversión a microglía se determinará por la expresión de CD45, CD11b y P2ry12. Una vez ~100% pura, las células se madurarán en presencia de CD200 y CX3CL1 y se determinará la expresión de marcadores microgliales específicos: P2RY12, GPR34, C1Q, CABLES1, BHLHE41, TREM2, ITAM, PROS1, APOE, SLCO2B1, SLC7A8, PPARD y CRYBB1 mediante QPCR, comparando con precursores hematopoyéticos, monocitos y microglía murina. Una vez optimizado el protocolo con 2-3 líneas, generaremos microglía de los distintos sujetos y se criopreservarán o se usarán directamente para los ensayos funcionales.

Todos los procedimientos se ajustan a los principios éticos de investigación siguiendo las Directivas Nacionales y Europeas 2010/63/UE de experimentación.

4. Resultados esperados y expectativas futuras

La enfermedad de Alzheimer supone un gran problema a nivel sanitario y social, el cual no hace más que agravarse debido al progresivo envejecimiento de nuestra sociedad. A pesar de que se ha avanzado en las últimas décadas en la comprensión de la patología de la enfermedad, todas las aproximaciones terapéuticas propuestas han fracasado en ensayos clínicos, lo que evidencia la falta de comprensión de la patología de la enfermedad y la poca correlación existente entre los modelos de AD y los pacientes.

En los últimos años han emergido un gran número de evidencias científicas que postulan a la neuroinflamación como un componente primordial en la patología de la enfermedad. Entre los distintos actores que intervienen, la microglía destaca entre todos ellos por ser el único componente celular del sistema inmune presente en el cerebro y por expresar ciertos receptores asociados al riesgo de padecer AD. Aunque la activación microglial es un evento presente en algunos modelos murinos de la enfermedad, el estado de la microglía en los pacientes es un hecho bastante más desconocido.

En relación a esto último, nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente la presencia de una marcada degeneración microglial en el hipocampo de pacientes con AD, lo cual no se había descrito con anterioridad. Aunque la presencia de TAU fosforilado parece ser el agente causante de esta disfuncionalidad, se desconocen totalmente los mecanismos implicados conducentes a esta degeneración

microglial. Postulamos que la dilucidación de dichos mecanismos dará lugar no sólo a un nuevo escenario con una mejor comprensión de la patología de la enfermedad, sino a la identificación de nuevas dianas terapéuticas. En este sentido, nuestra aproximación experimental aportará datos preliminares acerca de posibles aproximaciones terapéuticas y, además, establecerá nuevos y más fidedignos modelos de la enfermedad, representando un avance bastante notable en la comprensión de la enfermedad y contribuyendo a la generación de nuevas terapias capaces de contrarrestar el progreso de la enfermedad.

Financiación

Este trabajo se encuentra financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (ISCiii) de España, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Unión Europea, a través de los proyectos FIS PI15/00796 (IP: AG) y FIS PI15/00957 (IP: JV); por el Proyecto de Excelencia de la Consejería de Innovación de la Junta de Andalucía P12-CTS-2035 (IP: JV) y por el Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) (AG). JAGL disfruta de un contrato de incorporación de doctores del I Plan Propio de la Universidad de Málaga.

Referencias

1. REITZ C, MAYEUX R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*. 2014 Apr;88(4):640–51.
2. MEDEIROS R, LA FERLA FM. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* 2013;239(1):133–8.
3. WORTMANN M. Dementia: a global health priority – highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther*. 2012;4(5):40.
4. BARNES LL, BENNETT DA. Alzheimer's Disease In African Americans: Risk Factors And Challenges For The Future. *Health Aff*. 2014 Apr;33(4):580–6.
5. SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETELER MMB, DE STROOPER B, FRISONI GB, SALLOWAY S, et al. Alzheimer's disease. 2016 Jul;388(10043): 505–17.
6. JACK CR, HOLTZMAN DM. Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2013 Dec 18;80(6):1347–58.
7. POLANCO JC, LI C, BODEA L-G, MARTINEZ-MARMOL R, MEUNIER FA, GÖTZ J. Amyloid- β and tau complexity — towards improved biomarkers and targeted therapies. *Nat Rev Neurol*; 2017.
8. ROSENTHAL SL, KAMBOH MI. Late-Onset Alzheimer's Disease Genes and the Potentially Implicated Pathways. *Curr Genet Med Rep*. 2014 Jun;2(2):85–101.
9. GUERREIRO R, WOJTAS A, BRAS J, CARRASQUILLO M, ROGAEVA E, MAJOUNIE E, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013 Jan 10;368(2):117–27.
10. WU L, ROSA-NETO P, HSIUNG G-YR, SADOV-NICK AD, MASELLIS M, BLACK SE, et al. Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci*. 2012 Jul;39(4):436–45.
11. ANDREW RJ, KELLETT KAB, THINAKARAN G, HOOPER NM. A Greek tragedy: The grow-

- ing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis. *J Biol Chem.* 2016;291(37):19235–44.
12. SERRANO-POZO A, FROSCH MP, MASLIAH E, HYMAN BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 Sep 1;1(1):a006189.
 13. REIMAN EM, LANGBAUM JBS, FLEISHER AS, CASELLI RJ, CHEN K, AYUTYANONT N, et al. Alzheimer's Prevention Initiative: a plan to accelerate the evaluation of presymptomatic treatments. *J Alzheimers Dis.* 2011;26 Suppl 3:321–9.
 14. ZHANG F, JIANG L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* Dove Press; 2015 Jan;11:243.
 15. HENEKA MT, CARSON MJ, KHOURY J EL, LANDRETH GE, BROSSERON F, FEINSTEIN DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015;14(4):388–405.
 16. MCGEER PL, MCGEER EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995 Sep;21(2):195–218.
 17. ZHANG B, GAITERI C, BODEA L-G, WANG Z, MCELWEE J, PODTELEZHNIKOV AA, et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell.* 2013 Apr 25;153(3):707–20.
 18. SCHAFER DP, STEVENS B. Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015 Oct;7(10):a020545.
 19. KETTENMANN H, KIRCHHOFF F, VERKHRATSKY A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron.* 2013;77(1):10–8.
 20. DOENS D, FERNÁNDEZ PL. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation.* 2014 Mar;11(1):48.
 21. GOSSSELIN D, SKOLA D, COUFAL NG, HOLTMAN IR, SCHLACHETZKI JCM, SAJTI E, et al. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science (80-).* 2017;356(6344):eaal3222.
 22. TAY TL, MAI D, DAUTZENBERG J, FERNÁNDEZ-KLETT F, LIN G, SAGAR, et al. A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat Neurosci.* 2017;20(6):793–803.
 23. TEJERA D. Microglia in Alzheimer's Disease: The Good, the Bad and the Ugly Microglia in Alzheimer's Disease: The Good, the Bad and the Ugly. 2016;(June).
 24. LAVIN Y, WINTER D, BLECHER-GONEN R, DAVID E, KEREN-SHAUL H, MERAD M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell.* 2014 Dec 4;159(6):1312–26.
 25. SERRANO-POZO A, BETENSKY RA, FROSCH MP, HYMAN BT. Plaque-Associated Local Toxicity Increases over the Clinical Course of Alzheimer Disease. *Am J Pathol.* 2016 Feb;186(2):375–84.
 26. JIMENEZ S, BAGLIETTO-VARGAS D, CABALLERO C, MORENO-GONZALEZ I, TORRES M, SANCHEZ-VARO R, et al. Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.* 2008 Nov 5;28(45):11650–61.
 27. COLONNA M. TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol [Internet].* 2003 Jun;3(6):445–53.
 28. WANG Y, CELLA M, MALLINSON K, ULRICH JD, YOUNG KL, ROBINETTE ML, et al. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell.* 2015;160(6):1061–71.
 29. JAY TR, HIRSCH AM, BROIHIER ML, MILLER CM, NEILSON LE, RANSOHOFF RM, et al. Disease Progression-Dependent Effects of TREM2 Deficiency in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2017;37(3):637–47.
 30. WANG Y, ULLAND TK, ULRICH JD, SONG W, TZAFERIS JA, HOLE JT, et al. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med.* 2016 May 2;213(5):667–75.
 31. YUAN P, CONDELLO C, KEENE D, COLONNA M, BADDELEY D, GRUTZENDLER CORRESPONDENCE J, et al. TREM2 Haplodeficiency in

- Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. 2016;
32. STREIT WJ, BRAAK H, QING-SHAN A, AE X, BECHMANN I. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. 2009;
 33. SANCHEZ-MEJIAS E, NAVARRO V, JIMENEZ S, SANCHEZ-MICO M, SANCHEZ-VARO R, NUÑEZ-DIAZ C, et al. Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol.*; 2016;132(6):897–916.
 34. SAFAIYAN S, KANNAIYAN N, SNAIDERO N, BRIOSCHI S, BIBER K, YONA S, et al. Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat Neurosci.* 2016;19(8):995–8.
 35. HENN A, LUND S, HEDTJÄRN M, SCHRATTENHOLZ A, PÖRZGEN P, LEIST M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX.* 2009;26(2):83–94.
 36. VILLEGAS-LLERENA C, PHILLIPS A, REITBOECK PG, HARDY J, POCOCK JM. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* Elsevier Ltd; 2016;36:74–81.
 37. MA Y, ZHANG L, HUANG X. Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J.* 2014 Dec;281(23):5186–93.
 38. WILES M V., QIN W, CHENG AW, WANG H. CRISPR–Cas9-mediated genome editing and guide RNA design. *Mamm Genome.* 2015 Oct;26(9–10):501–10.
 39. HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science (80-).* 2010 Jan;327(5962):167–70.
 40. MOJICA FJM, DíEZ-VILLASEOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, SORIA E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol.* 2005 Feb;60(2):174–82.
 41. FINERAN PC, CHARPENTIER E. Memory of viral infections by CRISPR–Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology.* 2012 Dec;434(2):202–9.
 42. RAN FA, HSU PD, WRIGHT J, AGARWALA V, SCOTT DA, ZHANG F. Genome engineering using the CRISPR–Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–308.
 43. CONG L, RAN FA, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (80-).* 2013;339(6121):819–23.
 44. DOUDNA JA, CHARPENTIER E. The new frontier of genome engineering with CRISPR–Cas9. *Science (80-).* 2014 Nov;346(6213):1258096–1258096.
 45. ZHENG Q, CAI X, TAN MH, SCHAFFERT S, ARNOLD CP, GONG X, et al. Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells. *Biotechniques.* 2014 Sep;57(3):115–24.
 46. MUFFAT J, LI Y, YUAN B, MITALIPOVA M, OMER A, CORCORAN S, et al. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Med.* 2016;22(11):1358–67.
 47. PANDYA H, SHEN MJ, ICHIKAWA DM, SEDLOCK AB, CHOI Y, JOHNSON KR, et al. Differentiation of human and murine induced pluripotent stem cells to microglia-like cells. *Nat Neurosci.* 2017;20(5):753–9.
 48. ABUD EM, RAMIREZ RN, MARTINEZ ES, HEALY LM, NGUYEN CHH, NEWMAN SA, et al. iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron.*; 2017;94(2):278–293.e9.
 49. DOUVARAS P, SUN B, WANG M, KRUGLIKOV I, LALLOS G, ZIMMER M, et al. Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Microglia. *Stem Cell Reports...*; 2017;8(6):1516–24.

Toxicidad de las placas amiloides y su impacto en la progresión de la enfermedad de Alzheimer



Cristina Núñez-Díaz,^{a, b} Javier Vitorica,^{b, c, d} Antonia Gutiérrez^{a, b}

^a Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga. Málaga, España.

^b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, España.

^c Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

^d Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, CSIC, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

Resumen

La formación de depósitos extracelulares de beta-amiloide [A β] y la activación glial constituyen dos de los principales eventos patológicos en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer [AD]. A β se considera el agente causal de la enfermedad, ya que la acumulación de esta proteína comienza muchos años antes de que aparezcan los primeros síntomas. Los monómeros de A β se agregan, dando lugar a formas oligoméricas solubles, oligómeros prefibrilares y fibrilares, que finalmente dan lugar a las placas amiloides o seniles. El péptido A β se propaga entre regiones cerebrales conectadas sinápticamente durante la progresión de la patología, y desencadena la cascada de alteraciones características de la enfermedad: placas seniles, ovillos neurofibrilares, activación glial, pérdida sináptica y muerte neuronal. Aunque las placas de A β no correlacionan bien con el deterioro cognitivo de los pacientes, sí existe una alta correlación entre los niveles de oligómeros solubles y el grado de demencia. La acumulación del péptido A β atrae a las células microgliales y astrogliales, que se activan en torno a las placas, aunque la función de estas células activadas aún está por determinar. La hipótesis de este trabajo propone que las placas de A β podrían actuar como reservorio de oligómeros solubles de A β y que la glía reactiva que rodea a las placas regularía la toxicidad de éstas, favoreciendo la captación de oligómeros tóxicos hacia las placas, su compactación y su aislamiento del resto del parénquima cerebral. Una respuesta deficiente de la glía reactiva, podría llevar a una liberación de oligómeros tóxicos desde las placas, causando daño sináptico y muerte neuronal, contribuyendo por tanto a la progresión de la patología. La modulación de las propiedades tóxicas de las placas amiloides podría ser una estrategia terapéutica novedosa para modificar el curso de la enfermedad de Alzheimer.

1. Introducción

1.1. El péptido beta-amiloide y la enfermedad de Alzheimer

El péptido beta-amiloide (Abeta o A β) ha sido el punto focal central de la investigación de la enfermedad de Alzheimer (AD) en las últimas décadas y se considera el factor causal de esta enfermedad. Aunque muchos han sido los descubrimientos importantes acerca del mecanismo de producción de Abeta y sus efectos tóxicos, muchas preguntas y mecanismos críticos relacionados con la formación de las diferentes especies oligoméricas y fibrilares de Abeta, el origen de estas formas tóxicas y los medios por los cuales se propaga dentro del cerebro siguen siendo desconocidos. La AD es una enfermedad neurodegenerativa, hasta la fecha actual incurable, que cursa con un deterioro progresivo de la memoria y representa la causa más común de demencia entre las personas mayores de 65 años. En España existen actualmente unos 800.000 afectados, unos 6 millones en Europa y unos 46 millones a nivel mundial, y se prevé que estas cifras aumenten dramáticamente en los próximos años debido al incremento progresivo de la población de edad avanzada. Los esfuerzos para desarrollar una terapia que modifique el curso de la enfermedad no han tenido éxito aún y los escasos fármacos disponibles sólo afectan marginalmente a los síntomas cognitivos y conductuales. Por lo tanto, esta enfermedad es claramente uno de los problemas médicos y socioeconómicos más graves a los que se enfrenta nuestra sociedad, siendo urgente el desarrollo de terapias exitosas capaces de contrarrestar la progresión de las lesiones patológicas y el daño neuronal.¹ La ausencia de terapias efectivas se debe, principalmente, al desconocimiento de los mecanismos patogénicos subyacentes a la enfermedad, a la falta de buenas dianas terapéuticas y a la ausencia de buenos modelos animales que recapitulen la patología humana.

A nivel histopatológico, el cerebro de los pacientes de Alzheimer presenta: i) acumulación de proteínas agregadas en forma de depósitos extracelulares (placas seniles) de péptido Abeta, y de ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFTs, del inglés Neurofibrillary Tangles) compuestos por la proteína tau hiperfosforilada (fosfo-tau), ii) activación glial (microglía y astrogía), y iii) pérdida de sinapsis y muerte neuronal selectiva en regiones cerebrales superiores, responsables de los procesos de memoria y aprendizaje.²⁻⁴ El proceso patogénico en la AD comienza muchos años antes de que aparezcan los síntomas, de hecho la acumulación de péptido Abeta en forma de placas amiloides se puede iniciar hasta treinta años antes de la aparición de los síntomas generando cambios estructurales y funcionales en el cerebro de personas que se encuentran en la fase preclínica de la enfermedad.^{5,6} Una vez que se inicia el proceso de la enfermedad, las dos lesiones cerebrales típicas (placas seniles y ovillos neurofibrilares) se propagan sistemáticamente⁷⁻⁹ a través del cerebro y conducen a una neurodegeneración grave que afecta la integridad y funcionalidad de múltiples sistemas cerebrales que causan demencia y finalmente la muerte. Un tratamiento eficaz contra el Alzheimer debería frenar la producción, agregación y/o propagación de las especies tóxicas de Abeta y de tau para evitar la pérdida sináptica y la muerte neuronal progresiva que caracteriza a esta devastadora enfermedad.

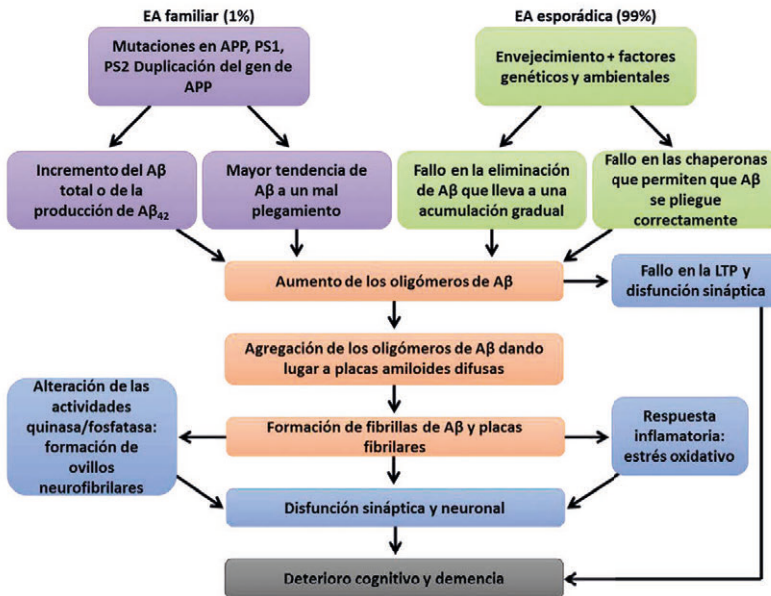


Figura 1. Hipótesis de la cascada amiloide. Es el modelo más influyente de las últimas décadas en la investigación sobre la enfermedad del Alzheimer. Plantea la idea de una cascada patogénica iniciada por la excesiva acumulación y/o escasa eliminación en el cerebro de péptidos de Abeta, tanto en los casos familiares como en los esporádicos. La acumulación cerebral de Abeta llevaría a la formación de las placas seniles, la formación de los ovillos neurofibrilares y una respuesta neuroinflamatoria que finalmente desencadenarían el daño neuronal y la aparición de los síntomas.

Aunque se desconoce la causa de la enfermedad, la hipótesis más aceptada actualmente es la hipótesis de la cascada amiloide (Figura 1), que defiende que el evento inicial que desencadena la AD es la acumulación y agregación de Abeta, ya sea por una sobreproducción de dicho péptido debida a mutaciones en los genes implicados en el procesamiento del mismo (APP, PS1 y PS2) y/o por un fallo en los mecanismos de eliminación del péptido. Como consecuencia de la acumulación de Abeta, se desencadenarían el resto de alteraciones propias de la enfermedad, como son la formación de las placas seniles y los NFTs, la neuroinflamación mediada por la activación de las células microgliales y astrogiales, la pérdida sináptica y la muerte neuronal.¹⁰⁻¹²

La agregación del Abeta es un proceso poco conocido, aunque una de las hipótesis más aceptadas defiende que se podría agregar y propagar de forma parecida a los priones.¹³⁻¹⁵ Según esta hipótesis, se produciría un mal plegamiento de la proteína, la cual tiende a autoagregarse formando *semillas* (del inglés *seeds*), que tendrían la capacidad de actuar como agente infeccioso, convirtiendo a proteínas con conformación nativa en proteínas con una conformación alternativa o mal plegada (Figura 2).^{16,17} De este modo, el péptido Abeta iría acumulándose, agregándose y propagándose a distintas regiones cerebrales durante la progresión de la patología mediante

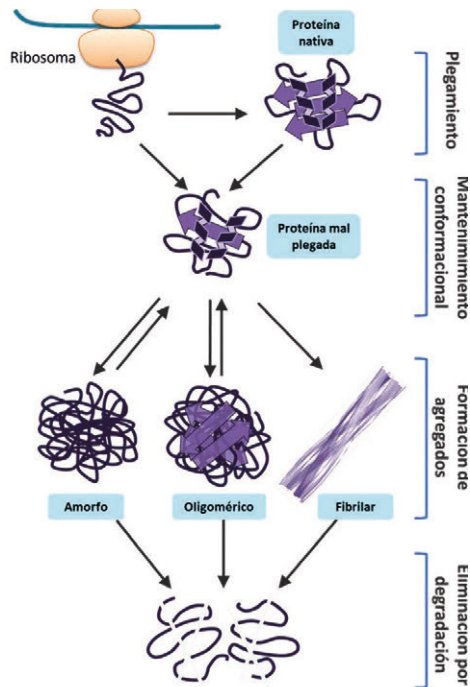


Figura 2. Plegamiento proteico y formación de agregados. Una vez sintetizadas, las proteínas pueden adquirir una amplia variedad de conformaciones, y en muchas ocasiones la conformación nativa es solo marginalmente estable bajo condiciones fisiológicas. El proceso de plegamiento es propenso a cometer errores que dan lugar a proteínas mal plegadas y agregados. Con el envejecimiento, se rompe la homeostasis proteica (proteostasis), los mecanismos de plegamiento y de degradación proteica empiezan a fallar, y empiezan a acumularse cada vez más proteínas mal plegadas, que tienen mayor capacidad de agregación. Los agregados que se forman pueden ser amorfos o bien tener estructura de lámina beta, siendo éstos los que dan lugar a los oligómeros y a los agregados fibrilares.

este fenómeno, denominado *siembra* (del inglés *seeding*).¹⁸ Apoyando esta teoría, diversos experimentos han demostrado que la inyección de las fracciones solubles procedentes de cerebros de pacientes de AD en el cerebro de ratones transgénicos amiloidogénicos produce un incremento de la agregación de Abeta y una aceleración de la patología amiloide.¹⁹⁻²²

En el cerebro de pacientes, así como de modelos transgénicos, la agregación de Abeta da lugar a diversas formas oligoméricas (dímeros, trímeros, tetrameros, hexámeros y otros complejos mayores 15-20 monómeros), denominados ADDLs (ligandos difusibles derivados del Abeta), oligómeros prefibrilares y fibrilares.²³⁻²⁸ Las conformaciones fibrilares más insolubles tienden a agregarse formando los depósitos extracelulares (placas) en el parénquima cerebral, y los depósitos amiloides vasculares. Sin embargo, las formas solubles de Abeta tienen un mayor efecto neurotóxico y actualmente se consideran los agentes causales de la disfunción sináptica y cognitiva en las fases tempranas de la enfermedad.²⁹⁻³¹ De hecho, la gravedad del

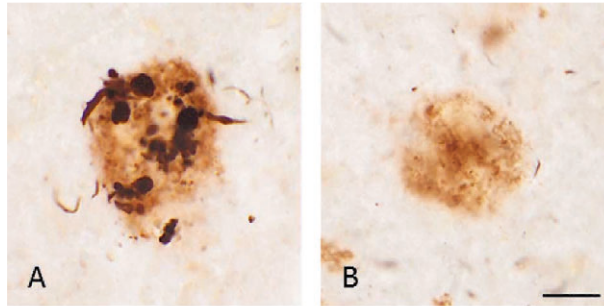


Figura 3. Subtipos más comunes de placas amiloides. Se muestra una placa amiloide de tipo neurítico (A) y otra de tipo difuso (B). En A, la placa amiloide (marrón claro) está rodeada por neuritas distróficas (negro), mientras que en B, la placa amiloide (marrón claro) carece de distrofias. Inmuntinción doble a microscopía de campo claro con anticuerpos para Abeta y APP (marcador de distrofias) en la corteza frontal de pacientes con AD en estadio Braak V-VI. Barra de escala: 20 μ m.

defecto cognitivo en la enfermedad de Alzheimer se correlaciona con los niveles de oligómeros solubles cerebrales y no con la carga total de Abeta.³²⁻³⁵ Tanto en pacientes como en modelos, la carga amiloide así como las formas oligoméricas solubles continúan incrementado con la progresión de la patología, sin embargo la relación entre las placas y estas formas solubles no es conocida. Numerosas investigaciones están dirigidas a identificar qué formas oligoméricas son las más deletéreas y los mecanismos moleculares implicados en el daño neuronal. Asimismo, se está probando experimentalmente la eficacia terapéutica de inmunoterapias para estas formas oligoméricas con escaso éxito hasta la fecha.³⁶⁻³⁸ Sin embargo, no se conoce cuáles son los mecanismos que llevan a la formación y acumulación progresiva de estas especies tóxicas de Abeta en el cerebro, ni si las placas son una fuente de estos oligómeros, ni el papel que las células gliales (microglía y astrogía), aparte de un proceso inflamatorio, puedan tener en la formación/compactación/degradación de placas.

1.2. Placas amiloides y neuroinflamación

La acumulación extracelular de péptidos Abeta da lugar a las denominadas placas amiloides, características de los pacientes de Alzheimer. De los muchos nombres descriptivos para clasificar a las placas amiloides, los dos subtipos más ampliamente utilizados son las placas neuríticas y las placas difusas (**Figura 3**):

- **Placas neuríticas:** están formadas principalmente por $A\beta_{42}$ (isoforma de 42 aminoácidos), aunque también presentan $A\beta_{40}$ (isoforma de 40 aminoácidos).³⁹ Son depósitos de Abeta fibrilar que presentan a su alrededor neuritas distróficas, que son prolongaciones neuronales (axones/presinapsis) engrosadas debido a la acumulación de vesículas por fallo en el transporte axonal. Además, la microglía y la astrogía activada se encuentran íntimamente asociadas a

este tipo de placas.^{40,41} Las placas neuríticas pueden subdividirse en placas primitivas (esféricas y sin un núcleo compacto, normalmente presentes cerca de axones y sinapsis) y placas clásicas (presentan un núcleo redondo y denso, suelen asociarse a vasos sanguíneos).

- **Placas difusas:** están compuestas mayoritariamente por la isoforma $A\beta_{42}$, presentando poco o nada $A\beta_{40}$. Son de naturaleza no fibrilar, sin una forma definida ni un núcleo compacto. Este tipo de depósitos no suele presentar células gliales asociadas a su alrededor ni neuritas distróficas.⁴²

La neuroinflamación es otra de las marcas histopatológicas de la AD, no obstante, el papel de la microglía y la astrogliá en la progresión de la patología aún no está claro. La identificación de polimorfismos asociados a la AD esporádica en genes microgliales (TREM2, CD33, HLA-DRB1, etc.) avala un papel predominante de estas células en la patogénesis de la enfermedad.⁴³ Por un lado, se cree que una desregulación del estado de activación de estas células gliales podría dar lugar a estrés oxidativo, neuroinflamación persistente y disfunción neuronal, lo cual favorecería la producción y agregación de Abeta.⁴⁴ En cambio, hay autores que sugieren que la activación de la microglía y los astrocitos es secundaria a la acumulación de Abeta, de modo que a través de la interacción entre el Abeta y las células gliales se desencadenaría la cascada inflamatoria.^{45,46} La presencia continuada del Abeta conduciría a un estado inflamatorio crónico, con una sobreactivación microglial y astrogliá, dando lugar a la producción y liberación de cantidades excesivas de citoquinas proinflamatorias y de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.⁴⁷ Esto a su vez provoca la desregulación de los procesos y mecanismos destinados a eliminar el daño causado y, por tanto, se acaba creando un ambiente en el que el estrés oxidativo, la muerte celular y la degeneración del tejido nervioso se van agravando.⁴⁸ Además, el péptido Abeta tiene la capacidad de atraer a las células microgliales y astrogliales, fomentando su activación en torno a las placas y provocando que éstas se encuentren rodeadas por prolongaciones gliales.⁴⁹⁻⁵³ De este modo, la glía reactiva podría constituir una barrera física frente a la toxicidad de la placa, promoviendo su compactación y aislamiento, evitando su expansión, y además participando en la fagocitosis del Abeta oligomérico en un intento de aliviar la carga amiloide de las placas.⁵⁴⁻⁵⁷ Estudios recientes han demostrado que la presencia de mutaciones asociadas a la AD en el gen de TREM2 (del inglés *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*), receptor expresado por la microglía en el cerebro, inducen un aumento de la patología en modelos amiloidogénicos produciendo placas menos compactas y con un número mayor de distrofias asociadas.⁵⁸ Por tanto, una respuesta deficiente de la microglia activada que rodea a las placas podría inducir una respuesta perjudicial para las neuronas en la AD.

Una de las incógnitas en la AD es el papel de las placas de Abeta en el desarrollo y progresión de la patología. Se ha considerado a las placas como almacenes inertes de Abeta, ya que no existe correlación entre la carga amiloide y el deterioro cognitivo. En el modelo transgénico PS1M146L/APP751SL^{59,60}, las placas están rodeadas de distrofias neuríticas (de naturaleza axonal/presináptica) conteniendo multitud de vesículas autofágicas al igual que las placas neuríticas de los pacientes.

El número de distrofias asociadas a las placas aumenta con el tamaño de la placa, que a su vez aumenta con la edad. Es posible que las placas con la edad cambien sus propiedades y liberen formas oligoméricas tóxicas afectando a los axones/sinapsis cercanos.

Nuestro grupo de investigación, perteneciente al CIBER de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) del Instituto de Salud Carlos III, trata de dar respuesta a varias de estas cuestiones, y algunas de ellas se plantean en este proyecto, ya que permitirían identificar dianas terapéuticas de intervención para modular la toxicidad de las placas y así evitar y/o disminuir los niveles de oligómeros tóxicos y por lo tanto preservar la integridad neuronal.

2. Hipótesis

La hipótesis de trabajo propone que **las placas de A β actúan como reservorio de formas oligoméricas solubles de A β y que la glía reactiva que rodea las placas regula la toxicidad de las mismas**. De comprobarse esta hipótesis, los resultados, altamente novedosos, supondrían un gran avance en el conocimiento de la participación de las placas (hasta ahora consideradas como estructuras inertes) y la glía reactiva asociada en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Los datos obtenidos podrán ser utilizados en futuros estudios preclínicos destinados a ver el efecto de nuevas terapias sobre la toxicidad de las placas y que permitan prevenir estos cambios y el daño neurotóxico.

3. Objetivos

3.1. Caracterizar la heterogeneidad de las placas amiloides durante la progresión de la patología en el hipocampo y la corteza entorrinal de animales transgénicos PS1_{M146L}/APP_{751SL} de distintas edades. Se emplearán técnicas histológicas e inmunohistoquímicas a microscopía óptica convencional y láser confocal, así como técnicas estereológicas y de análisis de imagen. Las diferencias entre las placas amiloides se establecerán en base a su morfología, tamaño y sus posibles cambios con la edad (compactación A β , tamaño del halo periférico oligomérico), empleando diversos marcadores tales como A β ₄₂, A β ₄₀, A β oligomérico OC y 6E10. Posteriormente, se caracterizará el efecto neurotóxico de las diferentes placas en el neuropilo circundante, analizando la formación de neuritas distróficas mediante marcadores como APP, AT8, SYN, LC3B o SMI132. Además, se estudiará el estado de activación microglial (IBA1, CD11b, CD45, CD68...) y astrogial (GFAP, ALDH1L1, acuaporina4) alrededor de las placas amiloides.

3.2. Se determinarán las alteraciones metabólicas que acompañan al proceso de deposición amiloide y al proceso neurodegenerativo en el modelo PS1_{M146L}/APP_{751SL}. La existencia de cambios en el metabolismo cerebral en pacientes de Alzheimer ha sido descrita previamente, por tanto el análisis de estos cambios y la

identificación de marcadores metabólicos podrían ser de relevancia para diagnosticar y monitorizar la progresión de la enfermedad. En nuestro modelo transgénico, se analizará el perfil metabólico de regiones como el hipocampo y la corteza cerebral, donde se acumula preferentemente el péptido amiloide. Este estudio se realizará en la unidad de metabolómica del servicio de Nanoimagen del Centro Andaluz de Biotecnología y Nanomedicina (Edificio Bionand situado en el Parque Tecnológico de Andalucía en Málaga).

3.3. Determinar el papel tóxico de las fracciones solubles S1 aisladas de ratones transgénicos y de muestras post mortem de pacientes en diversos estadios Braak (II-VI), así como de placas aisladas de ratones transgénicos, tanto in vivo como in vitro. Las placas amiloides, teñidas mediante Tioflavina S y clasificadas por tamaño, compactación y región, serán aisladas mediante microdissección láser según la metodología descrita previamente por el grupo.⁶¹ Por otro lado, las fracciones S1 se obtendrán de acuerdo al protocolo descrito por Jiménez et al.⁶², empleando homogeneizados del hipocampo y la corteza de ratones transgénicos y de muestras humanas *post mortem*. Estas fracciones, que contienen formas solubles de A β y de tau hiperfosforilado, serán inyectadas en animales silvestres y transgénicos, así como probadas *in vitro*.

3.3.1. En los ensayos *in vitro* se emplearán cultivos de líneas celulares comerciales (neuroblastoma N2a, microglía VB2), así como cultivos primarios de neuronas, de microglía y de astrocitos. El efecto biológico de las placas amiloides y de las fracciones S1 (toxicidad, degeneración neuronal, cambios en el metabolismo del APP, neuroinflamación) será ensayado sobre cultivos y analizado mediante diversas técnicas (RT-PCR, western blots, citometría de flujo, inmunocitoquímica).

3.3.2. Los ensayos *in vivo* se realizarán mediante inyección estereotóxica en el cerebro de ratones silvestres y transgénicos APP_{751SL}, 3xTgAD y APPKI-hA β wt. Parte de este objetivo se llevará a cabo durante una estancia en el laboratorio del Dr. Frank M. LaFerla en la Universidad de California en Irvine (Estados Unidos). El efecto de las fracciones S1 se analizará mediante estudios de conducta para la evaluación cognitiva de los animales y posteriormente se analizará la patología por inmunohistoquímica, estereología, RT-PCR y western blots.

3.4. Determinar si la glía reactiva que rodea a las placas regula la capacidad tóxica de las mismas durante la progresión de la patología tanto en modelos transgénicos como en muestras post mortem de pacientes con AD. Las placas inducen una fuerte activación microglial y astrogliar a su alrededor. El papel de la activación microglial está siendo objeto de numerosos estudios en relación a la respuesta neuroinflamatoria y su doble perfil protector/perjudicial. Sin embargo, poco se conoce sobre el posible papel de las células microgliales activadas en la formación/compactación/degradación de las placas y por tanto regulando la capacidad tóxica de las mismas (reduciendo/aumentando la liberación de oligómeros y su efecto sobre la formación de distrofias, pérdida sináptica y muerte neuronal) en la evolución de la patología. Del mismo modo, se desconoce la función de la astrogliar reactiva y de sus posibles fenotipos en la progresión de la enfermedad. Nuestro propósito es caracterizar las

células gliales activadas íntimamente asociadas a placas y su posible contribución en la regulación de la toxicidad de las placas.

Para ello, planteamos el estudio inmunohistoquímico y morfológico (longitud y número de prolongaciones, número de bifurcaciones, etc.) de las células microgliales activadas y astrocitos reactivos que rodean las diferentes placas durante la progresión de la patología en modelos y muestras *post mortem* de pacientes, con objeto de determinar si existen diferentes fenotipos en relación al tipo de placa así como la evolución patológica (cambios morfológicos/moleculares) de estas células con la edad. Además, se emplearán otras técnicas como citometría de flujo, microdissección láser, RT-PCR, etc.

El trabajo propuesto se encuadra en la línea de investigación del grupo, perteneciente al IBIMA y al CIBERNED. Los objetivos se encuadran en los proyectos actuales del grupo contando con los permisos éticos oportunos. Todos los procedimientos que involucren animales vivos se ajustan a los principios éticos de investigación siguiendo las Directivas nacionales y europeas 2010/63/UE de experimentación animal. La investigación se llevará a cabo en las instalaciones del Centro de Experimentación Animal de la UMA de acuerdo con las directrices institucionales para la manipulación de los animales y se harán los máximos esfuerzos para reducir el número y el sufrimiento de los animales. Se seguirá el principio de las 3R, es decir reducir, refinar y reemplazar animales tanto como sea posible.

4. Muestras

Se emplearán muestras humanas *post mortem* (fijadas en paraformaldehído y crioprotegidas) de hipocampo y corteza entorrinal de pacientes en estadios Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI con historial clínico conocido. Como controles se utilizarán muestras de individuos sanos y edades similares a los individuos con la patología. El grupo ya dispone de estas muestras procedentes del Banco de Tejidos Neurológicos del IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona) y del Biobanco del Hospital Clínic-IDIPAS (Barcelona). Además, se emplearán los siguientes modelos transgénicos:

- **APP_{751SL}**. Este modelo monogénico presenta dos mutaciones en el gen de APP que han sido identificadas en pacientes con AD familiar (mutaciones sueca: KM595/596NL y londinense: LV642).
- **PS1_{M146L}/APP_{751SL}**. Este doble transgénico ha sido ampliamente caracterizado por nuestro grupo. La colonia para estos transgénicos se está manteniendo y produciendo en el estabulario de la Universidad de Málaga a partir de los reproductores PS1 (mutación PS1M146L) y APP_{751SL} (mutaciones sueca: KM595/596NL y londinense: LV642).
- **3xTgAD**. Este modelo triple transgénico (Jackson lab) presenta mutaciones en los genes PS1 (mutación PS1M146V), APP (mutación sueca) y Tau (MAPT P301L). Desarrolla una patología amiloide muy tardía, pero manifiesta mayor deterioro cognitivo que otros modelos monogénicos y bigénicos.

- **APPKI-hA β wt.** Se trata de un nuevo modelo desarrollado por el grupo del Dr. LaFerla de la Universidad de California en Irvine (UCI, Estados Unidos). En él, la secuencia del A β humano no mutado ha sido insertada en el gen APP endógeno del ratón, tratándose de un modelo esporádico para la enfermedad de Alzheimer.

5. Resultados Esperados

El fracaso relativo de las propuestas etiopatogénicas en la AD ha abierto la puerta a una investigación más multifactorial de las causas de esta enfermedad. El objetivo de este proyecto es proponer dianas terapéuticas inéditas que permitan modular *in vivo* la toxicidad de las placas, y que podrían ser además de altamente novedosas, de gran interés clínico teniendo en cuenta el fracaso que han tenido hasta la actualidad las estrategias terapéuticas basadas en inmunoterapias para eliminar el A β .

Financiación

Este trabajo se encuentra financiado por la Junta de Andalucía a través del Proyecto de Excelencia CTS-2035 (JV y AG); por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (ISCiii) de España, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Unión Europea, a través de los proyectos PI15/00796 (AG) y PI15/000957 (JV); y por el Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) (AG y JV). C.N-D es beneficiaria de una beca predoctoral FPI asociada al proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía.

Referencias

1. WINBLAD B, QIU C, BALLARD C, JOHANSSON G. Evidence-based prevention and treatment of dementia – Authors' reply. *Lancet Neurol.* 2016 Sep;15(10):1007–8.
2. SERRANO-POZO A, FROSCHE MP, MASLIAH E, HYMAN BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 Sep;1(2157–1422):a006189.
3. CALDERON-GARCIDUEÑAS AL, DUYCKAERTS C. Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol.* Elsevier; 2018 Jan 1;145:325–37.
4. FORNER S, BAGLIETTO-VARGAS D, MARTINI AC, TRUJILLO-ESTRADA L, LAFERLA FM. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci.* 2017 Jun;40(6):347–57.
5. MASTERS CL, BATEMAN R, BLENNOW K, ROWE CC, SPERLING RA, CUMMINGS JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1:15056.
6. SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETELER MMB, DE STROOPER B, FRISONI GB, SALLOWAY S, et al. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2016 Jul 30;388(10043):505–17.
7. VICTORIA GS, ZURZOLO C. The spread of prion-like proteins by lysosomes and tunneling nanotubes: Implications for neurodegenerative diseases. *J Cell Biol.* 2017 Jul 4;216(9):2633–44.

8. GOEDERT M, EISENBERG DS, CROWTHER RA. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2017 Jul 25;40(1):189–210.
9. CONDELLO C, STÖEHR J. A β propagation and strains: Implications for the phenotypic diversity in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2018 Jan;109(Pt B):191–200.
10. HARDY J, ALLSOP D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1991 Oct;12(10):383–8.
11. HARDY JA, HIGGINS GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr 10;256(5054):184–5.
12. SELKOE DJ, HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;1–14.
13. DEL RÍO JA, FERRER I, GAVÍN R. Role of cellular prion protein in interneuronal amyloid transmission. *Prog Neurobiol*. 2018 Mar 9;
14. JUCKER M, WALKER LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013;501(7465):45–51.
15. WALKER LC, DIAMOND MI, DUFF KE, HYMAN BT. Mechanisms of Protein Seeding in Neurodegenerative Diseases. *JAMA Neurol*. 2013 Mar 1;70(3):304.
16. HARTL FU. Protein Misfolding Diseases. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun 20;86(1):21–6.
17. BALCHIN D, HAYER-HARTL M, HARTL FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* (80). 2016 Jul 1;353(6294):aac4354–aac4354.
18. MORENO-GONZALEZ I, SOTO C. Misfolded protein aggregates: Mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22(5):482–7.
19. KANE MD, LIPINSKI WJ, CALLAHAN MJ, BIAN F, DURHAM R A, SCHWARZ RD, et al. Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci*. 2000;20(10):3606–11.
20. MEYER-LUEHMANN M, COOMARASWAMY J, BOLMONT T, KAESER S, SCHAEFER C, KILGER E, et al. Exogenous Induction of Cerebral by Agent and Host. *Science* (80). 2006;313:1781–4.
21. FRITSCHI SK, CINTRON A, YE L, MAHLER J, BÜHLER A, BAUMANN F, et al. A β seeds resist inactivation by formaldehyde. *Acta Neuropathol*. 2014;128(4):477–84.
22. FRITSCHI SK, LANGER F, KAESER SA, MAIA LF, PORTELIUS E, PINOTSI D, et al. Highly potent soluble amyloid- β seeds in human Alzheimer brain but not cerebrospinal fluid. *Brain*. 2014;137(11):2909–15.
23. KAWAHARA M. Neurotoxicity of β -amyloid protein: oligomerization, channel formation, and calcium dyshomeostasis. *Curr Pharm Des*. 2010;16(25):2779–89.
24. LUBLIN AL, GANDY S. Amyloid- β Oligomers: Possible Roles as Key Neurotoxins in Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*. 2010 Jan;77(1):43–9.
25. SAKONO M, ZAKO T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J*. 2010 Mar;277(1742–4658):1348–58.
26. LEE DS, QIAN H, TAY CY, LEONG DT. Cellular processing and destinies of artificial DNA nanostructures. *Chem Soc Rev*. 2016;45(15):4199–225.
27. LIANG C, HSIEH M-C, LI NX, LYNN DG. Conformational evolution of polymorphic amyloid assemblies. *Curr Opin Struct Biol*. 2018 May 2;51:135–40.
28. CHUANG E, HORI AM, HESKETH CD, SHORTER J. Amyloid assembly and disassembly. *J Cell Sci*. 2018 Apr 13;131(8):jcs189928.
29. KLEIN WL, KRAFFT GA, FINCH CE. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci*. 2001 Apr;24(4):219–24.
30. SELKOE DJ. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science* (80-). 2002 Oct 25;298(5594):789–91.
31. THAL DR, WALTER J, SAIDO TC, FÄNDRICH M. Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2015 Feb 23;129(2):167–82.

32. MCLEAN CA, CHERNY RA, FRASER FW, FULLER SJ, SMITH MJ, BEYREUTHER K, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1999 Dec;46(6):860–6.
33. MUCKE L, MASLIAH E, YU GQ, MALLORY M, ROCKENSTEIN EM, TATSUNO G, et al. High-level neuronal expression of abeta 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*. 2000 Jun 1;20(11):4050–8.
34. NÄSLUND J, HAROUTUNIAN V, MOHS R, DAVIS KL, DAVIES P, GREENGARD P, et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA*. 283(12):1571–7.
35. VIOLA KL, KLEIN WL. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol*. 2015;129(2):183–206.
36. CUMMINGS J, LEE G, MORTSDORF T, RITTER A, ZHONG K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimer's Dement (N Y)*. 2017 Sep;3(3):367–84.
37. WANG Y, YAN T, LU H, YIN W, LIN B, FAN W, et al. Lessons from Anti-Amyloid- β Immunotherapies in Alzheimer Disease: Aiming at a Moving Target. *Neurodegener Dis*. 2017;17(6):242–50.
38. LIU J, YANG B, KE J, LI W, SUEN W-C. Antibody-Based Drugs and Approaches Against Amyloid- β Species for Alzheimer's Disease Immunotherapy. *Drugs Aging*. 2016 Oct 4;33(10):685–97.
39. DICKSON DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997 Apr;56(4):321–39.
40. DUYCKAERTS C, DELATOUR B, POTIER M-C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. 2009 Jul 21;118(1):5–36.
41. BOUVIER DS, JONES E V., QUESSEVEUR G, DAVOLI MA, A. FERREIRA T, QUIRION R, et al. High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. *Sci Rep*. 2016;6(April):24544.
42. PERL DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010;77:32–42.
43. HANSEN D V., HANSON JE, SHENG M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. 2018 Feb 5;217(2):459–72.
44. VON BERNHARDI R, EUGENÍN-VON BERNHARDI L, EUGENÍN J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*. 2015;7(July):1–21.
45. GUERRIERO F, SGARLATA C, FRANCIS M, MAURIZI N, FARAGLI A, PERNA S, et al. Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link. *Aging Clin Exp Res*. 2017 Oct 7;29(5):821–31.
46. MINTER MR, TAYLOR JM, CRACK PJ. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2016 Feb;136(3):457–74.
47. SOCHOCKA M, DINIZ BS, LESZEK J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol*. 2017 Dec 26;54(10):8071–89.
48. SCHWARTZ M, DECZKOWSKA A. Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends Immunol*. 2016 Oct;37(10):668–79.
49. MALM TM, KOISTINAHO M, PÄREPALO M, VATANEN T, OOKA A, KARLSSON S, et al. Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis*. 2005 Feb;18(1):134–42.
50. MEYER-LUEHMANN M, SPIRES-JONES TL, PRADA C, GARCIA-ALLOZA M, DE CALIGNON A, ROZKALNE A, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2008 Feb 7;451(7179):720–4.
51. MEDEIROS R, LAFERLA FM. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol*. 2013 Jan;239:133–8.
52. RODRÍGUEZ-ÁRELLANO JJ, PARPURA V, ZOREC R, VERKHRATSKY A. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2016 May 26;323:170–82.

53. HAIM L BEN, ROWITCH DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci*. 2017 Jan 1;18(1):31–41.
54. YUAN P, CONDELLO C, KEENE CD, WANG Y, BIRD TD, PAUL SM, et al. TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron*. Elsevier Inc.; 2016;90(4):724–39.
55. XIAO Q, YAN P, MA X, LIU H, PEREZ R, ZHU A, et al. Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates abeta clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci*. 2014 Jul 16;34(1529–2401):9607–20.
56. GARWOOD CJ, RATCLIFFE LE, SIMPSON JE, HEATH PR, INCE PG, WHARTON SB. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2017 Jun;43(4):281–98.
57. SERRANO-POZO A, MUZIKANSKY A, GOMEZ-ISLA T, GROWDON JH, BETENSKY RA, FROSCH MP, et al. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J NeuropatholExpNeurol*. 2013 Jun;72(1554–6578):462–71.
58. COLONNA M, BUTOVSKY O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. 2017;(January):441–68.
59. JIMENEZ S, TORRES M, VIZUETE M, SANCHEZ-VARO R, SANCHEZ-MEJIAS E, TRUJILLO-ESTRADA L, et al. Age-dependent accumulation of soluble amyloid β ($A\beta$) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein- α (sAPP α) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem*. 2011;286(21):18414–25.
60. TORRES M, JIMENEZ S, SANCHEZ-VARO R, NAVARRO V, TRUJILLO-ESTRADA L, SANCHEZ-MEJIAS E, et al. Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *MolNeurodegener*. 2012;7(1750–1326):59.
61. MORENO-GONZALEZ I, BAGLIETTO-VARGAS D, SANCHEZ-VARO R, JIMENEZ S, TRUJILLO-ESTRADA L, SANCHEZ-MEJIAS E, et al. Extracellular amyloid- β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis*. 2009;18(4):755–76.
62. JIMENEZ S, NAVARRO V, MOYANO J, SANCHEZ-MICO M, TORRES M, DAVILA JC, et al. Disruption of Amyloid Plaques Integrity Affects the Soluble Oligomers Content from Alzheimer Disease Brains. Trullas R, editor. *PLoS One*. 2014 Dec 8;9(12):e114041.

Respuesta microglial en la enfermedad de Alzheimer: nuevas perspectivas y potencial terapéutico



Marina-Mejías-Ortega,^{a,*}
Elisabeth-Sánchez-Mejías^{a,*}
y Antonia Gutiérrez^a

^a Dept. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA). Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Málaga, España.

*Ambos autores han contribuido por igual en este trabajo.

Resumen

La respuesta neuroinflamatoria, mediada principalmente por la activación microglial, es una característica del cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD). Aunque su implicación en la fisiopatología de la AD queda por esclarecer, la identificación de factores de riesgo genéticos relacionados con la función de la microglía, han situado a la respuesta inflamatoria como un factor crítico en la progresión de la AD. Recientemente, y al contrario de lo observado en modelos transgénicos amiloidogénicos, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las células microgliales sufren un proceso degenerativo en el hipocampo de los pacientes, implicando una desprotección inmunológica del parénquima nervioso y comprometiendo la homeostasis y supervivencia neuronal. En este sentido, proponemos que la disfunción/degeneración microglial podría estar implicada en el desarrollo/progresión de la AD existiendo diferencias regionales en el cerebro de los pacientes. El objetivo de este proyecto, por tanto, es analizar la respuesta de la microglía (activación/degeneración) en la corteza frontal de muestras humanas *post mortem* de pacientes de AD (fases avanzadas, Braak V-VI) e individuos control (fases asintomáticas, Braak II) y comparar los resultados con la región del hipocampo. Dicho propósito será abordado mediante aproximaciones inmunohistoquímicas e histológicas y técnicas de análisis de imagen. Se pretende con este trabajo proporcionar una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos asociados a la enfermedad, ayudar en la identificación de nuevas dianas terapéuticas y mejorar los modelos animales para que mimeticen en mayor grado la patología humana, y garanticen así el éxito traslacional del laboratorio a la clínica.

Abreviaturas:

A β : péptido β -amiloide, del inglés *Amyloid β* .

AD: enfermedad de Alzheimer, del inglés *Alzheimer's Disease*.

APOE: apolipoproteína E.

APP: proteína precursora amiloide, del inglés *Amyloid Precursor Protein*.

AT8: anticuerpo monoclonal para la Tau hiperfosforilado.

BAM10: anticuerpo monoclonal para β -amiloide total.

CLU: clusterina.

CR1: receptor del complemento tipo 1, del inglés *Complement Receptor 1*.

CSF1: factor estimulador de colonias de macrófagos, del inglés *Colony Stimulating Factor 1*.

CX3CR1: receptor de fractalquina, del inglés *C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1*.

DAM: microglía asociada a daño, del inglés *Disease Associated Microglia*.

DAP12: del inglés *DNAX Activating Protein of 12 KDa*.

GFAP: proteína ácida fibrilar glial; del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*.

GWAS: estudios de asociación del genoma completo; del inglés *Genome Wide Association Studies*.

IBA1: molécula adaptadora de unión a calcio; del inglés *Ionized calcium-Binding Adapter molecule*.

NFTs: ovillos neurofibrilares; del inglés *Neurofibrillary Tangles*.

NTs: fibras neuropílicas; del inglés *Neuropil Threads*.

OC: anticuerpo monoclonal para β -amiloide oligomérico.

P2RY12: receptor purinérgico P2Y; del inglés *Purinergic Receptor P2Y*.

SHIP: fosfatasa D inositol 5-polifosfato, del inglés *SH2-containing Inositol Phosphatase*.

TLRs: receptores de tipo toll, del inglés *Toll-like receptor*

TMEM119: proteína transmembrana 119.

TNF α : factor de necrosis tumoral α , del inglés *Tumoral Necrotic Factor*.

TREM2: receptor de activación expresado en células mieloides tipo 2, inglés *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*.

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa, progresiva, crónica, e irreversible, que constituye la principal causa de demencia entre la población envejecida en todo el mundo.¹

Las principales lesiones histopatológicas de esta enfermedad (*Figura 1*), contra las que han sido dirigidas la mayoría de las estrategias terapéuticas en las últimas décadas, son la acumulación extracelular de péptidos beta-amiloide (A β) en forma de placas seniles, y la agregación intracelular de la proteína Tau hiperfosforilada (fosfo-tau) que da lugar a los ovillos neurofibrilares.² Además, esta patología cursa con pérdida de sinapsis, disfunción y muerte neuronal selectiva, daños vasculares y glía reactiva, entre otros.^{3,4}

Aunque la función de la glía (microglía y astroglia) en la AD todavía no está esclarecida, uno de los mecanismos patológicos que ha ido ganando reconocimiento en los últimos años es el proceso neuroinflamatorio mediado por estas células. En este sentido, se ha propuesto que la activación del sistema inmune innato cerebral, que implica alteraciones en la morfología y función de las células microgliales y

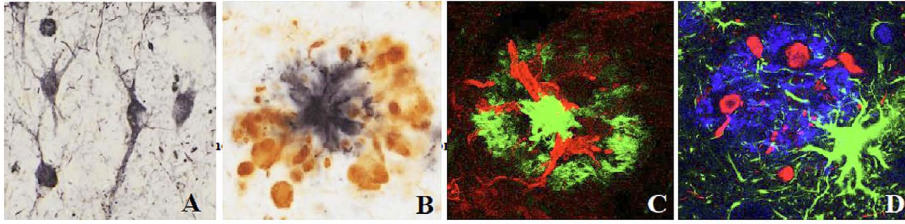


Figura 1. Principales lesiones histopatológicas del cerebro de un paciente con Alzheimer. (A) Ovillos neurofibrilares de neuronas piramidales; inmunotinción para AT8 (fosfo-tau). (B) Placa senil con neuritas distróficas asociadas; inmunotinción para A β en azul oscuro, AT8 en marrón. (C) Células microgliales reactivas alrededor de una placa amiloide; inmunotinción para Iba1 (microglía) en rojo, A β en verde. (D) Astrocito reactivo asociado a una placa neurítica; inmunotinción para GFAP (astroglía) en verde, AT8 en rojo, A β en azul. (A-C) Imágenes de microscopía convencional de campo claro; (D) Imagen de microscopía láser confocal de múltiple marcaje fluorescente. Barras de escala: A, 50 μ m; B-D, 20 μ m

astrocitos,⁵ contribuye al desarrollo y progresión de la enfermedad.⁶ Sin embargo, a día de hoy, no se excluye la posibilidad de que las acciones inmunes puedan, al menos en parte, desempeñar un papel decisivo en el inicio de la patología. De hecho, se ha llegado a plantear la denominada hipótesis de la desregulación de las células gliales según la cual, cambios y alteración de la activación y regulación microglial resultaría en estrés oxidativo, neuroinflamación persistente y disfunción neuronal, que favorecería la producción y agregación de A β .⁷

No obstante, actualmente la hipótesis de la cascada amiloide es la más aceptada, según la cual el primer evento que sucede y que desencadena la disfunción neuronal, es la acumulación extracelular del péptido A β . Esta agregación sería la que más adelante conduciría, por una parte, a la formación de los ovillos neurofibrilares y por otra, a la activación microglial y astrocitaria con la consecuente respuesta inflamatoria asociada. Así, estudios recientes, sugieren que la activación de las células inmunes residentes en el cerebro sigue a la acumulación de A β , desencadenándose la cascada del proceso inflamatorio a través de la interacción entre el amiloide y estas células gliales.^{8,9}

Los datos actuales indican que en este proceso neuroinflamatorio participan distintos tipos celulares como microglía, astrocitos, neuronas, células endoteliales y algunas células del sistema inmune adaptativo, entre otros. También, se ven implicados una gran cantidad de mediadores moleculares, como citocinas (pro y antiinflamatorias), quimiocinas, caspasas, factores del complemento y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.¹⁰ De todos ellos, las células microgliales, componentes del sistema inmune innato del cerebro, son las principales mediadoras de la inflamación.

La mayor parte del conocimiento que tenemos actualmente acerca de la activación microglial en la AD procede de los hallazgos en modelos murinos amiloideogénicos¹¹ basados en la sobreexpresión de APP y acumulación extracelular de A β . La activación microglial está caracterizada y modulada por el microambiente inflamatorio en el que se encuentran. En este estado, las células ponen en marcha mecanismos

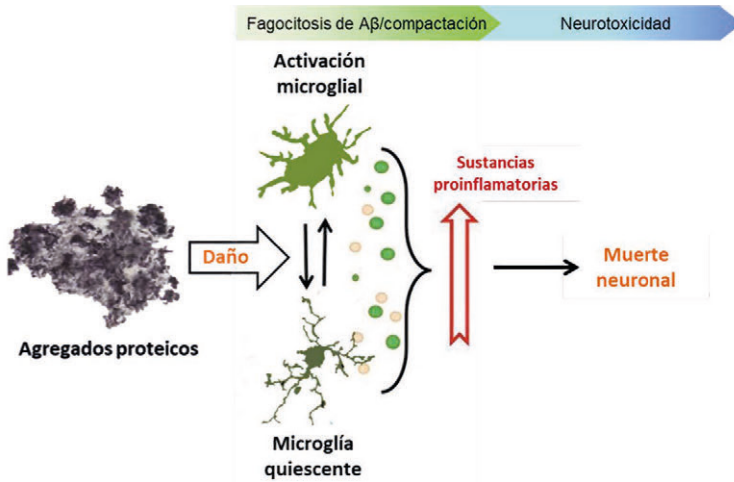


Figura 2. Respuesta microglial en la enfermedad de Alzheimer. La visión actual, aunque otorga a la microglía un papel beneficioso al inicio de la patología, sostiene que las células microgliales adquieren un fenotipo proinflamatorio con producción de sustancias tóxicas conforme la enfermedad progresa, contribuyendo finalmente a la muerte neuronal.

inflamatorios para reclutar otras células y eliminar el desencadenante patológico, así como antiinflamatorios para resolver la respuesta inmune iniciada y reparar el tejido dañado. No obstante, en la AD, la presencia continuada de los agregados de A β hace que haya niveles elevados de mediadores proinflamatorios y de neuronas dañadas, que conducen a las células hacia un estado activado crónico, en donde sus funciones se encuentran totalmente alteradas y la situación patológica se agrava aún más^{9,12} (Figura 2). En ratones transgénicos amiloidogénicos, así como en regiones neocorticales de los pacientes, las células microgliales adquieren un fenotipo reactivo, aumentando en número y tamaño de manera proporcional al grado de severidad de la patología amiloide,¹³ estando la activación microglial, por tanto, directamente relacionada con el A β . Si el papel de estas células es perjudicial o protector en el avance de la patología no está del todo claro a día de hoy. Por un lado, se ha visto que las placas neuríticas de A β están rodeadas y aisladas del resto del parénquima nervioso por células microgliales activadas que quizás contribuyan a su fagocitosis y/o compactación.^{14,15} Sin embargo, por otro lado, a estas células también se le han asociado efectos perjudiciales al liberar citoquinas proinflamatorias y neurotoxinas.¹⁶

En los últimos años, la implicación de la microglía en la AD, bien por pérdida de función protectora o ganancia de actividad tóxica, se ha visto reforzada por los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) (17). Estos análisis, llevados a cabo en un gran número de pacientes, han permitido identificar factores de riesgo genéticos para el Alzheimer esporádico y que se encuentran estrechamente relacionados con la respuesta inmune microglial. Entre los genes que aumentan la susceptibilidad de desarrollar la patología, destaca el receptor de células mieloides (TREM2).¹⁸ Se trata de una glicoproteína que, a través de su molécula adaptadora DAP12, está implicada

en promover la supervivencia, proliferación y activación microglial, llegando incluso a producir señales tónicas que preservan la función microglial a lo largo de los años. También se ha comprobado que presenta un papel importante en la fagocitosis de neuronas dañadas y muertas, y posiblemente del A β al formar este último, complejos con lipoproteínas que contienen APOE y CLU. Además, se le ha asociado un papel inmunorregulador y protector al limitar la inflamación por interferir con la producción de citocinas proinflamatorias vía TLRs así como por participar en la formación de una barrera microglial alrededor de las placas. Diversas variantes de pérdida de función de TREM2 parecen incrementar el riesgo de padecer Alzheimer, lo cual corrobora la hipótesis de que la alteración de las funciones microgliales contribuyen a la patogénesis de esta enfermedad. De hecho, son ya varios los genes expresados por la microglía y que están implicados en la patogénesis (CR1, CLU, CD33, SHIP, etc.) pudiendo estar conectados funcionalmente y presentar vías comunes que puedan ser objeto de estudio terapéutico. Así, la disfunción de las células microgliales en el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa, plantea el restablecimiento de la homeostasis microglial, comprometida en la patología, como una potencial estrategia terapéutica para hacer frente a la enfermedad y modificar su curso reduciendo el daño neuronal.

Nuestro grupo de investigación ha centrado la atención, durante años, en el estudio de varios modelos transgénicos murinos de AD con el objetivo de dilucidar y profundizar en los mecanismos celulares/moleculares implicados en los cambios neurodegenerativos. Concretamente, el grupo ha analizado en mayor detalle el proceso neurodegenerativo en el modelo doble transgénico que sobreexpresa las formas mutadas de las proteínas PS1M146L y APP751SL, implicadas en el desarrollo del Alzheimer familiar.^{19,20} Este modelo desarrolla una considerable y progresiva acumulación extracelular de A β , que tal y como hemos descrito, va acompañada por una intensa activación local de la microglía.²¹ A edades tempranas (4 meses) en el hipocampo e los ratones se produce una activación microglial neuroprotectora exclusivamente alrededor de las placas, y expresando estas células citoquinas anti-inflamatorias y factores neurotróficos. Sin embargo, a la misma edad, en la corteza entorrinal, la microglía reactiva también se encuentra en las regiones interplaca.¹⁹ En esta región cerebral la respuesta inflamatoria presenta un perfil citotóxico caracterizado por la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF α , coincidiendo temporalmente con la muerte de neuronas piramidales.²⁰ A edades más avanzadas (18 meses) la activación microglial en este modelo alcanza regiones hipocampales interplaca y muestra un perfil muy similar a la observada en la corteza entorrinal, es decir, muestra un fenotipo proinflamatorio. De este modo, en el hipocampo de nuestro modelo ocurre un cambio en la respuesta inflamatoria con el transcurso de la patología, pasando de ser potencialmente neuroprotectora al inicio, a mostrar un perfil citotóxico en etapas más avanzadas. Este hecho coincide con el aumento de las formas oligoméricas solubles de A β (formas a las que se les atribuye las propiedades más neurotóxicas) en el parénquima nervioso.²² Recientemente, se ha descrito mediante análisis transcriptómico de células individuales (*single-cell RNA sequencing*), la firma molecular característica de la activación microglial en modelos de AD, llegando a identificar la expresión de un programa genético característico. Esta microglía, denominada “microglía asociada a enfermedad” (DAM, del inglés *disease associated*

microglia), muestra una alta expresión de genes asociados con la patología de Alzheimer (TREM2 y APOE), y una disminución en la expresión de genes homeostáticos (CX3CR1, P2RY12 y TMEM119).²³ Estas células DAM han sido localizadas cercanas a las placas, posiblemente aislando el A β y ejerciendo un papel protector en la enfermedad. Así, se propone que este fenotipo DAM podría ser neuroprotector.²⁴

Por otro lado, clásicamente se ha aceptado que la respuesta microglial en pacientes de Alzheimer podría ser similar a la observada en los modelos murinos transgénicos. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro equipo de investigación muestran discrepancias, tanto cuantitativas como cualitativas, en esta respuesta entre pacientes y modelos, al menos a nivel de la formación hipocampal (Figura 3). Mediante técnicas inmunohistoquímicas y moleculares, hemos observado en el hipocampo de los pacientes con AD que existe una limitada activación microglial, restringida a las placas, que contrasta con la exacerbada activación microglial observada en los modelos transgénicos APP/PS1. Nos encontramos así con una respuesta microglial atenuada más que incrementada, no inflamatoria y en la que solo determinados genes DAM son inducidos (CD45, CD68 y CSF1) en las etapas más avanzadas.

Pero más relevante, hemos revelado una reducción no homogénea de la carga microglial (área del parénquima cerebral ocupada por las células microgliales) en el hipocampo de los pacientes de Alzheimer, siendo las zonas más afectadas la región hilar del giro dentado^{25, 26} y la región CA3 del hipocampo propio. Así, se ha observado en el giro dentado de los pacientes una disminución de la densidad numérica (células/mm³) de células inmunopositivas para Iba1 (marcador general de microglía) en la mitad de los casos analizados; una reducción tanto del dominio microglial (área que cada célula se encarga de vigilar de manera individual) como del patrón de distribución espacial de las células microgliales; y presencia de rasgos morfológicos patológicos, mostrando estas células desramificación, fragmentación, acortamiento de las prolongaciones y distrofias.

De este modo, estos resultados sugieren que existe un marcado proceso degenerativo de la microglía restringido a estas áreas que quedan desprovistas de protección microglial. A fin de dilucidar qué factores podrían resultar tóxicos para la microglía en el cerebro de estos pacientes, mediante técnicas *in vitro* de cultivos microgliales y citometría de flujo, hemos determinado que las formas solubles fosforiladas de tau, y no el A β , resulta tóxico y reduce la viabilidad de las células microgliales.²⁶

La deficiente protección inmunológica debida a la degeneración, así como la limitada activación microglial en los pacientes de Alzheimer, podría agravar la progresión de la patología ya que las funciones beneficiosas de la microglía (fagocitosis del A β , compactación y limitación de las placas seniles y eliminación de neuronas dañadas y/o restos neuronales) se ven comprometidas. Todo esto lleva a replantear el concepto clásico de la existencia de una respuesta microglial citotóxica asociada a la patología, hecho que se ve reforzado por el fracaso continuo de las estrategias terapéuticas anti-inflamatorias probadas hasta la fecha en pacientes. Además, se destaca la necesidad urgente de mejorar los modelos murinos existentes para que puedan recapitular todos los aspectos de la AD, incluyendo la degeneración microglial, al fin de aumentar su valor predictivo y poder garantizar el éxito traslacional del laboratorio a la clínica.

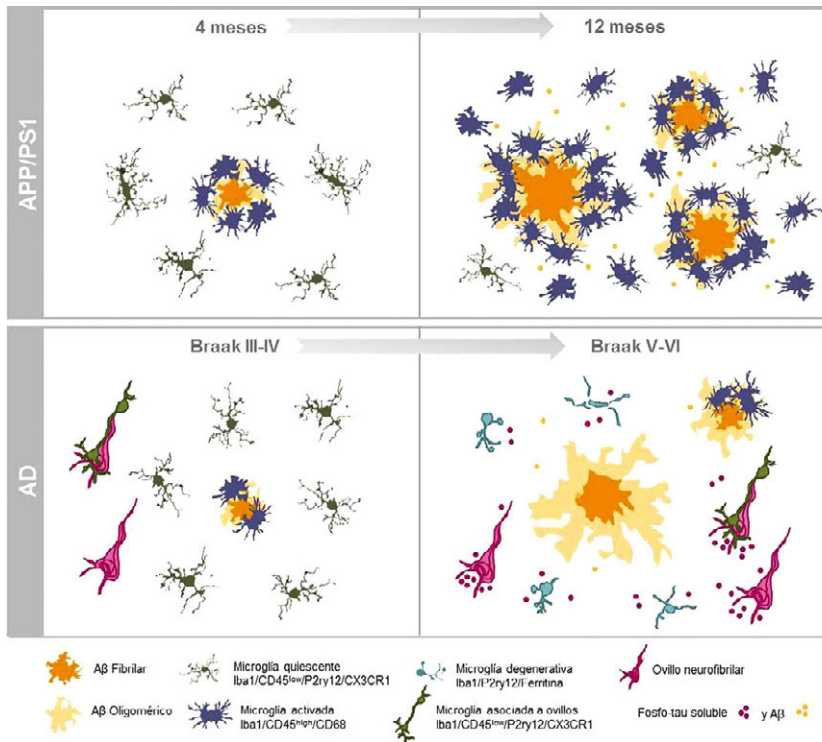


Figura 3. Diferente progresión de la respuesta microglial en el hipocampo de los ratones APP/PS1 y de pacientes. (A) Ilustra la activación microglial en el modelo amiloidogénico a 4 y 12 meses de edad. La microglía activada caracterizada por cambios morfológicos (hipertrofia del cuerpo celular y acortamiento de las prolongaciones), se localiza selectivamente alrededor de las placas amiloides desde etapas tempranas. El aumento de la carga amiloide con la edad conlleva a un incremento de la activación microglial. La acumulación de los oligómeros solubles de Aβ en etapas más avanzadas (12 meses) induce además, la activación de la microglía interplaca en los ratones transgénicos. (B) Ilustra la respuesta microglial durante el curso de la patología de la AD en el hipocampo de las muestras humanas. La acumulación extracelular amiloide es un evento tardío en el hipocampo, a diferencia de lo que ocurre con la patología neurofibrilar, que muestra un inicio temprano. En el hipocampo de individuos Braak III-IV, la microglía reactiva se encuentra limitada a los pequeños acúmulos de Aβ extracelular. Sin embargo, en estadios más avanzados (Braak V-VI), la activación microglial es leve y queda restringida al Aβ. En los casos más severos, las placas amiloides se encuentran desprovistas de células microgliales. El alto contenido de las formas solubles de fosfo-tau (intra y/o extracelular) en el hipocampo de los pacientes induce la degeneración de la microglía. Reproducido de Navarro et al. 2018, *Frontiers in Aging Neuroscience*.

2. Objetivos

En base a los antecedentes descritos y con el objetivo de seguir avanzando en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo y progresión de la patología en muestras humanas post mortem, proponemos **como hipótesis de trabajo**

que la disfunción/degeneración microglial podría estar implicada en el desarrollo/progresión de la AD existiendo diferencias regionales en el cerebro de los pacientes. Este proceso implicaría una desprotección inmunológica del parénquima nervioso, comprometiendo la homeostasis celular y la supervivencia neuronal.

Por tanto, el **objetivo principal** de este proyecto es analizar la respuesta microglial en la corteza frontal, una región cerebral cuyos circuitos se ven gravemente afectados en el Alzheimer y que presenta una elevada carga amiloide, y compararla con los resultados ya recopilados del hipocampo humano. Todos estos datos ayudarán a obtener una mayor comprensión de la respuesta glial en pacientes avanzando así en el conocimiento de los mecanismos patogénicos asociados a la enfermedad, identificando nuevas dianas terapéuticas, e introduciendo mejoras en los modelos animales para que mimeticen en mayor grado la patología humana.

Así, para este estudio proponemos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Realizar una caracterización histopatológica de la progresión de la patología neurofibrilar, producida como consecuencia de la producción y acumulación intracelular de la proteína tau hiperfosforilada (NFTs, NTs, y neuritas distróficas) en la corteza frontal de individuos sin deterioro cognitivo (Braak II) y pacientes con Alzheimer (Braak V-VI).

Para ello se llevará a cabo la técnica inmunohistoquímica para microscopía óptica de campo claro con el anticuerpo AT8 (fosfo Ser199-202, Thr205), específico para fosfo-tau, sobre las muestras *post mortem* de corteza frontal. Con ello se podrán visualizar los agregados neurofibrilares tanto a nivel del soma (en forma de pre-NFTs, NFTs intracelulares y extracelulares) como del compartimento dendrítico/axonal (NTs y neuritas distróficas).

Objetivo 2. Analizar la progresión histopatológica de la patología amiloide, como consecuencia de la acumulación extracelular del péptido β -amiloide en forma de placas seniles, en la corteza frontal de individuos no dementes (Braak II) y pacientes de Alzheimer (Braak V-VI).

Mediante la técnica inmunohistoquímica para microscopía óptica de campo claro empleando el anticuerpo OC, específico para $A\beta$ oligomérico, se analizará, a nivel cualitativo y cuantitativo, la acumulación extracelular de $A\beta$ en las diferentes capas de la corteza frontal. Por otro lado, y mediante inmunohistoquímica doble para $A\beta$ (BAM10, OC) y distrofias (APP, AT8), se estudiará la degeneración neurítica asociada al amiloide y su posible relación espacial con específicos tipos de placas. Por último, se caracterizará la angiopatía amiloide cerebral asociada a la progresión de la enfermedad.

Objetivo 3. Caracterizar la respuesta microglial en la corteza frontal de pacientes durante la progresión de la patología desde fases iniciales (Braak II) a fases avanzadas (Braak V-VI) y compararla con la que tiene lugar en el hipocampo de dichos individuos.

Se determinará el estado de activación y/o posible degeneración de la microglía, así como su patrón de progresión en relación a las patologías neurofibrilar y amiloide mediante técnicas inmunohistoquímicas (microscopía de campo claro y láser

confocal) y técnicas de análisis de imagen computerizado para los estudios morfológicos cuantitativos. Se emplearán marcadores específicos de fenotipo microglial: Iba1, para la población general de microglía; CD45 y CD163, para células microgliales activadas; P2ry12, para la microglía homeostática.

Para llevar a cabo los objetivos indicados, nuestro equipo de investigación dispone de muestras *post mortem* fijadas, crioprotegidas y congeladas de hipocampo y corteza frontal de individuos Braak II (no dementes) e individuos Braak V-VI (pacientes de Alzheimer) procedentes del Banco de Tejidos de la Fundación CIEN (Madrid), del Banco de Tejidos Neurológicos, IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona) y del Hospital Clinic-IDIBAPS (Barcelona), disponiendo del historial neurológico detallado de los pacientes (MMSE, GDS) en este último.

El trabajo propuesto se enmarca en la línea de investigación del grupo, perteneciente al IBIMA y al CIBERNED y los objetivos se encuadran en los proyectos actuales del grupo contando con los permisos éticos oportunos.

Hasta la fecha, las estrategias terapéuticas dirigidas a modular la respuesta inflamatoria en la AD no han tenido éxito en pacientes. Una posible explicación de este fracaso terapéutico posiblemente se basa en la diferencia de la respuesta microglial entre modelos y humanos. Los **resultados esperados** de este trabajo, quieren aportar conocimientos sobre el tipo de respuesta microglial que especulamos se desarrolla de manera diferente según la región del cerebro de pacientes de AD y que actúa como base del proceso degenerativo que subyace a la demencia. Así, con este trabajo se pretende obtener información para desarrollar nuevos modelos animales, o mejorar los ya existentes, que mimeticen mejor la patología de humanos, que sean de gran valor predictivo en estudios preclínicos así como proponer dianas terapéuticas inéditas, para que se desarrollen nuevas estrategias farmacológicas dirigidas a modular la actividad glial y modificar el curso de la enfermedad.

Financiación

Este trabajo se encuentra financiado por el Fono de Investigación Santiarria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III (ISCiii) de España, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Unión Europea, a través del proyecto PI15/00796 (AG); y por el Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) (AG). Durante la realización de este trabajo se está disfrutando además de un contrato Joven Personal Investigador de la Junta de Andalucía dentro del marco del Sistema Nacional de Garantía Juvenil y del Programa Operativo de Empleo Juvenil (MM-O).

Referencias

- WINBLAD B, AMOUYEL P, ANDRIEU S, BALLARD C, BRAYNE C, BRODATY H, et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. *Lancet Neurol.* 2016;15(5):455-532.
- CALDERON-GARCIDUEÑAS AL, DUYNCKAERTS C. Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol.* 2017;145:325-37.
- MASTERS CL, BATEMAN R, BLENNOW K, ROWE CC, SPERLING RA, CUMMINGS JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Prim.* Macmillan Publishers Limited; 2015;1:15056.
- SELKOE DJ, HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med [Internet].* 2016;8(6):595-608.
- CUELLO AC. Early and Late CNS Inflammation in Alzheimer's Disease: Two Extremes of a Continuum? *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(11):956-66.
- HENEKA MT, CARSON MJ, KHOURY J EL, LANDRETH GE, BROSSERON F, FEINSTEIN DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015;14(4):388-405.
- VON BERNHARDI R, EUGENÍN-VON BERNHARDI L, EUGENÍN J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* 2015;7(JUN):1-21.
- GUERRIERO F, SGARLATA C, FRANCIS M, MAURIZI N, FARAGLI A, PERNA S, et al. Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link. *Aging Clin Exp Res.* Springer International Publishing; 2016;1-11.
- MINTER MR, TAYLOR JM, CRACK PJ. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2016;136(3):457-74.
- DÁ MESQUITA S, FERREIRA AC, SOUSA JC, CORREIA-NEVES M, SOUSA N, MARQUES F. Insights on the pathophysiology of Alzheimer's disease: The crosstalk between amyloid pathology, neuroinflammation and the peripheral immune system. *Neurosci Biobehav Rev.* Elsevier Ltd; 2016;68:547-62.
- DRUMMOND E, WISNIEWSKI T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* Springer Berlin Heidelberg; 2017;133(2):155-75.
- SPANGENBERG EE, GREEN KN. Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. *Brain Behav Immun.* Elsevier Inc.; 2016;61:1-11.
- DOENS D, FERNÁNDEZ PL. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation.* 2014;11(1):48.
- CAI Z, HUSSAIN MD, YAN LJ. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci.* 2014;124(5):307-21.
- CONDELLO C, YUAN P, SCHAIN A, GRUTZENDLER J, HAVEN N, HAVEN N. HHS Public Access. 2015.
- SOCHOCKA M, DINIZ BS, LESZEK J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol.* Molecular Neurobiology; 2016;(November):1-19.
- VILLEGAS-LLERENA C, PHILLIPS A, REITBOECK PG, HARDY J, POCOCK JM. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* Elsevier Ltd; 2016;36:74-81.
- COLONNA M, WANG Y. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci.* Nature Publishing Group; 2016;17(4):201-7.
- JIMENEZ S, BAGLIETTO-VARGAS D, CABALLERO C, MORENO-GONZALEZ I, TORRES M, SANCHEZ-VARO R, et al. Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. *J Neurosci.* 2008;28(45):11650-61.
- MORENO-GONZALEZ I, BAGLIETTO-VARGAS D, SANCHEZ-VARO R, JIMENEZ S, TRUJILLO-ESTRADA L, SANCHEZ-MEJIAS E, et al. Extracellular amyloid- β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis.* 2009;18(4):755-76.

21. TRUJILLO-ESTRADA L, DÁVILA JC, SÁNCHEZ-MEJIAS E, SÁNCHEZ-VARO R, GOMEZ-ARBOLEDAS A, VIZUETE M, et al. Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimer's Dis.* 2014;42(2):521-41.
22. JIMENEZ S, NAVARRO V, MOYANO J, SANCHEZ-MICO M, TORRES M, DAVILA JC, et al. Disruption of amyloid plaques integrity affects the soluble oligomers content from alzheimer disease brains. *PLoS One.* 2014;9(12):1-17.
23. KEREN-SHAUL H, SPINRAD A, WEINER A, COLONNA M, SCHWARTZ M, AMIT I, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer 's Disease Article A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer 's Disease. *Cell. Elsevier;* 2017;169(7):1-15.
24. NAVARRO V, SANCHEZ-MEJIAS E, JIMENEZ S, MUÑOZ-CASTRO C, SANCHEZ-VARO R, DAVILA JC, et al. Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Front Aging Neurosci.* 2018;10(May):140.
25. GUTIERREZ A, VITORICA J. Toward a New Concept of Alzheimer's Disease Models: A Perspective from Neuroinflammation. *J Alzheimer's Dis.* 2018;1-10.
26. SANCHEZ-MEJIAS E, NAVARRO V, JIMENEZ S, SANCHEZ-MICO M, SANCHEZ-VARO R, NUÑEZ-DIAZ C, et al. Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol. Springer Berlin Heidelberg;* 2016;132(6):897-916.

Descifrando la contribución patogénica de Abeta y TAU en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer



Juan José Fernández-Valenzuela,* Raquel Sánchez-Varo* y Antonia Gutiérrez

Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga/IBIMA/CIBERNED, Málaga, España.

*Ambos autores han contribuido por igual en este trabajo.

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (AD) empieza a ser considerada como la epidemia del siglo XXI, por ser la demencia más común entre las personas mayores de 65 años en un contexto de continuo envejecimiento de la población y de ausencia de tratamientos eficaces, lo que inevitablemente va asociado a un aumento de su prevalencia. A nivel histopatológico, la AD está definida como una proteinopatía, caracterizada por depósitos extracelulares (placas seniles) formados por la acumulación de péptidos beta-amiloide (Abeta), y por la formación de ovillos intraneuronales neurofibrilares a partir de la proteína tau hiperfosforilada. La coexistencia de ambos agregados proteicos en el cerebro de los pacientes conduce a disfunción sináptica, muerte neuronal, y finalmente al declive cognitivo. Diversos estudios han identificado fallos en el transporte axonal y en las vías de homeostasis proteica, junto con defectos en la respuesta neuroinflamatoria mediada por la glía, como mecanismos patogénicos que participan en la acumulación de Abeta pero que también están presentes en otras demencias como las taupatías primarias. Así, el principal objetivo de este trabajo consiste en clarificar los efectos deletéreos de Abeta y fosfo-tau por separado, con la idea de obtener una mejor comprensión de la contribución diferencial de estos dos agentes tóxicos al proceso neurodegenerativo. Para ello, compararemos la progresión de los procesos antes mencionados en varios modelos murinos de la enfermedad basados en la expresión de genes APP o tau humano mutados utilizando diversas técnicas inmunohistoquímicas y moleculares. De este modo, podrían identificarse nuevas dianas terapéuticas relacionadas con las vías patogénicas de estas dos moléculas, lo que permitiría desarrollar nuevas estrategias neuroprotectoras contra esta devastadora enfermedad.

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (AD) es el tipo de demencia más común en la tercera edad, existiendo en la actualidad 46 millones de afectados a nivel mundial y se podrían superar los 135 millones para el año 2050.¹ La AD consiste en un trastorno neurodegenerativo que cursa con disfunción sináptica y pérdida neuronal progresiva en el sistema nervioso central (SNC). Desde un punto de vista clínico, la enfermedad empieza con una fase "preclínica" asintomática, seguida de una fase "prodrómica" (con deterioro cognitivo ligero o MCI, del inglés *mild cognitive impairment*), y por último una fase de demencia.² La ausencia de terapias que modifiquen su curso natural, junto con el rápido crecimiento de su prevalencia, evidencian la necesidad urgente de encontrar nuevos modelos animales que reproduzcan más fielmente esta enfermedad, así como de profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes. A nivel histopatológico, la AD está definida como una proteinopatía, caracterizada por depósitos extracelulares (placas seniles) formados por la acumulación de beta-amiloide (Abeta) y ovillos intraneuronales neurofibrilares (NFTs, del inglés *neurofibrillary tangles*) formados por la proteína tau hiperfosforilada (fosfo-tau). Ambas proteínas patogénicas, Abeta y fosfo-tau, que se postulan como principales responsables de la pérdida sináptica y de la muerte neuronal selectiva.³⁻⁷ Además, la AD se caracteriza por la presencia de un proceso neuroinflamatorio crónico en el cual están implicadas las células del sistema inmune innato cerebral, microglía y astrogliá.⁸

1.1. Dos actores principales: beta-amiloide y tau

La proteína **Abeta** es un péptido de tamaño pequeño, constituido por 39-43 aminoácidos.⁹ La producción de Abeta es un proceso que ocurre de forma natural, tanto en individuos sanos como enfermos. En condiciones fisiológicas, más del 90% de las especies de Abeta se encuentran como isoforma Abeta40 (soluble) y menos del 5% son Abeta42 (insoluble, con mayor propensión a la agregación). Sin embargo, en la AD ocurre un desequilibrio en el balance producción/eliminación de Abeta (fundamentalmente Abeta42) que provoca su acumulación y agregación, y que en última instancia da lugar a las placas amiloides extracelulares (Fig.1A) que suelen ir acompañadas de otra marca histopatológica típica de la AD, engrosamientos aberrantes de prolongaciones axonales (neuritas distróficas).¹⁰ En la generación de este péptido están implicadas la proteína precursora amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*) y las presenilinas 1 y 2 (PS1, PS2), cuyas mutaciones dan lugar a las formas familiares de la enfermedad (hereditarias y de inicio temprano, 1-5% de los casos).¹¹ Sin embargo, la etiología de la forma más frecuente de la AD, paradójicamente conocida como forma esporádica (asociada al envejecimiento y por tanto de inicio tardío), sigue siendo desconocida.

La proteína **tau** forma parte de las MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos, del inglés *microtubule-associated protein*), muy abundante en neuronas del SNC y también presente, aunque en menor medida, en células gliales.¹² En las neuronas se encuentra principalmente en los axones, donde estabiliza los haces de micro-

túbulos, interviniendo por tanto en el transporte axonal, la polarización neuronal y la axonogénesis, aunque también participa en el ciclo celular y en la protección del ADN, entre otras funciones.^{13,14} En principio, la agregación intraneuronal de tau puede desencadenarse por la presencia de mutaciones responsables de ciertas taupatías (aunque hasta el día de hoy no se han descrito mutaciones en tau responsables directas de la AD) y/o por determinadas modificaciones post-traduccionales, destacando la hiperfosforilación.¹⁵ De un modo u otro, se produce un cambio conformacional en la proteína que pierde su capacidad natural de unirse a las tubulinas. Una vez libre, la proteína tau hiperfosforilada se distribuye por todo el compartimento somatodendrítico (Fig.1B) y se agrega generando pares de filamentos helicoidales (PHFs) que finalmente dan lugar a los NFTs. La acumulación y agregación de tau en ovillos, en comparación con la acumulación de Abeta, correlaciona muy bien con el progresivo deterioro cognitivo característico de la AD.^{16,17} Además, la aparición de estos ovillos sigue un patrón espacio-temporal definido en base al cual se clasifica a los pacientes en los estadios de Braak (I a VI, de leve a severo).

A pesar de todos los avances conseguidos en este campo, aún quedan por esclarecer muchos puntos relevantes, como la contribución diferencial de la acumulación de Abeta y fosfo-tau al proceso patogénico de la enfermedad, su implicación en el proceso de activación glial, o la conexión entre estas dos proteinopatías coexistentes en los pacientes de la AD.

1.2. La hipótesis de la cascada amiloide

En 1992, Hardy y col. propusieron la principal teoría que integra el conjunto de eventos patológicos que desemboca en la demencia, la **hipótesis de la cascada amiloide**¹⁸⁻²⁰ (Fig. 2). Esta teoría, que hoy día sigue vigente (con algunas variantes), postula que el aumento de los niveles de Abeta (provocado por mutaciones, causas no hereditarias, y/o fallos en sus mecanismos de eliminación) contribuiría a su acumulación y posterior agregación en forma de oligómeros tóxicos. Éstos a su vez continúan agregándose en formas fibrilares, precipitando y dando lugar a las placas extracelulares insolubles. Además, los oligómeros de Abeta activarían procesos que conducen a la generación de fosfo-tau, con los consiguientes fallos en el transporte axonal y en la función sináptica, además de su agregación en forma de ovillos intraneuronales. Todos estos procesos inducirían una respuesta inflamatoria por parte de las células gliales, junto con pérdida sináptica y neuronal progresiva e irreversible, causantes del deterioro cognitivo.

Sin embargo, aún quedan por descifrar diversas incógnitas de esta teoría, como las causas que en las formas esporádicas de AD disparan los mecanismos responsables del aumento de los niveles de Abeta, así como su vinculación con la hiperfosforilación patológica de tau y la consiguiente desestabilización de los microtúbulos.

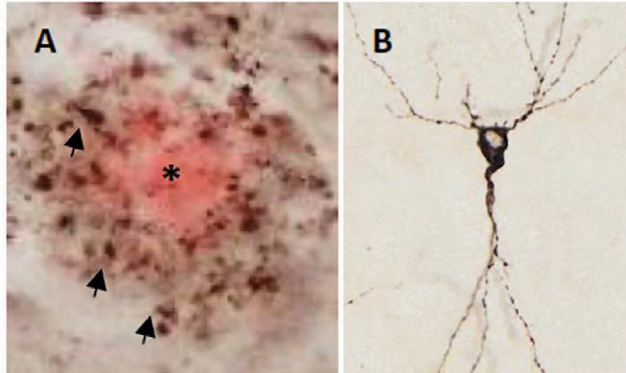


Figura 1. Reproducción de las marcas histopatológicas de la AD en modelos murinos transgénicos. (A) Placa neurítica de Abeta en el modelo de amiloidosis APP/PS1, teñida con rojo congo (*), colorante con afinidad por estructuras en hoja-beta plegada. Alrededor de la placa amiloide se localizan las neuritas distróficas (punteado marron, algunas se indican con flechas), engrosamientos aberrantes de prolongaciones neuronales con acumulación de material de naturaleza proteica y vesicular (tinción inmunohistoquímica para APP). (B) Neurona piramidal de la región CA1 hipocampal con acumulación patológica somatodendrítica de proteína tau hiperfosforilada (anticuerpo AT8) en el modelo de taupatía Thy-Tau22. Barra de escala A-B: 20 μ m.

1.3. El transporte axonal como nexa entre patología neuronal y diana terapéutica en AD

El transporte axonal es un proceso esencial para las neuronas debido a su extrema polaridad y las dimensiones que poseen. Los microtúbulos, polímeros de tubulina, están involucrados en el mantenimiento de la morfología neuronal, la formación de los procesos axonales y dendríticos, y en fenómenos de plasticidad.²¹ Además, son imprescindibles para el tráfico celular constituyendo los "carriles" por los que las proteínas motoras (kinesina, dineína) transportan sus cargos, entre ellos APP.²² Por tanto, destaca su contribución en el mantenimiento del flujo autofágico, así como su relación con la función sináptica, ya que se transportan sustancias desde y hacia las zonas pre- y post- sinápticas (vesículas sinápticas, receptores, proteínas de anclaje, etc.). Obviamente, cuando la comunicación entre el soma y el terminal sináptico se ve comprometida de manera permanente, la sinapsis se torna disfuncional y termina degenerando.

Es importante destacar que la disfunción de este sistema ha surgido recientemente como un factor común en varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la AD. La polimerización, estabilidad y organización de los microtúbulos está regulada por MAPs como MAP-2 o tau. Por tanto, se postula que los fallos en el transporte axonal, como consecuencia de la disfunción microtubular (Fig. 3) tras la hiperfosforilación de tau, contribuirían a la acumulación anómala de vesículas y autofagosomas en el neuropilo, que se acaba engrosando y dando lugar a las neu-

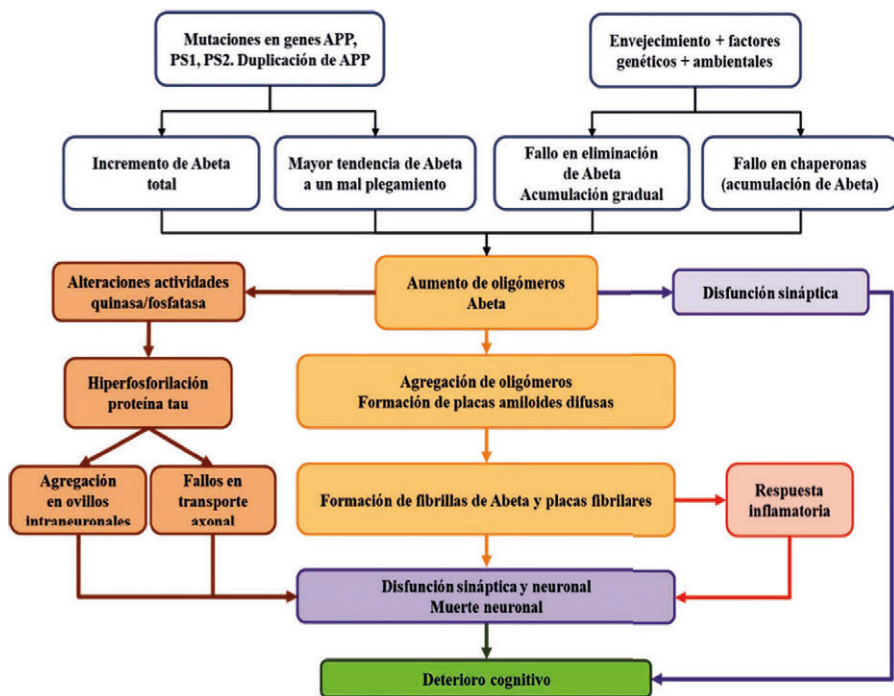


Figura 2. Hipótesis clásica de la cascada amiloide: conectando Abeta y tau. Según esta teoría, el aumento por causas diversas de los niveles de Abeta conduce a su oligomerización y acumulación en forma de placas extracelulares (color amarillo). El Abeta sería el iniciador de diversas cascadas de señalización que tendrían un impacto negativo en la función sináptica y neuronal incluyendo la hiperfosforilación de tau (color marrón), una de las causas de su agregación en ovillos y de fallos en el transporte axonal. Además, se desencadena una respuesta inflamatoria por parte de la glía (color rojo). En conjunto, estos procesos conducen a una disfunción sináptica y muerte neuronal (color morado), y por último al deterioro cognitivo y la demencia (modificado de²⁰)

ritas distróficas. De este modo, las distrofias neuronales constituirían un punto de conexión entre las patologías de Abeta y tau. Además, la acumulación de orgánulos subcelulares involucra a los de la ruta endosomal-lisosomal, que además se sabe que pueden presentar APP en su membrana, aumentando por tanto la probabilidad de que ésta sea procesada para generar Abeta. Así, el neuropilo aberrante sería una fuente adicional de producción de este péptido, generándose un círculo vicioso que conllevaría el crecimiento y formación de más placas.²³

Existe un número creciente de compuestos con los que se persigue restaurar la estabilidad de los microtúbulos²⁴, y así paliar los fallos en el tráfico axonal. Experimentos realizados con modelos murinos transgénicos para TAU humano mutado a los que se ha suministrado el estabilizador microtubular paclitaxel²⁵ demostraron que drogas que ya estaban siendo usadas como tratamientos oncológicos podían ser utilizadas en la AD y otras taupatías. La epotilona D (EpoD) es una de estas mo-

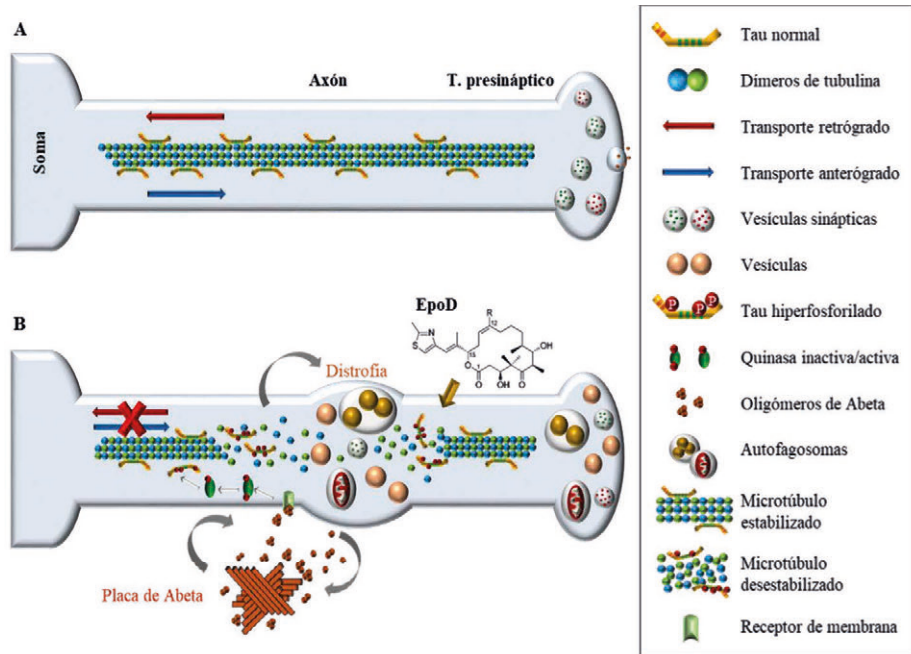


Figura 3. Los fallos en el transporte axonal como punto de conexión entre las patologías de Abeta y tau. En condiciones fisiológicas (A), los microtúbulos se encuentran estabilizados por tau, de modo que el transporte de vesículas y otros componentes celulares transcurre con normalidad entre el soma y el terminal presináptico, a lo largo del axón. En la AD (B), la presencia de Abeta oligomérico activa quininas (por ejemplo, a través de su unión con ciertos receptores) que hiperfosforilan a la proteína tau, la cual se desacopla de los microtúbulos comprometiéndose su estabilidad y el transporte axonal. Como consecuencia, se acumulan mitocondrias, vesículas autofágicas y lisosomas en diversos puntos del axón y los terminales, dando lugar a las neuritas distróficas, que se postulan como puntos de producción de más Abeta, generándose un ciclo de retroalimentación de la patología. Compuestos como la Epotilona-D, estabilizarían la estructura del microtúbulo impidiendo la acumulación de material, así como la restauración del transporte axonal y conexión soma-terminales sinápticos.

léculas, cuyo mecanismo de acción consiste en unirse a la β -tubulina, provocando cambios conformacionales que promueven la estabilización de la estructura.²⁶ La EpoD presenta un perfil farmacocinético y farmacodinámico favorable: es capaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica y mejor que otros compuestos, precisa menor dosis y el tiempo de retención en el tejido nervioso es mayor.²⁷ Los resultados obtenidos en modelos de taupatías²⁸ han demostrado una mejora cognitiva en aquellos que son tratados con EpoD. Además, se ha demostrado su capacidad neuroprotectora en otras enfermedades del mismo tipo como el Parkinson.²⁹ Incluso, otras eptilonas (EpoB) favorecen la reparación axonal.³⁰ Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre el potencial de la estabilización microtubular como diana terapéutica en modelos de amiloidosis.

1.4. El papel de la respuesta neuroinflamatoria en AD

Otro proceso relevante en la enfermedad de Alzheimer es la neuroinflamación, mediada por la activación de células microgliales y astrogliales, que podría realizar un papel neuroprotector o por el contrario provocar daño neuronal mediante la liberación de sustancias citotóxicas.^{26,27} Estas células del sistema inmune innato cerebral, de acuerdo a su función defensiva intrínseca, orquestan una inflamación controlada y rápida (inflamación aguda) frente a una lesión, tratando de recuperar la homeostasis en el parénquima nervioso. Sin embargo, la presencia continuada del agente desencadenante de esta respuesta inmunológica (ej., acumulación de proteínas tóxicas en las enfermedades neurodegenerativas) puede conducir a un estado inflamatorio crónico, con una sobreactivación microglial y astrocitaria que lleva a la producción y liberación de cantidades excesivas de citoquinas proinflamatorias así como de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otras sustancias.³³ Todos estos factores acaban creando un ambiente en el que el estrés oxidativo, la muerte celular, la infiltración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica alterada³⁴ y la degeneración tisular, se van agravando. La visión citotóxica de la activación glial (basada en cambios morfológicos y funcionales) deriva principalmente de datos obtenidos de estudios en modelos amiloidogénicos.

En muestras de pacientes y de modelos de AD, la microglía activada se concentra alrededor de las placas amiloides debido a la capacidad intrínseca del Abeta de atraer a estas células (con alta capacidad migratoria), y de estimular su activación.³⁵ Así, la microglía podría constituir una barrera física frente a la toxicidad de la placa, promoviendo su compactación y aislamiento, evitando su expansión.³⁶ Además, podría participar en la fagocitosis de Abeta oligomérico en un intento de aliviar la carga amiloide cerebral.³⁷ Por otro lado, los astrocitos reactivos también se disponen rodeando las placas amiloides³⁸ y podrían tener un papel protector, aislando a Abeta o incluso participando en su eliminación mediante fagocitosis.³⁹ Por otro lado, se ha demostrado que las células microgliales también son capaces de aumentar su capacidad fagocítica en presencia de formas patológicas de tau y de internalizarlo.⁴⁰

Sin embargo, también se postula que el proceso de envejecimiento afectaría a la efectividad de las células gliales⁴¹, lo que podría influir directamente en su capacidad de reacción frente a la patología en individuos enfermos de edad avanzada, tanto en el tipo de respuesta (neuroprotectora o proinflamatoria) como en su intensidad. En esta línea, resultados previos de nuestro grupo⁴² han demostrado que, durante la evolución patológica de la AD, las células microgliales sufren un proceso degenerativo en tanto que la astroglia podría adoptar un fenotipo proinflamatorio neurotóxico o incluso disfuncional. En este sentido, nuestros datos indican también la presencia, en pacientes con estadios de Braak V-VI (dementes), de factores solubles tóxicos para las neuronas y la microglía (fosfo-tau)³², a los que los astrocitos son totalmente resistentes. Esta toxicidad sobre las células microgliales no se reproduce utilizando fracciones solubles de modelos amiloidogénicos en los que la cantidad de oligómeros de Abeta es elevada. Por lo tanto, estos datos implicarían una contribución diferencial de las formas tóxicas de Abeta y tau al proceso neuroinflamatorio asociado a la enfermedad de Alzheimer.

1.5. Los modelos animales como herramienta para la búsqueda de dianas terapéuticas en la enfermedad de Alzheimer

Actualmente no existen dianas terapéuticas definitivas para el desarrollo de tratamientos efectivos, por lo que la obtención de buenos modelos animales, que reproduzcan la mayoría de los aspectos de la patología, es fundamental para evaluar y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Actualmente, los modelos más empleados en neurociencia son los murinos, y concretamente el ratón se ha convertido en la principal elección por su fácil manejo, crianza y reproducción, así como por su similitud en el genoma y sistema inmune con respecto a los seres humanos. Por ello, se han generado multitud de ratones transgénicos que portan genes humanos (*APP* o *PS1*) con mutaciones que provocan las formas familiares de la AD. Sin embargo, los modelos transgénicos disponibles no parecen reproducir con exactitud la evolución de la enfermedad y la patología de los pacientes.

En este sentido, nuestro grupo de investigación, perteneciente al CIBER de enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED), lleva varios años trabajando en la caracterización de modelos de AD, entre ellos el modelo transgénico murino **APP/PS1** (*APP*_{751SL}/*PS1*_{M146L}). Este ratón doble transgénico presenta depósitos de Abeta desde edades muy tempranas (3-4 meses de edad) en el subículo, hipocampo, y corteza entorrinal, las regiones cerebrales más vulnerables en esta patología y la principales implicadas en los procesos cognitivos.³⁷⁻³⁹ Además, al igual que en los pacientes, se desarrolla una respuesta inflamatoria con activación microglial y astrogial⁴⁰ y neuritas distróficas de origen axonal/sináptico asociadas a las placas amiloides,⁴¹ así como una significativa muerte neuronal de poblaciones GABAérgicas^{37,38,42} y piramidales de corteza entorrinal,³⁸ hipocampo⁴⁵ y subículo.⁴⁹ Por tanto, este modelo presenta muerte neuronal similar a la que ocurre en los pacientes, a diferencia de la mayoría de modelos animales actuales donde existe muy poca o nula pérdida neuronal. Además, aunque no llega a desarrollar NFTs, sí que exhibe acumulación de fosfo-tau en distrofias axonales.

A pesar de que no se ha encontrado ninguna mutación del gen *TAU* en pacientes de AD, hasta el momento su acumulación en forma de ovillos sólo se ha conseguido reproducir en modelos portadores del transgén para la proteína humana con mutaciones causantes de tauopatías, como la demencia frontotemporal. Estos modelos constituyen una herramienta muy útil para estudiar los procesos relacionados con la hiperfosforilación/agregación de tau, la formación de NFTs y los eventos patológicos asociados. Concretamente, el modelo **Thy-Tau22** expresa el transgén humano con las mutaciones G272V y P301S, bajo el promotor *Thy1*.²⁵⁰ y exhibe acumulación patológica de fosfo-tau a partir de 2 meses de edad. Este modelo presenta pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo desde los 12 meses así como una reducción significativa en el número de neuronas colinérgicas en el septum medial.⁵¹ La capacidad cognitiva aparece afectada desde los 6 meses⁵² sin que haya afectación motora como sí le ocurre a la mayoría de modelos de tauopatías. La activación astrogial y microglial se inicia a los 3 meses⁴⁵ apareciendo asociada a las zonas con mayor concentración de fosfo-tau, junto con un aumento progresivo de la infiltración de linfocitos T en la región hipocampal.⁵³

Por tanto, aunque se ha descrito la existencia de respuesta inflamatoria en modelos transgénicos de Abeta y de tau, aún no se comprende bien la relación entre la patología de estas proteínas y la reacción de las células gliales. Nuestro grupo de investigación también trata de profundizar en esta cuestión, pues permitiría identificar dianas terapéuticas de intervención para modular la respuesta glial ante la toxicidad de ambas proteinopatías, y preservar la integridad de los distintos tipos celulares del SNC.

2. Objetivos y resultados esperados

En base a los antecedentes expuestos, planteamos las siguientes **hipótesis de trabajo**:

1. El aumento en las formas tóxicas de Abeta y fosfo-tau incide de manera diferencial sobre la respuesta de las células gliales, así como sobre otros aspectos de la patología, como la disfunción sináptica y neuronal.
2. Los fallos en el transporte axonal, como consecuencia de la fosforilación de tau, están relacionados con el aumento de Abeta y la patología neurítica asociada.

Nuestro estudio se centra principalmente en el hipocampo, por su implicación en los procesos de memoria y aprendizaje, y su afectación temprana en la AD.

Por tanto, **el objetivo principal** de este trabajo consiste en esclarecer la contribución diferencial de las formas tóxicas de las especies de Abeta y tau en la progresión de la enfermedad de Alzheimer, así como la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que puedan tener impacto sobre ambas proteinopatías, mediante el empleo de modelos animales.

Este objetivo se divide en dos **subobjetivos** específicos:

1. Determinar los efectos individuales que las distintas especies de Abeta y tau tienen tanto a nivel sináptico y neuronal, como neuroinflamatorio (actividad de microglía y astrogía) en modelos de amiloidosis y taupatías.
2. Esclarecer la relación entre la disfunción del transporte axonal mediada por fosfo-tau con la patología amiloide y el proceso neurodegenerativo, aplicando un estabilizador microtubular (EpoD) a un modelo amiloidogénico.

Para la consecución del **primer objetivo** se emplearán:

- Modelo de amiloidosis: ratones doble-transgénicos APP_{751SL}/PS1_{M146L} (con las mutaciones de formas familiares de AD *Swedish* (KM595/596NL), y *London* (LV642) en el gen humano APP) de 2 a 18 meses de edad. Estos animales han sido generados y mantenidos en el estabulario de la Universidad de Málaga a partir de los parentales simples transgénicos (suministrados por Sanofi, Francia).
- Modelo de taupatía: ratones simple transgénicos Thy-Tau22 (con las mutaciones G272V y P301S en el transgen humano (Sanofi, Francia), de 2 a 18 meses de edad.
- Controles: ratones de genotipo silvestre, con la misma edad y fondo genético (C57BL/6).

- Modelos transgénicos de AD con disfunción microglial. Actualmente estamos generando nuevos modelos animales APP_{SL} y tau, en algunos de los cuales se está induciendo genéticamente una atenuación de la población microglial mediante cruce con ratones TLR2KO y TLR4KO (TLR, del inglés *Toll-like receptor*). Los nuevos modelos nos permitirán estudiar la repercusión de la eliminación de los receptores microgliales TLR2 y TLR4 sobre la patología amiloide y tau. Estos modelos serán evaluados cognitivamente.

Para la realización del **segundo objetivo**, animales APP/PS1 han sido sometidos a un tratamiento de 3 meses de duración (de 3 a 6 meses de edad) con el estabilizador de microtúbulos Epolitona-D mediante inyecciones intraperitoneales semanales (2 mg/kg; vehículo 50% DMSO). Como controles se usarán animales APP/PS1 tratados con la solución vehículo y animales controles (WT) de la misma edad.

El trabajo propuesto se encuadra en la línea de investigación del grupo, perteneciente al IBIMA y al CIBERNED. Los objetivos se encuadran en los proyectos actuales del grupo contando con los permisos éticos oportunos. Todos los procedimientos que involucren animales vivos se ajustan a los principios éticos de investigación siguiendo las Directivas nacionales y europeas 2010/63/UE de experimentación animal. La investigación se llevará a cabo en las instalaciones del Centro de Experimentación Animal de la UMA de acuerdo con las directrices institucionales para la manipulación de los animales y se harán los máximos esfuerzos para reducir el número y el sufrimiento de los animales. Se seguirá el principio de las 3R, es decir reducir, refinar y reemplazar animales tanto como sea posible.

La metodología a emplear para la consecución de estos objetivos será la siguiente:

Evaluación de la capacidad cognitiva. Una vez los modelos animales alcancen la edad establecida, o al finalizar el tratamiento con EpoD, la función cognitiva será evaluada mediante pruebas que permiten analizar el estado locomotor y exploratorio (prueba del campo abierto); la memoria de reconocimiento con pruebas para identificar el desplazamiento de objetos (*old-location task*, OLT) o su reemplazo por otros nuevos (*novel object recognition*, NOR); la memoria de trabajo (laberinto en Y) y el aprendizaje y la memoria espacial con laberinto acuático de Morris, en el que el animal deberá ser capaz de orientarse valiéndose de claves contextuales diversas.

Procesamiento de las muestras. Los cerebros se dividirán por la línea media, el hemiserebro derecho será fijado con una disolución al 4% de paraformaldehído, se crioprotegerá y seccionará en cortes coronales de 40 micras de grosor con un micrótopo de congelación. Las secciones serán mantenidas a 4°C en una solución de tampón fosfato salino y azida sódica hasta su uso para estudios de histología/inmunohistoquímica (técnica *free-floating*). El otro hemiserebro será diseccionado, y los hipocampos/cortezas cerebrales congelados para su utilización en estudios bioquímicos/moleculares. Los procedimientos han sido descritos previamente por el grupo.²⁴⁻³³

Estudios inmunohistoquímicos. Se emplearán técnicas inmunohistoquímicas (marcaje simple o doble con distintos cromógenos) para microscopía óptica convencional y marcaje inmunofluorescente doble o triple para microscopía confocal.

- Para analizar la progresión de ambas proteinopatías, se usarán anticuerpos específicos que marcan distintas formas de Abeta (Abeta42; OC, formas prefibrilares y oligoméricas) y de tau modificado (AT8, AT100, T22, TauC3).
- Para el estudio de la respuesta inflamatoria asociada a las proteinopatías, se utilizarán marcadores específicos de distintos fenotipos/estados de activación de células microgliales (Iba1, CD68, CD45) y astrogliales (GFAP), tanto de manera individual como combinados en dobles marcajes para microscopía confocal con los marcadores descritos para Abeta y tau.
- La muerte neuronal será analizada mediante marcadores de subpoblaciones neuronales como somatostatina (SOM), neuropéptido-Y (NPY) o parvalbúmina (PV), y la pérdida sináptica mediante marcadores sinápticos generales como la sinaptofisina (Syn, proteína presente en la membrana de las vesículas sinápticas) o específicos de terminales glutamatérgicos (transportador vesicular de glutamato, VGLUT-1), gabaérgicos (transportador vesicular de GABA, VGAT) o colinérgicos (acetilcolinesterasa, ChAT). Los daños axonales se evaluarán usando APP y AT8 como marcadores de neuritas distróficas.
- Se realizarán estudios cuantitativos mediante análisis de imagen con programas informáticos específicos (*Visilog*, *Image J*, *Imaris*) o estereología (*NewCast*).

Estudios bioquímicos. Se realizarán western blots para determinar la carga de Abeta (anticuerpos 6E10, 82E1) y fosfo-tau (AT8, AT100). El análisis de marcadores sinápticos se llevará a cabo por medio de western blot usando anticuerpos para Syn, VGAT, VGLUT-1 y ChAT. Los niveles de expresión de marcadores neuronales y relacionados con la respuesta inflamatoria también serán determinados mediante RT-PCR.

En definitiva, este trabajo pretende analizar el efecto individual de las patologías de Abeta y tau, así como los puntos de intersección entre ambas proteinopatías en la AD, en el hipocampo de modelos animales de amiloidosis (Abeta) y de taupatía (fosfo-tau). Si la desestabilización del citoesqueleto axonal está implicada en el aumento de la producción de Abeta, la progresión de la patología y los déficits cognitivos, entonces las mencionadas alteraciones en estos puntos y la sintomatología asociada deberían ser sensibles a tratamientos con estabilizadores microtubulares como la EpoD. Además, al contrastar los efectos diferenciales de Abeta y tau a distintos niveles, se pretende profundizar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a los efectos tóxicos de ambas proteínas en la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Así, finalmente podremos identificar nuevas dianas terapéuticas que podrían ser susceptibles de entrar en ensayos clínicos con fármacos que ralenticen o detengan el progreso de esta devastadora enfermedad.

Financiación

Este trabajo se realizará con el respaldo de los proyectos FIS-PI15/00796 (AG); FIS-PI15/00957 (JV); PPIT.UMA.B1.2017/26 (para RSV) y con una beca para la Formación de Profesorado Universitario (FPU, JFV) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, cofinanciados por fondos FEDER de la Unión Europea.

Referencias

1. WINBLAD B, AMOUYEL P, ANDRIEU S, BALLARD C, BRAYNE C, BRODATY H, et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. Vol. 15, *The Lancet Neurology*. 2016. p. 455–532.
2. SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETELER MMB, DE STROOPER B, FRISONI GB, SALLOWAY S, et al. Alzheimer's disease. Vol. 388, *The Lancet*. 2016. p. 505–17.
3. CASTELLANI RJ, ROLSTON RK, SMITH MA. Alzheimer disease. Vol. 56, National Institute of Health. Mosby; 2010 Sep.
4. PERL DP. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med*. 2010;77(1):32–42.
5. SERRANO-POZO A, FROSCHE MP, MASLIAH E, HYMAN BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1):a006189.
6. KARCH CM, CRUCHAGA C, GOATE AM. Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. Vol. 83, *Neuron*. NIH Public Access; 2014. p. 11–26.
7. POLANCO JC, LI C, BODEA LG, MARTINEZ-MARMOL R, MEUNIER FA, GÖTZ J. Amyloid- β and tau complexity - Towards improved biomarkers and targeted therapies. Vol. 14, *Nature Reviews Neurology*. 2018. p. 22–40.
8. HENKA MT, CARSON MJ, KHOURY J EL, LANDRETH GE, BROSSERON F, FEINSTEIN DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. Vol. 14, *The Lancet Neurology*. 2015. p. 388–405.
9. MACLEOD R, HILLERT E-K, CAMERON RT, BAILLIE GS. The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Futur Sci OA*. 2015 Nov;1(3):1–16.
10. CREWS L, MASLIAH E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 15;19(R1):R12–20.
11. MUELLER-STEINER S, ZHOU Y, ARAI H, ROBERSON ED, SUN B, CHEN J, et al. Anti-amyloidogenic and Neuroprotective Functions of Cathepsin B: Implications for Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2006 Sep 21;51(6):703–14.
12. WANG Y, MANDELKOW E. Tau in physiology and pathology. Vol. 17, *Nature Reviews Neuroscience*. 2016. p. 5–21.
13. MEDINA M, AVILA J. The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:113.
14. WANG Y, BALAJI V, KANIYAPPAN S, KRÜGER L, IRSEN S, TEPPER K, et al. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener*. 2017;
15. GUO T, NOBLE W, HANGER DP. Roles of tau protein in health and disease. Vol. 133, *Acta Neuropathologica*. 2017. p. 665–704.
16. BRAAK H, BRAAK E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991 Sep;82(4):239–59.
17. NELSON P. T. et al. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012 May ; 71(5) 362–381 doi:10.1097/NEN-0b013e31825018f7. 2013 May;71(5):362–81.
18. HARDY J, HIGGINS G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* (80-). 1992 Apr 10;256(5054):184–5.
19. BARAGE SH, SONAWANE KD. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015 Aug 1;52:1–18.
20. SELKOE DENNIS J. AND HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. Vol. 8, *EMBO Mol Med*. 2016. p. 1409–20.
21. MERRIAM EB, MILLETTE M, LUMBARD DC, SAENGSAWANG W, FOTHERGILL T, HU X, et al. Synaptic Regulation of Microtubule Dynamics in Dendritic Spines by Calcium, F-Actin, and Drebrin. *J Neurosci*. 2013 Oct 16;33(42):16471–82.
22. HIROKAWA N, NIWA S, TANAKA Y. Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. Vol. 68, *Neuron*. Cell Press; 2010. p. 610–38.

23. SCHOLZ T, MANDELKOW E. Transport and diffusion of Tau protein in neurons. Vol. 71, Cellular and Molecular Life Sciences. Springer- Basel; 2014. p. 3139–50.
24. BALLATORE C, BRUNDEN KR, HURYN DM, TROJANOWSKI JQ, LEE VMY, SMITH AB. Microtubule stabilizing agents as potential treatment for alzheimers disease and related neurodegenerative tauopathies. Vol. 55, Journal of Medicinal Chemistry. 2012. p. 8979–96.
25. ZHANG B, MAITI A, SHIVELY S, LAKHANI F, McDONALD-JONES G, BRUCE J, et al. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(1):227–31.
26. BRUNDEN KR, ZHANG B, CARROLL J, YAO Y, POTUZAK JS, HOGAN A-ML, et al. Epothilone D Improves Microtubule Density, Axonal Integrity, and Cognition in a Transgenic Mouse Model of Tauopathy. J Neurosci. 2010;30(41):13861–6.
27. YOSHIYAMA Y, LEE VMY, TROJANOWSKI JQ. Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration. Vol. 84, Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. NIH Public Access; 2013. p. 784–95.
28. ZHANG B, CARROLL J, TROJANOWSKI JQ, YAO Y, IBA M, POTUZAK JS, et al. The Microtubule-Stabilizing Agent, Epothilone D, Reduces Axonal Dysfunction, Neurotoxicity, Cognitive Deficits, and Alzheimer-Like Pathology in an Interventional Study with Aged Tau Transgenic Mice. J Neurosci. 2012;32(11):3601–11.
29. CARTELLI D, CASAGRANDE F, BUSCETI CL, BUCCI D, MOLINARO G, TRAFICANTE A, et al. Microtubule alterations occur early in experimental parkinsonism and the microtubule stabilizer Epothilone D is neuroprotective. Sci Rep. 2013;3:1837.
30. WANG H, XIAO C, DONG D, LIN C, XUE Y, LIU J, et al. Epothilone B Speeds Corneal Nerve Regrowth and Functional Recovery through Microtubule Stabilization and Increased Nerve Beading. Sci Rep. 2018 Feb 8;8(1):2647.
31. DANSOKHO C, HENEKA MT. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2017;1.
32. NAVARRO V, SANCHEZ-MEJIAS E, JIMENEZ S, MUÑOZ-CASTRO C, SANCHEZ-VARO R, DAVILA JC, et al. Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. Front Aging Neurosci. 2018 May 11;10:140.
33. SOCHOCKA M, DINIZ BS, LESZEK J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? Vol. 54, Molecular Neurobiology. Springer; 2017. p. 8071–89.
34. SCHWARTZ M, DECZKOWSKA A. Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. Vol. 37, Trends in Immunology. Elsevier Current Trends; 2016. p. 668–79.
35. HERZ J, FILIANO AJ, SMITH A, YOGEV N, KIPNIS J. Myeloid Cells in the Central Nervous System. Vol. 46, Immunity. Cell Press; 2017. p. 943–56.
36. YUAN P, CONDELLO C, KEENE CD, WANG Y, BIRD TD, PAUL SM, et al. TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. Vol. 92, Neuron. NIH Public Access; 2016. p. 252–64.
37. SERRANO-POZO A, MUZIKANSKY A, GÓMEZ-ISLA T, GROWDON JH, BETENSKY RA, FROSCH MP, et al. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. 2013 Jun;72(6):462–71.
38. MEDEIROS R, LAFERLA FM. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. Vol. 239, Experimental Neurology. Academic Press; 2013. p. 133–8.
39. GARWOOD CJ, RATCLIFFE LE, SIMPSON JE, HEATH PR, INCE PG, WHARTON SB. Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. Vol. 43, Neuro-pathology and Applied Neurobiology. Wiley/Blackwell (10.1111); 2017. p. 281–98.
40. BOLÓS M, LLORENS-MARTÍN M, JURADO-ARJONA J, HERNÁNDEZ F, RÁBANO A, AVILA J. Direct Evidence of Internalization of Tau by

- Microglia in Vitro and in Vivo. *J Alzheimer's Dis.* 2015 Nov 28;50(1):77–87.
41. GALATRO TF, HOLTMAN IR, LERARIO AM, VAINCHTEIN ID, BROUWER N, SOLA PR, et al. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nat Neurosci.* 2017 Jul 3;20(8):1162–71.
 42. SANCHEZ-MEJIAS E, NAVARRO V, JIMENEZ S, SANCHEZ-MICO M, SANCHEZ-VARO R, NÚÑEZ-DÍAZ C, et al. Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol.* 2016 Dec 14;132(6):897–916.
 43. RAMOS B, BAGLIETTO-VARGAS D, RIO JC DEL, MORENO-GONZALEZ I, SANTA-MARIA C, JIMENEZ S, et al. Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 × APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2006;27(11):1658–72.
 44. MORENO-GONZALEZ I, BAGLIETTO-VARGAS D, SANCHEZ-VARO R, JIMENEZ S, TRUJILLO-ESTRADA L, SANCHEZ-MEJIAS E, et al. Extracellular amyloid- β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis.* 2009;18(4):755–76.
 45. TORRES M, JIMENEZ S, SANCHEZ-VARO R, NAVARRO V, TRUJILLO-ESTRADA L, SANCHEZ-MEJIAS E, et al. Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.* 2012 Nov 22;7(1):59.
 46. JIMENEZ S, BAGLIETTO-VARGAS D, CABALLERO C, MORENO-GONZALEZ I, TORRES M, SANCHEZ-VARO R, et al. Inflammatory Response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL Mouse Model of Alzheimer's Disease: Age-Dependent Switch in the Microglial Phenotype from Alternative to Classic. *J Neurosci.* 2008;28(45):11650–61.
 47. SANCHEZ-VARO R, TRUJILLO-ESTRADA L, SANCHEZ-MEJIAS E, TORRES M, BAGLIETTO-VARGAS D, MORENO-GONZALEZ I, et al. Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.* 2012;123(1):53–70.
 48. BAGLIETTO-VARGAS D, MORENO-GONZALEZ I, SANCHEZ-VARO R, JIMENEZ S, TRUJILLO-ESTRADA L, SANCHEZ-MEJIAS E, et al. Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid- β pathology in PS1/A β PP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimer's Dis.* 2010;21(1):119–32.
 49. TRUJILLO-ESTRADA L, DÁVILA JC, SÁNCHEZ-MEJIAS E, SÁNCHEZ-VARO R, GÓMEZ-ARBOLEDAS A, VIZUETE M, et al. Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimer's Dis.* 2014;42(2):521–41.
 50. SCHINDOWSKI K, BRETTEVILLE A, LEROY K, BÉGARD S, BRION JP, HAMDANE M, et al. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol.* 2006;169(2):599–616.
 51. BELARBI K, SCHINDOWSKI K, BURNOUF S, CAILLIERE R, GROSJEAN M-E, DEMEYER D, et al. Early Tau pathology involving the septo-hippocampal pathway in a Tau transgenic model: relevance to Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2009;6(2):152–7.
 52. JEUGD A VAN DER, AHMED T, BURNOUF S, BELARBI K, HAMDAME M, GROSJEAN ME, et al. Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;95(3):296–304.
 53. LAURENT C, DOROTHÉE G, HUNOT S, MARTIN E, MONNET Y, DUCHAMP M, et al. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain.* 2017;140:184–200.

CUARTA PARTE:

Crónica del
Workshop

El proceso de la carcinogénesis

Alberto Muñoz

Instituto de Investigaciones Biológicas, CSIC/UAM, Madrid

Alberto Muñoz Terol es uno de los investigadores españoles de mayor prestigio internacional en la actualidad. Se graduó en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid obteniendo el premio extraordinario de licenciatura y se doctoró en el centro de biología molecular CSIC-UAM, obteniendo también el premio extraordinario de doctorado. Ha realizado numerosas estancias en instituciones internacionales, entre ellas, el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), en Heidelberg (Alemania) y el Karolinska Institutet, en Estocolmo (Suecia). A lo largo de su carrera investigadora, ha participado en diferentes líneas de investigación de índole muy variada: desde el mecanismo de acción del interferón humano, hasta el estudio del papel de la vitamina D en el cáncer de colon y mama, pasando por el estudio de la biología de los genes *erbA* y hormona tiroidea en cáncer y sistema nervioso central y el antagonismo entre glucocorticoides y otras hormonas con receptores nucleares. Actualmente, es profesor del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Resumen

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación excesiva y descontrolada de células que invaden y dañan tejidos y órganos, pudiendo llegar a provocar la muerte de los individuos afectados. Todos los cánceres tienen una causa genética, aunque muy pocos son hereditarios; la mayoría de ellos son esporádicos.

El proceso de carcinogénesis comienza cuando en una célula normal se desregula crecimiento o la apoptosis. La masa tumoral prolifera adquiriendo un crecimiento notorio, lo cual se denomina tumor benigno primario. A partir de cierto volumen, el tumor requiere la formación de nuevos vasos sanguíneos, y es entonces cuando comienza el proceso de angiogénesis para el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos. Algunas células tumorales pueden romper la matriz extracelular que rodea al epitelio, produciéndose la disgregación del tumor y la invasión de tejidos adyacentes, y, finalmente, la llegada a la circulación sanguínea para diseminarse hacia otras partes del cuerpo.

Una característica importante de las células cancerosas es su inestabilidad genética, que puede producirse a nivel de las estructuras cromosómicas o en las secuencias

de ADN. La inestabilidad cromosómica se debe a fallos en el control del ciclo celular, produciéndose una segregación irregular de los cromosomas o el acortamiento de los telómeros. La inestabilidad en las secuencias de ADN se atribuye a fallos en los sistemas de reparación, provocando esto la acumulación de mutaciones puntuales.

Los telómeros actúan como mecanismo protector de la degradación de los cromosomas, por lo que su acortamiento tras divisiones sucesivas provoca el envejecimiento celular. Estos son elongados por la telomerasa únicamente en la etapa fetal y, cuando se deterioran, la proteína p53 es la encargada de reconocer este fenómeno y dirigir las células hacia un proceso de senescencia y muerte celular. En un gran número de tumores, se da una sobreexpresión de la telomerasa, lo cual impide a las células entrar en senescencia.

La cromotripsis es el fenómeno por el cual se producen una gran cantidad de reordenamientos cromosómicos en un único evento catastrófico. La acumulación de un gran número de mutaciones puntuales en ciertas regiones del genoma se conoce como *kataegis*, del griego, tempestad, debido al parecido de las gráficas de mutaciones a una lluvia.

El análisis de exones ha permitido observar la gran diversidad existente en las mutaciones que se producen en los tumores, aunque la mayor parte de los genes tumorigénicos son proteínas quinasas o factores de transcripción. Las técnicas de secuenciación masiva desarrolladas en los últimos años (*Next Generation Sequencing*, NGS) han permitido realizar análisis multiplataforma incluyendo muestras de un número considerable de pacientes, pudiendo observarse así las firmas genéticas y rutas alteradas en los diferentes tipos de cáncer y ayudando a la asignación de tratamientos. Estos estudios han revelado un curioso hecho: la presencia de ADN mitocondrial en el ADN nuclear de las células tumorales. Además, se han encontrado múltiples copias de ADN circulares en el ADN tumoral, por lo que el efecto patológico podría deberse a la repetición de copias de los oncogenes.

En el avance de la investigación del cáncer, el concepto de mutación, concebido hasta la fecha como una alteración en la secuencia de ADN que da lugar a una alteración en la secuencia aminoacídica de la proteína resultante, se ve falseado al ver que las mutaciones sinónimas pueden alterar el reconocimiento de proteínas de *splicing*.

El análisis de los tumores en investigación biomédica procede del tumor primario. Al secuenciar diferentes regiones de este y compararlas con una biopsia de metástasis, se observa que las mutaciones existentes son distintas no solo entre el tumor primario y la metástasis, sino entre las distintas regiones existentes en el tumor primario. Esto lleva a pensar que las mutaciones individuales no son tan importantes como las rutas alteradas en las células cancerosas.

Más del 80% de los tumores que se desarrollan en humanos son carcinomas. El inicio de carcinoma implica que las células epiteliales se separan, degradan la matriz extracelular y adquieren capacidad de migración. El proceso comienza con la transición epitelio-mesénquima, donde se producen cambios en las uniones célula-célula y en las uniones célula-matriz. La E-cadherina es una proteína esencial para la unión de las células epiteliales y se pierde en las etapas iniciales de los carcinomas. Existen muchos estímulos que inducen esta transición, siendo TGF- β uno de los más importantes.

Para atravesar la lámina basal, son necesarias unas proteínas denominadas proteasas. Estas no solo aumentan la capacidad invasiva, permitiendo a las células tumorales alcanzar el torrente circulatorio, sino que pueden degradar parcialmente factores de crecimiento de la matriz extracelular, produciendo su activación. Una vez en el torrente circulatorio, las células tumorales no viajan solas, sino que forman agregados que les aportan una mejor protección frente al líquido en movimiento y frente al sistema inmune.

Para explicar el proceso de metástasis, existen dos teorías. La primera de ellas, conocida como *seed and soil*, propone que los tejidos expresan algún producto génico que los hace más receptivos para distintos tipos tumorales. La segunda teoría, conocida como teoría anatomomecánica, afirma que la metástasis se produce cuando hay un capilar lo suficientemente pequeño para que una célula tumoral quede atrapada. Estas teorías no son excluyentes. Algunos estudios han mostrado que es posible predecir el lugar en el que un tumor va a producir metástasis por su patrón de mutaciones. En este fenómeno, parece haber una modulación cuantitativa de las vías de señalización o cualitativa por cambios epigenéticos, pero en las metástasis no hay presentes mutaciones que no estuvieran en el tumor primario. Existen también modelos de acondicionamiento del nicho metastásico que proponen la preparación de los lugares donde va a tener lugar la metástasis por parte del tumor, mediante la secreción de factores solubles o exosomas.

Al igual que en el caso de la metástasis, existen varios modelos para explicar la progresión tumoral. El modelo de Darwin se basa en que las mutaciones puntuales aportan a una clona celular una ventaja evolutiva que permite su selección para continuar proliferando. Existe un segundo modelo basado en los errores de los sistemas de reparación del ADN y un tercero basado en la inestabilidad cromosómica de las células tumorales.

Los tumores no están constituidos únicamente por células tumorales, sino que son heterotípicos. El 70% de las células de un tumor son fibroblastos asociados a tumores (CAFS). El conjunto de las células y otros factores acompañantes de los tumores se ha denominado microambiente tumoral. Entre las células tumorales y los fibroblastos, se produce un cruce de señales que inducen el cambio de estos últimos a CAFS, que, a su vez, segregan factores que malignizan a las células tumorales.

Otro factor conocido que conduce al desarrollo del cáncer es la inflamación crónica, debido a la abundancia de células del sistema inmune y acumulación de macrófagos, con la consiguiente producción de sustancias proinflamatorias. La inmunoterapia está dirigida a activar los sistemas efectoros del sistema inmune para combatir el cáncer. Los tumores secretan factores inhibidores, como TGF- β , y proteínas que desactivan linfocitos, como PD-1. Una terapia actual fundamentada en este proceso se basa en anticuerpos frente a PD-1 o PD-1L. Estos son los conocidos inhibidores de los puntos de control inmune.

Las células troncales del cáncer, llamadas equívocamente células madre, son las propuestas como el origen de las células tumorales por la acumulación de sucesivas mutaciones. Las células troncales no son un tipo celular, sino un estado plástico, por lo que es muy difícil encontrar dianas terapéuticas para su destrucción. Aunque la

cantidad de mutaciones presentes en un tumor es muy grande, existe una mutación conocida como *driver* o conductora, responsable definitiva del desarrollo del tumor. Estas mutaciones consisten en alteraciones determinadas en rutas complejas y su identificación es de gran importancia para el avance en la cura de esta enfermedad.

Regulación metabólica del crecimiento y la función vasculares

Michael Potente

Max Planck Research Group Leader, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany

Michael Potente es cardiólogo y dirige el Laboratorio de Angiogénesis y Metabolismo del Instituto Max Planck en Nauheim, Alemania. Su grupo de investigación combina la investigación cardiovascular básica con la práctica clínica, estudiando el desarrollo y crecimiento de los vasos sanguíneos y cómo la vasculatura cambia durante el envejecimiento y la enfermedad. Este grupo cuenta con numerosas publicaciones científicas, muchas de ellas en revistas de alto impacto, como *Nature*, *Cell* o *Science*. En esta conferencia, Michael Potente plantea cómo los mecanismos metabólicos subyacentes dentro de las células endoteliales controlan el crecimiento, el mantenimiento y la función de los vasos sanguíneos.

Resumen

Existen numerosos estudios recientes que han resaltado la importancia de la regulación metabólica en el endotelio y los mecanismos de regulación que impulsan el proceso angiogénico. Las proteínas FOXO, que son factores de transcripción, constituyen uno de los reguladores centrales del metabolismo y el crecimiento endotelial y puede desempeñar más papeles de los conocidos actualmente en el endotelio.

En el embrión, la formación de nuevos vasos sanguíneos se produce mediante vasculogénesis, un proceso en el que se reclutan angioblastos y se forman las llamadas islas sanguíneas. En adulto, por el contrario, se da el proceso de angiogénesis, la formación de vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes mediante la adaptación metabólica. Las células endoteliales (EC), como consecuencia de la demanda energética, adaptan su metabolismo y comienzan a trabajar como si se encontrasen en condiciones de hipoxia. De esta forma, las células sanguíneas angiogénicas utilizan el piruvato para convertirlo en lactato y generar ATP rápidamente, permitiendo la provisión de nucleótidos, aminoácidos y lípidos. Por otro lado, la vía PI3K da lugar a la activación de AKT, que fosforila al factor de transcripción FOXO, inhibiéndolo. FOXO participa en el crecimiento, la resistencia al estrés y el metabolismo anabólico, por lo que la eliminación de FOXO1 en EC es letal para los embriones. La morfogénesis también se ve afectada al alterar de forma selectiva FOXO: su sobreexpresión favo-

rece la quiescencia vascular, inhibiendo la angiogénesis, mientras que su inhibición da lugar a la hiperplasia de muchos órganos.

FOXO1, que se expresa en arterias, venas y capilares, inhibe la glucólisis y la captación de glucosa y reduce la actividad mitocondrial, disminuyendo la producción de ROS y favoreciendo la quiescencia metabólica. FOXO1 antagoniza la vía de MYC, que participa en el metabolismo anabólico, el crecimiento y la proliferación. Mediante la inhibición de MYC, FOXO1 impide la proliferación y crecimiento de las EC. La sobreexpresión de MYC produce hiperplasia linfática, por lo que FOXO1 funciona como un punto de control en la regulación metabólica y la proliferación de las EC.

Existen otros factores de la familia FOXO con funciones interesantes. FOXO3 y 4 son esenciales para el desarrollo de las EC y las redes vasculares en adulto. Estos factores no se expresan en gran cantidad, por lo que su delección no afecta al fenotipo de la red vascular en gran medida. El triple KO de FOXO exagera el fenotipo de FOXO1, produciendo malformaciones vasculares e, incluso, tumores, por lo que FOXO1 es el factor más importante en el control de la formación de la red vascular, aunque necesite la contribución de los otros dos.

Combustible y aceite del motor del cáncer

Arkaitz Carracedo

IKERBASQUE, investigador ERC, Universidad del País Vasco, España

Arkaitz Carracedo es Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid. Es el investigador principal del grupo CIBERONC en el CIC BioGUNE y profesor asociado en la Universidad del País Vasco. Cuenta con una amplia experiencia adquirida en prestigiosos centros de investigación de Europa y Estados Unidos, y es experto en biología celular del cáncer y en la identificación de dianas terapéuticas en esta enfermedad. Su investigación se centra en el estudio de la contribución de la reprogramación metabólica en la biología celular del cáncer y la implicación de las rutas de señalización en la regulación del metabolismo del cáncer, con especial énfasis en el cáncer de próstata.

Resumen

El metabolismo es importante en el cáncer porque en las células tumorales se producen alteraciones que les permiten crecer más rápido, adaptarse al medio y remodelar el entorno secretando metabolitos. La adaptación metabólica es esencial para la supervivencia de las células tumorales.

En el cáncer de próstata, uno de los más prevalentes en hombre, los niveles de *PTEN* se ven reducidos en un 70% de los casos. La función no catalítica de *CK1 α* produce la estabilización de *PTEN*, que activa la expresión de *ATG7* dependiente de *FOXO3A* y estimula la autofagia supresora de tumores. En ratones, se ha demostrado que la pérdida de un alelo de *PTEN* conduce al desarrollo del cáncer y la pérdida de los dos alelos da lugar a metástasis.

Es posible estudiar el metabolismo a través de aproximaciones mediante programas transcripcionales sin necesidad de analizar los metabolitos producidos. En los tumores, las rutas de la metionina y las poliaminas se encuentran sobreactivadas. Estas últimas son esenciales para el crecimiento de las células tumorales y regulan una gran cantidad de funciones. En estado tumoral y pretumoral, los principales metabolitos producidos son los pertenecientes a la ruta de las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) y la metionina.

La expresión de *AMD1* es también esencial para el crecimiento de las células tumorales; al eliminarlo, las células no pueden crecer. *AMD1* se sobreexpresa incluso antes del proceso canceroso. Está regulado por la vía de *mTORC1* y los tratamientos de inhibición de esta vía producen un descenso de los niveles de poliaminas. *In vivo*, se ha comprobado que el 60% de casos de cánceres humanos presentan reducción de

los niveles de poliaminas ante este tratamiento; el porcentaje restante de pacientes carecen de AMD1. No obstante, hay otras rutas relacionadas con la producción de poliaminas, por lo que las células tumorales tienen más mecanismos para aumentar los niveles de estos compuestos.

La aproximación transcriptómica permite identificar reguladores claves de las fuentes de energía de las células tumorales. De 23 correguladores metabólicos identificados, PGC1 α es el único candidato relacionado con el progreso del cáncer. Este coactivador coordina el metabolismo oxidativo y los pacientes con una expresión disminuida presentan más riesgo de recurrencia. En ratones KO para PGC1 α , se observó un aumento de la metástasis. Para determinar si PGC1 α puede bloquear la metástasis, se sobreexpresó en ratones con cáncer de próstata metastásicos, obteniéndose como resultado la detención de los procesos metastásicos. El mecanismo de actuación propuesto para PGC1 α es la inhibición del anabolismo y la capacidad invasiva mediante la inducción de ERR α , un regulador negativo de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, PGC1 α no tiene el mismo efecto en todos los tipos de cáncer, debido a las diferencias entre nichos y orígenes celulares, por lo que es necesario realizar estudios específicos para determinar si puede ofrecer posibilidades terapéuticas en otros tipos tumorales.

C01. La reprogramación metabólica. Prefacio del *workshop*

Miguel Ángel Medina Torres

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, España

Miguel Ángel Medina es Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga (1985) y Doctor en Ciencias Biológicas por la misma Universidad (1989). En 1990 se convierte en profesor ayudante doctor LRU de la Universidad de Málaga, pasando a ser profesor titular en 1995. Desde 2009 es catedrático de Bioquímica y Biología Molecular. Dirige los grupos de Angiogénesis y Sistemas Metabólicos en dicho departamento. Es autor de más de 250 publicaciones científicas indexadas, la mayor parte en el cuartil primero (Q1) dentro de su área correspondiente.

Resumen

El metabolismo consiste en una compleja red formada por numerosos componentes que interaccionan entre sí en vías diferentes. Los sistemas vivos se encuentran alejados del equilibrio e intercambian información constantemente con el medio en el que viven. El metabolismo vivió su primera era dorada en los años 20-30 del siglo XX, época en la que Warburg recibió el premio Nobel por su descubrimiento del modo de acción de la enzima respiratoria. En el contexto de la oncología, Warburg descubrió que las células tumorales pueden crecer mediante fermentación incluso en condiciones oxigénicas, es decir, pueden realizar glucólisis aerobia, lo que se conoce como “efecto Warburg”. A partir de esta idea, sugirió una nueva posibilidad para combatir el cáncer: evitando la provisión de oxígeno y nutrientes en las células tumorales.

La segunda era dorada se dio en los años 60-70, con contribuciones significativas de científicos como Peter Mitchell, Calvin o Lehninger. Los años 70 dieron paso a la era oscura de los estudios metabólicos, debido al genocentrismo que invade a la biología. Este panorama se mantiene hasta los años 90, tras los cuales tiene lugar, hasta hoy en día, la nueva era dorada del metabolismo y la bioenergética. Con el uso de la tecnología de la tomografía de emisión de positrones (PET) en oncología clínica a finales de los 90 y el redescubrimiento del efecto Warburg, comienzan a encontrarse relaciones de causalidad entre el metabolismo y el cáncer. Debido a ello, la reprogramación metabólica se convierte en una de las características distintivas del cáncer descritas por Hanahan y Weinberg.

El cáncer es una enfermedad muy compleja que engloba a cientos de enfermedades. Las células tumorales se encuentran junto a otras células acompañantes formando el llamado microambiente tumoral; todos los tipos celulares del microambiente tumoral se ven afectados por la reprogramación metabólica: células endoteliales, macrófagos, fibroblastos, etc. Pero la reprogramación no solo es una característica distintiva del cáncer, sino un proceso que permite a los organismos vivos responder a los cambios en el medio externo e interno. Esto permite entender que exista una estrecha relación entre metabolismo y una gran cantidad de enfermedades diferentes, y constituye una razón de peso para analizar el papel que cumple en el desarrollo de éstas.

CO2. La coordinación de la energía y el metabolismo de las poliaminas en el neuroblastoma humano

Francisca M. Sánchez Jiménez

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, España

Francisca M. Sánchez Jiménez es Doctora en Ciencias por la Universidad de Málaga (1984). Realizó estancias posdoctorales en la Universidad Católica de Roma y la Universidad de California, de las cuales importó el uso de las técnicas de Biología Molecular más punteras en aquella época. Hasta el año pasado (cuando se jubiló anticipadamente), fue catedrática del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga. Su investigación se ha desarrollado en el campo de la biomedicina, de la oncología y de las enfermedades raras. Ha dirigido el grupo de "Sistemas Metabólicos" de la Universidad de Málaga y formado parte de una unidad del Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (www.ciberer.es). Su producción científica ha generado más de 150 trabajos científicos y ha dirigido cerca de dos decenas de tesis doctorales.

Resumen

Las poliaminas son moléculas simples, pero esenciales para la viabilidad y proliferación de los organismos vivos. Entre sus funciones, se puede destacar que se unen al ADN y cambian su estructura 3D, estabilizándolo; modifican la síntesis de ADN, ARN y proteínas y se utilizan como coadyuvantes en nanotecnología en terapias génicas. Además, se unen a la membrana celular y pueden cambiar su forma y dar lugar a interacciones con el material genético, proporcionando un ambiente adecuado para las reacciones necesarias para el origen de la vida.

Las poliaminas están implicadas en una gran variedad de procesos importantes en las células tumorales, como la proliferación, la diferenciación, la síntesis, la apoptosis, etc., por lo que su metabolismo puede constituir una diana para el tratamiento del cáncer. La regulación del metabolismo de las poliaminas es muy robusta. La principal enzima implicada en su síntesis *de novo* es la ornitina descarboxilasa (ODC), cuya expresión está regulada por miembros de la familia Myc. La enzima espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT) es la enzima clave para su degradación. Los mecanismos que permiten el transporte de poliaminas no se conocen con exactitud, pero es muy probable que la dinámica de membranas esté implicada en la regulación de dicho transporte. La robustez del metabolismo de las poliaminas y la falta de conocimiento acerca de los transportadores son los mayores retos actuales para poder llegar a controlar los niveles de poliaminas en las células tumorales.

Se han descrito algunos inhibidores de la síntesis de poliaminas, entre los que destaca la α -difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor irreversible específico de la ODC. Se utiliza como agente quimiopreventivo en terapias combinadas para el cáncer de colon y para reducir la expresión de *MYCN* y el metabolismo glucolítico en el neuroblastoma pediátrico. Este último es el tumor sólido extracraneal más frecuente en niños, que presenta amplificación del oncogén *MYCN* en más del 25% de los casos y se asocia a fracaso del tratamiento y mal pronóstico. La inhibición de la glucólisis con DFMO puede dar lugar a eventos de señalización que conducen a la reducción de los niveles de la proteína N-Myc y, posteriormente, de ODC y los niveles de poliaminas, dando lugar a un bloqueo del ciclo celular que culmina con la muerte celular.

El diálogo existente entre la glucólisis y la síntesis de las poliaminas puede dar lugar a nuevas formas de tratamiento mediante terapias combinadas dirigidas contra estas rutas metabólicas. Estas estrategias terapéuticas podrían ser efectivas en el tratamiento de tumores que expresan N-Myc, como es el caso del neuroblastoma pediátrico. Por tanto, el metabolismo de las poliaminas constituye un objeto de estudio interesante para el desarrollo de nuevas terapias antitumorales y debe ser considerado al hablar de reprogramación metabólica en el cáncer.

C03. El tejido adiposo marrón como estrategia terapéutica contra los desórdenes relacionados con la obesidad

María Calderón Domínguez

Facultad de Farmacia, Universidad CEU San Pablo, Madrid, España

María Calderón es Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga (2009). Durante el período de licenciatura fue alumna interna en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica (2006-2009). Entre los años 2010 y 2012 trabajó en la Universidad de Virginia (Estados Unidos) estudiando el papel de StarD4 y StarD5 en el metabolismo del colesterol. En 2013 obtuvo el título de Doctora en Biología Celular y Molecular por la Universidad de Málaga. Posteriormente realizó una estancia postdoctoral en la Universidad de Barcelona, estudiando el papel del tejido adiposo como diana terapéutica en obesidad. Actualmente, trabaja en la Universidad CEU San Pablo (Madrid) con la misma línea de investigación de estancia postdoctoral.

Resumen

La obesidad es una enfermedad que ha alcanzado el carácter de epidemia mundial y está asociada a una gran cantidad de patologías que pueden llegar a suponer un problema grave para la salud: diabetes, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, etc. El papel del tejido adiposo blanco en esta enfermedad ha sido ampliamente estudiado, ya que el síndrome metabólico está íntimamente relacionado con el aumento de dicho tejido.

El tejido adiposo pardo, relegado a un segundo plano durante mucho tiempo, ha sido objeto de estudio en los últimos años, debido al descubrimiento de su actividad termogénica, su alta capacidad de oxidación de sustratos y la disminución de sus niveles en los pacientes con obesidad o diabetes. Estas características convierten al tejido adiposo pardo en una interesante diana terapéutica para tratar la obesidad, ya sea mediante el aumento de su actividad o mediante el aumento de su masa y estado de diferenciación.

La generación de líneas inmortales de tejido adiposo pardo ha permitido comprobar que este aumenta la oxidación de ácidos grasos. Además, el trasplante de este tejido en ratones obesos aumenta su capacidad de respiración mitocondrial, por lo que el aumento de tejido adiposo pardo en pacientes con obesidad puede constituir un tratamiento efectivo para esta enfermedad.

C04. La inhibición de la síntesis de ácidos grasos *de novo* induce la diferenciación en neuroblastoma

Maria Victoria Ruiz Perez

Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC), Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia

Maria Victoria Ruiz Pérez es Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga (2008) y doctora en Biología Celular y Molecular por la misma Universidad (2013). Desde enero de 2015, es investigadora postdoctoral en el Departamento de Microbiología, Biología Celular y Tumoral del Instituto Karolinska, en Suecia. Su investigación gira en torno al estudio del metabolismo tumoral, con especial énfasis en el metabolismo lipídico y su control por el gen *MYC*.

Resumen

El neuroblastoma es el tumor sólido no encefálico más frecuente en niños. La mitad de estos tumores están presentes desde el nacimiento y se diagnostican mayoritariamente en niños menores de 5 años. En España, se registran unos 100 casos de neuroblastomas al año, la mayoría en niños. La causa del tumor se desconoce en la actualidad y es objeto de estudio de muchos grupos de investigación, aunque la genética tiene un peso importante en su desarrollo.

Más del 25% de los niños con neuroblastoma presentan aberraciones en el gen *MYCN*, un protooncogén que codifica la proteína N-Myc, un factor de transcripción. N-Myc participa en vías de señalización que promueven el crecimiento celular, la proliferación y el metabolismo de células progenitoras en diferentes órganos y tejidos en desarrollo. La desregulación de su señalización puede ser la causa principal del neuroblastoma y otros cánceres que ocurren en edad adulta. Por tanto, *MYCN* puede constituir una diana terapéutica para el tratamiento de estos tumores.

Existen estudios recientes que demuestran que la síntesis *de novo* de ácidos grasos se encuentra activada en las células tumorales del neuroblastoma. En el estudio presentado en este *workshop*, se utilizaron 5 inhibidores de ácidos grasos diferentes que redujeron la expresión de *MYCN*. La inhibición de la síntesis de ácidos grasos cambió la morfología de la mitocondria y redujo su metabolismo, aumentando la glucólisis como forma de compensación. Además, la retirada de lípidos exógenos indujo la diferenciación de células neuronales, debido al aumento de la fosforilación de ERK1/2. Por tanto, estos inhibidores de la síntesis de ácidos grasos actúan desregulando la expresión de *MYCN* e induciendo la diferenciación neuronal de una forma específicamente relacionada con el metabolismo de los lípidos, mostrando efectos antitumorales prometedores *in vivo*.

C05. La proteína transportadora de colesterol STARD5 como nueva diana en las células madre tumorales

Daniel Rodríguez Agudo

Departamento de Medicina Interna/Gastroenterología, Virginia Commonwealth University, EE. UU.

Daniel Rodríguez Agudo es Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga y Doctor en Ciencias Biológicas por la misma Universidad (2003). En 2003, comenzó su estancia postdoctoral en el Departamento de Medicina Interna de la Virginia Commonwealth University, en Virginia, EE. UU. Estando en dicha Universidad, en 2008, consiguió una beca de la Sociedad Americana del Corazón y se convirtió en profesor asociado. Desde ese momento, también dirige su propio grupo de investigación, centrado en el papel de los transportadores de colesterol y su papel en determinados tipos de patologías, como el cáncer de colon.

Resumen

El metabolismo del colesterol puede estar íntimamente relacionado con el cáncer. El aumento de SREBP-2, un factor de transcripción que favorece la síntesis de proteínas como la HMG-CoA reductasa, es una señal oncogénica. El 27-hidroxicolesterol (27-HC) se une al receptor de estrógeno y provoca crecimiento tumoral en cáncer de mama. En general, los niveles de colesterol son altos en cáncer, aunque es un factor que varía de un paciente a otro dependiendo de su estilo de vida.

STARD5 es un transportador que pertenece a la familia de proteínas con dominio START (de transferencia de lípidos relacionado con StAR). Esta proteína une colesterol y lo transloca a la membrana plasmática, evitando así su acumulación intracelular. En macrófagos, se expresa constitutivamente y se encuentra en el citoplasma, aunque su expresión se induce por situaciones de estrés. La taspigargina, que estabiliza el ARNm de STARD5, aumenta aún más la cantidad de colesterol en la membrana. En respuesta al estrés, aumenta la expresión de STARD5 y la síntesis de colesterol en el RE. En los tumores, se da un aumento tanto de los niveles de STARD5 como de otros transportadores de colesterol.

Utilizando la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9, el grupo de Daniel Rodríguez generó ratones STARD5 *-/-*. En ellos, disminuye el colesterol de la membrana plasmática, el flujo de colesterol en macrófagos y el transporte reverso de colesterol por macrófagos, y aumentan los lípidos neutrales. En el 70% de los tumores, se produce un aumento de la expresión de STARD5, incluidos los tumores de colon, lo cual puede observarse en los esferoides ricos en células troncales de cáncer de colon, independientemente de su variante genética y estatus tumoral. En los tumores de hígado, también aumenta STARD5, posiblemente, de forma específica, y α -FP. Ante un

knock-down de STARD5, se forman menos esferoides en células HT-29 y el colesterol de su membrana plasmática se reduce, por lo que se vuelve más fluida y disminuye la actividad de factores de crecimiento en los esferoides. Como consecuencia, el colesterol se acumula en otros compartimentos. Si vuelve a expresarse STARD5, se recuperan los esferoides. En tumores de colon, el *knock-down* de STARD5 conduce a una reducción del 70% del tamaño del tumor. Además, eliminar el gen de STARD5 vuelve a las células de cáncer de colon más susceptibles a los quimioterapéuticos. En definitiva, los inhibidores de STARD5 constituyen buenos agentes quimioterapéuticos porque reducen el colesterol de la membrana plasmática, inhiben a las colonosferas y carecen de toxicidad sobre las células madre normales del colon.

C06. Lipemia postprandial e hipoxia tisular

Pedro Valdivieso Felices

UGC Medicina Interna, Hospital Virgen de la Victoria. IBIMA. Universidad de Málaga, España

Pedro Manuel Valdivielso Felices se licenció en Medicina y trabaja actualmente en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga. Es catedrático del Departamento de Medicina y Dermatología en la Universidad de Málaga. También pertenece al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), dirigiendo el grupo "Arterioesclerosis, Prevención Cardiovascular y Metabolismo".

Resumen

La enfermedad arterial periférica (PAD) es una forma de arteriosclerosis. El riesgo de sufrir PAD se puede evaluar mediante el índice tobillo-brazo y se observa que una mayor presión en los tobillos que en los brazos produce un dolor al caminar que desaparece tras 1-2 minutos de descanso. Esta enfermedad es común en individuos que presentan diabetes. La mayoría de las enfermedades arteriales periféricas son asintomáticas.

La arteriosclerosis guarda una estrecha relación con los niveles de lipemia postprandial. En los pacientes de diabetes tipo II, se da un aumento de ApoB48 en plasma, en situación de ayuno y postprandial, por lo que existe una relación entre la ApoB48 y la PAD.

Investigando la relación entre PAD y diabetes, se encontró que la lipoproteína lipasa (LPL) toma ácidos grasos de vesículas de grasa en un complejo proceso. La LPL es inhibida por ANGPTL4; cuando se produce esta inhibición, se da una menor captación de ácidos grasos. Los pacientes con PAD, aunque sean asintomáticos, sufren de cierta isquemia y, por tanto, de hipoxia, lo que conduce a la activación del factor inducible por hipoxia (HIF- α), que aumenta la expresión de ANGPTL4. Esto conduce al bloqueo de la LPL, de forma que aumenta la lipemia postprandial, detectada mediante el marcador ApoB48. Como consecuencia del bloqueo de LPL, se produce un cierre de las arterias en los pacientes con PAD. Para revertir estos efectos, es necesario realizar una revascularización, de forma que se potencia la actividad de LPL y bajan los niveles de triglicéridos libres y de ANGPTL4.

C07. Descifrando la disfunción neuronal y glial en la enfermedad de Alzheimer: de los mecanismos a las oportunidades terapéuticas

Antonia Gutiérrez Pérez

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. IBIMA. CIBERNED, España

Antonia Gutiérrez Pérez es Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Málaga (1991) y realizó su especialización postdoctoral durante tres años en Estados Unidos, período tras el cual regresó a la Universidad de Málaga con un contrato de reincorporación, consiguiendo plaza como profesora titular un año después (1995). Es catedrática de Biología Celular en la Universidad de Málaga desde el año 2011. Desde 2003, dirige un grupo de investigación biomédica sobre la enfermedad de Alzheimer y desde 2007, es investigadora principal de una unidad de trabajo del Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Asimismo, es Investigadora Responsable del Grupo NeuroAD de la Junta de Andalucía (CTS-950), que forma parte de IBIMA, así como miembro de diferentes asociaciones relacionadas con la neurociencia y revisor científico para numerosas revistas internacionales del área.

Resumen

El Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa causante de demencia más prevalente en la actualidad, que supone un gran impacto económico y social, debido a la inexistencia de buenas herramientas diagnósticas y de un tratamiento efectivo. La hipótesis amiloide sitúa al β -amiloide ($A\beta$) como agente iniciador de la patología, pero los sucesivos fracasos en el desarrollo de tratamientos basados en esta diana han provocado la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos, por ejemplo, en la respuesta inflamatoria que se da por parte de la astrogliá y la microglía, que contribuye a la pérdida sináptica y neuronal.

En contraposición a la hipótesis de agregación de $A\beta$, en los últimos años, ha cobrado fuerza la hipótesis de la neuroinflamación para explicar la neurodegeneración. En una situación de inflamación crónica, se acaban produciendo citoquinas proinflamatorias que dan lugar a la muerte neuronal, al menos, en los modelos animales estudiados. El grupo de Antonia desarrolló un modelo de ratón que reproducía de la forma más fielmente posible la enfermedad con el objetivo de estudiar el proceso de neuroinflamación, identificar nuevos biomarcadores y evaluar nuevos tratamientos.

La microglía se activa durante el transcurso de la enfermedad, adquiriendo un fenotipo patológico disfuncional. Cuando se forman las placas amiloides, la microglía

parece formar una barrera que las rodea para proteger al parénquima cerebral de la toxicidad, función que se pierde conforme la enfermedad progresa. Esto da lugar al crecimiento de las placas y, finalmente, a la muerte neuronal. El hipocampo es el área más afectada por la enfermedad, razón por la que los pacientes presentan pérdidas de memoria. Los estudios de este grupo han concluido que la gran activación microglial observada en los modelos animales no se corresponde con los resultados observados en humano, donde la activación de la microglía observada en cerebros *post mortem* es muy baja. Además, las células microgliales observadas presentan características patológicas. En los casos más severos, las placas amiloides ni siquiera están cubiertas por microglía. El uso de fármacos antiinflamatorios en estos casos es inútil, ya que las dianas de estos fármacos ni siquiera están presentes en el parénquima.

C08. La incorporación mediada por exosomas de triptasa de los mastocitos al núcleo de las células de melanoma regula la expresión de microARN, el corte de las histonas y la proliferación

Gunnar Pejler

Departamento de Bioquímica Médica y Microbiología, Universidad de Uppsala, Suecia

Gunnar Pejler, es investigador en la Universidad de Uppsala en Suecia, en el Departamento de Bioquímica Clínica y Microbiología, donde dirige un grupo de investigación cuyo campo de estudio es el papel de los mastocitos en diversas enfermedades inflamatorias, así como los mecanismos de formación de los gránulos de secreción de los mastocitos y la función de los componentes de dichos gránulos, en particular, proteasas y proteoglicanos.

Resumen

En los procesos alérgicos, se da la degranulación de los granulocitos. Los mastocitos están llenos de lisosomas de secreción y cuando se produce su liberación, salen de su interior sustancias inflamatorias que pueden dar lugar a un shock anafiláctico. Estos gránulos acumulan aminas biogénicas (incluidas poliaminas), citoquinas, enzimas lisosomales, proteasas específicas, proteasas no específicas, proteoglicanos, etc. Una de las enzimas encontradas en los gránulos es la triptasa, una proteína tetramérica con cuatro sitios activos en el poro central que requiere heparina para su activación. La triptasa es resistente a los inhibidores fisiológicos de proteasas por tener los centros activos en el poro central de la proteína.

Los mastocitos se asocian a muchas enfermedades, aunque también pueden desempeñar funciones protectoras en situaciones patológicas. En pacientes de cáncer, los niveles de mastocitos aumentan, acumulándose en el estroma del tumor y en el propio tumor. Hay estudios que indican que afectan al desarrollo de este, pero no existe una asociación clara a un buen o mal pronóstico. Para comprobar el papel de las proteasas de los mastocitos, este grupo generó un modelo de ratón KO sin quimasa, triptasa ni carboxipeptidasa A3 y comprobaron el efecto de estas alteraciones en el melanoma pulmonar, observándose más puntos afectados en los ratones KO que en los *wild-type*, además de alteraciones genéticas relacionadas con el melanoma. Por tanto, la función de las proteasas en este modelo es protectora.

Para comprobar el efecto de la triptasa sobre la expresión de genes de melanoma, cultivaron triptasa humana purificada con células de melanoma humana y observaron que el número de células de melanoma disminuía tras la incubación. La triptasa se introducía en las células de melanoma por endocitosis y se translocaba al

núcleo, produciendo la regulación negativa de dos oncogenes: *SNORA80E* y *EGR1*. Comprobaron, además, que la triptasa incorporada procedía de exosomas secretados por las propias células de melanoma. A estos exosomas, que contienen ADN en su superficie, se une la triptasa que se libera de los mastocitos cuando estos degranulan. De esta forma, son los propios exosomas liberados por las células de melanoma los que vuelven a entrar en ellas ya cargados de triptasa, demostrándose una vez más la función protectora de esta enzima.

C09. Landscape de la regulación de las células endoteliales en la hipertensión arterial pulmonar

Armando Reyes-Palomares

European Molecular Biology Laboratory, unidad SBC, Heidelberg, Alemania

Armando Reyes-Palomares es Licenciado en Biología y Doctor en Ciencias por la Universidad de Málaga (2014) con una tesis centrada en el desarrollo de modelos de redes para analizar las relaciones genéticas y fenotípicas en enfermedades raras. Ha realizado estancias predoctorales en The Max Delbrück Center for Molecular Medicine (Berlín, Alemania) y en el Biomedicum (Helsinki, Finlandia). En 2015, se incorporó como investigador postdoctoral en el *European Molecular Biology Laboratory* (Heidelberg, Alemania), becado por la Fundación Ramón Areces. Actualmente, su investigación se centra en generar nuevos métodos de análisis epigenéticos para estudiar cambios en la regulación de genes en enfermedades como la leucemia o la hipertensión pulmonar arterial.

Resumen

La hipertensión arterial pulmonar (PAH) es una enfermedad cardiovascular rara caracterizada por anomalías estructurales en las arterias de los pulmones provocadas por un exceso de proliferación de las células vasculares e inflamación. Estas alteraciones provocan un aumento de la presión sanguínea en las arterias pulmonares, generando una patología de pronóstico pobre.

El objetivo del investigador Armando Reyes-Palomares y su grupo consistía en estudiar los perfiles epigenéticos de las células endoteliales afectadas de las arterias pulmonares (sPAECs) en un grupo de pacientes que padecen PAH, así como en un control de individuos sanos. Realizaron también una aproximación multi-ómica para integrar diversos fenotipos moleculares tales como la modificación de histonas (H3K27ac, H3K9me3, H3K9me1), la expresión génica (mediante RNA-seq) y las interacciones de la cromatina. Esta integración multinivel permitió descubrir dominios de la cromatina que están completamente potenciados o inhibidos en la PAH, incluyendo la regulación de varios genes relacionados con la remodelación vascular. Estos dominios reguladores de la cromatina supusieron la base para la construcción de una red comprensible de regulación génica que permitiera entender los mecanismos moleculares y las vías responsables de los cambios en las sPAECs durante la progresión de la enfermedad.

Los resultados presentados sugieren que se dan cambios epigenéticos en las actividades de los factores de transcripción y que ocurre una reorganización de la cromatina causada por el daño que provoca la hipertensión. Teniendo esto en

cuenta, Armando mostró cómo las marcas de la cromatina pueden utilizarse para estudiar cómo diferentes programas de factores de transcripción activan genes que se encuentran reprimidos con el fin de producir una respuesta de PAH diferencial ante un estímulo.

C10. La reprogramación de la expresión de transposones en cáncer

Manuel Gonzalo Claros Díaz

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España

Manuel Gonzalo Claros Díaz es Doctor en Ciencias, Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid y, actualmente, Catedrático del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Resumen

Los transposones son elementos móviles muy abundantes en el genoma humano. En ocasiones, pueden saltar y situarse dentro o cerca de un gen, por lo que la desregulación del movimiento de los transposones supone un problema de inestabilidad genómica. Cuando una célula se transforma en tumoral, la represión de los transposones disminuye, con lo que aumenta esta inestabilidad genómica.

Empleando una línea celular con un transposón muy expresado en muchos cánceres, Manuel Gonzalo analizó la expresión en cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y en adenocarcinoma pulmonar, comparando tejidos sanos y tumorales del mismo paciente, utilizando un algoritmo informático basado en "RepEnrich".

En primer lugar, observaron que el transposón no presentaba una regulación disminuida en SCLC. Al comparar la expresión en células de adenocarcinoma con células normales, observaron que había tres transposones algo más expresados en células normales y claramente regulados negativamente en adenocarcinoma pulmonar. Comparando la expresión en ambos cánceres, se observó que la reprogramación es mayor en SCLC que en adenocarcinoma pulmonar, destacando la expresión diferencial de dos transposones: LTR7B y LTR9C. Además, se encontró que los dos únicos transposones reprimidos en ambos cánceres son LTR18B y MER126, que podrían constituir marcadores tumorales.

Al estudiar el cáncer de próstata, se encontraron 5 transposones sobreexpresados, uno de ellos (HERV) asociado al proceso carcinogénico. El transposón LINE-1, muy expresado en muchos cánceres humanos y previamente relacionado con el cáncer de próstata, se encuentra reprimido en SLCL y sobreexpresado en adenocarcinoma pulmonar y en células escamosas.

Por tanto, la reprogramación de los transposones es muy heterogénea y no puede explicar la inestabilidad genómica en el cáncer. Los transposones son elementos altamente regulados en el cáncer, pero el conocimiento de la magnitud de

esta reprogramación es aún dependiente de un algoritmo bioinformático, dada su naturaleza repetitiva. Además, es el entorno genómico de los transposones el impulsor de la reprogramación de su expresión, y no los propios transposones.

C11. La implicación del metabolismo del cáncer de mama triple negativo en la respuesta a la terapia neoadyuvante

Aurelio Moya García

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, España

Aurelio Moya García es Licenciado en Química por la Universidad de Málaga (2001), donde también obtuvo el grado de Doctor en Biología Molecular (2007). Ha sido investigador postdoctoral del Centro de Investigación Biomédica de Enfermedades Raras (CIBERER) hasta 2017 y ha realizado una estancia postdoctoral en el University College London, desde 2014 a 2016. Su investigación se centra en usar el modelado de redes para encontrar alteraciones genómicas en enfermedades raras.

Resumen

En tumores muy agresivos, puede no haber respuesta a la quimioterapia normal. Para tratar estos tumores, es necesaria otra solución; por ejemplo, la quimioterapia neoadyuvante, que consiste en la administración de agentes terapéuticos antes del tratamiento normal. Esta terapia se utiliza en algunos cánceres de mama. Las células de cáncer de mama modifican su metabolismo celular para responder a las necesidades de supervivencia, proliferación e invasión, y esta reprogramación influye en la respuesta a la quimioterapia. La terapia neoadyuvante no solo es útil para aumentar el número de pacientes que pueden ser tratados con las terapias clásicas; también lo es para investigar la sensibilidad y la resistencia a agentes terapéuticos. Las células tumorales inducen estrés oxidativo en los tumores, pero también lo sufren, por lo que necesitan protegerse a sí mismas de él. Este fenómeno es aprovechado en el tratamiento neoadyuvante de algunos cánceres de mama.

Las alteraciones genómicas en diferentes células del cuerpo dan lugar a la formación de gran variedad de tipos de cáncer y todos los tumores tienen una patología y una biología diferentes. El proyecto Pan-Cancer analiza las similitudes y diferencias en las alteraciones genéticas y celulares de los distintos tipos de cáncer, de forma que se haga posible encontrar estrategias de tratamiento específicas para cada uno de ellos. La biología de sistemas estudia los sistemas biológicos como un conjunto y busca determinar las interacciones dinámicas entre los componentes de éstos. En terapia neoadyuvante, se utiliza para ayudar a encontrar las estrategias terapéuticas óptimas en cada caso, teniendo siempre presente el hecho de que los genes no están solos, sino agrupados y asociados bajo una misma condición patológica. Se pueden encontrar lazos de conexión entre los módulos topológico, funcional y patológico, y analizando estos tres aspectos, es más probable encontrar una terapia que pueda resultar efectiva.

C12. La medicina de sistemas aplicada a la identificación de asociaciones genotipo-fenotipo en pacientes con enfermedades genéticas raras

Juan Antonio García Ranea

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, España

Juan Antonio García Ranea es Doctor en Ciencias Biológicas por el Centro Nacional de Biotecnología [2001]. Sus estudios postdoctorales los realizó en el University College of London desde 2001 a 2007 (*Senior Research Fellow*). Actualmente, forma parte del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Málaga como profesor titular. Su línea de investigación se centra en la biología molecular de sistemas, concretamente en el estudio de las variaciones genómicas y genéticas de diferentes patologías entre las que se encuentran diversos tipos de enfermedades raras.

Resumen

Los progresos realizados en los últimos años en el campo de la genética y el descenso paulatino del precio de la secuenciación de genomas han dado lugar al comienzo de una nueva era en la biología, conocida como era post-genómica, a pesar de que las interacciones caracterizadas experimentalmente rondan el 10%, quedando aún un 90% por definir. Al realizar diagnósticos clínicos sobre determinadas patologías, es necesario tener en cuenta que solo se conoce una pequeña parte subyacente de éstas. Esto es algo particularmente relevante en las enfermedades raras, en las que la identificación de regiones genómicas afectadas y la asociación a fenotipos patológicos es compleja.

Una forma de abordar este tipo de problemas es analizar cómo interaccionan los elementos de las redes génicas entre ellos, de forma que se pueda predecir la función de cada uno de ellos y llevar a cabo predicciones. La biología de sistemas, a diferencia de las aproximaciones reduccionistas de la biología molecular clásica, propone un enfoque holístico para entender los procesos biológicos, alejado de la visión “un gen-una función”.

Ante la gran cantidad de datos existente en la medicina genómica, es fundamental el paso de extracción e interpretación de éstos en el camino al entendimiento de los sistemas de estudio. Para llevar a cabo esta tarea, el grupo de Juan Antonio García Ranea, en su estudio de enfermedades raras, utiliza información procedente de DE-CHIPER (Database of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) para construir redes que permitan establecer sistemas de predicción para asociar alteraciones genotípicas a los fenotipos patológicos.

C13. ¿Pueden los estándares ayudar al desarrollo de la metabolómica?

Ismael Navas Delgado

Lenguajes y Sistemas Computacionales, Departamento de Lenguajes y Ciencias de la Computación, Universidad de Málaga, España

Ismael Navas Delgado terminó su Doctorado en Ciencias de la Computación en la Universidad de Málaga en 2009. Es un investigador cuyos intereses principales son la Web Semántica, la Integración de Datos, los Datos Vinculados y las aplicaciones Big Data a las ciencias de la vida. Ha intervenido en proyectos sobre análisis de Big Data, así como en el diseño de una plataforma para la Exploración de Datos Vinculados en Biología de Sistemas, entre muchos otros proyectos.

Resumen

Ante la gran cantidad de datos y recursos existentes en la web relacionados con el metabolismo hoy en día, es común preguntarse qué fuentes utilizar a la hora de comenzar un trabajo en este campo. Para tomar esta decisión, es necesario comenzar por la exploración de las distintas bases de datos para intentar encontrar la información que pueda resultar de mayor utilidad para el propósito del estudio, siguiendo los enlaces a las bases de datos que son de interés para la investigación. Una vez se han encontrado las fuentes y datos de utilidad, es importante saber utilizar y analizar tales datos, y para ello, existen estándares relacionados con distintas vías, pero al realizar una búsqueda de bases de datos en un navegador como Google, se pueden encontrar estándares diferentes que incluyen elementos que no permiten la comparación entre ellos. La solución a esto para por la colaboración de las distintas bases de datos y el uso de una misma nomenclatura, y ya existen algunas propuestas en este sentido para estandarizar el acceso o la descarga de información en las bases de datos. *Biopax*, por ejemplo, es una herramienta estándar que integra información procedente de distintas bases de datos, siendo estas mismas las que traducen su información para que *Biopax* pueda utilizarla. Al trabajar con bases de datos que han traducido su información a *Biopax*, se garantiza una pérdida mínima de información; sin embargo, al utilizar bases de datos que no emplean el formato de *Biopax*, se puede perder gran cantidad de información y desvirtuarse por completo el estudio. Por tanto, es necesario el trabajo conjunto de los propietarios de las distintas bases de datos para alcanzar una unificación que facilite el trabajo a los investigadores y permita realizar investigaciones más productivas con la gran cantidad de datos almacenados en la web.

C14. Aeroplisinina-1: una visión integradora

Beatriz Martínez Poveda

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga

Beatriz Martínez Poveda es Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga (2002) y doctora por la misma Universidad (2007), con un trabajo centrado en la caracterización de componentes naturales con potencial antiangiogénico. Realizó una estancia postdoctoral en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (Madrid), centrándose en el estudio de la hipoxia y las terapias antiangiogénicas, usando para ello técnicas de imagen *in vivo*. En 2009, comenzó una segunda estancia postdoctoral en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid), trabajando en la caracterización molecular de enfermedades cardiovasculares, con contribuciones significativas en el campo de la estenosis y la calcificación de la válvula aórtica, aterosclerosis y en la no compactación del ventrículo izquierdo. Desde el 2015 a 2018, la Doctora Martínez Poveda ha trabajado como profesora sustituta interina en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica en la Universidad de Málaga, y como investigadora postdoctoral en proyectos relacionados con la angiogénesis tumoral y la inflamación. En la actualidad es profesora ayudante doctor.

Resumen

La aeroplisinina-1 es un compuesto procedente de una esponja marina (*Aplysina aerophoba*) del mar Mediterráneo. En esta especie, presenta una actividad protectora, y en humanos, se ha demostrado que tiene una actividad pleiotrópica, incluyendo actividad antitumoral, angiogénica, antibiótica y antiinflamatoria. *In vitro*, previene la formación de estructuras tubulares, es decir, inhibe la angiogénesis. *In vivo*, a bajas concentraciones, se ha visto que inhibe la angiogénesis, mientras que, a altas concentraciones, induce la apoptosis de las células endoteliales por la vía intrínseca, ya que inhibe la fosforilación de AKT y la de Erk en las células endoteliales. Su actividad antiinflamatoria se debe a la inhibición que produce de moléculas proinflamatorias, como TSP-1, COX-2 y MCP1, entre otras.

La vía de señalización de NF- κ B participa en proliferación, angiogénesis, inflamación y apoptosis, por lo que es interesante comprobar si existe algún efecto de la aeroplisinina-1 sobre esta vía. En este sentido, se observó que el compuesto podría inhibir NF- κ B interviniendo a nivel de receptor o en la translocación al núcleo.

Debido al *crosstalk* que existe entre la vía de NF- κ B y AKT, descrito en el proceso de angiogénesis y en arteriosclerosis y otras enfermedades, la aeroplisinina-1 podría constituir un buen tratamiento para la arteriosclerosis y otras enfermedades relacionadas con el endotelio por su actividad antiangiogénica y antiinflamatoria, en las dosis adecuadas para no activar la apoptosis.

C15. El papel de la oxidación de los cuerpos cetónicos en la linfangiogénesis y su posible relevancia en el linfedema

Melissa García Caballero

Laboratorio de Angiogénesis y Metabolismo Vascular, VIB-KU Leuven Center for Cancer Biology (CCB), Departamento de Oncología, KU Leuven, Bélgica

Melissa García-Caballero es Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga y doctora por la misma Universidad (2013). Tras una primera estancia postdoctoral como contrada Marie Curie en el grupo de la doctora Agnes Noël (Liege University, Bélgica), se encuentra en estos momentos realizando su segunda estancia postdoctoral en el grupo del doctor Peter Carmeliet (VIB, Lovaina, Bélgica), estudiando la relación entre el metabolismo y el proceso de linfangiogénesis.

Resumen

Los vasos linfáticos están formados por células endoteliales linfáticas y son muy importantes en funciones tales como la homeostasis, el transporte de líquidos o la inflamación. Por tanto, tanto el exceso como el defecto de linfangiogénesis están relacionados con la aparición de distintas patologías. El exceso de vasos linfáticos está relacionado con procesos metastásicos e inflamatorios, y el defecto, con el linfedema, un edema producido por la obstrucción de los vasos linfáticos. El proceso de linfangiogénesis era, hasta hace poco, totalmente desconocido.

Los vasos linfáticos tienen la vía glucolítica disminuida y, por el contrario, presentan una alta oxidación lipídica. El factor de transcripción Prox1 induce la expresión de la carnitina palmitoiltransferasa-1, lo cual da lugar a la metabolización, en la mitocondria, de ácidos grasos a acetil-CoA, un intermediario clave en la diferenciación de células endoteliales. La suplementación con acetato, una fuente alternativa de acetil-CoA, potencia la linfangiogénesis *in vivo*, por lo que presenta un gran potencial para el tratamiento del linfedema.

Una alternativa al acetil-CoA distinta al acetato son los cuerpos cetónicos, como el β -hidroxibutirato, metabolizado rápidamente a acetil-CoA en las células endoteliales linfáticas. La concentración de cuerpos cetónicos es mayor en la linfa que en el plasma sanguíneo; en una dieta normal, esta concentración es de 0,5 mM. Con las dietas cetogénicas, que consisten en una alta ingesta de lípidos y pocos carbohidratos, se puede aumentar esta concentración. Esto puede potenciar la linfangiogénesis sin provocar ningún efecto colateral en la angiogénesis, por lo que es una dieta segura que puede utilizarse en algunos tratamientos.

El silenciamiento de la 3-oxoácido CoA-transferasa 1 (OXCT1), una enzima clave en la oxidación de cuerpos cetónicos, mediante pequeños ARN muestra una reducción de la proliferación de células endoteliales linfáticas mediante la reducción de la respiración basal y la función mitocondrial de producción de ATP. Además, el silenciamiento afecta al reabastecimiento de ácidos tricarboxílicos, reduce la expresión de marcadores linfáticos y pone de manifiesto cambios epigenéticos: no afecta a la acetilación, pero sí aumenta la metilación de las histonas. La reducción de los niveles de α -cetoglutarato, un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, provoca la inhibición de las demetilinasas, por lo que las histonas permanecen metiladas, lo cual está asociado a la represión transcripcional.

En modelos ratón con linfedema en la cola alimentados con dieta cetogénica, se observó una mejora de la función linfática y de la capacidad de drenaje. Por tanto, la dieta cetogénica es una potencial estrategia de tratamiento para los pacientes con linfedema, ya sea hereditario o adquirido.

C16. Adaptación metabólica del tumor a la hipoxia inducida por la terapia antiangiogénica

Nor Eddine Sounni

PhD, LBTD, GIGA-Cancer, ULiege, Bélgica

El Doctor Nor Eddine Sounni es Investigador principal del F.R.S (Fonds de la Recherche Scientifique)-FNRS y del Departamento de Ciencias Preclínicas y GIGA Cancer, en la Universidad de Lieja, Bélgica. Recibió su Doctorado en Ciencias Biomédicas (Universidad de Lieja), en el laboratorio de Agnes Noel y Jean-Michel Foidart en 2004. Completó su beca postdoctoral 2005-2007 en Biología del Cáncer en la Universidad de California, San Francisco, en el laboratorio de Lisa Coussens, donde estuvo investigando el papel de la matriz extracelular y las MMP en la permeabilidad de los vasos y el suministro de fármacos en tumores sólidos. En 2005, el Doctor Sounni recibió el prestigioso premio internacional Henny C. Dirven de la Universidad de Leiden, Países Bajos, por su trabajo sobre el papel de las MMP en la progresión del cáncer de mama. En 2008, se unió al Laboratorio del Profesor Alex Strongin en el Instituto Burnham de Investigación Médica, La Jolla, California, donde investigó el papel de las proteasas de la superficie celular en la migración de células cancerígenas. Desde que se unió a la Universidad de Lieja, en 2009, el doctor Sounni centra su investigación en el metabolismo de la biología vascular y la biología vascular del microambiente tumoral.

Resumen

El tratamiento del cáncer con antiangiogénicos, como sunitinib y sorafenib, puede verse frustrado ante la capacidad de los tumores para adaptarse a las condiciones de hipoxia que se producen en tal situación. Tras el tratamiento antiangiogénico, muchas vías metabólicas se encuentran reguladas positivamente; es el caso de las enzimas lipogénicas, cuya actividad se ve aumentada. Cuando se reduce la hipoxia después del tratamiento y se produce la reoxigenación del tumor, aumenta la actividad de la sintasa de ácidos grasos (FASN) y se producen más ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados. La inhibición de FASN, con la consiguiente disminución de la producción de ácidos grasos, potencia el efecto de los inhibidores de la angiogénesis.

El transporte de lípidos y su desaturación tienen un papel importante en el impulso de la agresividad del tumor tras el tratamiento. La actividad de la proteína 4 de unión a ácidos grasos (FAB4) y de la esteroil-CoA desaturasa 1 (SDC) aumenta en los vasos sanguíneos cerrados que forman parte del microambiente tumoral tras el tratamiento antiangiogénico, y se correlacionan con un aumento de la agresividad tumoral. Por tanto, la combinación de inhibidores de FABP4 y SCD1

con tratamientos antiangiogénicos puede constituir una estrategia terapéutica efectiva para evitar la angiogénesis y la metástasis que puede producirse tras los tratamientos antiangiogénicos.

C17. Autoensamblaje de conjugados de fármacos para el tratamiento contra el cáncer

Daniele Passarella

Departamento de Química, Università degli Studi di Milano, Italia

Daniele Passarella es Graduado en Química por la Universidad de Milán (1986) y Doctor por esa misma Universidad (1991). En 1992, realizó una estancia postdoctoral bajo la supervisión de J. Bosch, en la Universidad de Barcelona. Desde 2006, es *Associate Professor* de Química Orgánica en la Universidad de Milán. Su investigación se basa en la preparación de compuestos heterocíclicos y de origen natural con interés biológico.

Resumen

Los conjugados de autoensamblaje para el tratamiento del cáncer están compuestos por una molécula transportadora unida a un fármaco mediante algún tipo de enlace. Cuando se rompe este enlace, se puede conseguir la liberación del fármaco en el lugar deseado. Por ejemplo, cuando este enlace es un puente disulfuro, el glutatión produce su reducción y la consiguiente liberación del fármaco.

Utilizando un compuesto lipofílico como molécula transportadora, se puede conseguir el autoensamblaje de la nanopartícula agua; el conjugado obtenido se puede internalizar y el fármaco puede ser liberado en el interior celular. Para estudiar la dinámica de internalización, se utilizó un fluoróforo y se construyeron heteronanopartículas, utilizando dos fármacos y comprobando el efecto que se producía en las células tumorales. Al combinar ciclopamina y paclitaxel, se observó una modificación de la ruta *hedgehog*. Combinando esteroides con doxorubicina para tratar células resistentes a doxorubicina, se demostró la eficiencia de la nanopartícula, obteniéndose una reducción del tumor y una menor toxicidad de la doxorubicina. En las células tumorales tratadas con estas nanopartículas, la disfunción fue mayor que en las tratadas únicamente con doxorubicina. Esto se debe a que los esteroides reducen la actividad del transportador que expulsa la doxorubicina, por lo que esta puede permanecer en el interior celular y dirigirse a su diana terapéutica.

El éxito de estos experimentos demuestra que este campo puede ofrecer nuevas posibilidades interesantes para el tratamiento del cáncer. Los conjugados no solo pueden incluir varios fármacos y liberarlos de forma selectiva en el interior celular, sino mejorar la biocompatibilidad de los medicamentos y hacerlos accesibles a un mayor número de pacientes.

C18. Desarrollo de inhibidores de quinasas y PFKFB3

Andrej Bohac

Departamento de Química Orgánica, Comenius University, Bratislava, Eslovaquia

Andrej Bohac es profesor universitario e investigador en Eslovaquia. Estudió Química Orgánica y Bioorgánica en Comenius University, en Bratislava (1983-1987). En 1993 finalizó su tesis doctoral, por la misma Universidad. Durante el periodo de 1993 a 1996, estuvo como investigador postdoctoral bajo la supervisión de los profesores C. Ganter y D. Seebach en el Federal Institute of Technology (ETH) en Zúrich. Desde 2003, es *Associate Professor* en Comenius University, donde imparte asignaturas de química médica, síntesis estereoselectiva y química orgánica. Su investigación está orientada a la búsqueda y descubrimiento de fármacos contra el cáncer, concretamente en el desarrollo de inhibidores de angiogénesis y compuestos que tienen como diana la resistencia a fármacos de células troncales del cáncer.

Resumen

La inhibición de la angiogénesis está siendo objeto de estudio en muchos grupos de investigación de química médica. La primera diana encontrada en este campo fue el receptor tirosina quinasa 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2 TK), el principal receptor implicado en angiogénesis, que cuenta con actividad enzimática en su porción intracelular.

Los dominios tirosina-quinasa de VEGFR2 cuentan con un *loop* de activación y uno catalítico, y son varias las moléculas orgánicas que compiten por el sitio de unión a ATP. La fosforilación de un residuo de tirosina es lo que provoca el cambio conformacional necesario para que el sitio activo sea accesible. La posición de la tríada de aminoácidos Asp-Phe-Gly determina la actividad catalítica del receptor.

El grupo de Andrej Bohác ha desarrollado más de 35 inhibidores de VEGFR2 TK con actividad antitumoral a concentración nanomolar. Además, han desarrollado inhibidores de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3 (PFKFB3), una enzima clave en la reprogramación metabólica. Interferir en este nivel de regulación puede ser una estrategia terapéutica interesante, afectando al abastecimiento energético de las células tumorales y provocando su muerte.

C19. Una estrategia fructífera para la búsqueda de nuevos inhibidores de la angiogénesis

Ana Rodríguez Quesada

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España

Ana R. Quesada se graduó en Química en la Universidad de Granada (España) en 1982 y obtuvo su Doctorado en Química por la Universidad de Málaga en 1987. Fue científica visitante en la Universidad de Bristol (Reino Unido) en 1987 y en la UWM (Wisconsin, EEUU) en 1991. Después de trabajar siete años en departamentos de investigación de compañías farmacéuticas (Farmacia, Antibióticos Farma/Farmitalia), se trasladó a la Universidad de Málaga en 1994, donde ocupa desde 2009 un puesto de catedrática en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Su principal interés investigador radica en la búsqueda y caracterización de nuevos candidatos a medicamentos anti-angiogénicos.

Resumen

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente, es un mecanismo principal de vascularización durante el desarrollo embrionario, el crecimiento, la regeneración, la curación de heridas y algunos procesos fisiológicos como la formación del cuerpo lúteo y el endometrio. Las células endoteliales son importantes en angiogénesis porque permiten la formación de nuevos vasos sanguíneos.

La angiogénesis anormal también está involucrada en una serie de procesos patológicos tales como el crecimiento tumoral, la metástasis, la retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad, la psoriasis o la artritis, entre otros. Por esta razón, la inhibición de la angiogénesis ha atraído una gran atención en el campo de la investigación farmacológica.

Ana Rodríguez Quesada y su grupo se dedican a la búsqueda de nuevos moduladores de la angiogénesis, algunos de ellos derivados de organismos marinos o plantas medicinales y otros de origen sintético. Para probar estos compuestos, han desarrollado una serie de procedimientos experimentales que incluyen ensayos *in vitro* que recrean diferentes etapas del proceso angiogénico (como el ensayo de herida o el ensayo de migración) y ensayos *in vivo* para evaluar la actividad inhibidora de la angiogénesis de estos compuestos (como el ensayo con membrana corioalantoica). De esta forma, han descubierto varios compuestos con notable actividad antiangiogénica, como el dimetilfumarato, la aeroplisinina-1, la hipericina, la aloe-emodina, el toluquinol y la homocisteína. Los fármacos antiangiogénicos que se utilizan para

el cáncer, además, pueden usarse en el tratamiento de otras enfermedades, como la psoriasis, por lo que la investigación en este campo puede ofrecer soluciones a distintas patologías.

C20. La medicina de precisión aplicada al diagnóstico, pronóstico y predicción de cáncer colorrectal asociado a la obesidad

Manuel Macías González

UGC Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Virgen de la Victoria. IMABIS, Málaga, España

Manuel Macías González se licenció en Biología y en Química por la Universidad de Granada en 1993 y 1995, respectivamente. Hizo su tesis doctoral en la misma universidad, la cual le concedió el premio extraordinario de tesis doctoral en Bioquímica y Biología Molecular. Llevó a cabo una investigación postdoctoral en el Departamento de Química-Fisiológica, Facultad de Medicina, Universidad de Düsseldorf (Alemania). También trabajó en el Departamento de Nutrición Clínica de la Universidad de Kuopio (Finlandia). En la actualidad, forma parte del IBIMA en el Complejo Hospitalario de Málaga (Virgen de la Victoria).

Resumen

La obesidad constituye la segunda causa de cáncer después del tabaco. Es una enfermedad de carácter epidémico y multifactorial, relacionada tanto con el medio ambiente como con la genética. Un índice de masa corporal mayor a 25 se considera obesidad y supone un riesgo para la salud. La obesidad está relacionada con la aparición de, al menos, 11 tipos de cáncer. Un ejemplo de la asociación entre obesidad y cáncer se encuentra en la relación entre las células tumorales de cáncer de colon y las células del tejido adiposo, el cual tiene la capacidad de inactivar agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer y provocar un estado de no respuesta en el paciente.

Analizando el metiloma de pacientes con obesidad, se observó que la metilación de algunas regiones del ADN es mayor que en los individuos con un peso normal. El aumento del tejido adiposo no es la consecuencia de las metilaciones, sino su causa. En cáncer colorrectal humano, la metilación del ADN está asociada al silenciamiento de ZNF543. Los cambios en la metilación del ADN debido al aumento de la adiposidad han permitido conocer factores epigenéticos y epitranscriptómicos muy útiles para la búsqueda de biomarcadores con capacidad de predecir y prevenir con precisión el cáncer asociado a la obesidad. Este es el fundamento del proyecto EPIONCOBESITY, del que Manuel Macías es autor.

En esta área, existe un interés creciente por la predicción de la predisposición a padecer cáncer, debido al importante papel de la prevención en cuanto a esta enfermedad. Además, el aumento de literatura científica relacionada con ello pone sobre la mesa la posibilidad de explotación terapéutica de esta herramienta en el tratamiento del cáncer.

C21. El gen supresor tumoral Wilms: nuevas funciones más allá del desarrollo embrionario

Ramón Muñoz Chápuli

Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España

Ramón Muñoz-Chápuli estudió la licenciatura de Biología en la Universidad de Granada y se doctoró en Ciencias Biológicas por la Universidad de Málaga en 1982. En 1986, se convirtió en Profesor Titular de la misma Universidad y desde 1999 es Catedrático e la misma Universidad. Dirige el grupo de investigación "Desarrollo y Enfermedad Cardiovascular". Su línea de investigación se centra en el sistema cardiovascular de vertebrados, pero también está muy interesado en las relaciones entre desarrollo y evolución, y como alteraciones de procesos de desarrollo pueden ser la base de innovaciones evolutivas.

Resumen

El gen supresor tumoral Wilms (*WT1*) codifica un factor de transcripción que contiene 4 dedos de zinc tipo C₂H₂ que participa en la regulación transcripcional, el metabolismo del ARN y las interacciones proteína-proteína. 25 años después de su descubrimiento, se conoció su implicación en la transición epitelio mesénquima. En condiciones normales, *WT1* está implicado en el desarrollo de numerosos órganos, incluyendo el hígado, el corazón y los pulmones, entre otros.

Estudios recientes sugieren que *WT1* podría jugar un papel fisiológico importante en la vida adulta, ya que es esencial para mantener la expresión de la E-cadherina, esencial para mantener unido el tejido exocrino, y la citoarquitectura. La delección de *WT1* conlleva la atrofia del páncreas exocrino, por lo que se está investigando en la actualidad su papel en la homeostasis del páncreas y su regeneración, buscando aspectos relevantes desde el punto de vista clínico.

La delección de *WT1* da lugar también a malformaciones en el corazón y alteraciones en el electrocardiograma tanto en embriones como en adultos. El próximo proyecto dirigido por Ramón Muñoz Chápuli, de hecho, consistirá en estudiar la expresión de *WT1* en el miocardio embrionario adulto, con el fin de determinar su implicación en el funcionamiento correcto del corazón y su relación con distintas enfermedades cardíacas.

C22. La base embrionica de la remodelación ventricular: perfil metabólico del corazón infartado

José María Pérez Pomares

Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España

José María Pérez Pomares es Licenciado en Biología y Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Málaga (2000). Realizó una estancia postdoctoral en el departamento de Anatomía y Biología Celular de la Medical University of South California, Charleston, USA (2000-2002). Fue técnico de apoyo a la investigación entre 2002 y 2004, profesor ayudante hasta 2010 y profesor titular desde entonces en la Universidad de Málaga hasta 2018, año en que se ha incorporado a su nueva plaza de catedrático. En 2010, fue nombrado colaborador científico del Centro Nacional de Investigación Cardiovascular (CNIC) en Madrid. Dirige el grupo "Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis".

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares constituyen en la actualidad la principal causa de muerte en el mundo, por encima de otras enfermedades como el cáncer. La enfermedad cardiovascular más prevalente es la cardiopatía coronaria (CAD) o arteriopatía coronaria, en la que la grasa y otras sustancias se acumulan en las paredes de las arterias coronarias, formando placas que producen un estrechamiento de los vasos sanguíneos y una disminución del flujo sanguíneo en el corazón. La CAD es una enfermedad multifactorial, con factores de riesgo ambientales importantes, pero muy relacionada con el estilo de vida de los individuos.

Los objetivos del estudio de José María Pérez Pomares consistían en inducir la diferenciación de células madre pluripotentes humanas (hPSC) en pro-epicardios y comprobar las propiedades funcionales de las células derivadas de hPSC en dichas estructuras frente a las células de epicardio. Al realizar este estudio experimental, se observó que las hPSC se diferenciaban en células de epicardio en respuesta a la adición de proteína morfogénica del hueso 4 (BMP4) y de ácido retinoico (RA). La expresión de WT1 es una señal para la diferenciación de hPSC en células epicárdicas, que expresan genes como *TBX18*, *TCF21*, *RALDH2* o *COUP-TFII*. La expresión de este último gen sugiere que las células obtenidas podrían ser incluso más primitivas que las células epicárdicas. Además, se observó que la diferenciación pro-epicárdica y epicárdica progresan a expensas del potencial de diferenciación miocárdica y, por último, que las células pro-epicárdicas y epicárdicas derivadas de las hPSC muestran las propiedades funcionales (adhesión, expansión, capacidad invasiva) que su equivalente *in vivo*.

C23. Diferenciación de las células madre embrionarias humanas hacia las células cardíacas del polo venoso/flujo cardíaco

Juan Antonio Guadix Domínguez

Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, España

Juan Antonio Guadix Domínguez, es licenciado en Biología por la Universidad de Málaga (2004) y Doctor en Ciencias Biológicas por la misma Universidad (2010). Realizó una estancia postdoctoral en el Leiden University Medical Center desde enero de 2013 a diciembre de 2014 y desde enero de 2015 es investigador postdoctoral en el grupo "Desarrollo y enfermedades cardiovasculares" en el centro Bionand de la Universidad de Málaga.

Resumen

El desarrollo del corazón da lugar a tres capas: endocardio, epicardio y miocardio. El pro-epicardio puede diferenciarse en células vasculares coronarias, células madre cardíacas, células musculares lisas, células endoteliales y otros tipos celulares, por lo que la función del epicardio es muy importante después de producirse un daño cardíaco. Cuando este daño ocurre, muchas células cardíacas mueren o se convierten en fibroblastos, pero las células cardíacas no pueden regenerarse. Por ello, el fallo cardíaco es algo bastante común después de un ataque al corazón, ya que mueren demasiadas células y el corazón no puede volver a realizar su función normal. Para el tratamiento de las personas que viven con este daño, es crucial la búsqueda de nuevas estrategias que permitan la regeneración del tejido cardíaco. Una posibilidad en este sentido consiste en el uso de hPSC para inducir la diferenciación pro-epicárdica. Las hPSC se pueden diferenciar en células parecidas a las de epicardio en respuesta a BMP4 y RA.

GFP es uno de los genes más importantes en la diferenciación cardíaca de las células madre embrionarias (hESC). Para estudiar la regulación de esta diferenciación, se utilizó la línea celular NKX2-5(eGFP/w). Las células se trataron con diferentes cócteles de factores de crecimiento durante varios días y se analizaron los resultados mediante inmunohistoquímica, q-PCR y co-cultivos. Se observó que en los cuerpos embrioides derivados de las hESC había aumentado la expresión de genes como *RALDH2*, *COUP-TFII*, *WT1*, *TBX5*, *PDGFRA* y de E-cadherina respecto a la diferenciación miocárdica normal. Todos estos marcadores son característicos del desarrollo del flujo cardíaco del corazón. La expresión de *WT1* es una señal para la diferenciación de hPSC en células epicárdicas, lo que sugiere que estas células tendrían un fenotipo pro-epicárdico o epicárdico *in vitro*. En definitiva, los resultados

de este estudio muestran que las células NKX2-5(eGFP/w) pueden diferenciarse en progenitores epicárdicos embrionarios con un tratamiento de BMP4 + RA. Esto demuestra que dicha línea celular puede diferenciarse de forma específica en células del mesodermo lateral similares a progenitores epicárdicos.

C24. Reprogramación metabólica en el cáncer: ¿Quimera o Belerofón?

José Manuel Matés Sánchez

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias,
Universidad de Málaga, España

José Manuel Matés Sánchez es licenciado en Ciencias Químicas y doctor en Química por la Universidad de Málaga. Actualmente, es catedrático de Bioquímica en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica en la Universidad de Málaga.

Resumen

En la mitología griega, Quimera era un monstruo híbrido que algunas descripciones afirman que contaba con tres cabezas, y que el héroe Belerofón derrotó quemando sus órganos vitales con la punta de su lanza. El cáncer puede entenderse como una quimera, un cuerpo con múltiples cabezas, cada una de ellas simbolizando el cáncer de cada paciente, y muy difícil de derrotar atacando a cada cabeza una por una. La gran diferencia que puede existir entre los tumores de cada individuo.

Algunas de las características fundamentales en el desarrollo del cáncer son el estrés metabólico y el factor genético, que consiste en una balanza entre la expresión de oncogenes y genes supresores tumorales, todos ellos modificados en gran medida por el metabolismo. Dos vías esenciales en la reprogramación metabólica del cáncer son la glucólisis y la fosforilación oxidativa. En esta última, es relevante el papel de la enzima glutaminasa, debido a la alta demanda de glutamina como donador de nitrógeno por parte de las células tumorales para la síntesis de macromoléculas.

La glutamina es el sustrato anaeróbico del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, capaz de producir una gran cantidad de energía, y es también sustrato del metabolismo reductor para la producción de citrato. En individuos sanos, hay órganos típicamente productores de glutamina y otros típicamente consumidores. En pacientes de cáncer, se da un enorme desequilibrio entre la producción y el consumo de glutamina, resultando en una elevación de los niveles de glutamina. La glutaminasa cataliza la hidrólisis de glutamina para introducirla en un flujo glucolítico aberrante, constituyendo la glutamina una fuente de energía anaplerótica no derivada de la glucosa.

Existen dos isoformas de glutaminasa: GLS, regulada por el protooncogén *c-Myc*, y GLS2, regulada por el gen supresor tumoral *TP53*. Por tanto, el control de la expresión de ambas es una herramienta útil para influir en la reprogramación tumoral. Por ejemplo, en el cáncer de hígado asociado a *c-Myc*, la inhibición de la glutaminasa es una estrategia terapéutica que proporciona buenos resultados.

Debido al estilo de vida actual y al envejecimiento de la población, el cáncer es una enfermedad que parece no haber mostrado todavía todas sus cabezas. En un futuro, es posible que existan tantos cánceres como individuos, por lo que la medicina personalizada parece la única solución efectiva ante este panorama. Teniendo en cuenta la heterogeneidad tumoral, la combinación de distintas técnicas de diagnóstico y experimentales es fundamental en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas efectivas para el tratamiento del cáncer.

SESIÓN DE PÓSTER

Los pósteres expuestos a continuación pertenecen al grupo de investigación de angiogénesis y cáncer liderado por Ana R. Quesada y Miguel Ángel Medina, Catedráticos de Bioquímica y Biología Molecular, en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga. La búsqueda de compuestos moduladores de la actividad angiogénica es un campo emergente que atrae el interés de muchos laboratorios, debido a su gran potencial terapéutico. El desarrollo de agentes antiangiogénicos se convierte así en una estrategia fundamental para el diseño de terapias efectivas para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades dependientes de angiogénesis. En este sentido, este grupo participa activamente en la identificación de nuevos moduladores naturales de la actividad angiogénica y en la investigación de sus efectos específicos sobre las diferentes etapas del proceso angiogénico. Además, en colaboración con empresas externas, participa en la búsqueda de fármacos antitumorales, centrando su investigación en la implementación de ensayos *in vivo* e *in vitro* capaces de permitir la identificación de sustancias antiangiogénicas. Tras esta primera selección, se realiza un rastreo secundario a partir del cual se valora su interés clínico y comercial y se procede, finalmente, al desarrollo de patentes, como punto de partida para el diseño clínico de fármacos apropiados.

P01. GR-24, un análogo de la estrigolactona, induce cambios en el citoesqueleto de células endoteliales e inhibe la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*

Paloma Carrillo, M^a Carmen Ocaña, Beatriz Martínez-Poveda, Miguel Ángel Medina, Ana R. Quesada

Paloma Carrillo, licenciada en Biología por la Universidad de Málaga y con Máster en Biología Celular en la misma Universidad, forma parte actualmente del grupo de investigación de angiogénesis liderado por Miguel Ángel Medina y Ana R. Quesada en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga. Su labor investigadora relativa a su tesis doctoral se centra en testar compuestos con actividad anti-angiogénica, como el GR-24, del cual se presentaron algunos resultados en este póster.

Resumen

Muchas fitohormonas han mostrado un gran potencial en la prevención y terapia contra el cáncer. Las estrigolactonas son hormonas vegetales derivadas de los carotenoides que están implicadas en la inhibición de la ramificación de la raíz y el brote, promueven la germinación de plantas parásitas e intervienen en el establecimiento de simbiosis con micorrizas arbusculares. Se ha descrito la capacidad antitumoral de diferentes análogos de estrigolactonas, entre ellos, GR-24, frente a diferentes líneas celulares tumorales *in vitro* y en modelos xenográficos. En este estudio, se ha evaluado la capacidad citotóxica y anti-angiogénica de GR-24, tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, GR-24 presenta una IC50 (la mitad de la máxima concentración inhibitoria) entre 50 y 90 μ M en diversas líneas celulares tumorales y endoteliales. Además, afecta a pasos clave del proceso angiogénico, como son la proliferación, diferenciación, migración y capacidad de degradación de la matriz extracelular de células endoteliales, a concentraciones menores que su IC50. En los ensayos *in vivo*, GR-24 muestra un gran efecto inhibitor sobre la formación de vasos sanguíneos en la membrana corioalantoica de pollo y sobre la formación de vasos intersegmentales en embriones de *Danio rerio*. En conjunto, estos resultados sugieren que GR-24 puede ser un nuevo compuesto prometedor en la terapia antiangiogénica y otras enfermedades dependientes de angiogénesis.

P02. Actividad biológica de derivados del toluquinol

José Antonio Torres-Vargas, Paloma Carrillo, Iván Cheng-Sánchez,
Miguel Ángel Medina, Francisco Sarabia, Ana R. Quesada

José Antonio Torres-Vargas, Graduado en Bioquímica por la Universidad de Málaga y con Máster en Biología Celular en la misma universidad, se encuentra realizando su tesis doctoral en el grupo de investigación liderado por Miguel Ángel Medina y Ana R. Quesada.

Resumen

La angiogénesis, uno de los sellos distintivos del cáncer, es un proceso esencial para la progresión y metástasis tumoral. Actualmente, se sabe que el toluquinol, una metil-hidroquinona producida por un hongo marino, es un potente compuesto antitumoral y antiangiogénico. En este estudio, se ha evaluado, *in vitro*, la actividad citotóxica y el potencial antiangiogénico de diferentes derivados del toluquinol. Para ello, se han llevado a cabo ensayos de proliferación celular (método MTT) utilizando líneas celulares endoteliales y tumorales, con el fin de determinar los valores de IC50 y la capacidad de los compuestos estudiados de interferir en diferentes pasos de la angiogénesis: su habilidad de inhibir la formación de estructuras tipo tubular sobre la Matrigel y de disminuir el potencial migratorio de las células endoteliales. Los resultados muestran que los compuestos estudiados producían cambios significativos en la toxicidad frente al cáncer y las células endoteliales, además de afectar a la actividad antiangiogénica *in vitro*, en comparación con el compuesto original. Esto sugiere que la modificación estructural del toluquinol podría ayudar a conseguir fármacos candidatos para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis con actividad biológica mejorada y citotoxicidad reducida.

P03. Incorporación de glucosa y palmitato en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231

M^a Carmen Ocaña, Paloma Carrillo, Beatriz Martínez-Poveda, Ana R. Quesada, Miguel Ángel Medina

M^a Carmen Ocaña, tras licenciarse en Biología y realizar el Máster en Biología Celular y Molecular en la Universidad de Málaga, se encuentra trabajando en su tesis doctoral en el grupo de investigación dirigido por Miguel Ángel Medina y Ana R. Quesada. Su investigación se centra en el estudio del metabolismo de células endoteliales en el microambiente tumoral, así como en los posibles efectos de compuestos antiangiogénicos en el metabolismo y de compuestos moduladores del metabolismo en la angiogénesis.

Resumen

En el trabajo presentado en este *workshop*, M^a Carmen estudia cómo varía la incorporación de glutamato, glutamina y glucosa en células de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 en distintas combinaciones y concentraciones de tales compuestos, todos ellos utilizados como combustibles metabólicos. El diseño experimental realizó acorde a los experimentos *Seahorse* que se utilizaron para las mediciones, puesto que miden acidificación, y es importante medir de forma inmediata las concentraciones de ácido láctico producidas.

Se observó que el palmitato no afecta a la incorporación de glucosa ni de glutamina, pero la incorporación de palmitato aumenta en presencia de glucosa y se ve inhibida por la presencia de 2-deoxiglucosa. Esto da a entender que la glucosa debe ser metabolizada para producir un aumento en la incorporación de palmitato. El palmitato incorporado por las células MDA-MB-231 no es oxidado y no produce lactato, y, finalmente, la presencia de glucosa no afecta a la incorporación de palmitato en otras líneas celulares. Por tanto, el metabolismo del palmitato puede estar regulado de manera diferente en MDA-MB-231.

El siguiente bloque de pósteres pertenece al grupo de investigación liderado por Javier Márquez, licenciado en Ciencias Químicas y Doctorado en Bioquímica por la Universidad de Málaga. Desde 2002, es Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, además de investigador principal del grupo *Canceromics*. Este grupo tiene 4 líneas de investigación acerca de la biología molecular, genómica y proteómica del cáncer y de la transmisión glutamatérgica y la expresión de glutaminasa en mamíferos, tanto en tejidos sanos como en situaciones patológicas como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas. El grupo de Javier Márquez ha producido un importante volumen de publicaciones desde el año 2000, llegando a ser algunos de sus miembros los primeros investigadores andaluces en publicar en la revista *Nature Medicine*, la más prestigiosa en la categoría de investigación en medicina a nivel mundial. Además, forma parte como investigador principal junto a su grupo de investigación del área de Oncología del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), el cual se encuentra en continua colaboración con otros grupos de investigación de Neurociencias del IBIMA.

P04. La expresión de isoenzimas de la glutaminasa regula el estrés oxidativo en células procedentes de glioma

Juan de los Santos Jiménez, Nieves Urbano Polo, Ana Peñalver, José A. Campos-Sandoval, Javier Márquez, José M. Matés

Resumen

La glutamina tiene un papel esencial en el metabolismo de las células cancerosas por su versatilidad metabólica. Puede utilizarse para la producción de energía o como fuente de carbono y nitrógeno para la producción de biomasa. La glutaminasa cataliza la conversión de glutamina en glutamato y amonio, y existen 4 isoenzimas codificadas por 2 genes distintos que se regulan de forma diferente: uno de ellos por el oncogén *c-Myc* y otro por el gen supresor de tumores *TP53*.

En el estudio presentado, se ha evaluado el papel de la glutaminasa en el equilibrio redox de las células procedentes de glioma mediante siete ensayos realizados en estas células y en células *wild type*: peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, capacidad antioxidante total, actividad superóxido dismutasa, actividad catalasa, actividad glutatión reductasa y niveles totales de glutatión.

Se encontraron diferencias significativas en la peroxidación de lípidos, en la capacidad antioxidante total y en la actividad de la superóxido-dismutasa, la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa. Estos resultados muestran que el estado redox y el sistema de defensa de enzimas antioxidantes son dependientes de la expresión de las isoenzimas de glutaminasa en las células procedentes de glioma.

P05. La isoforma GLS2 de la glutaminasa en el cáncer: localización subcelular e implicación en la reversión del cáncer

David Caro Vázquez, Marina García Frutos, Mercedes Martín Rufián, Ana Peñalver Alonso, María C. Gómez García, Laura Castilla Ruiz, Javier Márquez Gómez

David Caro Vázquez y Martina García Frutos son Graduados en Bioquímica y con Máster en Biotecnología Avanzada en la Universidad de Málaga y forman parte del grupo *Canceromics* dirigido por Javier Márquez.

Resumen

La glutaminasa (GA) cataliza el primer paso en la glutaminólisis mitocondrial y tiene un papel clave en la reprogramación metabólica del cáncer. Presenta dos isoformas en humanos, GLS y GLS2, que difieren en expresión, regulación y en las funciones opuestas que cumplen durante la tumorigénesis; mientras que GLS se asocia con crecimiento celular y proliferación, GLS2 parece estar implicada en la diferenciación y supresión tumoral, aunque aún no se conocen los mecanismos moleculares subyacentes. En este trabajo, se ha iniciado la caracterización funcional de las isoformas de GLS2 en líneas celulares humanas de cáncer, junto con el estudio de su localización subcelular, sus cambios en el ciclo celular y en perfiles proteómicos nucleares. En concreto, en este trabajo se han centrado en una isoforma de GLS2 llamada GAB, sobreexpresada en una línea celular de glioblastoma humano (T98G). Se concluyó que GLS2 podría ser considerada una proteína multifacética, con localizaciones nuclear y mitocondrial y con papel antiproliferativo (ya que la regulación positiva de GLS2 estaba asociada al arresto del ciclo celular en fase G2/M), lo que podría ser independiente o no de su actividad enzimática.

A continuación, se presentan los pósteres expuestos por el grupo de Ramón Muñoz Chápuli y José María Pérez Pomares. Ramón Muñoz Chápuli es Catedrático de Biología Animal e investigador en el campo de la Biología del Desarrollo Cardiovascular, siendo sus áreas de especialización el desarrollo cardíaco, la vasculogénesis, la angiogénesis, la diferenciación celular en el mesodermo embrionario, la evolución y el desarrollo. Actualmente, forma parte del Departamento de Biología Animal y del grupo de Investigación "Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis", centrado en las bases del desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y en identificar nuevos marcadores diagnósticos y pronósticos, dianas terapéuticas y terapias avanzadas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. José María Pérez Pomares es Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Málaga y tras acabar su tesis, comenzó a investigar el desarrollo embrionario del corazón de los vertebrados y su relación con las enfermedades del sistema cardiovascular. En la actualidad es Catedrático de Biología Animal e investigador principal, junto a Ramón, del grupo de investigación "Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis".

P06. *WT1* está implicado en el desarrollo del páncreas y en la homeostasis pancreática en adultos

Laura Ariza, Rita Carmona, Beatriz Aguilera, Ana Cañete, Ramón Muñoz-Chápuli

Laura Ariza es Investigadora Predoctoral en el grupo “Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis” y presenta en este póster los resultados de sus últimos experimentos relacionados con su tesis doctoral.

Resumen

Existe una población celular específica en el hígado, las células hepáticas estrelladas (HSC), que se origina en el desarrollo a partir de una transición epitelio-mesénquima del mesotelio embrionario. En este trabajo, se quería comprobar si el origen embrionario de las células pancreáticas estrelladas (PSC) era el mismo que el de una población de células estromales que comparten muchas características con las HSC y que desempeñan papeles esenciales en condiciones fisiológicas y patológicas.

Puesto que el gen supresor de tumores Wilms (*WT1*) está altamente expresado en el mesotelio adulto y embrionario, para marcar el linaje celular derivado del mesotelio en el páncreas usaron dos modelos de ratones murinos, uno de expresión constitutiva de *WT1* y otro de expresión inducible mediante tamoxifeno. También suprimieron de forma condicional *WT1* en el mesotelio de ratones adultos. Los resultados muestran que el mesotelio pancreático embrionario genera células mesenquimales que contribuyen al estroma pancreático, incluyendo la mayor parte de las PSC. La supresión sistemática de *WT1* en ratones adultos genera una atrofia severa del páncreas. Además, sorprendentemente, la regulación de *WT1* se vio disminuida en las PSC adultas en un modelo de pancreatitis inducido mediante ceruleína. Se puede concluir, por tanto, que la señalización dependiente de *WT1* parece ser necesaria para la homeostasis pancreática, actuando ésta desde el mesotelio embrionario. *WT1* también juega un papel importante en la activación de las PSC, participando en la reparación pancreática tras producirse algún daño.

P07. FSP1/S100A4 permite distinguir poblaciones de miocardio y endotelio cardíaco

Sara Cano-Ballesteros, Juan Antonio Guadix, José M. Pérez Pomares

Sara Cano-Ballesteros es licenciada en Biología por la Universidad de Málaga y, actualmente, Investigadora Predoctoral en el grupo de investigación "Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis".

Resumen

El polipéptido S100A4, Metastasina (Mts1) o proteína específica de Fibroblasto 1 (Fsp1) pertenece a la familia S100 de las proteínas de unión a calcio. Estas proteínas están involucradas en una gran variedad de procesos biológicos, tales como proliferación, migración e invasión, inflamación y diferenciación. En concreto, S100A4 se expresa en diferentes tipos celulares como fibroblastos, macrófagos, monocitos y leucocitos polimorfonucleares, además de estar presente también en varios tipos de células cardíacas embrionarias. Respecto a esta última localización, se utilizó un modelo transgénico de ratón para determinar si S100A4 es necesario para que se dé un correcto desarrollo de los tejidos del corazón. En este modelo, la expresión de la proteína GFP está controlada por el promotor S100A4, permitiendo detectar la localización del polipéptido. Tal y como se esperaba, los resultados mostraron la detección de S100A4 en estructuras del sistema de conducción cardíaco, incluyendo el nodo atrioventricular y las fibras de Purkinje. Además, pudieron comprobar que las válvulas venosas están formadas por células endoteliales que expresan el polipéptido, y que algunas de estas células cardíacas de las válvulas proceden de células circulantes de la médula ósea.

P08. El patrón coronario embrionario aviar requiere la contribución de diferentes poblaciones celulares endoteliales y endocárdicas

Paul Palmquist-Gomes

Investigador Predoctoral en el grupo "Desarrollo cardiovascular y angiogénesis" y presenta en este póster uno de sus últimos trabajos publicados, en la revista *Developmental Dynamics*.

Resumen

Los vasos sanguíneos coronarios irrigan el músculo cardíaco y son fundamentales para el correcto funcionamiento del corazón en embriones tardíos y en adulto. A pesar de su importancia en el desarrollo y en la clínica, su origen embrionario y la regulación de la formación de los patrones todavía no se conocen. Existen estudios que establecen un solo origen celular para el endotelio coronario, pero las investigaciones más recientes sugieren que debe haber más de un tipo celular involucrado en su desarrollo. En este trabajo, se ha utilizado el modelo embrionario aviar para estudiar el desarrollo coronario, con el objetivo de responder a esta cuestión.

Gracias a tres técnicas experimentales diferentes (quimeras codorniz-pollo, inyecciones intravasculares de lectina e injertos de fibrina recombinante), se obtuvieron resultados que muestran que hay, al menos, cuatro poblaciones endoteliales que se coordinan para dar lugar a la vascularización coronaria: (I) el endocardio del seno venoso, (II) el endocardio ventricular, (III) derivados del septo transversal/proepicardio y (IV) derivados del tracto de salida distal. Este proceso requiere, además, la activación de los mecanismos de angiogénesis y vasculogénesis durante las fases tempranas del desarrollo coronario.

P09. Composición celular y molecular del nicho pre-coronario: interacciones neurovasculares y neurotrofinas

Cristina Pogontke, Juan Antonio Guadix, José M. Pérez-Pomares

Cristina Pogontke, licenciada en Biología y con Máster en Biología Evolutiva por la Universidad de Málaga, se encuentra realizando su tesis doctoral en el grupo de investigación "Desarrollo Cardiovascular y Angiogénesis". Su investigación se centra en el estudio de los mecanismos que controlan la capacidad regenerativa del corazón en mamíferos y las moléculas implicadas, tanto en condiciones normales como de daño y muerte celular.

Resumen

En los últimos años, se ha descrito un tipo de células madre/progenitoras cardíacas residentes capaces de diferenciarse en diversos tipos de células cardiovasculares. Sin embargo, se desconoce si estas células derivan de una o varios linajes de desarrollo y si son verdaderas células madre cardíacas que se hospedan en nichos reales (microambiente específico que ayuda a que las células madre mantengan sus propiedades y que regula su diferenciación bajo ciertas condiciones). Este grupo sugiere que algunas de las células residentes intersticiales son células madre mesenquimales cardíacas y que el intersticio cardíaco, el espacio intercelular entre las fibras de cardiomiocitos, podría actuar como un nicho real para estas células, donde los vasos sanguíneos coronarios y los nervios cardíacos periféricos podrían ser candidatos adecuados para actuar como estructuras de soporte biológico del nicho, dada su intensa interacción a través de diversas moléculas como las neurotrofinas. Algunas de estas supuestas células madre se caracterizan por la expresión de marcadores como c-Kit, Bmi-1 o Sca-1, la capacidad de autorenovación, formación de cardioesfera y diferenciación clonal hacia tipos celulares cardiovasculares (células endoteliales, células musculares lisas y cardiomiocitos).

En este trabajo, se ha estudiado, por un lado, el origen embrionario de células que expresan dichos marcadores (procedentes del proepicardio o de la médula ósea de modelos murinos adultos) y sus relaciones con células endoteliales (CD31+), músculo liso (α SMA+), fibroblastos (FSP1+) y células nerviosas (β III Tubulina+), tanto *in vivo* como *in vitro* (cardioesferas), y por otro lado, el sistema de señalización paracrina implicada en el mantenimiento del supuesto nicho intersticial cardíaco, centrándose en buscar receptores de neurotrofinas. Los resultados obtenidos apuntan a que las células que expresan Sca-1 y Bmi-1 proceden al linaje proepicardial, mientras que aquellas que expresan c-Kit y Sca-1 tienen un origen epicardial. Por otro lado, el receptor de neurotrofinas TrkB es expresado por las fibras nerviosas, cardiomiocitos, células endoteliales y células proepicárdicas derivadas del intersticio tanto en embriones como en ratones adultos.

P10. Aproximación bioinformática para descifrar las bases genéticas de enfermedades metabólicas

Elena Rojano-Rivera, F. Moreno-Jabato, P. Seoane, J.R. Perkins, J. A. G. Ranea

Elena Rojano-Rivera y F.-Moreno Jabato pertenecen al grupo de investigación en bioinformática liderado por Juan Antonio García Ranea, profesor titular del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga. Elena se encuentra finalizando su tesis doctoral, centrada en el desarrollo de herramientas de caracterización de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en regiones genómicas no codificantes y el análisis de asociaciones entre ontologías de fenotipos humanos (HPO) y regiones genómicas concretas a través del análisis de redes. Fernando es Graduado en Ingeniería de la Salud y trabaja en la aplicación de estudios de similitud semántica al mismo modelo de red de relaciones fenotipo-genotipo con el que trabaja Elena.

Resumen

En este póster, se presenta un sistema de predicción desarrollado por este grupo que utiliza asociaciones HPO-loci previamente descritas para predecir qué regiones genómicas están asociadas a una lista de HPO determinados clínicamente. En este trabajo, se analizaron dos enfermedades, el síndrome de deficiencia de MCT8 y MCT8-like, que presentaban fenotipos similares y distintas expresiones génicas, y buscaron las asociaciones entre las características patológicas de la enfermedad con los loci mutados. Encontraron varias regiones asociadas al fenotipo patológico y escogieron las tres con mayor significancia. Estas asociaciones fenotipo-región genómica permitirán futuras predicciones en ambas direcciones. Aunque el método es computacional, es necesario realizar una validación clínica del mismo para comprobar si las regiones realmente afectadas coinciden con las predichas.

Una vez validado, el software de predicción podría ser útil para determinar regiones genómicas específicas de un perfil fenotípico. Además, pretenden elaborar una página web para permitir a las comunidades científica y clínica el uso del sistema de predicción, contribuyendo así a la transferencia del conocimiento científico.

P11. Reprogramación metabólica y ecofenotipos estructurales en sistemas evolutivos tumorales

Jose J. Serrano, Miguel Ángel Medina, Raúl Montañez

Jose J. Serrano es Licenciado en Biología por la Universidad de Málaga y Máster de Biología Celular y Molecular en dicha universidad. Su investigación se centra en la comprensión de las dinámicas ecológicas y en las relaciones de información estructural en tumores, basándose en herramientas de biología sintética y enfoques computacionales.

Resumen

Los tumores albergan una intrincada red dinámica de ecosistemas organizados. Se conoce que el comportamiento celular colectivo es una estrategia común durante la invasión y la metástasis. Esta cooperatividad entre subclones celulares puede suponer un acoplamiento metabólico asociado al proceso carcinogénico. Sin embargo, aún no está claro cómo contribuyen a estos procesos las diferentes subpoblaciones de células cancerígenas y estromales. Debido a la enorme cantidad de subpoblaciones celulares diferentes implicadas y a la falta de herramientas adecuadas para investigar estas relaciones directamente en muestras de pacientes, en este estudio, se aplicaron modelos matemáticos y teóricos para intentar descifrar la dinámica entre subpoblaciones que subyace a estos procesos. Siguiendo el modelo de la medicina Hamiltoniana, se utilizaron los modelos de cooperación e interacción entre microorganismos para compararlos con aquellos de las células tumorales, además de recurrir también al modelado matemático, con el fin de crear un modelo conceptual aplicable a los tumores. Así, se demostró que el comportamiento de las subpoblaciones celulares implicadas en un tumor es similar al que desempeñan las bacterias mutualistas.

El estudio continúa con prometedores avances, con el objetivo de comprobar estos modelos en experimentos *in vitro* en cultivos celulares y de identificar perfiles de expresión de genes metabólicos claves en la migración y metástasis, tanto individuales como colectivos. Como objetivo final, se propone la creación de un "perfil genético de migración" específico de las células en el frente de propagación.

P12. RPath: una aplicación web para la exploración de vías metabólicas

Antonio Benítez-Hidalgo, César Lobato-Fernández, María José Muñoz-González, Daniel Torres- Ramírez, Ismael Navas-Delgado and José F. Aldana-Montes

Antonio Benítez-Hidalgo forma parte del grupo de investigación Khaos, cuya actividad se centra en el desarrollo de Middleware Semántico, y cuenta con una amplia experiencia en tecnologías de Web Semántica, Integración de Datos y de Aplicaciones y Bases de Datos.

Resumen

Existen más de 300 bases de datos biológicas y cada una de ellas utiliza sus propios métodos de nomenclatura y almacenamiento de la información, lo que complica la integración de esta a la hora de realizar un trabajo de investigación y limita la experiencia del usuario. Además, las vías metabólicas almacenadas en las bases de datos, hasta hace poco tiempo, solo podían ser interpretadas de forma manual y no computacional, lo cual dificulta el hallazgo de interacciones entre sus componentes. El estándar BioPAX, que traduce las vías metabólicas a un lenguaje OWL que pueden interpretar los ordenadores, es la base para la construcción de la herramienta RPath.

RPath es una aplicación web desarrollada en R que permite buscar, analizar y visualizar las vías metabólicas de forma accesible e intuitiva para el usuario. Se trata de un proyecto de carácter *open source*, por lo que se encuentra accesible en la web a todos los usuarios que deseen utilizarlo.

P13. Identificación de elementos móviles expresados en cáncer de pulmón

Macarena Arroyo Varela, Rocío Bautista Moreno, Rafael Larrosa Jiménez, José Luis De La Cruz Ríos, Manuel Ángel Cobo Dols y Manuel Gonzalo Claros Díaz

Macarena Arroyo Varela es médico en el Departamento de Neumología del Hospital Regional Universitario de Málaga. El trabajo presentado se ha realizado en colaboración con la línea de investigación liderada por el Catedrático Manuel Gonzalo Claros.

Resumen

Los elementos móviles, que incluyen transposones de ADN y ARN, son secuencias que pueden moverse de forma autónoma de un lugar a otro del genoma. La activación de elementos móviles se ha descrito en numerosas enfermedades, incluyendo el cáncer.

En este estudio, se han utilizado lecturas de RNA-seq de tejido tumoral de pulmón y tejido sano adyacente y se ha desarrollado un flujo de trabajo bioinformático para cuantificar la expresión diferencial de transposones. Se identificaron 18 transposones con expresión diferencial en adenocarcinoma y 71 en cáncer de pulmón de células pequeñas, siendo 13 los transposones comunes a ambos tipos de cáncer. Sorprendentemente, solo 2 de ellos estaban sobreexpresados en el tejido canceroso; los demás, se encontraban menos expresados que en el tejido sano. Esto puede resultar útil para el desarrollo de futuros métodos de diagnóstico y pronóstico.

P14. Interferir la interrupción génica debida a transposones en pacientes con cáncer de pulmón utilizando datos de secuenciación de ARN

Carmen María López, Macarena Arroyo, Rocío Bautista, Rafael Larrosa, M. Gonzalo Claros

Carmen María López colabora en la línea de investigación liderada por el Catedrático Manuel Gonzalo Claros.

Resumen

En los últimos años, la presencia de secuencias repetitivas en el genoma y, en concreto, de transposones, han ganado bastante popularidad debido a su implicación en múltiples enfermedades, como en el cáncer, ya que parecen estar implicados en algunas alteraciones, incluyendo la interrupción génica y la aparición de nuevos transcritos de fusión TE-gen. Los métodos más comunes para detectar estos eventos de transposición son la RT-PCR y la secuenciación del ADN. Sin embargo, utilizar técnicas de secuenciación del ARN presenta *a priori* más ventajas, ya que, además de su rentabilidad coste-eficacia, permite la expresión de genes concomitantes, la detección de genes de fusión, aberraciones en el *splicing* alterantivo y presencia de virus patógenos. Este grupo de investigación ha empleado herramientas bioinformáticas conocidas para analizar la expresión diferencial de genes y transposones (basándose en bases de datos como RepEnrich, RepBase y de elementos retrovirales). Con esto, quieren extender el workflow resultante para la identificación de eventos de transposición. Para ello, están probando dos nuevas herramientas bioinformáticas publicadas en 2017, LIONS y TETools, con el deseo de identificar transposones expresados diferencialmente en pacientes con cáncer de pulmón, junto con su posición en el genoma. Además, como objetivo futuro, pretenden identificar las putativas fusiones químéricas en estos pacientes (con la ayuda del software STAR-fusion) y, quizá, los cambios inesperados de expresión génica provocado por los transposones. Otra meta planteada consiste en encontrar biomarcadores diagnósticos o pronósticos, o desarrollar una terapia futura para tratar a otros pacientes de cáncer de pulmón.

P15. Las estrategias de edición génica revelan degeneración microglial en la enfermedad de Alzheimer

Juan Antonio García León, Francisco Ruiz-Contreras, Javier Vitorica, Antonia Gutiérrez

Juan Antonio García-León, Doctor en Biología, actualmente trabaja como investigador postdoctoral en el grupo Neuropatología de la Enfermedad de Alzheimer (NeuroAD), dirigido por Antonia Gutiérrez, en la Universidad de Málaga. La experiencia adquirida durante su estancia postdoctoral en la Universidad de Leuven (Bélgica) ha permitido a este grupo iniciar una línea de trabajo utilizando modelos *in vitro*, células iPS derivadas de pacientes y tecnología de edición génica CRISPR-Cas9 enfocada en la modulación de la enfermedad de Alzheimer.

Resumen

La enfermedad del Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa crónica que conlleva la pérdida cognitiva debido a la disfunción sináptica y la muerte neuronal. En la actualidad, no existe cura para esta patología y por ello, es necesario alcanzar una mayor comprensión del proceso patológico de la enfermedad. Lo que sí se conoce es el hecho de que la microglía juega un papel clave en la patogénesis del Alzheimer; mientras que en modelos murinos, su activación implica un papel neurotóxico, en pacientes con esta enfermedad, existe degeneración microglial hipocampal, lo que lo cual puede deberse a la hiperfosforilación de la proteína tau. Con estos antecedentes, este grupo de investigación se propuso elucidar los mecanismos moleculares que conducen a la disfunción microglial en los pacientes de Alzheimer. Para ello, estudiaron rutas específicas relacionadas con la microglía que estuviesen implicadas en la degeneración microglial que se da en pacientes de Alzheimer, llevando a cabo *knock-out* génicos mediante CRISPR-Cas9; además, evaluaron la funcionalidad de las células modificadas (proliferación, activación y degeneración de la microglía) mediante una combinación de ensayos experimentales (capacidad fagocítica, proliferación y supervivencia). Como perspectiva futura, y una vez identificadas las rutas moleculares implicadas en la degeneración microglial del hipocampo de pacientes con Alzheimer, estos avances podrían dar lugar a la identificación de nuevas dianas moleculares terapéuticas.

P16. Patología amiloide en el hipocampo de los pacientes con enfermedad de Alzheimer y en ratones transgénicos

C. Núñez-Díaz, E. Sánchez-Mejías, R. Sánchez-Varo, V. Navarro, A. Gómez-Arboledas, J. Fernández-Valenzuela, M. Vizuite, J.C. Dávila, J. Vitorica, A. Gutiérrez

Cristina Núñez, tras licenciarse en Biología y realizar una estancia de investigación en la Universidad de California, está actualmente trabajando en su tesis doctoral en el grupo NeuroAD. Su tesis está enfocada en la identificación de características patogénicas de las placas amiloides en el Alzheimer, tanto en modelos transgénicos como en muestras de pacientes.

Resumen

Los depósitos de β -amiloide ($A\beta$) y la activación glial suponen dos de los procesos patológicos típicos de la enfermedad de Alzheimer (AD). La relación entre ambos procesos durante toda la progresión de la enfermedad no está clara. En este estudio, se examinaron la patología amiloide y la microglía asociada a las placas en muestras de hipocampo de cerebro humano *post mortem* y en ratones transgénicos APP/PS1. Así, llegaron a la conclusión de que las placas amiloides son estructuras dinámicas que varían sus propiedades según la progresión de la enfermedad, provocando daños sinápticos y neuronales. La microglía puede modular la liberación de oligómeros de $A\beta$ al parénquima cerebral o bien promover la acumulación de estos oligómeros para formar placas. Además, sugieren que los depósitos de amiloides extracelulares tanto en los ratones transgénicos como en los pacientes puedan tener un origen distinto, lo que aporta una visión novedosa a la hora de estudiar la enfermedad.

P17. Las respuestas de la microglía en la enfermedad de Alzheimer

M. Mejías-Ortega, E. Sánchez-Mejías, V. Navarro, J. C. Dávila, J. Vitorica, A. Gutiérrez

Marina Mejías Ortega es Graduada en Bioquímica por la Universidad de Málaga e investigadora en el grupo NeuroAD.

Resumen

La neuroinflamación constituye, al igual que la acumulación de beta-amiloide y tau, un sello distintivo de la enfermedad de Alzheimer, y ha sido postulada como un factor crítico en la progresión de la enfermedad desde que se identificaron diversos factores de riesgo severos relacionados con la función microglial y el sistema inmune que incrementan el riesgo de desarrollar la patología.

En este trabajo, se han evaluado, mediante técnicas de inmunohistoquímica y RT-qPCR, las respuestas microgliales en diferentes áreas del cerebro de pacientes de la enfermedad de Alzheimer y se han comparado los resultados con los previamente obtenidos en relación con el modelo amiloidogénico APP/PS1. La corteza frontal de los pacientes parece mostrar una activación microglial generalizada, muy similar a la observada en el modelo transgénico y a diferencia de lo que ocurre en las células microgliales del hipocampo, que cursan con una leve activación y presentan una morfología degenerativa y senescente. Estos resultados pueden ayudar al entendimiento de los mecanismos inmunológicos subyacentes en la progresión de la enfermedad de Alzheimer y marcar el camino hacia potenciales terapias para restaurar la función cognitiva en pacientes de la enfermedad.

P18. Descifrando la contribución patológica de A β y tau al Alzheimer en modelos transgénicos de A β y tau

J. J. Fernández-Valenzuela, R. Sánchez-Varo, V. Navarro, S. Jiménez, E. Sánchez-Mejías, C. Núñez-Díaz, A. Gómez-Arboledas, M. Vizuetete, J. C. Dávila, J. Vitorica, A. Gutiérrez

Juan José Fernández es licenciado en Biología y está realizando su tesis doctoral en el grupo NeuroAD. Su investigación se centra en determinar la contribución diferencial de la patología tau y amiloide a la enfermedad de Alzheimer utilizando diversos modelos animales transgénicos APP/PS1 y Tau. En este trabajo, presenta los resultados obtenidos hasta ahora.

Resumen

Los depósitos extracelulares de A β y los ovillos intraneuronales de tau hiperfosforilada son las principales características patológicas del Alzheimer. La coexistencia de ambos lleva a la disfunción sináptica, pérdida neuronal y deterioro cognitivo. Por lo tanto, con el fin de aclarar los efectos de A β y de tau por separado, comparan, mediante técnicas moleculares e inmuno- histoquímicas, modelos animales que presenten una patología o la otra.

Los resultados mostraron que la acumulación de ambas proteínas aumenta con la edad, aunque con distintos patrones de agregación/localización dentro del hipocampo. Además de observarse una mayor activación glial en los modelos de A β que en los de Tau, la microglía y los astrocitos reactivos también parecen asociarse más a las placas que a los ovillos. No obstante, la afectación a los sistemas de transporte es común a ambas patologías, así como el daño sináptico que causa la misma. La diferencia más significativa es que la afectación pre-sináptica y que lleva a la degeneración está mucho más asociada al A β que a fosfo-Tau. Finalmente, proponen la estabilización de los microtúbulos como “método” de rescate de la memoria, puesto que reduce la carga amiloidea en los modelos APP/PS1.

ÍNDICE

Agradecimientos	5
Declaración de autoría	7
Primera parte: Introducción y programa del <i>Workshop</i>	11
Segunda parte: Resúmenes de las comunicaciones	45
Tercera parte: Capítulos de proyectos de investigación de predoctorales	81
Cuarta parte: Crónica del <i>Workshop</i>	235

Libro de actas
del *Workshop* Internacional
**Metabolic Reprogramming
as a Target for Cancer
and Other Diseases**

Coordinadores:
Beatriz Martínez Poveda
Juan Antonio Guadix
Miguel Ángel Medina Torres

