



## 27ª Reunión Farmacólogos de la Comunidad de Madrid

26-Junio-2018  
Facultad de Psicología, UNED



Departamento de Psicobiología



Departamento de Psicobiología





## UNAS PALABRAS DE BIENVENIDA...

Decía Claude Bernard que “el Arte es yo, la Ciencia es nosotros”. Qué duda cabe de que uno de los aspectos más característicos de nuestra actividad como científicos es compartir y diseminar nuestros hallazgos, pero también expresar la duda, comentar de manera constructiva el trabajo de los compañeros y contribuir de manera conjunta al incremento paulatino pero imparable del saber colectivo. De esta manera, las reuniones, congresos, conferencias, cumbres, simposios, seminarios, congregaciones de estudiosos de todo tipo cumplen la función fundamental de promover el debate y el pensamiento crítico, tan necesarios en nuestra sociedad. Farmadrid tiene ya una larga historia, y este tipo de empresas solo perduran en el tiempo gracias a una combinación de elementos simple, la ilusión, el tesón, y el trabajo bien hecho. Es “marca de la casa” reconocida por todos la grandísima calidad de los trabajos y presentaciones que constituyen el núcleo fundamental de Farmadrid, calidad que surge por una lado de la sabia dirección de los investigadores más senior y por otra, del trabajo inquebrantable y la ilusión sin límites de los investigadores jóvenes (y a veces no tan jóvenes) que pasan horas incontables en los laboratorios. En este contexto, la organización de esta reunión nuestra, lejos de verse como una obligación aparece más bien como un honor, una gran responsabilidad y si se nos permite, hasta un lujo. Os damos la bienvenida a la Facultad de Psicología de la UNED, vuestra casa. Esperamos fervientemente que os sintáis a gusto, que el debate y la discusión científica sea excelente, que disfrutéis de la comida y de los compañeros y que volváis a vuestros laboratorios y despachos, con energías y fuerzas renovadas, con nuevas preguntas y sugerencias para responderlas, con nuevas propuestas de colaboración y sinergias establecidas. Si esto, aunque sea en parte, se cumple, nos daremos por satisfechos.

Recibid un abrazo muy fuerte de,

Emilio Ambrosio Flores, Alejandro Higuera Matas y el resto del Comité Organizador de Farmadrid27.

## Mindfulness en la Psicología Occidental

### Resumen

En Occidente, el anglicismo *mindfulness* hace referencia a una muy antigua práctica de meditación budista basada en la forma correcta de prestar atención y, también, al movimiento que en la psicología occidental ha incorporado esta técnica en el ámbito psicoterapéutico. Revisamos, en primer lugar, el concepto de *mindfulness* y su contextualización en su ámbito original, el budismo, a fin de tener un conocimiento básico de en qué consiste. En segundo lugar, abordamos, también la psicobiología de mindfulness a través del conocimiento neurocientífico de las redes neurales de la atención implicadas en esta práctica y de algunos de los experimentos claves que nos han permitido conocer los efectos de la meditación basada en mindfulness en el Sistema Nervioso, el Sistema Endocrino y el Sistema Inmune. Por último, nos centramos en la incorporación de mindfulness en el ámbito de la intervención psicoterapéutica, especialmente de la mano de las llamadas *Terapias de Tercera Generación*, en numerosos trastornos psicológicos y físicos, así como en la evaluación que los meta-análisis han venido realizando sobre su eficacia terapéutica.

Santiago Segovia Vázquez

*Licenciado por la UCM, doctor en Psicología por la UAM y catedrático de psicobiología en la UNED desde 1989 hasta 2011. Investigador principal de numerosos proyectos y coautor de alrededor de un centenar de publicaciones científicas con líneas de investigación como el dimorfismo sexual en el SNC o las conductas reproductoras. Ha sido director del Departamento de Psicobiología, decano de la Facultad de Psicología y director del Instituto Universitario de Investigación de la UNED. Desde 1999 dirige talleres y cursos de meditación basada en mindfulness, siendo uno de los pioneros en introducir esta práctica en el ámbito de la psicología académica.*





## PRESENTACIONES ORALES

### FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DERIVADAS DE VIRUS DE PLANTAS CON ALÉRGENOS DE MELOCOTÓN

CLÉMENCE MARGAIN<sup>1</sup>, CARMEN YUSTE CALVO<sup>1</sup>, ARACELI DIAZ PERALES<sup>1</sup>, JAIME TOMÉ<sup>1</sup>, JOSE MARIA SANCHEZ MONTERO<sup>2</sup>, FLORA SÁNCHEZ<sup>1</sup>, FERNANDO PONZ ASCASO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, UPM-INIA). Universidad Politécnica de Madrid (UPM) - Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223.

<sup>2</sup> Facultad de Farmacia. Plaza de Ramón y Cajal sn, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid (España). Dpto. Química en Ciencias Farmacéuticas. Grupo de Biotransformaciones.

Las alergias a los alimentos son un problema creciente en el campo de la medicina. De hecho, todavía no hay tratamientos definitivos, sino meramente sintomáticos. La alergia al melocotón (*Prunus persica*) es la más común en los pacientes adultos del área mediterránea. El alérgeno es Pru p 3, una proteína de transferencia de lípidos. Generalmente lleva un ligando lipídico derivado de la camptotecina unido a la fitoesfingosina, parte del ligando que tiene la actividad inmunogénica. A partir del virus del mosaico del nabo (TuMV por sus siglas en inglés) desarrollamos nanopartículas proteicas, funcionalizando la proteína de la cápsida (CP) con el alérgeno mediante conjugación química y fusión genética. Estas nanopartículas funcionalizadas tendrán aplicación tanto en el tratamiento como en el diagnóstico precoz de este tipo de alergias. La idea del tratamiento sería modificar la sensibilización de los pacientes potenciales a Pru p 3. Con ese objetivo, proponemos un complejo Pru p 3-ligando con la CP que dirigiría la producción de anticuerpos a IgG anti-Pru p 3 en lugar de los IgE producidos en una persona alérgica por Pru p 3. Eso ayuda a producir una respuesta inmune igual a la de una persona sin alergia. Entonces, en la siguiente toma de contacto con el alérgeno, no desarrollaría síntomas. En lo que concierne al diagnóstico precoz de esas alergias, las nanopartículas de virus recubiertas de Pru p 3 deberían aumentar significativamente la detección de los anticuerpos específicos de esa proteína. Así se puede bajar el umbral de detección de los anticuerpos anti-Pru p 3 en el suero de los pacientes potenciales y realizar un diagnóstico temprano de la alergia al melocotón. En nuestro grupo de investigación hemos producido mediante expresión genética proteínas de fusión Pru p 3-CP en planta, que gracias a su capacidad de autoensamblado han dado lugar a nanopartículas virales. El próximo objetivo es ligar la Pru p 3 presente en las nanopartículas *in-vitro* con el ligando para desencadenar la respuesta inmunogénica. La funcionalización gracias a la conjugación química todavía está en proceso de desarrollo. Todas estas características ofrecen un nuevo abordaje de diagnóstico y tratamiento con el potencial de mejorar la calidad de vida de las personas alérgicas.

**Palabras clave:** Nanobiotecnología - Nanopartículas virales - Funcionalización - Alergia alimentaria

**Agradecimientos:** Agradecer especialmente la asistencia técnica de Lucía Zurita, técnico de laboratorio. El trabajo de desarrollo de las VNP's en el laboratorio ha sido financiado durante varios años por distintos proyectos del INIA.

### ¿PUEDE LA ELECTROENCEFALOGRAFÍA MEDIANTE MICROESTADOS CEREBRALES VALORAR CAMBIOS TERAPÉUTICOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON?

CORTÉS VERÓNICA. MD.<sup>1</sup>, SERRANO J. IGNACIO PHD.<sup>2</sup>, MENDES NUNO BSC.<sup>3</sup>, DEL CASTILLO M. DOLORES PHD.<sup>2</sup>, ARROYO AIDA MSC.<sup>1</sup>, ANDREO JORGE<sup>1</sup>, ROCÓN EDUARDO PHD.<sup>2</sup>, DEL VALLE MARÍA MD.<sup>4</sup>, HERREROS JAIME MD.<sup>5</sup>, ROMERO JUAN PABLO MD. PHD.<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Experimental Sciences, Francisco de Vitoria University, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Neural and Cognitive Engineering group, Centre for Automation and Robotics (CAR) CSIC-UPM, Arganda del Rey, Spain.

<sup>3</sup> Faculty of Sciences, University of Lisbon, Lisboa, Portugal.

<sup>4</sup> Department of Neurology, Fuenlabrada University Hospital, Madrid, Spain.

<sup>5</sup> Department of Neurology, "Infanta Leonor" Hospital, Madrid, Spain.

<sup>6</sup> Brain Damage Unit, Beata Maria Ana Hospital, Madrid, Spain.

La enfermedad de Parkinson idiopática (EPI) es la segunda enfermedad neurológica más común en la tercera edad. Es un trastorno crónico degenerativo caracterizado por un déficit dopaminérgico. Caracterizado por síntomas motores (temblor de reposo, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural) y no motores (trastornos cognitivos y emocionales). La respuesta a la dopamina es una condición indispensable para el diagnóstico ya que hay varios subtipos "atípicos" que, aunque tienen síntomas muy similares no responden adecuadamente a la levodopa y tienen una progresión muy diferente. El diagnóstico de EPI basado en síntomas clínicos y su respuesta al tratamiento es indispensable pero difícil en la etapa inicial debido a escaso margen de mejoría motora y dificultad para evidenciar mejoría no motora así como a la intolerancia digestiva a dosis altas de dopamina. El electroencefalograma (EEG) puede ser de ayuda, estudiándose mediante microestados cerebrales (ME) los cambios producidos por la medicación en los pacientes con EPI. Se incluyeron 21 sujetos sanos y 14 con Parkinson  $\leq$  HYIII, sin fluctuaciones evidentes (evolución  $6,5 \pm 1,74$  años), en tratamiento con medicación dopaminérgica (MD) ( $576 \pm 475,0$  equivalentes levodopa totales). Se realizó EEG en reposo antes de MD (condición PRE), con 64 electrodos (Sistema 10-20). Tras una hora de MD (condición POST) se repitió EEG. Se procesó la señal con MATLAB y LORETA. Se calcularon las variables de tiempo y frecuencia por ME. La diferencia de promedios entre condición PRE y POST se verificó mediante prueba t para medidas repetidas con bootstrapping ( $n=2000$ ). En condición PRE se encontraron ME: A(19.55%) asociado con procesamiento fonológico, B(20.34%) con la red visual, C(18.55%), con la red de relevancia, D(19.58%) con la red atencional y E(19.58%) con la inhibición. La arquitectura estaba alterada en ME B y C. En condición POST: ME A(20.12%), B(18.39%), C(20.00%) y D(16.67%) con patrones normales. ME E no estaba presente. Pero, se encontró ME G(15.39%) relacionado con comportamiento motor. Entre sujetos control y pacientes en condición POST no hubo diferencias significativas. Los cambios de MS descritos con el uso de medicación se han correlacionado con fatiga cognitiva, atención y cambios en la función ejecutiva, síntomas no motores de EP. El EEG puede ser útil para caracterizar la respuesta farmacológica de síntomas no motores de EPI y descartar atipicidad. Esto abre un nuevo campo para la caracterización de la enfermedad, y la variación de su respuesta al tratamiento. Se requieren estudios adicionales para cuadros atípicos de EP y en diferentes fases farmacocinéticas de la administración del medicamento.

**Palabras clave:** Parkinson, electroencefalograma, microestados, síntomas no motores, medicación dopaminérgica.

**Agradecimientos:** El Dr. Romero cuenta con el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad (beca DPI2015-68664-C4-3-R (MINECO / FEDER). E. Rocón, MD del Castillo, JI Serrano cuenta con el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad (concesión DPI2015-68664-C4-1-R (MINECO / FEDER), NeuroMOD

## INFLUENCIA DE LA ENZIMA HEMOXIGENASA I (HO-1) EN PROCESOS DE NEUROINFLAMACIÓN: REGULACIÓN DIFERENCIAL CON EL ENVEJECIMIENTO

CRISTINA FERNÁNDEZ-MENDIVIL<sup>1</sup>, ENRIQUE LUENGO<sup>1</sup>, PAULA TRIGO-ALONSO<sup>1</sup>, IZASKUN BUENDIA<sup>1</sup>, SERGIO CANO-PEIRÓ<sup>1</sup>, JOSE LOBARDIA<sup>1</sup>, RAFAEL LEÓN<sup>1</sup> Y MANUELA G. LOPEZ<sup>1</sup>

Instituto Teófilo Hernando del Medicamento. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid. España.

Instituto de Investigación La Princesa. Hospital Universitario La Princesa. Madrid, España.

Las enfermedades neurodegenerativas (ENDs) comparten mecanismos patológicos comunes como el estrés oxidativo, la agregación proteica o la neuroinflamación crónica, proceso en el cual están involucradas las células microgliales, que son las células del sistema inmune innato del sistema nervioso central. Se ha descrito que la enzima HO-1 microglial, presenta efectos anti-inflamatorios, anti-oxidantes y neuroprotectores. Sin embargo, en pacientes con Alzheimer y durante el envejecimiento los niveles de HO-1 se encuentran elevados con respecto a sujetos sanos, y existen elevados depósitos de hierro derivados de la actividad de HO-1, que son tóxicos. Por tanto, se planteó profundizar en el conocimiento del papel de esta enzima en la toxicidad inducida por el LPS (estímulo inflamatorio) en ratones jóvenes (3 meses) y envejecidos (15 meses) C57/BL6 (WT) y LysMCreHmox1 $\Delta\Delta$  (HO-1 KO), carentes de HO-1 en la microglía. Inicialmente, se trataron ratones WT y KO HO-1 adultos y envejecidos con 0,5 mg/Kg de LPS. Los resultados de parámetros de comportamiento muestran que los animales adultos HO-1 KO tratados con LPS presentan una recuperación significativamente más tardía que los ratones WT tratados con LPS. Además, la ausencia de HO-1 microglial se relaciona con una mayor liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) y con un aumento en la expresión de enzimas proinflamatorias y prooxidantes. Sin embargo, en los animales envejecidos, observamos que la delección genética de esta enzima resulta beneficiosa, basándonos en los resultados de comportamiento y bioquímica. Estos resultados se han corroborado mediante una aproximación farmacológica, empleando la protoporfirina de zinc (ZnPP, 20 mg/Kg) como inhibidor de HO-1. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la enzima HO-1 microglial, así como su regulación diferencial, ya que su ausencia en individuos jóvenes, se relaciona con una recuperación más lenta de los animales sometidos a un estímulo inflamatorio, mientras que en animales envejecidos su ausencia se relaciona con una mejor recuperación. Por tanto, su regulación desempeña un papel crítico para resolver el estado inflamatorio subcrónico que subyace a muchas ENDs.

**Palabras clave:** neuroinflamación, hemoxigenasa I, microglía.

**Agradecimientos.** Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (ref. SAF2015-63936R) y ha sido posible gracias a una beca FPU concedida a CFM por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (ref. FPU15/03269). También apreciamos el continuo apoyo del Instituto Fundación Teófilo Hernando.

## EL POLIMORFISMO p.P888L DE SAP97 ACORTA LA DURACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO Y EL INTERVALO QT

DAVID TINAQUERO<sup>1</sup>, RAQUEL G. UTRILLA<sup>1</sup>, PALOMA NIETO-MARÍN<sup>1</sup>, SILVIA ALFAYATÉ<sup>1</sup>, SANDRA SACRISTÁN<sup>1</sup>, MARÍA TAMARGO<sup>2</sup>, JUAN TAMARGO<sup>1</sup>, RICARDO CABALLERO<sup>1</sup>, EVA DELPÓN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. CIBERCV. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Consorcio ITACA. 28040-MADRID.

<sup>2</sup>Departamento de Cardiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. CIBERCV. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. 28007-Madrid.

El gen DLG1 codifica la proteína de anclaje SAP97, que interacciona con los canales iónicos que generan las corrientes cardíacas de sodio (I<sub>Na</sub>), de potasio con rectificación interna (I<sub>K1</sub>) y transitoria de potasio (I<sub>to</sub>). Mediante secuenciación masiva, identificamos un polimorfismo (p.P888L) en DLG1 (5.3% en la población europea) en un varón y en dos hermanas diagnosticados con Síndrome de Brugada (SBr), en dos hermanos con fibrilación auricular familiar, y en dos pacientes con fibrilación ventricular idiopática y repolarización precoz, respectivamente. El objetivo de este trabajo fue determinar las consecuencias electrocardiográficas y electrofisiológicas a nivel celular de este polimorfismo en SAP97. Los ADNc de las formas nativa (WT) y p.P888L de SAP97 junto a ds-red se co-transfectaron o no con las subunidades alfa y beta de los canales que generan la I<sub>Na</sub>, la corriente de calcio tipo-L (I<sub>CaL</sub>), la I<sub>K1</sub> y la I<sub>to1</sub> humanas en células de ovario de hámster chino (CHO). Además, mediante transferencia génica con virus adeno-asociados se generaron ratones transgénicos que sobreexpresaban SAP97 WT o p.P888L específicamente en miocardio. Las corrientes y los potenciales de acción (PAs) fueron registrados mediante la técnica de "patch-clamp". La coexpresión de SAP97 WT aumentó significativamente la densidad de la I<sub>Na</sub>, I<sub>K1</sub> e I<sub>to1</sub> y redujo la de la I<sub>CaL</sub> en células CHO y en los miocitos ventriculares disociados a partir de los ratones transgénicos. Los efectos producidos por SAP97 p.P888L sobre la I<sub>Na</sub> y la I<sub>CaL</sub> fueron idénticos a los de SAP97 WT. Sin embargo, el polimorfismo no aumentó la I<sub>K1</sub> en ninguno de los dos tipos celulares. SAP97 p.P888L aumentó el pico de la I<sub>to1</sub>, pero además produjo un retraso significativo de la cinética de inactivación que condujo a un incremento muy marcado de la densidad de la carga que atraviesa la membrana en células CHO (126%) y en los miocitos procedentes de los ratones transgénicos (74.4%). Como consecuencia de este efecto, SAP97 p.P888L acortó significativamente la duración de los PAs registrados en los miocitos ventriculares. Estos efectos se correlacionaron con un acortamiento del intervalo QT del electrocardiograma en los ratones que sobreexpresaban SAP97 p.P888L. El polimorfismo p.P888L de SAP97 acorta la duración del potencial de acción y del intervalo QT como consecuencia del marcado aumento en la carga de la I<sub>to1</sub>. Por lo tanto, los portadores de este polimorfismo podrían ser más propensos al desarrollo de arritmias por reentrada.

**Palabras clave:** corriente transitoria de potasio, SAP97, electrocardiograma, corazón.

**Agradecimientos:** Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017-88116-P), Instituto de Salud Carlos III (PI16/00398), Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3738), Fundación BBVA y S. Española de Cardiología.



## ALTERACIONES CONDUCTUALES, METABÓLICAS Y ESTRUCTURALES IMPLICADAS EN LA COMORBILIDAD ENTRE ESQUIZOFRENIA Y ADICCIÓN A COCAÍNA

ROBERTO CAPELLÁN<sup>1</sup>, JAVIER ORIHUEL<sup>1</sup>, MARTA OTEO VIVES<sup>2</sup>, MARTA IBÁÑEZ MORAGUES<sup>2</sup>, NATALIA MAGRO CALVO<sup>2</sup>, MIGUEL ÁNGEL MORCILLO ALONSO<sup>2</sup>, MARTA CASQUERO-VEIGA<sup>3,4</sup>, MARÍA LUISA SOTO-MONTENEGRO<sup>3,4</sup>, MARCOS UCHA<sup>1</sup>, EMILIO AMBROSIO<sup>1</sup> Y ALEJANDRO HIGUERA-MATAS<sup>1</sup>

1. Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, UNED. Madrid, España.

2. CIEMAT – Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinética. Madrid, España.

3. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, España.

4. CIBER de Salud Mental (CIBERSAM), Madrid, España.

La infección prenatal y las experiencias traumáticas en torno a la pubertad son factores de riesgo para el desarrollo de esquizofrenia en la edad adulta, siendo más frecuente en hombres que en mujeres. Además, hay una alta incidencia de trastornos adictivos entre pacientes esquizofrénicos. En este estudio, se utilizó un modelo de doble impacto para analizar la relación entre síntomas cognitivos y positivos de la enfermedad y la propensión a consumir cocaína en ratas macho, así como las alteraciones conductuales, metabólicas y estructurales subyacentes. Se inyectó intraperitonealmente lipopolisacárido (LPS, 100 µg / kg) o solución salina en los días gestacionales 15 y 16. Además, durante los días postnatales (PNDs) 28 a 38, las ratas se expusieron a cinco factores estresantes diferentes o handling en días alternos. Una vez se alcanzó la edad adulta (PND70), se estudió la activación sensorimotora mediante la prueba de inhibición por prepulso (PPI). Posteriormente, a partir del PND90, se analizaron la impulsividad motora y diferentes aspectos de la autoadministración de cocaína en busca de características cardinales de la adicción a esta droga. Además, se utilizó resonancia magnética (RM), espectroscopía in vivo / ex vivo y tomografía por emisión de positrones (PET) para evaluar los posibles cambios volumétricos y metabólicos existentes en diferentes áreas cerebrales. El estrés peripuberal aumentó el PPI y disminuyó la autoadministración de cocaína, así como la impulsividad motora, sin embargo, la exposición a LPS aumentó la motivación para la cocaína en un cronograma de razón progresiva. El consumo compulsivo de cocaína (castigado) se vió potenciado en ratas expuestas a LPS y estrés, así como durante el acceso extendido. Los resultados de RM mostraron un volumen estriatal aumentado, así como niveles de N-acetil-aspartato y N-acetil-aspartil-glutamato disminuidos en ratas expuestas a LPS y estrés. Los niveles de glicerofosforilcolina cortical y fosforilcolina disminuyeron en las ratas expuestas a estrés. También encontramos evidencia de algunas alteraciones en el metabolismo cerebral medidas por PET entre los grupos. Nuestros resultados sugieren una interacción compleja entre la activación inmune prenatal y las experiencias traumáticas en la pubertad, sin embargo, parece que existe una sinergia entre ambos factores en el consumo compulsivo de la droga, una característica clave de la adicción.

**Palabras clave:** Esquizofrenia, Adicción, Cocaína, Doble impacto.

**Agradecimientos:** MINECO (SAF2013-47520-P y PSI2016-80541-P); MSSSI (RTA-RD12 / 028/0020 del ISCIII y PNSD, 2012I057); CM (S-2011 / BMD-2308; CANNAB-CM); UNED; UE (JUST / 2013 / DPIP / AG / 4823-EU MADNESS). RF, LC, GM y AM por su excelente asistencia técnica.

## NIVELES PLASMÁTICOS Y CEREBRALES DE CLUSTERINA EN DOS MODELOS ANIMALES DE DOLOR NEUROPÁTICO

CARMEN RODRÍGUEZ-RIVERA<sup>1</sup>, ROCÍO GIRÓN MORENO<sup>2</sup>, EVA M<sup>a</sup> SÁNCHEZ-ROBLES<sup>2</sup>, CARMEN GONZÁLEZ-MARTÍN<sup>1</sup>, LUIS FERNANDO ALGUACIL MERINO<sup>1</sup>, CARLOS GOICOECHEA GARCÍA<sup>2</sup>

1 Farmacología y Toxicología, Universidad CEU San Pablo, Madrid.

2 Farmacología, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid.

Estudios previos sugieren que clusterina (CLU) podría tener un papel regulador en las alteraciones funcionales del sistema nervioso central consecuentes a neurodegeneración, adicción o dolor. El presente trabajo pretende abundar en este conocimiento utilizando dos modelos diferentes de dolor neuropático. Así pues, estudiamos comparativamente los niveles plasmáticos y la expresión de CLU en núcleo accumbens (NAC) y corteza prefrontal (CPF) de animales tratados con paclitaxel (PCTX) o sometidos a una ligadura parcial del nervio ciático (CCI). Dado que la dieta parece influir tanto en el dolor como en los niveles de CLU, se ha estudiado además la posible modulación de estos efectos por una dieta grasa (high fat, HF). Se utilizaron ratas Wistar macho (250-300 g) que fueron tratadas con PCTX (1 mg/kg i.p., 4 días) o sometidas a CCI, además de los correspondientes controles (vehículo de PCTX, cirugía SHAM). Durante 28 días se realizaron evaluaciones semanales de la alodinia mecánica (test de von Frey), hiperalgesia térmica (plantar test) y concentraciones plasmáticas de CLU (ELISA). Al finalizar el protocolo se realizó un test de ansiedad (laberinto elevado en cruz) y se determinó la expresión de CLU en las fracciones mitocondrial (m-) y citosólica (c-) de homogenados de NAC y CPF (western blot). En el modelo de CCI se añadieron además grupos de animales alimentados con HF. PCTX y CCI provocaron alodinia mecánica el día 7, efecto que se mantuvo hasta el día 28, y también conductas indicativas de ansiedad. No modificaron sin embargo los niveles plasmáticos de CLU (contrariamente a la dieta HF, que los disminuyó). PCTX incrementó la expresión de CLU tanto en m-NAC como en m-CPF, aunque el efecto sólo fue significativo en este último caso acompañándose además de una disminución paralela en c-CPF. De forma aparentemente opuesta al modelo anterior, CCI disminuyó significativamente CLU en m-CPF. La dieta no modificó la expresión cerebral de CLU. Ambos modelos causan alodinia y ansiedad, pero sus efectos sobre los niveles cerebrales de CLU son diferentes. La translocación de CLU desde el citosol a las mitocondrias inducida por PCTX concuerda con lo descrito en la bibliografía, y se puede interpretar como parte de una respuesta celular de neuroprotección ante el efecto tóxico directo del antitumoral. Por el contrario, en el modelo CCI la disminución de CLU en m-CPF podría estar más relacionada con la reorganización funcional que provoca el dolor neuropático en esta zona del cerebro.

**Palabras clave:** Clusterina, dolor neuropático, paclitaxel, ligadura nervio ciático

**Agradecimientos:** SAF2012-40075-C02-01, Fundación Española del Dolor BF2-17-15.

## UNA MUTACIÓN EN EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TBX5 DISMINUYE LA CORRIENTE DE SODIO CARDÍACA HUMANA Y SE ASOCIA CON EL SÍNDROME DE BRUGADA

PALOMA NIETO-MARÍN, SILVIA ALFAYATE, DAVID TINAQUERO, RAQUEL G. UTRILLA, SANDRA SACRISTÁN, JUAN TAMARGO, EVA DELPÓN, RICARDO CABALLERO

En un probando con Síndrome de Brugada (SBr), en el cual tras un cribado genético no se encontraron mutaciones en los genes previamente asociados a la enfermedad, se identificó una mutación de cambio de sentido en el factor de transcripción Tbx5 (p.F206L). Se ha descrito que Tbx5, además de dirigir la cardiogénesis, controla la expresión de los canales Nav1.5 en el corazón del ratón adulto, aunque su papel en el miocardio adulto humano es desconocido. Dado que el SBr se asocia a mutaciones que producen la pérdida de función de los canales Nav1.5, en este trabajo analizamos los efectos de Tbx5 p.F206L sobre la corriente de sodio (INa) con el objetivo de determinar si dicha mutación podría dar lugar al SBr. La forma nativa (WT) y mutada de Tbx5, marcadas con proteína verde fluorescente (GFP), se transfectaron en células HL-1 o se introdujeron en partículas lentivirales con las que se infectaron cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC-CM). El registro de la  $I_{Na}$  en estas células se realizó mediante la técnica del parche de membrana. La sobre-expresión de Tbx5 WT en células HL-1 duplicó la densidad máxima de la INa comparada con la registrada en células sin transfectar (de  $-37.5 \pm 5.1$  a  $-62.6 \pm 8.2$  pA/pF,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ), mientras que la transfección con Tbx5 p.F206L produjo una disminución marcada de la densidad de la INa ( $-6.7 \pm 0.2$  pA/pF;  $n=6$ ;  $P<0.01$ ). Estos efectos se reprodujeron en hiPSC-CM, de modo que la infección con Tbx5 WT incrementó significativamente la densidad máxima de la INa (desde  $-19.4 \pm 2.8$  hasta  $-27.6 \pm 1.9$  pA/pF;  $n \geq 7$ ;  $P<0.05$ ) mientras que la infección con Tbx5 p.F206L produjo una disminución significativa de la misma ( $-9.5 \pm 1.9$  pA/pF). En células HL-1 y en hiPSCCM la expresión de Tbx5, tanto en su forma WT como mutada, no modificó la dependencia de voltaje de activación e inactivación de la INa. Los ensayos de luciferasa utilizando el promotor mínimo del gen humano que codifica los canales Nav1.5 (SCN5A) demostraron que Tbx5 p.F206L anulaba la actividad pro-transcripcional producida por Tbx5 WT. Los resultados demuestran que la mutación p.F206L disminuye de forma marcada la densidad de la INa como consecuencia de la supresión de la actividad pro-transcripcional de Tbx5 sobre el gen SCN5A. Estos resultados sugieren, por primera vez, que mutaciones en el gen TBX5 podrían asociarse con el SBr.

**Palabras clave:** corriente de sodio, Tbx5, Síndrome de Brugada, corazón.

**Agradecimientos:** Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017-88116-P), Instituto de Salud Carlos III (PI16/00398), Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3738), Fundación BBVA y S. Española de Cardiología.

## UNA MUTACIÓN EN EL GEN TBX5 SE ASOCIA AL SÍNDROME QT LARGO

**RAQUEL G. UTRILLA, PALOMA NIETO-MARÍN, DAVID TINAQUERO, SILVIA ALFAYATE, SANDRA SACRISTÁN, TERESA CRESPO, JUAN TAMARGO, RICARDO CABALLERO, EVA DELPÓN**

Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense. CIBERCV. Instituto de Investigación Biomédica Gregorio Marañón. Consorcio ITACA. 28040-Madrid, España.

En un probando diagnosticado de Síndrome QT Largo (SQTL), en cuyo análisis genético no se identificaron mutaciones en los genes relacionados con la enfermedad, se encontró una mutación de cambio de sentido (p.D111Y) en el factor de transcripción Tbx5, perteneciente a la familia T-box. En el

miocardio adulto de ratón Tbx5 regula la expresión de los canales Nav1.5 que generan la corriente de entrada de sodio (INa). El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de p.D111Y Tbx5 sobre la INa e identificar el mecanismo por el cual dicha mutación puede causar el SQTL. Para ello, el factor Tbx5 humano en su forma nativa (WT) o mutada, unido a GFP, se transfectó transitoriamente en células HL-1. La INa y la corriente tardía de sodio (INaL) fueron registradas mediante la técnica del parche de membrana. Además, se realizaron ensayos de luciferasa para analizar los cambios producidos por la mutación sobre la actividad transcripcional de Tbx5. Tbx5 tanto en su forma WT como mutada, aumentó significativamente la densidad de la INa desde  $-52.6 \pm 5.5$  a  $-78.7 \pm 11.3$  y  $-71.0 \pm 11.0$  pA/pF, respectivamente [ $n \geq 15$ ,  $P<0.05$  vs Tbx5(-)]. Tbx5 WT y p.D111Y no modificaron la dependencia de voltaje de la activación e inactivación de la INa. Tbx5 WT tampoco modificó la densidad de INaL medida al final de pulsos de 500 ms de duración ( $-2.9 \pm 0.5$  pA/pF). Por el contrario, Tbx5 p.D111Y aumentó la densidad de la INaL de forma significativa ( $-4.6 \pm 0.8$  pA/pF) [ $n \geq 15$ ,  $P<0.05$  vs Tbx5 WT]. La densidad de la INaL cardíaca es regulada por la Ca calmodulina cinasa II (CaMKII) que forma un complejo tripartito con el canal y la  $\beta$ -espectrina IV. Por tanto, se realizó un ensayo de luciferasa utilizando los promotores mínimos de los genes humanos que codifican la CaMKII (CAMKIID) y la  $\beta$ -espectrina IV (SPTBN4), respectivamente, en los cuales se identificaron los sitios consensos de unión de Tbx5. Los resultados demostraron que Tbx5 WT reprime la expresión de ambos genes. Por el contrario, p.D111Y Tbx5 carece completamente de la actividad represora por lo que aumenta la expresión de ambas proteínas. Estos resultados demostraron que p.D111Y Tbx5 aumenta la INaL incrementando la expresión de CaMKII y  $\beta$ -espectrina IV lo que puede dar lugar a una prolongación de la duración de los potenciales de acción ventriculares y del intervalo QT del electrocardiograma. Por tanto, describimos por primera vez, que mutaciones en el gen TBX5 pueden ser responsables de la aparición de SQTL.

**Palabras Clave:** Tbx5, INa, INaL, patch-clamp, Síndrome de QT largo.

**Agradecimientos:** Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2017-88116-P), Instituto de Salud Carlos III (PI16/00398), Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3738), Fundación BBVA y S. Española de Cardiología.

## EL ANTAGONISTA DE GLUCOCORTICOIDES MIFEPRISTONA NO PREVIENE EL HIPOMETABOLISMO NI EL DAÑO HIPOCAMPAL INDUCIDO POR EL STATUS EPILEPTICUS EN EL MODELO DE LITIO-PILOCARPINA EN RATA

**ÁGATA SILVÁN<sup>1\*</sup>, RUBÉN FERNÁNDEZ DE LA ROSA<sup>1</sup>, MERCEDES DELGADO<sup>1</sup>, DEBORAH LÓPEZ<sup>1</sup>, FRANCISCA GÓMEZ<sup>1,2</sup>, MIGUEL ÁNGEL POZO<sup>1,3</sup>, LUIS GARCÍA-GARCÍA<sup>1,2</sup>**

1. Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, UCM, Madrid.

2. Dpto. de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, Fac. Farmacia, UCM, Madrid.

3. Dpto. de Fisiología, Fac. Medicina, UCM, Madrid.

\* Dirección actual: Dpto. de Ciencias Básicas de la Salud, URJC, Alcorcón, Madrid.

La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es la forma más común de epilepsia focal, asociándose a daño y alteraciones en la actividad metabólica en el foco, presentando además un elevado grado de resistencia al tratamiento farmacológico. El modelo de status epilepticus (SE) por administración de litio-pilocarpina en rata es uno de los modelos de ELT más extendidos en la actualidad. Este modelo se caracteriza por la aparición rápida de SE a las que le sigue una fase silente en

el que hay hipometabolismo y daño cerebral, signos que ocurren también en la ELT. Está ampliamente aceptado que una elevación mantenida de los niveles circulantes de glucocorticoides (GC) potencia el daño neuronal inducido por múltiples insultos. Estudios previos de nuestro grupo muestran que el pretratamiento con metirapona, un inhibidor de la síntesis de corticosterona (principal GC en rata), previene frente a las crisis epilépticas y al daño asociado a éstas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el eventual efecto neuroprotector del bloqueo de los receptores de GC (GR) en el modelo de litio-pilocarpina en rata. Para ello se administró el antagonista GR mifepristona (RU-486; 25 mg/kg, i.p.) 45 min antes de la administración de pilocarpina (25 mg/kg, i.p.). La actividad metabólica cerebral se evaluó in vivo mediante tomografía por emisión de positrones (PET) 3 días después del SE. Al día siguiente, las ratas se sacrificaron y se midieron diferentes parámetros de daño cerebral. Los resultados muestran que el SE indujo una reducción del metabolismo cerebral de forma generalizada (ej. SUVVEH+SAL=4,71 ± 0,27 vs SUVVEH+PILO=2,48 ± 0,17, p<0,001 en hipocampo). Este hipometabolismo fue acompañado de neurodegeneración, muerte neuronal, neuroinflamación y gliosis reactiva a nivel del hipocampo. Por otra parte, el tratamiento con mifepristona no previno el hipometabolismo hipocampal (SUVMI+PILO= 2,74 ± 0,12 vs SUVVEH+PILO= 2,48 ± 0,17; n.s.) ni el daño inducido por el insulto epileptogénico. En conjunto nuestros resultados muestran que mientras la inhibición de la síntesis de GC mostró efectos neuroprotectores, el bloqueo agudo de los GR no ha mostrado capacidad protección efectiva frente al SE. Todo ello sugiere que los efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores de la metirapona están mediados principalmente por la desviación de la ruta de síntesis de GC hacia la formación de esteroides neuroactivos (moduladores alostéricos del GABA) más que por la reducción de la actividad de los GC sobre los GR cerebrales.

**Palabras clave:** glucocorticoides, status epilepticus, pilocarpina, PET, neurodegeneración

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO; CTQ2014-52213-R).

### COMPUESTOS MULTIDIANA INDUCTORES DE NRF2 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

JOSE LOMBARDIA<sup>1</sup>, CRISTINA FERNÁNDEZ-MENDÍVIL<sup>1</sup>, ENRIQUE LUENGO<sup>1</sup>, SERGIO CANO-PEIRÓ<sup>1</sup>, PAULA TRIGO-ALONSO<sup>1</sup>, IZASKUN BUENDIA<sup>1,2</sup>, RAFAEL LEÓN<sup>1,2</sup>, CLARA HERRERA-AROZAMENA<sup>3</sup>, MARÍA ISABEL RODRÍGUEZ-FRANCO<sup>3</sup>, MANUELA G. LÓPEZ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Teófilo Hernando del Medicamento. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. UAM. Madrid. España.

<sup>2</sup> Hospital Universitario La Princesa. Madrid. España

<sup>3</sup> Instituto de Química Médica. CSIC. Madrid. España.

Las enfermedades neurodegenerativas (ENDs) se caracterizan por el desarrollo de diversos mecanismos patológicos como la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial o la formación de agregados proteicos. Ante esta situación, el desarrollo de fármacos multidiana supone una estrategia muy prometedora, pues ofrece la posibilidad de combatir, de manera simultánea, varios procesos responsables del empeoramiento de la homeostasis. Este trabajo presenta un estudio farmacológico de compuestos capaces de inducir la vía de señalización de Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), factor de transcripción íntimamente relacionado con la expresión de

genes con capacidad antioxidante y anti-inflamatoria. Para su estudio, se han empleado diferentes modelos in vitro de la enfermedad de Alzheimer. Los compuestos han demostrado ser protectores frente a ácido okadaico (AO: inhibidor de fosfatasa, que genera hiperfosforilación de la proteína Tau) en la línea celular de neuroblastoma SHSY-5Y. Además, hemos observado que en cultivos primarios de glía tratados con LPS como estímulo inflamatorio, estos compuestos fueron capaces de modular la liberación de nitritos (medida directa de neuroinflamación). De entre ellos, seleccionamos aquellos que presentaron un mejor perfil protector y antiinflamatorio, como el compuesto K. En rodajas de hipocampo tratadas con AO (1 µM) durante 6 horas, este compuesto fue capaz de aumentar la viabilidad celular (medida mediante la sonda fluorescente iodo de propidio (IP) y por MTT) y disminuir el estrés oxidativo (medido mediante la sonda fluorescente DCFDA). Los resultados obtenidos parecen indicar que el compuesto K presenta un perfil neuroprotector y antiinflamatorio adecuado para profundizar en su estudio farmacológico en el tratamiento de ENDs, debido a su capacidad multidiana.

**Palabras clave:** multidiana, enfermedades neurodegenerativas, Nrf2.

**Agradecimientos.** Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida por el MINECO (ref. SAF2015-63936R y SAF2015-64948R). A su vez, agradecemos el continuo apoyo del Instituto Fundación Teófilo Hernando.

### PAPEL REGULADOR DE LOS MACRÓFAGOS PERIVASCULARES EN UN MODELO ANIMAL DE ACTIVACIÓN NEUROINMUNE INDUCIDO POR ESTRÉS CRÓNICO

JAVIER ROBLEDÓ<sup>1</sup>, ALINE SAYD<sup>1</sup>, MARTA GONZÁLEZ-PRIETO<sup>1</sup>, ÁLVARO G. BRIS<sup>1</sup>, CRISTINA ULECIA-MORÓN<sup>1</sup>, DAVID MARTÍN-HERNÁNDEZ<sup>1</sup>, LAURA ORÍO<sup>2</sup>, BORJA GARCÍA-BUENO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid; Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM); Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12); Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica UCM; Avda. Complutense s/n, Madrid-28040 (Spain).

<sup>2</sup>Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Spain. Red de Trastornos Adictivos (RTA) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain.

La respuesta inflamatoria es un mecanismo necesario para hacer frente al estrés. Sin embargo, numerosas evidencias experimentales sugieren que una respuesta neuroinflamatoria desregulada podría ser un elemento central en la fisiopatología de múltiples patologías neuropsiquiátricas relacionadas con el estrés, afectando tanto a la estructura como a la función cerebral. Los macrófagos perivascuales (PVMs) son células hematopoyéticas con una tasa de reemplazo constante y actividad fagocítica basal, que migran al espacio perivascular cerebral modulando las interacciones entre el sistema inmune y el parénquima cerebral. Se ha demostrado que, tras la depleción selectiva de los PVMs, se produce un aumento en la producción de la prostaglandina proinflamatoria E2, sobre-activando el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y otras respuestas de fase aguda tras la administración sistémica de LPS. Otros estudios sugieren que el papel de los PVMs en la señalización entre ambos sistemas puede variar en función de la naturaleza del estímulo inmune. Nuestro estudio tiene como objetivo describir el posible papel regulador de los PVMs en diferentes vías de señalización pro/antiinflamatorias y oxidativas en muestras de corteza frontal de ratas Wistar macho expuestas a un

modelo de estrés crónico de 21 días conocido como “chronic mild stress CMS”. Las muestras han sido analizadas a siguiendo un curso temporal (1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> y 3<sup>o</sup> semana de estrés). El estudio del papel de los PVMs se realiza mediante su depleción selectiva a través de la administración icv de la molécula pro-apoptótica clodronato encapsulado en liposomas. Los resultados corroboran el papel regulador de los PVMs en condiciones de activación inmune, al mostrar una expresión reducida de los elementos de la vía de señalización del receptor de inmunidad innata Toll-like receptor a los 21 días de estrés en los animales sin PVMs en comparación con los animales con células intactas.

**Palabras clave:** neuroinflamación, estrés crónico, macrófagos perivasculares, clodronato.

### PLEIOTROPHIN OVEREXPRESSION IN THE 6-HYDROXYDOPAMINE STRIATAL MOUSE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE: INVOLVEMENT OF NEUROINFLAMMATION

Rosalía Fernández-Calle<sup>1\*</sup>, Esther Gramage<sup>1</sup>, Yasmina B. Martín<sup>2</sup>, Gonzalo Herradón<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, CEU Universities, Urbanización Montepríncipe, 28925, Alcorcón, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Anatomía, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Francisco de Vitoria, Ctra. M-515, Pozuelo-Majadahonda, km 1,800; 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

Pleiotrophin (PTN) is a cytokine involved in nerve tissue repair processes and in the survival and differentiation of dopaminergic neurons. Its expression levels are upregulated in the nigrostriatal pathway of Parkinson's disease (PD) patients and in animal models of PD. In addition, it has been proposed as a modulator of neuroinflammation after different stimulus, such as lipopolysaccharide (LPS). Specifically, LPS-induced microglial activation significantly increased in mice that overexpress PTN (PTN-Tg mice) compared to Wild type (WT) mice. We aim to characterize the dopaminergic denervation in the Striatum after intra-striatal injections of the Parkinsonian toxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in PTN-Tg mice, and classify the microglial and astrocytic population in this process. Due to the known relevance of Toll-like receptors (TLRs) in inflammation, we also aim to characterize the influence of TLRs in this process pre-treating the animals with TAK242 (a TLR4 inhibitor). The injection of 6-OHDA induced a significant decrease of tyrosine hydroxylase (TH) staining in the Striatum of WT mice. However, this dopaminergic degeneration induced by 6-OHDA was totally absent in mice overexpressing PTN (PTN-Tg). Pre-treatment with TAK242 did not affect 6-OHDA effect in PTN-Tg mice, however, caused a higher impact of 6-OHDA damage in WT mice. Regarding neuroinflammation, an extremely high reactive astrocytosis was found in WT mice treated with 6-OHDA, specifically in the area where the dopaminergic axons were degenerated. Microglia was also activated, but in a lesser extent than astrocytes. In PTN-Tg mice, the glial activation induced by 6-OHDA was significantly reduced, matching the areas that lacked dopaminergic denervation. These evidences demonstrate that PTN overexpression protects against the damage on dopaminergic nigrostriatal pathway, and suggest an involvement of neuroinflammation in the protective actions of PTN.

**Key words:** Neuroinflammation, 6-hydroxydopamine, Microglia, Astrocytes, Parkinson's disease.

**Acknowledgements:** SAF2014-56671-R grant from Ministerio de Economía y Competitividad to Gonzalo Herradón and M<sup>a</sup> Pilar

Ramos Álvarez, and FPI grant from Universidad San Pablo CEU to Rosalía Fernández Calle.

### FACILITACIÓN DE LA EXOCITOSIS POR TETRABENAZINA MOVILIZANDO CA<sup>2+</sup> DEL RE EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINA

NURIA ÁLVAREZ ORTEGO, GEMA JACOB, RICARDO DE PASCUAL, ANTONIO G. GARCÍA Y LUIS GANDÍA

Instituto Teófilo Hernando. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. UAM.

El transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) se expresa en la membrana de vesículas secretoras presinápticas del SNC. Su bloqueo por tetrabenazina (TBZ) causa el agotamiento de la dopamina en los ganglios basales estriados; debido a este mecanismo se usa desde hace años en el tratamiento de la corea de Huntington y otros trastornos hipercinéticos tardíos. En este contexto, hayamos que la TBZ facilitaba la exocitosis, por lo que usamos células cromafines bovinas (CCBs) que fueron estimuladas con pulsos de 5 segundos a intervalos de 1 minuto con 35 mM de KCl (K+), observando que la liberación de catecolaminas disminuía. Sin embargo, cuando las células se superfunden con TBZ (1-3 µM), la secreción aumenta. La facilitación de la exocitosis no se debió a una entrada de Ca<sup>2+</sup> por los canales plasmáticos de Ca<sup>2+</sup> voltaje dependientes (CCVDs), ya que la TBZ bloqueó la corriente de Ca<sup>2+</sup> y además no observamos efecto sinérgico junto a Bayk8644 (1µM), activador de los CCVDs del subtipo L. Explorando el RE, observamos que la TBZ aumentó las respuestas secretoras a la cafeína pero no a histamina, planteando la hipótesis de que la TBZ está facilitando la exocitosis mediante la movilización de Ca<sup>2+</sup> a través del receptor de rianodina del retículo endoplásmico.

**Palabras clave:** Secreción de catecolaminas, Tetrabenazina, Receptor de Rianodina, Célula cromafín.

**Agradecimientos:** Agradecemos al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación de este trabajo a través del proyecto SAF 2016-78892-R y a la Fundación Teófilo Hernando por su continuo apoyo.

### REPROGRAMACIÓN NEURONAL DIRECTA DE CÉLULAS GLIALES REACTIVAS EN CULTIVO

ANA GUILLÉN MARTÍNEZ<sup>1</sup>, ROCIO BARTOLOMÉ CABRERO<sup>1</sup>, PAULA GARCÍA SOCUELLAMOS<sup>1</sup>, MARINA ARRIBAS BLÁZQUEZ<sup>1</sup>, SERGIO GASCÓN JIMÉNEZ<sup>1</sup>, MAGDALENA GÖTZ<sup>1,2</sup>, ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología y toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

<sup>2</sup>Institute of Stem Cell Research, Helmholtz Center Munich and Physiological Genomics, Biomedical Center Munich, Großhadernerstr. 9, 82152 Planegg/Munich, Germany.

Una característica del sistema nervioso central de mamíferos es la capacidad limitada de regeneración después de una lesión, lo que se debe al escaso número de precursores neuronales existentes en la edad adulta. Estudios recientes sugieren que células gliales localizadas en el cerebro y la médula espinal pueden ser convertidas directamente a neuronas, mediante la expresión de factores neurogénicos, mediada por vectores virales. Esta posibilidad abre nuevas expectativas terapéuticas basadas en la regeneración de poblaciones neuronales a partir de células gliales residentes del área lesionada. A pesar de ser un campo prometedor, aún existen limitaciones para la aplicación de esta tecnología a la medicina regenerativa. En nuestros estudios anteriores observamos que factores neurogénicos capaces de inducir

conversión neuronal en astrocitos cultivados in vitro, son inefectivos in vivo, en el contexto de la lesión cerebral. Esto indica que no todas las células gliales son susceptibles de ser reprogramadas a neuronas, al tiempo que sugiere que un ambiente de gliosis post-traumática podría dificultar el proceso de reprogramación. Para investigar estas hipótesis hemos establecido un nuevo modelo de cultivo de células gliales, reactivas, aisladas de corteza cerebral de ratón adulto, previamente lesionada por la técnica de "stab wound". Los cultivos así obtenidos están constituidos por una población mixta de astrocitos (GFAP+), oligodendrocitos (O4+) y microglía (CD45+). Posteriormente, confirmamos la presencia de estas estirpes celulares en nuestros cultivos mediante líneas de ratón modificados genéticamente para expresar moléculas reporteras bajo el control de los promotores génicos GLAST/GFAP (astrocitos), Sox10/Ng2 (oligodendrocitos), y Ccr2 (microglía). Finalmente utilizamos técnicas de seguimiento con vídeo-microscopía de fluorescencia para evaluar la eficiencia de reprogramación, mediada por los factores Neurog2 y Bcl2, en cada estirpe celular. Observamos que, tanto astrocitos como oligodendrocitos, respondieron favorablemente a la conversión neuronal directa, mientras que células de microglía no lo hicieron.

**Palabras clave:** Reprogramación directa, lesión cerebral, glía reactiva, medicina regenerativa, factores neurogénicos.

**Agradecimientos:** Este trabajo está siendo financiado por el programa Estatal de Promoción del Talento y Empleabilidad en I+D+i (RYC-2015-19185).

## SPATIAL MEMORY IMPAIRMENT INDUCED BY PALMITIC ACID ENRICHED-DIET IN ADOLESCENT MICE

ANA CONTRERAS, VICTOR NARANJO, ADRIÁN PLAZA, BEATRIZ MERINO, LIDIA MORALES, VICTORIA CANO, MARIANO RUIZ-GAYO AND NURIA DEL OLMO

Department of Pharmaceutical and Health Sciences, Facultad de Farmacia, Universidad CEU-San Pablo, Madrid, Spain

The consumption of high-fat diets (HFD) is associated with hippocampus-dependent cognitive deficits, mainly in adolescent individuals. HFD used in most studies contain elevated amounts of both palmitic and oleic acids, together with large amounts of sucrose, making very difficult to properly identify the relative influence of each fatty acid within the hippocampus. Our study aimed to investigate the lasting effects of diets enriched with either oleic (OHFD) or palmitic acids (PHFD) on hippocampal-dependent spatial memory in adolescent and adult mice. Adolescent (4-week old) and adult (8-week old) male C57BL/6 mice fed either standard rodent diet (SD), OHFD (60% SD + 40% high-oleic sunflower oil), or PHFD (60% SD + 40% palm kernel oil) during 8 weeks. Spatial memory was evaluated by analyzing the spontaneous alternation in the Y-maze. The effect of these diets on glutamatergic transmission-related genes such as *glt1*, *gluA 1-2* and *grin2 A-D* was evaluated by RT-qPCR. Our results show that both OHFD and PHFD induced a greater increase of body weight than SD in adolescent as well as in adult mice. Nevertheless, adolescent mice, but not adult mice, that consumed PHFD displayed impaired spatial memory in the Y-maze test compared to the other two groups. Moreover, modifications in hippocampus gene expression in this cohort were compatible with the above mentioned behavioral impairment. Our study shows that the exposure to PHFD, but not to OHFD, during the adolescence impairs hippocampus-dependent memory processes. Furthermore, our findings further support the concept that the neurobehavioral vulnerability to this kind of diets is more

prominent during the adolescent than during the adult period.

**Key words:** Kernel palm oil, high-oleic oil, high fat diet, memory.

**Funding:** Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2016-78556R), European Regional Development Fund, and Fundación Universitaria CEU-San Pablo. AC and AP are supported by the post-graduate fellowship programs of Universidad CEU-San Pablo and MINECO (BES-2012-063773), respectively.

## VIDEOMICROSCOPÍA EN TIEMPO REAL Y SEGUIMIENTO A NIVEL DE CÉLULA ÚNICA PARA MONITORIZAR LA BIOLOGÍA CELULAR Y LA PROGRESIÓN DE LINAJE DE DISTINTAS POBLACIONES NEURALES

David de Agustín-Durán<sup>1,2,3</sup>, Rosa Gómez-Villafuertes<sup>1,2,3</sup>, Lucía Paniagua-Herranz<sup>1,2,3</sup>, Sergio Gascon<sup>4,5</sup>, María de la O Ferreras<sup>1,2,3</sup>, Juan Carlos Gil-Redondo<sup>1,2,3</sup>, María José Queipo<sup>1,2,3</sup>, Aida Menendez-Mendez<sup>1,2,3</sup>, Ráquel Pérez-Sen<sup>1,2,3</sup>, Esmerilda G. Delicado<sup>1,2,3</sup>, Javier Gualix<sup>1,2,3</sup>, Marcos R. Costa<sup>6</sup>, Timm Schroeder<sup>7</sup>, María Teresa Miras-Portugal<sup>1,2,3</sup>, Felipe Ortega<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Biochemistry and Molecular Biology Department, Faculty of Veterinary medicine, Complutense University

<sup>2</sup>University Institute for Neurochemistry Research (IUIN)

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC)

<sup>4</sup>Institute of Stem Cell Research, Helmholtz Center Munich, Neuherberg/Munich, Germany Physiological Genomics, Biomedical Center, Ludwig-Maximilians University Munich

<sup>5</sup>Toxicology and Pharmacology Department, Faculty of Veterinary medicine, Complutense University

<sup>6</sup>Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte

<sup>7</sup>Department of Biosystems Science and Engineering, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zurich

La comprensión de los mecanismos que controlan eventos biológicos críticos para distintas poblaciones neurales, tales como proliferación, migración y diferenciación hacia un determinado destino celular, resulta de crucial importancia en el diseño de estrategias terapéuticas para numerosas patologías que afectan al sistema nervioso. Los métodos actualmente empleados a tal fin se basan en un análisis a tiempo final, por lo que no proporcionan una resolución temporal suficiente como para caracterizar el comportamiento de las poblaciones neurales. Además, alteraciones en la muerte celular, la heterogeneidad en el seno de una misma población neural o la baja eficiencia de los marcadores moleculares empleados habitualmente suponen importantes limitaciones que conducen a una interpretación incompleta o incluso incorrecta de los resultados. Por el contrario, la videomicroscopía en tiempo real combinada con un seguimiento a nivel de célula única bajo las condiciones apropiadas constituye una potente herramienta para monitorizar cada uno de los eventos mencionados, lo que hace posible un conocimiento más exacto y detallado del comportamiento de las distintas poblaciones neurales. En esta presentación describiremos un protocolo desarrollado para el estudio a tiempo real de las mismas.

**Palabras clave:** neurociencia, videomicroscopía timelapse a tiempo real, seguimiento a nivel de célula única, células madre adultas neurales, progresión de linaje.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por las becas de investigación "Red de Excelencia Consolider-Ingenio Spanish Ion Channel Initiative" (BFU2015-70067RED), MEC (BFU2014-53654-P), BRADE-CM (S2013/ICE-2958), UCM-Santander (PR26/16-18B-3), el programa de becas de la Fundación Areces (PR2018/16-02) y el programa Ramón y Cajal del Ministerio de Economía y Competitividad (MEC:RYC-2013-13290).

## MEJORÍA EN EL ÍNDICE DE PROTEÍNAS TIOLADAS TRAS TRATAMIENTO CON DRONEDARONA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL

LAIA PAZÓ-SAYÓS<sup>1</sup>, RAQUEL MARTÍN-OROPESA<sup>1</sup>, PILAR RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ<sup>3</sup>, EMILIO DELGADO-BAEZA<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> CARMEN GONZÁLEZ-GARCÍA<sup>3</sup>, BEGOÑA QUINTANA-VILLAMANDOS<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Anestesiología y Reanimación, Hospital Gregorio Marañón, Madrid.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, IISGM, Madrid.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>4</sup> Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid.

El índice de proteínas tioladas (PTI) ha sido estudiado como un marcador de estrés oxidativo en pacientes hemodializados<sup>1</sup>. Por otro lado, la dronedarona es un agente antiarrítmico que actúa sobre múltiples canales iónicos. Nuestra hipótesis fue que el PTI podría ser también un biomarcador de daño oxidativo en la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) en un modelo experimental de hipertensión e HVI. El animal empleado en el estudio fue la rata espontáneamente hipertensa (SHR), macho, adulta. Se establecieron dos grupos experimentales randomizados de ratas SHR según el tratamiento recibido: ratas tratadas con dronedarona (SHR-D, n=9) and ratas que recibieron placebo (SHR, n=9). Las ratas Wistar Kyoto (WKY, n=9) fueron usadas como controles normotensos. Tras 14 días de tratamiento, se obtuvo plasma mediante punción intracardiaca y centrifugación de la sangre y se analizó la concentración de tioles y proteínas tioladas. El PTI se calculó según se indica<sup>1</sup>: [proteínas tioladas] / [tioles]. El análisis de los datos se realizó mediante el test ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. Todos los datos fueron expresados como media±SEM y se consideró significativa P< 0.05. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Los controles hipertensos mostraron un aumento del PTI en comparación con los controles normotensos. De forma interesante, tras tratamiento con dronedarona, se produjo un descenso del PTI en comparación con el grupo SHR (p<0.01), sin encontrar diferencias entre SHR-D y WKY. El tratamiento con dronedarona mejora el estrés oxidativo en un modelo experimental de hipertensión arterial.

**Palabras clave:** Índice de proteínas tioladas, estrés oxidativo, dronedarona, hipertrofia ventricular izquierda, hipertensión Arterial  
**Agradecimientos:** Estudio financiado por FIS13/01261, PI16/02069 y Fondos FEDER.

## INFLUENCIA DE LA CAPTACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN LA INTEGRACIÓN SINÁPTICA

IRIS ÁLVAREZ-MERZ<sup>1,2</sup>, JAVIER G LUENGO<sup>1</sup>, MARÍA-DOLORES MUÑOZ<sup>3</sup>, ANTONIO S. HERRANZ<sup>2</sup>, RAFAEL MARTÍN DEL RÍO<sup>2</sup>, JESÚS MIGUEL HERNÁNDEZ-GUIJO<sup>1</sup>, JOSÉ MARÍA SOLÍS<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Fundación Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

<sup>2</sup>Servicio de Neurobiología-Investigación, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, España.

<sup>3</sup>Unidad de Neurología Experimental, Departamento de Investigación, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid, España.

La taurina, un aminoácido muy abundante en el sistema nervioso central, aplicada a altas concentraciones (3-10 mM) provoca una potenciación duradera de la transmisión sináptica y de la excitabilidad axonal probablemente mediada por un sistema de transporte. Para encontrar el

sistema de transporte implicado en este efecto, hemos realizado experimentos en rodajas de hipocampo de rata, utilizando técnicas electrofisiológicas y de análisis de aminoácidos por HPLC. Hemos encontrado que 11 aminoácidos o análogos de aminoácidos aplicados a altas concentraciones (10 mM) son capaces de producir un efecto potenciador similar al de la taurina (aminoácidos potenciadores), mientras otros 7 aminoácidos no tuvieron efectos duraderos sobre la transmisión sináptica (aminoácidos no potenciadores). Esta variedad de aminoácidos potenciadores implica que el efecto sobre la transmisión sináptica ha de estar mediado por al menos dos sistemas diferentes de transporte de aminoácidos, que aún no hemos identificado. Hemos observado que la cantidad acumulada del aminoácido aplicado se correlaciona positivamente con el grado de potenciación sináptica provocada. Esta acumulación intracelular de partículas, que da lugar a la potenciación del potencial postsináptico excitatorio (fEPSP por sus siglas en inglés) y de la excitabilidad axonal, parece provocar un incremento del volumen intracelular, ya que se ha detectado un aumento de la resistividad del tejido producida por los aminoácidos potenciadores pero no por los no potenciadores. La utilización de una mezcla con siete de los aminoácidos potenciadores a sus concentraciones plasmáticas (siendo 2,1 mM la concentración final de la mezcla) fue capaz de potenciar la transmisión sináptica y la excitabilidad axonal. Estos resultados sugieren que la activación prolongada de los sistemas de transporte de aminoácidos de baja afinidad y alta capacidad puede reducir el volumen del compartimento extracelular en el tejido cerebral y en consecuencia influir en su funcionalidad.

**Palabras clave:** Potenciación sináptica, taurina, aminoácidos, transportador de aminoácidos, hipocampo.

**Agradecimientos:** Agradecemos el continuo apoyo y colaboración del personal técnico superior de laboratorio Jose Barbado Fernández y María José Asensio Vegas. Agradecemos también el apoyo del Instituto Teófilo Hernando y del IRYCIS.

## LA INHIBICIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 REDUCE EL VOLUMEN DE INFARTO, LA INFLAMACIÓN Y MEJORA LA PÉRDIDA DE LA FUNCIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN ISQUEMIA CEREBRAL

ALEJANDRA PALOMINO-ANTOLÍN<sup>1,2</sup>, VÍCTOR FARRÉ-ALINS<sup>1,2</sup>, PALOMA NARROS<sup>1,2</sup>, JULIANA MARTINS ROSA<sup>1,2</sup>, ANA ISABEL CASAS<sup>3</sup>, HARALD HHW SCHMIDT<sup>3</sup>, JAVIER EGEA<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

<sup>3</sup> Department of Pharmacology & Personalised Medicine, CARIM, Maastricht University, Universiteitssingel 50, 6229 ER Maastricht, The Netherlands.

La isquemia cerebral es una de las lesiones cerebrales agudas con más incidencia, representa el 10% de muertes a nivel mundial y es una de las principales causas de discapacidad en la tercera edad. El único tratamiento farmacológico actual es el activador tisular del plasminógeno recombinante (r-TPA), que se aplica tan solo a un 10-15% (PMID: 26508752). El inflammasoma NLRP3, que promueve la liberación de IL-1β, es un componente clave del sistema inmune innato. El objetivo de este estudio es validar el inflammasoma NLRP3 como una nueva diana terapéutica en isquemia "in vivo". Para ello hemos utilizado un potente inhibidor selectivo de la activación del inflammasoma, el MCC950. Como modelo de

isquemia cerebral, hemos utilizado el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante 1 hora mediante el filamento intraluminal. El compuesto se inyectó i.p. a las dosis de 1, 3 y 10 mg/kg, 1 hora tras la reperusión del tejido. En estas condiciones, el MCC950 ofreció un efecto neuroprotector a las dosis de 3 y 10 mg/kg (53,23% y 50,57% respectivamente) evaluado 24 h después de la isquemia. Además, se observa una mejora funcional significativa a la dosis de 3 mg/kg, dato que concuerda con la reducción del volumen de infarto. Para establecer la ventana terapéutica se inyectó MCC950 3mg/kg a las 2 horas de la reperusión, y no apreciamos un efecto protector en relación con los animales no tratados. Además, hemos observado una reducción de los niveles de ARNm de los diferentes componentes del inflammasoma en los animales tratados con MCC950 a 3mg/kg. A su vez, hemos evaluado el estado de la barrera hematoencefálica (BHE) mediante el colorante Evans-blue y, a través de la expresión de las diferentes proteínas que forman las uniones estrechas características del endotelio del SNC (Claudina-5, ZO-1, VE-cadherina). Como conclusión, el bloqueo de la activación del inflammasoma con MCC950 ofrece un efecto neuroprotector significativo, acompañado de una mejora funcional de los animales, y del estado de la BHE a través de la recuperación funcional de las proteínas que forman las uniones estrechas. Por ello, creemos que el bloqueo de la activación del inflammasoma NLRP3 produce una protección de la BHE y puede ser una buena diana terapéutica en isquemia cerebral.

**Palabras clave:** *Isquemia cerebral, inflammasoma NLRP3, barrera hematoencefálica.*

**Agradecimientos:** *Este estudio está financiado por la Fundación Mutua Madrileña, el Programa Miguel Servet (CP14/00008) del IS Carlos III, y el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (ISCIII/FEDER) (PI16/00735).*

### EVALUACIÓN DE UN ANTAGONISTA DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB<sub>2</sub> EN UN MODELO MURINO DE MALARIA CEREBRAL

**ANA BORREGO-ESCArtÍN<sup>1,2</sup>, MARÍA GÓMEZ-CAÑAS<sup>1</sup>, PAULA MORALES<sup>3</sup>, NADINE JAGEROVIC<sup>3</sup>, JAVIER FERNÁNDEZ-RUIZ<sup>1</sup>, AMALIA DIEZ<sup>2</sup>**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid: <sup>1</sup>Sección de Medicina y <sup>2</sup>Sección de Veterinaria; <sup>3</sup>Instituto de Química Médica-CSIC, Madrid.*

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más importantes por su alta morbilidad, mortalidad e impacto socio-económico que ocasiona. Anualmente se diagnostican más de 200 millones de nuevos casos, de los cuales aproximadamente 1 millón mueren a consecuencia de la infección. Una de sus complicaciones más graves es la malaria cerebral (MC), causada por la extensión de la infección de *Plasmodium falciparum* al tejido nervioso. La MC cursa con alteraciones neurológicas que desembocan en la muerte del paciente en un tiempo corto si no recibe atención médica adecuada. Incluso con el tratamiento correcto, la tasa de letalidad entre los niños es alta. Actualmente, esta forma severa se considera una de las encefalopatías más comunes y la infección parasitaria con mayor importancia del Sistema Nervioso Central (SNC). La MC puede causar déficits neurológicos y de comportamiento permanentes, haciendo que la carga sanitaria radique tanto en el posible fallecimiento de quienes la padecen como en las graves secuelas que ocasiona. Todo lo anterior justifica la necesidad de buscar terapias que impidan que la enfermedad progrese hacia la forma cerebral y que puedan prevenir, e incluso eliminar, las secuelas neurocognitivas de los individuos que sobreviven. Por su parte, el sistema

endocannabinoide juega un importante papel en la inmunomodulación del SNC mediante el receptor CB<sub>2</sub>. Estudios previos realizados por otros autores han puesto de manifiesto que ratones con la delección del gen que codifica para CB<sub>2</sub> mejoran la supervivencia a la MC con respecto a los ratones *wild type*, proponiendo el potencial de este receptor para el tratamiento de encefalitis inducida por parásitos. Considerando dichos antecedentes, se procedió a evaluar el potencial terapéutico de un antagonista del CB<sub>2</sub> en un modelo murino de MC. Para ello, se realizaron estudios de afinidad y funcionalidad de distintos compuestos cannabinoides (PM475C, PM117B y SR144528), con el fin de determinar su perfil farmacodinámico y discernir el mejor candidato para su evaluación en el modelo *in vivo*. Posteriormente, ratones C57BL/6 infectados con *Plasmodium berghei* se trataron diariamente con el antagonista SR144528, y se procedió a la determinación de la parasitemia y valoración fenotípica de las alteraciones neurológicas de los animales incluidos en el ensayo. Encontramos que un 30% de los ratones tratados con SR144528 se recuperan de los síntomas de MC y aumentan su supervivencia, sucumbiendo finalmente por hiperparasitemia y anemia severa sugiriendo que la severidad de la MC podría ser modulada mediante el bloqueo farmacológico de CB<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** *malaria cerebral, receptor cannabinoide, antimalárico, antagonista, farmacodinámica.*

**Agradecimientos:** *Estudio financiado por el MINEICO-Plan Nacional de Biomedicina (SAF2015-68580-C2-1/2-R).*

### ACTIVIDAD PROINFLAMATORIA DE LA GRANZIMA A EN EL ÍLEON EN UN MODELO ANIMAL DE INFLAMACIÓN INTESTINAL

**EDUARDO MOREO<sup>1</sup>, MARTA SOFÍA VALERO<sup>1,2,3</sup>, MARCELA GARZÓN<sup>2,5</sup>, LLIPSY SANTIAGO<sup>2,5</sup>, MARÍA PILAR ARRUEBO<sup>1,2,3</sup>, MIGUEL ÁNGEL PLAZA<sup>1,2,3</sup>, JULIÁN PARDO<sup>2,4,5</sup>, MARTA CASTRO<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup> *Dpto. de Farmacología y Fisiología. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.*

<sup>2</sup> *Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón). Zaragoza, España.*

<sup>3</sup> *Instituto de Investigación Mixto Agroalimentario de Aragón (IA2). CITA-Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.*

<sup>4</sup> *Fundación Aragón I+D. Instituto de Nanociencia de Aragón. Zaragoza, España.*

<sup>5</sup> *Centro de Investigación Biomédica de Aragón. Zaragoza, España.*

La granzima A es una serín-proteasa con actividad proinflamatoria que se encuentra elevada en el fluido sinovial y/o el suero de pacientes de enfermedades inflamatorias o en infecciones por virus y bacterias. Recientemente se ha demostrado que los animales *knock-out* de granzima A están protegidos en modelos experimentales de artritis reumatoide y sepsis. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar si la granzima A se encuentra implicada en la inflamación intestinal inducida por Dextrán Sulfato de Sodio (DSS). Se indujo inflamación intestinal aguda en ratones B6 *wild-type* (WT) y *knock-out* de granzima A (grA<sup>ko</sup>) mediante la administración de DSS al 2,5% (p/v) en agua de bebida durante 7 días. Se monitorizó diariamente el peso, consistencia de las heces y presencia de sangre en las mismas para establecer un score clínico. Tras el sacrificio, se obtuvieron explantes (30 mg) del íleon terminal y se cultivaron (37 °C, 24 h en una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 10 mM de glutamina, 10 mM de HEPES y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. A continuación, se midieron los niveles de granzima A y TNFα en los sobrenadantes mediante ELISA de tipo sandwich. El score clínico de los ratones grA<sup>ko</sup>

fue significativamente menor que el de los animales WT en los días 5, 6 y 7 de tratamiento. En los sobrenadantes de explantes de íleon de animales WT tratados con DSS los niveles de granzima A aumentaron significativamente con respecto a los controles sanos, hecho que se vio acompañado por un aumento en los niveles de la citocina proinflamatoria TNF $\alpha$ . Por el contrario, en el íleon de animales grA<sup>ko</sup> tratados con DSS los niveles de TNF $\alpha$  no aumentaron con respecto a los controles sanos. Nuestros resultados sugieren que, en el modelo de colitis inducida por DSS, el íleon terminal se encuentra afectado. La granzima A podría estar implicada en esta respuesta inflamatoria a través de la citocina proinflamatoria TNF $\alpha$ . De confirmarse, la granzima A podría constituir una nueva diana terapéutica en enfermedades inflamatorias intestinales.

**Palabras clave:** Granzima A, Inflamación, Íleon, TNF $\alpha$

**Agradecimientos:** Financiado por UZ-Fundación Ibercaja (JIUZ-2015-BIO-02), DGA (B61) y SAF2017-83120-C2-1-R. SCTs del CIBA (IACS-Universidad de Zaragoza).

## ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS CON LA FARMACOCINÉTICA, FARMACODINÁMICA Y EFECTOS ADVERSOS DE FENTANILO

CORAL HERRADOR SÁNCHEZ<sup>1,2</sup>, MIRIAM SAIZ RODRÍGUEZ<sup>2</sup>, MANUEL ROMÁN<sup>2</sup>, DOLORES OCHOA<sup>2</sup>, FRANCISCO ABAD SANTOS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.

<sup>2</sup> Unidad de Farmacogenética, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España.

Fentanilo es un opioide indicado para el manejo del dolor que actúa como agonista de los receptores  $\mu$  opioides (MORs), cuya activación desemboca en una reducción de la sensibilidad al dolor. Para estudiar si la variabilidad en la respuesta a este fármaco está asociada con la genética, se analizaron varios polimorfismos en genes codificantes para receptores, transportadores o enzimas metabolizadoras de fentanilo. Los genes analizados fueron: *CYP3A4* y *CYP3A5*, implicados en el metabolismo de fentanilo; *ABCB1*, involucrado en su transporte a través de la barrera hematoencefálica; *OPRM1*, codificante para el MOR de tipo 1; el gen de la catecol-O-metiltransferasa (*COMT*), que metaboliza catecolaminas; y finalmente, el gen codificante del receptor adrenérgico  $\beta$ -2, involucrado en ciertos efectos adversos. Este estudio pretende descubrir si los polimorfismos seleccionados sirven como marcadores genéticos para predecir la farmacocinética, farmacodinamia y los efectos adversos de fentanilo. Además, se estudió la influencia del sexo en estos parámetros. La población de estudio fue de 35 voluntarios sanos procedentes de un ensayo de bioequivalencia que, tras recibir una única dosis oral de fentanilo, fueron genotipados mediante PCR cuantitativa. Los niveles plasmáticos del fármaco se midieron mediante cromatografía líquida de alta eficacia combinada con espectrometría de masas en tándem. Se recogieron todos los posibles efectos adversos durante el estudio. En el análisis estadístico, los factores con un valor de  $p < 0,05$  en el análisis univariante se incluyeron en una regresión lineal (logística en el caso de los efectos adversos). Las mujeres presentaron mayores volúmenes de distribución corregidos por peso (Vd/P) y menores áreas bajo la curva ajustadas a dosis-peso (AUC/dP). Los portadores del alelo *CYP3A4*\*22 mostraron una mayor AUC/dP y un menor aclaramiento ajustado al peso (Cl/P), al contrario que los individuos con genotipo *ABCB1* 1236 CT, quienes presentaron menores AUC/dP y mayores Cl/P, así como una menor vida media. Las mujeres presentaron menor presión arterial y mayor intervalo QT corregido. Además, fentanilo mostró un efecto

hipotensor. Los polimorfismos en *OPRM1* y *COMT* afectaron a la somnolencia al tener los portadores de las variantes alélicas menores un mayor riesgo de sufrir este efecto adverso. *CYP3A5*, *ABCB1* C3435T y *ABCB1* G2677A/T no tuvieron ningún efecto sobre los parámetros estudiados. En conclusión, el sexo y los polimorfismos en *CYP3A4* y *ABCB1* influyen sobre la farmacocinética de fentanilo. El sexo afecta a la farmacodinamia. Los genes *OPRM1* y *COMT* influyen sobre el perfil de seguridad de fentanilo.

**Palabras clave:** Fentanilo, farmacogenética, polimorfismo, *CYP3A4*, *ABCB1*.

**Agradecimientos:** Miriam Saiz, Francisco Abad y Pablo Zubiaur su ayuda durante el desarrollo de este proyecto. A los voluntarios su participación en el estudio y a Pedro Cáceres su gran apoyo.

## DEVELOPMENT OF NOVEL BLOOD-BRAIN BARRIER-PERMEABLE P2X7 PURINERGIC ANTAGONISTS WITH NEUROPROTECTIVE ACTIVITY

FRANCESCO CALZAFERRI, ANTONIO G. GARCÍA AND CRISTÓBAL DE LOS RÍOS

Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

The P2X7 purinergic receptor is a trimeric ligand-gated, non-selective ion channel expressed in several cell types including macrophages, mast cells, and microglia. It is physiologically activated by high concentrations of ATP, which are mostly reached under pathological conditions, and induces depolarization in excitable cells, the activation of pro-inflammatory processes, and the promotion of cell death. P2X7 receptors are involved in several neurodegenerative, neurological, and psychiatric disorders and, therefore, have been recently considered as one of the most interesting therapeutic targets in the central nervous system. Unfortunately, the currently available P2X7 antagonists suffer several flaws. For instance, they are not selective for either the various P2X subtypes or the G protein-coupled P2Y receptors. In addition, they present relevant affinity differences between rat and human orthologues. Also, most of the ligands do not fulfil appropriate pharmacokinetic parameters, such as aqueous solubility, sufficient lipophilicity to cross the blood-brain barrier, and good stability at physiological conditions, thus decreasing their drugability. Hence, the aim of this work is to develop a novel series of P2X7 antagonists or P2X7 allosteric modulators for overcoming these limitations. First, the ligands are rationally designed through the support of computational predictive software, and then synthesised. In the meanwhile, we are looking for the best cell model to evaluate the relationship between the P2X7 blocking activity of new compounds and neuroprotection. Among the cell lines investigated so far, there are the SH-SY5Y cell line of human neuroblastoma, which overexpresses the P2X7 receptor under particular incubation conditions, and the 661W cell line from murine retinal glaucoma. The most promising compounds will be finally optimised to keep on further investigation and their drug development process.

**Key words:** P2X7, purinergic antagonists, medicinal chemistry, neuroprotection

**Acknowledgements:** The project is part of "PurinesDX" programme and has received funding from the EU-H2020 research and innovation programme under the MSC grant agreement No 766124. The Instituto-Fundación Teófilo Hernando participates in disclosing more deeply the biological and pharmacological profile of the P2X7 receptor.



## CHRONIC ETHANOL EXPOSURE ALTERS KYNURENINE LEVELS AND PRODUCES GUT BARRIER DISRUPTION IN MICE. ROLE OF INTESTINAL MICROBIOTA

MERCEDES PEREZ-HERNANDEZ<sup>1,2,3,6</sup>, PABLO GIMÉNEZ-GÓMEZ<sup>1,2,3,6</sup>, ESTHER O'SHEA<sup>1,2,3,6</sup>, LUIS ALOU CERVERA<sup>4</sup>, MARÍA LUISA GÓMEZ-LUS CENTELLES<sup>4</sup>, JAVIER R. CASO<sup>1,2,5,6</sup>, MARÍA DOLORES GUTIERREZ-LOPEZ<sup>1,2,3,6</sup>, MARÍA ISABEL COLADO<sup>1,2,3,6</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, 28041, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Red de Trastornos Adictivos del Instituto de Salud Carlos III, 28029, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain.

<sup>5</sup>Centro de Investigación Biomédica en Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, 28029, Madrid, Spain.

<sup>6</sup>Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica (IUIN), Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain.

El microbioma intestinal constituye una comunidad de más de 40 billones de bacterias que juegan un papel clave en la absorción de nutrientes, en el metabolismo y en la función inmune. Durante los últimos años se han encontrado gran cantidad de evidencias sobre la implicación de la microbiota, como parte del eje intestino-cerebro, en el desarrollo de patologías tales como la depresión, el autismo o la esquizofrenia. La microbiota participa en la modulación del eje intestino-cerebro, entre otros mecanismos, mediante la regulación del triptófano libre el cual puede metabolizarse dando lugar a la formación de serotonina o kinurenina. Ésta última encabeza una vía metabólica regulada por factores inflamatorios que está involucrada en patologías neurológicas y neurodegenerativas. El consumo abusivo de alcohol produce, entre otros muchos efectos disbiosis del microbioma, inflamación intestinal y neuroinflamación, además de estar estrechamente relacionado con el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas. En el presente estudio analizamos el efecto que el consumo crónico y voluntario de etanol podría tener sobre la permeabilidad e integridad de la barrera intestinal en ratones y sobre el metabolismo del triptófano. En primer lugar, el consumo crónico de etanol produce un incremento de la permeabilidad de la barrera intestinal, detectándose traslocación de bacterias de la microflora a ganglios mesentéricos y lipopolisacárido (LPS) en plasma. Este aumento de la permeabilidad está asociado a un incremento en la actividad de la metaloproteínasa inducible MMP-9 y a la disminución en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas que sellan el epitelio, ocludina y ZO-1. Por otro lado, la concentración de kinurenina en plasma y cerebro se encuentra elevada por el consumo crónico de etanol, sin apreciarse cambios en los niveles de triptófano. La descontaminación bacteriana mediante la administración de antibióticos no evita las alteraciones que produce el etanol en la integridad de la barrera intestinal, si bien previene tanto el aumento de LPS en plasma como el incremento en la concentración cerebral de kinurenina que se observa tras el consumo crónico de etanol. En conjunto, los resultados señalan a la microbiota como un factor alterado por el consumo crónico de etanol que a través de la liberación de endotoxinas a la sangre y de la modulación de los niveles de kinurenina podría participar en las alteraciones del SNC producidas por el consumo crónico de alcohol.

**Palabras Clave:** Etanol, consumo crónico, traslocación bacteriana, eje intestino-cerebro, kinurenina.

**Agradecimientos:** MEC (SAF2013-40592-R y SAF2016-78864-R), MSSI (PNSD 2014I015 y PNSD 2017I017), ISCIII RETICS RTA (RD12/0028/0002 y RD16/0017/0021), (UCM 910258) y CAM S2010-BMD-2308; PGG es FPU. MPH tiene un contrato postdoctoral f RETICS RTA.

## ALTERACIONES EN EL ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO EN EL MODELO MURINO DE SENESCENCIA ACELERADA SAMP8

ANDRÉS M. BARAIBAR-SIERRA<sup>1</sup>, CARMEN NANCLARES<sup>1</sup>, INÉS COLMENA<sup>1</sup>, ISABEL GAMEIRO-ROS<sup>1</sup>, ALICIA MUÑOZ-MONTERO<sup>1</sup>, IRIS ALVAREZ-MERZ<sup>1</sup>, JESÚS M. HERNÁNDEZ-GUIJO<sup>1</sup>, LUIS GANDÍA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

El sistema nervioso es especialmente vulnerable al envejecimiento. Esta vulnerabilidad se manifiesta por la existencia de patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras. En estas enfermedades, se han observado diferentes alteraciones de los sistemas de neurotransmisores. Aunque, también se pueden observar numerosos cambios en muchos individuos durante el envejecimiento no patológico. Nuestra hipótesis de trabajo sugiere que, con la progresión de la edad, pueden ocurrir alteraciones en el acoplamiento estímulo-secreción, comprometiendo la liberación de neurotransmisores, causando déficits cognitivos. En este trabajo, se han utilizado ratones propensos a la senescencia (SAMP8) que muestran deficiencias en el aprendizaje y la memoria, por lo que se utilizan como modelo de enfermedad de Alzheimer que ocurre espontáneamente. En paralelo, hemos utilizado sus hermanos resistentes a la senescencia (SAMR1) como control. Utilizamos la célula cromafín como modelo de neurosecreción en ambos ratones a los 2, 6 y 12 meses de edad. Mediante la técnica de patch-clamp, hemos estudiado las corrientes iónicas implicadas en el proceso de secreción de las catecolaminas y en la transmisión del impulso nervioso. También hemos evaluado la excitabilidad celular al medir el potencial de membrana y los potenciales de acción espontáneos. Además, hemos estudiado la liberación de los neurotransmisores mediante la técnica amperométrica usando K<sup>+</sup> como estímulo. Hemos observado que se produce un aumento en todas las corrientes iónicas con la edad en los ratones P8 y R1, pero este aumento ocurre antes y es más notable en los ratones P8. En cuanto al potencial de membrana, hemos observado que existe una hiperpolarización de éste en ambos tipos de ratones durante el envejecimiento; además, la despolarización que produce la ACh es menor a lo largo de la edad y nuevamente este fenómeno ocurre antes en ratones P8. Además, el número de potenciales de acción espontáneos disminuye durante el envejecimiento, siendo mayor la amplitud y el área de la posthiperpolarización de éstos. Sin embargo, el número de potenciales de acción provocados por ACh aumenta con el envejecimiento debido a la menor despolarización, siendo más notable en los ratones P8. Con respecto a la liberación de neurotransmisores, hemos visto que cuando estimulamos con K<sup>+</sup> hay un aumento en la secreción de catecolaminas a lo largo de la edad, que ocurre antes en los ratones P8, y también en la forma en que se liberan.

**Palabras clave:** excitosis, célula cromafín, envejecimiento, Alzheimer.

**Agradecimientos:** Este estudio está financiado mediante ayudas del MINECO (SAF2016-78892-R). Agradecemos también el continuo apoyo de la Fundación Teófilo Hernando.

## LA ALTERACIÓN DE LA EXCITABILIDAD Y EXOCITOSIS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATONES R6/1, MODELO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON, ESTÁ ASOCIADA A LA SOBREENPRESIÓN DE LA HUNTINGTINA MUTADA

CARMEN MARTÍNEZ-RAMÍREZ<sup>1</sup>, ANDRÉS M. BARAIBAR<sup>1</sup>, CARMEN NANCLARES<sup>1</sup>, IAGO MÉNDEZ-LÓPEZ<sup>1</sup>, ANA GÓMEZ<sup>2</sup>, LUCÍA RIVERA<sup>2</sup>, LUIS GANDÍA<sup>1</sup>, MARÍA JOSÉ CASAREJOS<sup>2</sup>, ANTONIO G. GARCÍA<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

En los últimos años se han descrito alteraciones en la excitabilidad, corrientes iónicas, transientes de calcio citosólico, liberación de catecolaminas y en la cinética de fusión del poro exocitótico en las células cromafines de la médula adrenal (CCs) de ratones transgénicos de modelos de algunas enfermedades neurodegenerativas. Este trabajo se centra en el estudio de cambios funcionales en las CCs de ratón modelo de la enfermedad de Huntington, R6/1 y controles, a dos edades, 2 meses (2m) y 7 meses (7m), estimulando con acetilcolina (ACh) o K<sup>+</sup>. Algunos de los cambios observados están presentes a edades presintomáticas de la enfermedad (2m), y que luego se acentúan en estados avanzados de la enfermedad donde los ratones tienen un déficit motor claro (7m). Los hallazgos más importantes se enumeran a continuación: (i) sobreexpresión de la huntingtina en forma de agregados nucleares en CCs; (ii) menor tamaño de célula con una disminución en la expresión de dopamina β-hidroxilasa, lo que indica un menor número de vesículas secretoras (iii) disminución del contenido de catecolaminas en tejido de médula adrenal; (iv) hiperpolarización de la membrana con una reducción de los potenciales de acción provocados por ACh; (v) una disminución de la corriente de Na<sup>+</sup>; (vi) un menor transiente de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> con un aclaramiento más rápido; (vii) una reducción de la secreción cuántica con menor carga cuántica; (viii) una cinética del poro de fusión, con una expansión y cierre del poro más rápida. Estos cambios demuestran que la alteración de la liberación de neurotransmisores que ocurre en el cerebro de pacientes con HD también se produce en el sistema simpático periférico, del que forman parte las CCs. Debido a que algunos de los cambios se observan a edades presintomáticas, su monitorización podría usarse como marcadores para un diagnóstico temprano de la enfermedad.

**Palabras clave:** enfermedad de Huntington, ratón R6/1, células cromafines, exocitosis

**Agradecimientos:** agradecemos al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación de este trabajo a través del proyecto SAF2016-78892-R, y el continuado apoyo de la Fundación Teófilo Hernando.

## CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE UN NUEVO MODELO MURINO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO INDUCIDO POR IMIQUIMOD

NURIA CANO-ADAMUZ<sup>1</sup>, MARÍA MORELL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. GENYO, Centro de Genómica e Investigación Oncológica, Universidad de Granada.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multifactorial caracterizada por la hiperactivación de las células B y la consecuente producción de una alta titulación de autoanticuerpos. Varios estudios han demostrado que los receptores tipo Toll (TLRs), concretamente TLR7 y TLR9, están críticamente involucrados en la patogénesis del LES. Estos receptores participan en la activación de células dendríticas y células B autorreactivas a través del reconocimiento de autoantígenos nucleares endógenos con el subsecuente desarrollo de respuestas autoinmunitarias. El presente trabajo se centra en el estudio y la caracterización de un nuevo modelo murino basado en la activación del receptor TLR7 mediante el tratamiento tópico con su agonista, el imiquimod. El objetivo del proyecto es la generación de un modelo de LES inducido en ratones de la cepa C57BL/6, una cepa a priori resistente a la autoinmunidad y en la que se han desarrollado numerosas líneas de transgénicos y *knockout* para estudio del papel de distintos genes implicados en la enfermedad. Para el desarrollo de este modelo, tratamos con imiquimod ratones C57BL/6 silvestres y monitorizamos su evolución a lo largo del tratamiento (8-9 semanas). La evaluación del desarrollo de la enfermedad se basó principalmente en dos parámetros: los niveles de anticuerpos antinucleares (ANAs) en suero y la presencia de proteínas en orina, proteinuria, indicativa de daño renal. Finalmente, una vez sacrificados los animales al final del tratamiento, también se determinó la esplenomegalia o grado de inflamación del bazo y se realizó un cultivo primario de esplenocitos para el análisis de la secreción de mediadores inflamatorios, citoquinas inducidas tras una estimulación *in vitro*. A través de los diferentes marcadores de la enfermedad analizados obtuvimos unos resultados preliminares que nos han permitido extraer las siguientes conclusiones: la activación del TLR7 inducida por la administración *in vivo* -vía tópica- de imiquimod, en ratones resistentes a la enfermedad de la cepa C57BL/6, desencadena manifestaciones clínicas similares a las presentes en el LES. Concretamente, los ratones tratados presentan síntomas de LES que se observan en pacientes como: esplenomegalia ( $p < 0.001$ ), aumento significativo de los niveles séricos de ANAs (anti-ADNDC, anti-Sm y anti-ENAs) y presencia de proteínas en orina ( $p < 0.05$ ). Estos resultados apoyan un mayor estudio de este modelo murino para elucidar el papel patogénico del TLR7 en esta enfermedad.

**Palabras clave:** Lupus eritematoso sistémico, autoinmunidad, receptor tipo Toll, imiquimod.

**Agradecimientos:** Agradecemos a la Asociación Americana de Investigación para el LUPUS (Lupus Research Alliance LRA) la financiación de este trabajo.

## BASES MOLECULARES DE LA ACTIVIDAD ANTI-TUMORAL DE NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS DERIVADOS DE LA HISPANOLONA

VANESA SÁNCHEZ MARTÍN<sup>1,2</sup>, SONSOLES HORTELANO BLANCO<sup>1</sup>, BEATRIZ DE LAS HERAS POLO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Terapias Farmacológicas. Área de Genética Humana. Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, España.

Los productos naturales desempeñan un papel fundamental en el descubrimiento de nuevos fármacos, particularmente evidente en áreas como el cáncer, donde alrededor del 60% de los agentes terapéuticos utilizados son de origen natural. Los terpenos son un grupo químico de amplia distribución en la naturaleza a los que se les han atribuido actividades biológicas diversas: antiinflamatoria, antiviral, antiproliferativa y antibacteriana, entre otras. En este

estudio hemos evaluado el potencial anti-tumoral del  $\alpha$ -hispanolol, un diterpeno de tipo labdano derivado de la hispanolona, en células de glioblastoma, uno de los tumores cerebrales más agresivos a día de hoy y para el que todavía no existen terapias eficaces. Nuestros resultados muestran que el  $\alpha$ -hispanolol es capaz de inducir cambios morfológicos característicos de los procesos de apoptosis, además de disminuir la viabilidad de las líneas celulares U87 y U373 de manera dosis- y tiempo-dependiente. El análisis del ciclo celular confirmó la inducción de apoptosis, observándose un aumento de las células en la fase sub-G<sub>0</sub>. Por otra parte, el  $\alpha$ -hispanolol aumenta la actividad de las caspasas y la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bax y Bid) e inhibe la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xl). Finalmente, este compuesto inhibe la angiogénesis, disminuyendo la migración y la invasividad de las células tumorales a través de un mecanismo que parece implicar a las metaloproteasas (MMPs). En resumen, nuestros datos sugieren que el  $\alpha$ -hispanolol podría tener potencial terapéutico en el tratamiento de los glioblastomas.

**Palabras clave:**  $\alpha$ -hispanolol, glioblastoma, antitumoral, apoptosis.

**Agradecimientos:** Este estudio está financiado por los siguientes proyectos: PI11/00036, PI14/00055 y PI17/00012 del Instituto de Salud Carlos III

### EFFECTOS DE LA QUIMIOQUINA CCL2 SOBRE LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN CULTIVO DE ASTROCITOS

IRENE L. GUTIÉRREZ<sup>1</sup>, MARTA GONZÁLEZ-PRIETO<sup>1</sup>, ALINE SAYD<sup>1</sup>, KARINA S. MACDOWELL<sup>1</sup>, JAVIER R. CASO<sup>1</sup>, BORJA GARCÍA-BUENO<sup>1</sup>, JOSÉ LM. MADRIGAL<sup>1</sup>

1. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

La inflamación es un mecanismo defensivo fundamental para reestablecer la homeostasis y recuperar el tejido dañado. Sin embargo, una resolución inadecuada y su acción prolongada en el tiempo y descontrolada presenta efectos citotóxicos contribuyendo a la progresión de múltiples enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple o el Parkinson y enfermedades mentales como la Depresión o la Esquizofrenia, entre otras. La quimioquina CCL2 (C-C motif ligand 2) también conocida como MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) es uno de los miembros de la familia de las citoquinas quimioatrayentes. Los niveles de estas proteínas se elevan durante la respuesta inflamatoria y tienen como principal función la inducción de la quimiotaxis de diferentes tipos celulares, especialmente células del sistema inmune, hacia las zonas de daño con el fin de reparar el tejido. Aunque sus efectos son inicialmente beneficiosos, su sobreproducción favorece la cronificación de la inflamación empeorando el curso de estas enfermedades. Sin embargo, la mayoría de los mecanismos directos a través de los cuales CCL2 actúa son todavía desconocidos. Por ello, en este trabajo se ha estudiado el efecto de CCL2 sobre la resolución de la inflamación en cultivo de astrocitos. Las resolvinas de la serie E y D son mediadores lipídicos endógenos generados durante la fase de resolución de la inflamación a partir de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 como el ácido eicosanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA). El tratamiento de cultivos de astrocitos con LPS (un componente bacteriano utilizado para inducir una respuesta inflamatoria) incrementó los niveles de las enzimas de síntesis de estos mediadores lipídicos, las lipooxigenasas, así como de alguno de sus receptores a las 4-6 horas, mientras que disminuyó dicha expresión a las 24 horas. El pre-tratamiento con CCL2 dio lugar a un aumento de la expresión de estas proteínas en los cultivos controles, sin tratar con LPS, pero tuvo el efecto opuesto en los cultivos tratados con LPS. Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos por los cuales CCL2 contribuye a la cronificación de la inflamación es a través de la disminución de la señalización de estos mediadores lipídicos endógenos. Así, CCL2 podría considerarse tanto un interesante biomarcador, como una diana terapéutica sobre la que desarrollar futuros tratamientos frente a enfermedades donde la inflamación crónica juega un importante papel.

**Palabras clave:** CCL2, neuroinflamación, resolvinas, astrocitos.

**Agradecimientos:** El trabajo recogido en esta presentación oral se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología y Toxicología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid bajo la supervisión del Dr. José Luis Muñoz Madrigal y el Dr. Juan Carlos Leza a quienes les expreso mi agradecimiento.

### EFFECTO DEL ESMOLOL SOBRE LA HIPERTROFIA VENTRICULAR EN UN MODELO DE RATA CON CARDIOPATÍA HIPERTENSIVA

SOLCHAGA-SÁNCHEZ I<sup>1</sup>, PAZÓ-SAYÓS L<sup>1</sup>, MARTIN-OROPESA R<sup>1</sup>, ARNALICH-MONTIEL A<sup>1</sup>, GÓMEZ DE DIEGO JJ<sup>2</sup>, DELGADO-MARTOS MJ<sup>3</sup>, DELGADO-BAEZA E<sup>3</sup>, QUINTANA-VILLAMANDOS B<sup>1,4</sup>

1Hospital General Universitario Gregorio Marañón

2Hospital Clínico San Carlos

3Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón

4 Departamento Farmacología Facultad Medicina UCM

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el esmolol produce regresión de la hipertrofia ventricular izquierda tras 48h de tratamiento, sin embargo, aún no se ha estudiado la permanencia de dicho efecto a lo largo del tiempo. El objetivo del estudio es analizar la permanencia en el tiempo del efecto producido por el esmolol sobre la hipertrofia ventricular en un modelo experimental cardiopatía hipertensiva (rata SHR, spontaneously hypertensive rat). Material y Método. Se han empleado en el estudio ratas SHR (n=10), machos, de 14 meses. Recibieron esmolol durante 48h. Tras el tratamiento, a la semana y al mes del mismo se midió la presión arterial sistólica, frecuencia cardiaca y la masa del ventrículo izquierdo mediante ecocardiografía transtorácica (modo M). Esmolol produce disminución de la masa del ventrículo izquierdo indexada por el peso del animal en SHR-E (P<0,05) a las 48h del tratamiento, manteniéndose este efecto a la semana y al mes. La regresión de la HVI producida por el esmolol tras 48h de tratamiento podría mantenerse en el tiempo. Serán necesarios estudios adicionales que confirmen estos resultados.

**Palabras clave:** ecocardiografía, esmolol, hipertrofia ventricular.

**Agradecimientos:** Fondo de Investigación Sanitaria FIS 16/02069 y Fondos FEDER.

### CLUSTERINA COMO BIOMARCADOR POTENCIAL DE DEPENDENCIA / ADICCIÓN A TABACO

IÑIGO PALLARDO-FERNÁNDEZ<sup>1</sup>; VICTORIA IGLESIAS<sup>1,2</sup>; CARMEN RODRÍGUEZ-RIVERA<sup>1</sup>; CARMEN GONZÁLEZ-MARTÍN<sup>1</sup>; LUIS FERNANDO ALGUACIL<sup>1</sup>.

[1] Grupo de Investigación Traslacional sobre Adicciones, Universidad CEU San Pablo, Alcorcón, Madrid, España.

[2] Madrid Salud, Ayuntamiento de Madrid, España.

Datos preclínicos y clínicos de nuestro grupo de investigación sugieren claramente que la proteína multifunción *clusterina* podría ser un interesante candidato como biomarcador de adicción. Basándonos en estos antecedentes, hemos estudiado los niveles de clusterina en saliva de fumadores en terapia de cesación, para establecer puntos de partida en el desarrollo de nuevos métodos para el diagnóstico y seguimiento de la adicción. Se presentan resultados preliminares de un estudio de cohortes prospectivo con seguimiento. Hasta hoy, 63 pacientes (24 hombres, 39 mujeres; 22-85 años de edad) han sido reclutados para un programa de cesación tabáquica ambulatoria que incluye terapia farmacológica y conductual. Los sujetos se han evaluado clínica y psicológicamente (incluyendo el test *Fagerström* de dependencia a nicotina, así como los DAST-20

y ASSIST para adicción). Se han recogido muestras de saliva de todos ellos al inicio del programa, así como seis meses después. Tras un estudio comparativo de diferentes tecnologías analíticas, se ha seleccionado un ensayo ELISA sandwich no competitivo (Invitrogen) para la cuantificación de *clusterina* en saliva. Sus concentraciones se han comparado intra e inter-sujetos mediante contrastes estadísticos de *Wilcoxon* y ANCOVA. Las concentraciones de *clusterina* correlacionan significativamente con la duración de la adicción al tabaco, desde  $6.9 \pm 1.0$  ng/ml (media  $\pm$  SEM) en pacientes con hasta 26 años de consumo de tabaco, hasta  $10.7 \pm 1.2$  en pacientes con más de 41 años fumando ( $P < 0.05$ ). Además, los niveles de *clusterina* decrecen en cada paciente tras un periodo de 6 meses de cesación tabáquica (desde  $8.6 \pm 1.1$  ng/ml hasta  $5.4 \pm 0.8$  ng/ml,  $p < 0.01$ ). Estos resultados preliminares indican que los niveles de *clusterina* podrían estar asociados con el grado de dependencia / adicción al tabaco. El conocimiento de los mecanismos involucrados en esta expresión diferencial de *clusterina* requiere la realización de estudios específicos adicionales.

**Palabras clave:** *clusterina*, tabaco, adicción, vulnerabilidad adictiva, biomarcador.

**Agradecimientos:** En la financiación de este trabajo han participado la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (PNSD 2016I025) y la Fundación Universitaria CEU /Banco de Santander (PI16/01489).

## EFFECTO DE ANTIDEPRESIVOS DE USO CLÍNICO SOBRE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES DE ACETILCOLINA

ISABEL GAMEIRO-ROS<sup>1</sup>, CARMEN NANCLARES<sup>1</sup>, ANDRÉS M. BARAIBAR<sup>1</sup>, ALICIA MUÑOZ-MONTERO<sup>1</sup>, IRIS ÁLVAREZ-MERZ<sup>1</sup>, INÉS COLMENA<sup>1</sup>, JESÚS MIGUEL HERNÁNDEZ-GUIJO<sup>1</sup>, LUIS GANDÍA<sup>\*1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid

La depresión es el trastorno afectivo más común, y los tratamientos actuales se basan en la teoría monoaminérgica, que atribuye su origen a un déficit de neurotransmisores monoaminérgicos, principalmente serotonina y noradrenalina. Sin embargo, a pesar de que los niveles de estas monoaminas aumentan tras pocos días de iniciar el tratamiento, deben transcurrir al menos dos semanas para que se manifieste su efecto terapéutico. Además, un 30% de los pacientes no responden a los tratamientos actuales. Ante esta problemática, en este trabajo nos hemos centrado en la teoría colinérgica de la depresión, que considera que la hiperactividad del sistema colinérgico observada en esta patología podría ser una de sus principales causas. En base a esta teoría alternativa, nos hemos propuesto estudiar el potencial efecto anticolinérgico de algunos antidepresivos de uso clínico para determinar si poseen un mecanismo de acción adicional. Concretamente, hemos seleccionado los antidepresivos reboxetina, mirtazapina y moclobemida, y hemos estudiado su potencial capacidad para bloquear el receptor nicotínico neuronal de acetilcolina (nAChR), empleando como modelo la célula cromafín bovina (CCB), y estudiando su efecto sobre: 1) la secreción de catecolaminas mediante amperometría en poblaciones celulares; 2) los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular mediante fluorescencia en poblaciones celulares; 3) las corrientes nicotínicas y de  $Ca^{2+}$  en célula única mediante técnicas de patch-clamp. De los antidepresivos estudiados, la reboxetina fue capaz de bloquear la secreción de catecolaminas estimulada fisiológicamente por acetilcolina (ACh) de forma

concentración-dependiente, efecto no observado al emplear un estímulo despolarizante (solución de alto potasio). Además, este antidepresivo bloqueó la entrada de  $Ca^{2+}$  en las CCBs sometidas a la estimulación fisiológica, pero no con la despolarizante, bloqueo también proporcional a la concentración de reboxetina. Por su parte, mirtazapina y moclobemida mostraron un efecto bloqueante notablemente menor en estos experimentos. Finalmente, los tres antidepresivos, pero destacadamente reboxetina, bloquearon la corriente nicotínica en célula única de forma concentración-dependiente, mientras que la corriente de calcio no se vio afectada por estos antidepresivos a voltajes a los que se abren los canales de calcio implicados en la secreción de catecolaminas. Estos resultados nos permiten concluir que la reboxetina es capaz de bloquear el nAChR neuronal en nuestro modelo, sin actuar sobre los canales de calcio voltaje-dependientes implicados en la secreción de catecolaminas, confiriéndole un mecanismo de acción adicional. Este estudio podría ayudar a conocer mejor la fisiopatología de la depresión, así como contribuir al desarrollo de fármacos más efectivos para su tratamiento.

**Palabras clave:** depresión, antidepresivos, teoría colinérgica, receptor nicotínico neuronal de acetilcolina, célula cromafín.

**Agradecimientos:** SAF 2016-78892-R a L.G.; UAM, FPI-UAM 2014 a I.G.; MECD-FPU 2016 a A. M. M. e I. A. M.

## ANÁLOGOS DEL DERIVADO DE GRAMINA ITH12657 Y SU EFECTO NEUROPROTECTOR

Lucía Viejo<sup>1,2</sup>, Dorleta González-Chichón<sup>1</sup>, Raquel López-Arribas<sup>1</sup>, Cristóbal de los Ríos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Teófilo Hernando, Dpto. de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo, 4. 28029 Madrid, España.

<sup>2</sup> Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de la Princesa, C/ Diego de León, 62, 28006 Madrid, España

Teniendo en cuenta el carácter multifactorial de la enfermedad de Alzheimer, nos proponemos estudiar una familia de compuestos con potencial acción farmacológica multidiana, relacionada estructuralmente con el alcaloide indólico natural gramina. Esta familia es derivada de una anteriormente evaluada en estudios previos de nuestro grupo, que presentó capacidad para modular tanto la señal neuronal de  $Ca^{2+}$  como para activar las enzimas Serina/Treonina fosfatasas. En esos ensayos, el derivado ITH12657 presentó las mejores propiedades farmacológicas. Por ello, la nueva familia está basada en este cabeza de serie al cual hemos incorporado diversas sustituciones sobre la subestructura *N*-benzónica de ITH12657. En primer lugar, se ha estudiado la toxicidad *per se* a diferentes concentraciones evaluando su efecto sobre la viabilidad celular por el método de MTT, tanto en línea de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) como en cultivo primario de corteza de embrión de rata. A continuación, se analizó su efecto sobre los incrementos de la señal celular de  $Ca^{2+}$  debidas a despolarización y al agonista glutamatérgico NMDA utilizando la sonda fluorescente FLUO4. Nuevamente se ensayó sobre la línea SH-SY5Y y en cultivos primarios de corteza embrionaria de rata, respectivamente para cada estímulo. Por último, se analizó el efecto sobre la actividad fosfatasa comprometida por la presencia del inhibidor de la fosfatasa 2A ácido okadaico (AO). Se midió tanto el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular (MTT) como su capacidad de aumentar la actividad enzimática de esta fosfatasa (pNPP) frente al tóxico AO.

**Palabras clave:** Alzheimer, Multidiana, Calcio, Fosfatasas.

**Agradecimientos:** Miguel Servet II (CPII16/00040, IS Carlos III, Spain) and Acción Estratégica en Salud (PI16/01041, IS Carlos III, Spain) (Proyectos financiados con fondos FEDER).

## LA FLUDARABINA INHIBE LA CORRIENTE $K_v1.3$ EN LINFOCITOS B HUMANOS

ALBA VERA-ZAMBRANO<sup>1,2,\*</sup>, ALICIA DE LA CRUZ<sup>2</sup>, DIEGO A. PERAZA<sup>2</sup>, JUAN M. ZAPATA<sup>2,3</sup>, CARMEN VALENZUELA<sup>2</sup>, GEMA PEREZ-CHACON<sup>2,3</sup>, Y TERESA GONZALEZ<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, UAM, Madrid, España  
<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, España  
<sup>3</sup>Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPaz), Madrid, España

La fludarabina (F-ara-A) es un análogo de purina usado comúnmente en el tratamiento de neoplasias malignas de linfocitos B que interfiere con diferentes aspectos de la síntesis del ADN y ARN. Los canales de  $K^+$   $K_v1.3$  son proteínas de membrana implicadas en el mantenimiento del potencial de reposo celular, controlando así, los eventos de señalización, proliferación y apoptosis en los linfocitos. En este trabajo hemos analizado los efectos de la F-ara-A sobre la corriente  $K_v$  generada en linfocitos B humanos. Nuestros datos indican que  $K_v1.3$  se expresa en las líneas celulares de linfocitos B BL2 y Dana, aunque los niveles totales de  $K_v1.3$  son más altos en las células BL2 que en las Dana. Sin embargo, las corrientes  $K_v$  en la membrana plasmática fueron similares en ambas líneas celulares y fueron derogadas por el inhibidor específico de  $K_v1.3$  PAP-1, indicando que la mayoría de la corriente  $K_v$  en estas líneas celulares es debido a  $K_v1.3$ . La F-ara-A, a una concentración de 3.5  $\mu$ M (similar a la alcanzada en el plasma de los pacientes tratados con fludarabina fosfato, 3  $\mu$ M), inhibió la corriente  $K_v1.3$  en un 61.0 $\pm$ 6.3 % y un 52.3 $\pm$ 6.3 % en las células BL2 y Dana, respectivamente. El efecto inhibitorio de la F-ara-A fue dependiente de concentración, con un valor de  $CI_{50}$  de 0.36 $\pm$ 0.04  $\mu$ M y un valor de  $n_H$  de 1.07 $\pm$ 0.15, en células BL2, y de 0.34 $\pm$ 0.13  $\mu$ M ( $IC_{50}$ ) y 0.77 $\pm$ 0.11 ( $n_H$ ), en células Dana. La inhibición de  $K_v1.3$  por la F-ara-A se observó independientemente de su efecto citotóxico en las células, siendo las células BL2 sensibles y las células Dana resistentes a la citotoxicidad de la F-ara-A. Curiosamente, el PAP-1, a concentraciones tan altas como 10  $\mu$ M, no afectó a la viabilidad de las células BL2 y Dana, lo que indica que el bloqueo de  $K_v1.3$  en estas células no es tóxico. Finalmente, la F-ara-A no tuvo efecto en canales  $K_v1.3$  expresados ectópicamente, sugiriendo un mecanismo de inhibición indirecto. En resumen, nuestros resultados describen el efecto inhibitorio de la F-ara-A sobre la actividad del canal  $K_v1.3$ . Aunque la inhibición de  $K_v1.3$  no es suficiente para inducir la muerte celular, es necesaria más investigación para determinar si podría contribuir a la citotoxicidad de la F-ara-A en células sensibles o ser responsable de algunos de los efectos clínicos secundarios del fármaco.

**Palabras clave:** Fludarabina, F-ara-A,  $K_v1.3$ , linfocito B

**Agradecimientos:** Financiado por MINECO (SAF2013-45800-R, SAF2016-75021-R, RD12/0042/0019, CB/11/00222) e ISCIII (PI12/01135 y PI16/00895). Las líneas BL2 y Dana fueron proporcionadas por el Dr. M. R. Campanero.

## PAPEL DEL INTERCAMBIADOR $Na^+/Ca^{2+}$ MITOCONDRIAL EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3

Paloma Narros Fernández<sup>1,2</sup>, Alejandra Palomino Antolín<sup>1,2</sup>, Víctor Farré Alins<sup>1,2</sup>, Juliana M. Rosa<sup>1,2</sup>, Cristóbal de los Ríos<sup>1,2</sup>, Javier Egea<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario Santa Cristina, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Madrid, Spain.Di

<sup>2</sup>Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid

El inflammasoma NLRP3, encargado de procesar y liberar la citoquina IL-1 $\beta$ , participa en la fisiopatología de múltiples enfermedades inflamatorias y es activado por diferentes señales. Recientemente se ha propuesto a la mitocondria como un elemento clave en la activación del inflammasoma, sin embargo, los mecanismos que regulan este proceso no se conocen. La mitocondria regula la homeostasis del calcio celular mediante un transporte cíclico que implica al intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  mitocondrial (NCLX). Resultados previos muestran que la inhibición del NCLX por la benzotiazepina CGP37157 ejerce un efecto protector en modelos *in vitro* de neurodegeneración. En este contexto, queremos estudiar si NCLX participa en la activación del inflammasoma NLRP3. Para ello hemos utilizado el compuesto ITH12575, un derivado sintético del CGP37157, y hemos estudiado su efecto en la línea celular de macrófagos murinos J774 A.1 y en cultivos primarios de microglía de ratón. La estimulación de la microglía y de los macrófagos con lipopolisacárido (LPS) 1  $\mu$ g/ml durante 3'5 h seguido de ATP 5 mM 30 min produjo la activación del inflammasoma y la liberación de IL-1 $\beta$ . En estas condiciones, la inhibición del NCLX por ITH12575 redujo la liberación de IL-1 $\beta$  de manera concentración dependiente (1, 3 y 10  $\mu$ M). A continuación, estudiamos la producción de ROS mitocondriales (mROS) en los cultivos de microglía, mediante la sonda mitoSOX<sup>®</sup>, y observamos que con LPS+ATP se produce un aumento en la liberación de mROS que se ve reducido por ITH12575. Se sabe que el factor de transcripción inducible por hipoxia-1 (HIF-1) participa en la regulación de la función de los macrófagos mediante cambios en su metabolismo celular. La estimulación de los macrófagos J774 A.1 con LPS durante 24 horas produjo un aumento en la estabilización de HIF-1 $\alpha$  y en los niveles de expresión de pro IL-1 $\beta$ , viéndose potenciado este efecto en condiciones de hipoxia (1%O<sub>2</sub>). Observamos que la inhibición del NCLX mediante ITH12575 redujo la estabilización de este factor, lo que sugiere un posible mecanismo por el cual el NCLX puede estar participando en la señalización entre la mitocondria y el inflammasoma NLRP3. De estos resultados podemos concluir que (i) la inhibición del NCLX por ITH12575 reduce la liberación de IL-1 $\beta$  inducida por LPS+ATP en cultivos de glía y en macrófagos, (ii) ITH12575 reduce la producción de ROS mitocondriales producidos en condiciones de activación del inflammasoma NLRP3 y (iii) ITH12575 reduce la estabilización de HIF-1 $\alpha$  inducida por LPS en macrófagos.

**Palabras clave:** NLRP3 inflammasome, mitochondrial  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger (NCLX), mitocondria, inflammation.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el programa Miguel Servet (CP14/00008), por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (ISCIII/FEDER) (PI16/00735), y por la Fundación Mutua Madrileña.

## EFFECTO NEUROPROTECTOR DE NUEVOS COMPUESTOS DERIVADOS DE ÁCIDO OKADAICO

RAQUEL LÓPEZ ARRIBAS<sup>1</sup>, ROCÍO LAJARÍN CUESTA<sup>1</sup>, CRISTÓBAL DE LOS RÍOS SALGADO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Fundación Teófilo Hernando. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa de demencia más común. En la actualidad, no existe ningún tratamiento capaz de revertir o detener el proceso de neurodegeneración que conlleva esta enfermedad. Los cerebros de pacientes con EA muestran dos lesiones características: las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, formados fundamentalmente por la proteína tau hiperfosforilada. Durante las últimas dos décadas, la mayoría de los esfuerzos científicos invertidos en desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la EA se han centrado en inhibir la degradación de acetilcolina y evitar la formación de placas seniles formadas por el péptido beta-amiloide. Por contra, menos interés ha despertado el abordaje terapéutico consistente en prevenir la degeneración neurofibrilar provocada por la anormal hiperfosforilación de tau. En este sentido, las estrategias farmacológicas se han orientado casi completamente en inhibir la actividad de las enzimas cinasas de tau, con resultados desalentadores. Nuestro grupo propone abordar la aberrante fosforilación de tau restaurando la actividad de su principal enzima fosfatasa, la proteína fosfatasa 2A (PP2A), que se encuentra disminuida en cerebros de pacientes con EA, principalmente por el aumento de sus inhibidores endógenos  $I_1^{PP2A}$  y  $I_2^{PP2A}/SET$ .

El ácido okadaico (AO) es una toxina capaz de inhibir PP2A induciendo así hiperfosforilación de tau y conduciendo a una formación de ovillos fibrilares neurotóxicos. Además, el AO provoca activación de GSK3 $\beta$ , estrés oxidativo, neuroinflamación y neurotoxicidad, todas ellas características de la EA. Para diseñar ligandos capaces de unirse a PP2A sin inhibir su acción, nos preguntamos si la preparación de análogos de AO que carecieran de la infraestructura que induce inhibición, podría por el contrario promover un mantenimiento de la actividad fosfatasa, por evitar la unión de otros inhibidores a su sitio catalítico en la subunidad C. En este trabajo presentamos la síntesis de dichos análogos de AO, su evaluación farmacológica en distintos modelos *in vitro* de características fisiopatológicas de la EA, los resultados de la medida de actividad fosfatasa, y estudios *in silico* de acoplamiento molecular con la subunidad catalítica de la proteína diana PP2A.

**Palabras clave:** Alzheimer, tau, PP2A, neuroprotección

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por: Proyectos de Investigación en Salud (PI16/01041, IS Carlos III), Fondos FEDER, beca FPI-UAM e Instituto Fundación Teófilo Hernando. Agradecemos también el apoyo de FIB-Hospital de La Princesa.

## MODELOS DOBLE HIT EN ROEDORES PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD PSICÓTICA

ÁLVARO G. BRIS, CRISTINA ULECIA-MORÓN, KARINA S. MACDOWELL, DAVID MARTÍN-HERNÁNDEZ, IRENE L. GUTIÉRREZ, JLM. MADRIGAL, JAVIER R. CASO.

*Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid; Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM); Instituto de Investigaciones Sanitarias Hospital 12 de Octubre (IImas12); Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica (IUINQ-UCM).*

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades mentales suponen una de las principales cargas tanto económicas como en términos de discapacidad y en pérdida de años de calidad de vida. En concreto, son 21 millones de personas las que padecen esquizofrenia en todo el mundo. La esquizofrenia es una enfermedad discapacitante y multifactorial caracterizada por la presencia de una sintomatología de diversa naturaleza. A pesar del elevado número de personas afectadas, su terapia de elección no es eficaz, alejándose, en muchas ocasiones, de su causa

inmediata: se desconoce la fisiopatología de la esquizofrenia, lo que sin lugar a dudas dificulta su tratamiento. Es por ello que existe la necesidad de evaluar los posibles orígenes de la esquizofrenia y las enfermedades psicóticas, para la elección y el desarrollo de terapias farmacológicas adecuadas, el mejor manejo de los síntomas y el aumento de la calidad de vida de los pacientes. Este objetivo es el que persiguen los modelos “doble hit” en roedores: acercarnos al posible origen de la enfermedad psicótica, para entender en qué punto y en qué medida se producen las alteraciones neurológicas. Dichos modelos constituyen la aplicación práctica de una de las hipótesis sobre la fisiopatología de la psicosis, según la cual, la esquizofrenia sería una enfermedad del neurodesarrollo: diversos estresores durante las etapas perinatal y posnatal (primer hit) contribuirían a la formación de un sistema nervioso defectuoso, que junto con otros factores en etapas tempranas de la adolescencia y juventud (segundo hit), serían la causa del desarrollo de la patología. Por todo ello, los modelos doble hit suponen un avance en el estudio de la etiología y fisiopatología de la enfermedad psicótica, ya que ayudan a mimetizar la cronología en la que los desencadenantes se producirían. En este estudio se emplearon ratas Wistar y se efectuaron tres modelos doble hit: privación materna como primer hit e inyección de LPS, restricción de movimiento o aislamiento como segundo hit. Conjuntamente, se realizó una batería de test comportamentales formada por el laberinto en cruz elevado, el laberinto en T y el splash test que permitieron evaluar las diferentes alteraciones de cada modelo. Así, se comprobó que cada uno de los modelos provocaba afectaciones a diferentes niveles comportamentales. En conclusión, los modelos doble hit representan una herramienta prometedora a nivel preclínico que permiten la investigación para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad psicótica.

**Palabras clave:** esquizofrenia, modelos doble hit, neurodesarrollo, test comportamentales.

**Agradecimientos:** Proyecto financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2016-75500-R).

## AMINAS PLASMÁTICAS Y CEREBRALES COMO BIOMARCADORES DE LA INCUBACIÓN DEL SEEKING

DAVID ROURA MARTÍNEZ, ALBERTO MARCOS, JAVIER ORIHUEL, ROBERTO CAPELLÁN, EMILIO AMBROSIO, ALEJANDRO HIGUERA MATAS

*Departamento de Psicobiología de la Universidad Nacional de Educación a Distancia.*

La adicción es considerada una psicopatología crónica debido a sus altas tasas de recaída. Por su naturaleza multifactorial, ningún modelo recoge todas sus características, si bien es cierto que los modelos animales con protocolos en los que a los animales se les da acceso a la droga durante más de cuatro horas al día (acceso extendido) parecen producir fenotipos más parecidos a los adictivos. El ansia por la droga (craving) inducido por la exposición a claves asociadas a las drogas de abusos aumenta a lo largo de la abstinencia de los drogodependientes, fenómeno denominado incubación del craving, y con posible relevancia clínica, aunque difícil de monitorizar debido a factores interferentes como el estrés. Un fenómeno equivalente, la incubación de la búsqueda de la droga (seeking), se ha logrado reproducir con animales en los protocolos de acceso extendido. Para un correcto tratamiento del paciente es de vital importancia conocer los factores y momentos clave en los que éste tiene más riesgo de recaída. Por ello, el objetivo de esta investigación fue buscar biomarcadores que cambiaran en paralelo con la incubación del craving y que fueran monitorizables en

humanos. Para ello se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Lewis (N=48) a las que se implantó un catéter en la yugular para llevar a cabo procedimientos de autoadministración intravenosa de cocaína, heroína y suero salino (grupo control), 6 horas al día durante 10 días (acceso extendido). Se sacrificaron la mitad tras un día de abstinencia y la otra mitad tras un mes de abstinencia (n=8 ratas por grupo), momento en el que un experimento previo con las mismas características demostró que se observaba la incubación del seeking. Se extrajo plasma y tejido cerebral de seis regiones relacionadas con el fenómeno de estudio (amígdala basolateral, núcleo central de la amígdala, cortezas prefrontal dorsomedial y ventromedial, núcleo accumbens core y shell). Se analizó mediante electroforesis capilar el contenido plasmático de aminoácidos y de glutamato y GABA en cerebro. Éstas últimas son monitorizables en humanos mediante técnicas de neuroimagen. Se reagrupó a los individuos en tres grupos: abstinentes tempranos de cocaína y heroína, abstinentes tardíos de cocaína y heroína (grupo incubación) y controles. Mediante Análisis Discriminante se observó en cada grupo un patrón característico de las moléculas analizadas. Este resultado apoya la idea de que estos u otros analitos podrían ser monitorizados en humanos para conocer cómo el riesgo de recaída individual varía a lo largo de la abstinencia, y utilizar dicha información para redirigir el tratamiento.

**Palabras clave:** Incubación del craving, biomarcador, drogas de abuso, aminoras, abstinencia

**Agradecimientos:** Ministerio de Ciencia e Innovación (PSI2016-80541-P); Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (Red de Trastornos Adictivos: RTA-RD16/020/0022 Instituto de Salud Carlos III; Plan Nacional sobre Drogas: 2016I073); Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid (S-2011/BMD-2308; Programa de Actividades I+D+I CANNAB-CM); UNED (Plan de Promoción de la Investigación); Unión Europea (JUST/2013/DPIP/AG/4823-EU MADNESS).

## MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN Y LA AUTOFAGIA COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

ENRIQUE LUENGO<sup>1,2,3</sup>, IZASKUN BUENDIA<sup>1,2,3</sup>, CRISTINA FERNÁNDEZ-MENDIVIL<sup>1,2,3</sup>, PAULA TRIGO<sup>1,2</sup>, SERGIO CANO-PEIRÓ<sup>1,2</sup>, JOSÉ LOMBARDÍA<sup>1,2</sup>, PATRYCJA MICHALSKA<sup>1,2,3</sup>, RAFAEL LEÓN<sup>1,2,3</sup> y MANUELA GARCÍA LÓPEZ<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Teófilo Hernando (ITH). Universidad Autónoma de Madrid, España. <sup>2</sup>Departamento de farmacología de la Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid, España. <sup>3</sup>Hospital Universitario de la Princesa.

En los cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA), la principal característica histopatológica es la proteinopatía. Además, se observa un aumento del daño oxidativo, neuroinflamación entre otras alteraciones. Actualmente se sabe que existe una marcada correlación entre el deterioro cognitivo evidenciado en pacientes con EA y la carga y distribución de la proteína Tau hiperfosforilada. Pese a que estudios previos han demostrado que la taupatía produce alteraciones en la autofagia, no se conoce ni el mecanismo de acción, ni si una modulación de este proceso podría constituir una potencial estrategia terapéutica para estos pacientes. Los objetivos de este estudio han sido: (i) estudiar la relación existente entre la hiperfosforilación de la proteína tau, la neuroinflamación y la alteración de la autofagia en distintos modelos *in vivo* de taupatía (ii) evaluar los efectos neuroprotectores de la hormona anti-oxidante melatonina en el contexto de una taupatía y su relación con la autofagia y la neuroinflamación. La inyección intracerebroventricular (i.c.v) de un adenovirus que contiene la mutación P301L de la proteína tau humana (AAV-hTau)

incrementó la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y un marcado componente inflamatorio tras 7 días de la inyección. Sin embargo, estas alteraciones no repercutieron negativamente en el estado cognitivo de los animales. Tras 28 días de la inyección, AAV-hTau no sólo produjo un incremento en el componente inflamatorio y pro-oxidante, sino que desencadenó un bloqueo en el flujo de la autofagia. Estas alteraciones, provocaron un marcado deterioro cognitivo evidenciado en el test de reconocimiento de objetos (NOR). En este contexto, el tratamiento con la neurohormona anti-oxidante melatonina 7 días después de la inyección de AAV-hTau, revirtió las alteraciones previamente descritas. Además, melatonina demostró un perfil neuroprotector interesante en rodajas de tejido cortical humano sometido al tratamiento con ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasa que conduce a la hiperfosforilación de tau, a través de la modulación de la autofagia. Estos resultados ponen de manifiesto que la modulación de la autofagia y la inflamación, previos al deterioro cognitivo causado por la proteína tau hiperfosforilada, puede resultar beneficioso en el tratamiento de la EA.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer, Taupatía, Autofagia, Estrés oxidativo, Inflamación.

**Agradecimientos:** Proyecto del MINECO con Ref. SAF2015-63935R de MGL. EL cuenta con contrato predoctoral de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. Agradecemos también el continuo apoyo del Instituto-Fundación Teófilo Hernando.

## EL RECEPTOR P2X7R COMO NUEVA DIANA TERAPÉUTICA EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

CRISTINA RUIZ RUIZ<sup>1</sup>, ANTONIO M.G. DE DIEGO<sup>1</sup>, ANTONIO G. GARCÍA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Fundación Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la rápida y específica pérdida de motoneuronas que cursa con espasticidad, debilidad y atrofia muscular, y degenera en parálisis e insuficiencia respiratoria las cuales causan la muerte de los pacientes. Más de medio millón de personas se ven afectadas por esta enfermedad, cuya esperanza de vida media va de los 3 a los 5 años desde el momento del diagnóstico. La existencia de modelos animales de la enfermedad, como el ratón SOD1<sup>G93A</sup> ha facilitado el estudio de su patogénesis, aunque la etiología de la misma aún es desconocida. Procesos tales como la acumulación de proteínas no viables y radicales libres, y en especial la neuroinflamación crónica, parecen tener un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. El receptor purinérgico P2X7 (P2X7R) juega un papel crítico en la activación de la microglía y en el proceso de neuroinflamación. En este contexto, el presente estudio pretende determinar el potencial de P2X7R como nueva diana terapéutica en la ELA, teniendo como hipótesis que el antagonismo del receptor podría limitar o prevenir el proceso de neuroinflamación en pacientes, mejorando los síntomas y progresión de la enfermedad. Para ello, se realizará la administración crónica del compuesto de Janssen Pharmaceutica JNJ-47965567, antagonista altamente selectivo de P2X7R, en ratones SOD1<sup>G93A</sup> desde edad presintomática hasta el punto final humanitario. Durante el estudio se analizarán parámetros motores funcionales, biomarcadores y supervivencia de los ratones tratados con respecto a un grupo control SOD1<sup>G93A</sup> no tratado. Estudios previos llevados a cabo con diferentes moléculas

antagonistas observaron una leve mejoría de los parámetros de estudio ligada al sexo de los ratones SOD1<sup>G93A</sup>. En el presente estudio, el uso de un antagonista más potente y selectivo de P2X7R junto con un aumento en el número de administraciones del fármaco, podría mejorar de forma más significativa los parámetros de estudio. De este modo, P2X7R se postularía como una diana terapéutica para pacientes con ELA.

**Palabra clave:** *esclerosis lateral amiotrófica, ratón SOD1<sup>G93A</sup>, JNJ-47965567, receptor P2X7*

**Agradecimientos:** *agradecemos a la Unión Europea por la financiación de este trabajo a través del proyecto PurinesDX (European Union's Horizon 2020 y Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 766124) y el continuado apoyo de la Fundación Teófilo Hernando.*

## DISFUNCIÓN DE CANALES KV7 EN HIPERTENSIÓN ARTERIAL PULMONAR

**GEMA MONDEJAR-PARREÑO, MARÍA CALLEJO, BIANCA BARREIRA, DANIEL MORALES-CANO, SERGIO ESQUIVEL-RUIZ S, LAURA MORENO, FRANCISCO PÉREZ-VIZCAÍNO, ÁNGEL COGOLLUDO**

<sup>1</sup>*Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, 28040.*

<sup>2</sup>*Ciber Enfermedades Respiratorias (Cíberes), Spain.*

<sup>3</sup>*Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM).*

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es un trastorno crónico y progresivo caracterizado por vasoconstricción pulmonar, trombosis *in situ* y remodelado vascular en arterias pulmonares (AP). Estos cambios aumentan la resistencia vascular pulmonar y la presión arterial, causando fallo del ventrículo derecho. La actividad de canales K<sup>+</sup> desempeña un papel fundamental en control del potencial de membrana (Em) de células de músculo liso de arterias pulmonares (CMLAP) y, por tanto, en el control del tono vascular. En los últimos años, diversos estudios han demostrado un papel clave de los canales Kv7, codificados por los genes *Kcnq1-5*, en el control del tono vascular y en la relajación producida por la vía del AMPc. Asimismo, diversos estudios han mostrado una disminución de los canales Kv7 en diferentes patologías cardiovasculares como diabetes, hipertensión arterial o síndrome del QT largo. Sin embargo, su posible alteración en la HAP es desconocida. Por ello, nuestro objetivo fue estudiar la posible alteración de canales Kv7 en un modelo de HAP. Se emplearon AP de rata Wistar control o con HAP (expuestas a Hipoxia+Suge5416). Se analizaron las corrientes de K<sup>+</sup> en miocitos aislados de las AP empleando la técnica de patch-clamp en su configuración de célula entera. El registro de corrientes de K<sup>+</sup> se realizó utilizando un protocolo de pulsos despolarizantes de 4s para inactivar canales de K<sup>+</sup> dependientes del tiempo, como son los canales Kv1.5. La caracterización de canales Kv7 se realizó mediante un bloqueante selectivo de canales Kv7, XE-991. Los estudios de reactividad vascular se realizaron en anillos de AP de rata. La vasodilatación de la vía del AMPc se evaluó utilizando el activador de la adenilil ciclasa, forskolina. Por último, se analizó la expresión del mRNA de KCNQ1, KCNQ4 y KCNQ5 mediante qPCR y la expresión proteica de canales Kv7.1, Kv7.4 y Kv7.5 mediante Western blot en homogenados de pulmón. Los resultados electrofisiológicos mostraron una disminución en la actividad de los canales Kv7 en ratas hipertensas. Estos datos fueron apoyados por una disminución de la expresión del mRNA KCNQ1, KCNQ4 y KCNQ5 y de la expresión proteica de canales Kv7.1 y Kv7.4 en homogenados de pulmones de ratas hipertensas. En línea con estos datos, la relajación inducida por forskolina estaba disminuida en AP de ratas hipoxia+Suge5416. En conclusión, la actividad y expresión de canales Kv7, así como de la

relajación de la vía del AMPc, están disminuidas en un modelo de HAP. Nuestros datos sugieren que la alteración de estos canales podría desempeñar un papel en la fisiopatología de la HAP.

**Palabras clave:** *Canales Kv7, tono vascular, células de músculo liso, potencial de membrana, hipertensión arterial pulmonar, patch clamp.*

**Agradecimientos:** *Trabajo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2016-77222-R). G.Mondéjar-Parreño es beneficiaria de un contrato Predoctoral CIBER.*

## LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL PRECEDE A LA ALTERACIÓN DE LA NEUROSECRECIÓN EN LAS CÉLULAS CROMAFINES DEL RATÓN MODELO DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA SOD1<sup>G93A</sup>

**IAGO MÉNDEZ-LÓPEZ<sup>1</sup>, CARMEN MARTÍNEZ-RAMÍREZ<sup>1</sup>, ANTONIO G. GARCÍA<sup>1</sup>, J. FERNANDO PADÍN<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.* <sup>2</sup>*Departamento de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España.*

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas motoras, causando parálisis y fallo respiratorio. La hipótesis más asentada tras esta patología es la hiperexcitabilidad y excitotoxicidad calcio-dependiente debida a glutamato, aunque todavía existen muchas dudas sobre su fisiopatología. Explorando la célula cromafín en un modelo murino de ELA familiar, el ratón SOD1<sup>G93A</sup>, hemos descrito alteraciones en el poro de fusión excitotóxico (más lento pero con mayor contenido cuántico de neurotransmisores), una vez establecida la enfermedad (Calvo-Gallardo et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 2015;308:C1-C19). Para buscar una explicación y un origen a estos cambios, nos hemos centrado en el estudio de la mitocondria por su relación con la exocitosis, dada su capacidad de gestionar los microdominios de calcio y de generar ATP. Hemos realizado experimentos tanto funcionales como ultraestructurales a una edad presintomática (30 días posnatal), y hemos encontrado que las mitocondrias de la célula cromafín del ratón SOD1<sup>G93A</sup> muestran las siguientes diferencias con respecto al control: i) mayor número y menor tamaño; ii) mayor espacio intermembrana; iii) menor número e hinchamiento de crestas mitocondriales. Estos cambios ultraestructurales van acompañados de menor producción de ATP y mayor producción de radicales libres. Sin embargo, en los estudios amperométricos de liberación de neurotransmisores no hemos observado diferencias significativas respecto al control. Estas alteraciones muestran una interesante degeneración que no es exclusiva de la neurona motora. También demuestran que el daño mitocondrial precede a la instauración de los síntomas de la enfermedad, sugiriendo nuevos indicios sobre su inicio y progresión. Nuestros datos consolidan a la mitocondria como una potencial diana terapéutica en la ELA, así como el estudio del eje simpato-adrenal como estrategia diagnóstico presintomática de la enfermedad.

**Palabras clave:** *ELA, SOD1<sup>G93A</sup>, célula cromafín, estructura mitocondrial, exocitosis.*

**Agradecimientos:** *Proyecto SAF 2016-78892-R a A.G.G. MINECO, España.; Beca FPI BES-2014-069005 a I. M-L., MINECO, España. También se agradece el apoyo continuado de la Fundación Teófilo Hernando.*

## LA AUSENCIA DE NOD1 PREVIENE LAS ALTERACIONES EN EL DINAMISMO DEL CALCIO INTRACELULAR



## CARDIACO ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

MARTA GIL FERNÁNDEZ<sup>1</sup>, ALMUDENA VAL BLASCO<sup>1</sup>, JOSÉ ALBERTO NAVARRO GARCÍA<sup>2</sup>, CARMEN DELGADO CANENCIA<sup>3</sup>, MARÍA TAMAYO GARCÍA<sup>3</sup>, GEMA RUIZ HURTADO<sup>2</sup>, MARÍA FERNÁNDEZ VELASCO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Respuesta Inmune Innata, IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España. <sup>2</sup>Laboratorio Traslacional Cardiorenal y Unidad de Hipertensión, Instituto de Investigación i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España. <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España.

La enfermedad renal crónica (ERC) es una patología compleja caracterizada por una pérdida de la función renal que contribuye al deterioro de la función cardíaca. Los mecanismos responsables de las complicaciones cardiovasculares ligadas a la ERC no han sido dilucidados completamente. Por otro lado, un aumento de la respuesta inflamatoria constituye una complicación común en la ERC y en las enfermedades cardiovasculares. En este contexto, el receptor citosólico del sistema inmune innato NOD1 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1) se ha relacionado con enfermedades renales y cardiovasculares. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la ausencia de NOD1 previene el remodelado deletéreo asociado al desarrollo de insuficiencia cardíaca en un modelo experimental de ratón. Sin embargo, no existen evidencias sobre la relevancia de este receptor en el marco de la disfunción cardíaca inducida por la ERC. Por tanto, el objetivo principal de este estudio es evaluar el papel que juega la ausencia de NOD1 en la progresión de la enfermedad cardiovascular inducida por la ERC en un modelo experimental murino. Para ello, hemos analizado el papel que juega el receptor NOD1 en el manejo del calcio intracelular en cardiomiocitos aislados tanto de ratones wild-type y como knock out para NOD1 sometidos a una nefrectomía 5/6 durante 8 semanas. Nuestros resultados demuestran que la ausencia de NOD1 previene las alteraciones del manejo del calcio intracelular inducidas por la nefrectomía 5/6. La prevención de dichas alteraciones se explica por una mejora de la liberación de Ca<sup>2+</sup> sistólico (transitorios de calcio [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), así como en la cantidad de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico, además de prevenir el aumento de liberación anormal de Ca<sup>2+</sup> durante la diástole. Por el contrario, todos estos parámetros se encuentran alterados en el caso del grupo wild-type sometido a la nefrectomía. De esta manera, nuestro estudio demuestra que la ausencia del receptor NOD1 previene las alteraciones en el dinamismo intracelular del Ca<sup>2+</sup> asociadas a la ERC, emergiendo como un nuevo modulador tanto de la liberación de calcio sistólico como diastólico; y proporcionando una base sólida para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento y prevención de las alteraciones cardiovasculares asociadas a la ERC.

**Palabras clave:** NOD1, calcio, enfermedad renal crónica, disfunción cardíaca.

**Agradecimientos:** Me gustaría mostrar mi agradecimiento a mis compañeros del grupo de Fisiopatología Cardíaca del IdiPAZ por su ayuda y apoyo en el desarrollo del trabajo. Este estudio ha sido financiado a través del FIS (ISCIII).

## EFFECTO DE LA HIPOTERMIA EN LA REPROGRAMACIÓN NEURONAL DIRECTA DE CÉLULAS GLIALES

ROCÍO BARTOLOMÉ-CABRERO<sup>1</sup>, ANA GUILLÉN MARTÍNEZ<sup>1</sup>, PAULA GARCÍA-SOCUÉLLAMOS<sup>1</sup>, MARINA ARRIBAS BLÁZQUEZ<sup>1</sup>, SERGIO GASCÓN JIMÉNEZ<sup>1</sup>, ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología y Toxicología, Universidad Complutense de Madrid

Aunque la reprogramación directa de células gliales a neuronas es una alternativa prometedora para la regeneración cerebral después de la lesión, aún existen limitaciones importantes en cuanto a la eficiencia de la conversión neuronal y la supervivencia e integración de las neuronas inducidas. Nuestras investigaciones previas han demostrado que la conversión de células gliales al fenotipo neuronal implica un incremento de los niveles de radicales libres de oxígeno que conlleva a la muerte celular por estrés oxidativo. En este proyecto estamos investigando la hipotermia como enfoque para reducir el estrés oxidativo durante la conversión neuronal. Para ello, utilizamos un modelo de reprogramación neuronal en el que cultivos primarios postnatales de astrocitos corticales de ratón son transfectados con vectores codificantes de genes neurogénicos. Después, expusimos estos cultivos a diferentes condiciones de normotermia (37°C) e hipotermia (por debajo de 36°C) durante el proceso de reprogramación neuronal. En primer lugar, evaluamos la eficiencia de reprogramación para distintas condiciones de temperatura, y observamos un incremento significativo en la proporción de neuronas inducidas en un rango de temperatura cercano a 34°C, sugiriendo que la hipotermia permite una reducción efectiva de los niveles de estrés oxidativo durante la reprogramación. Para confirmar esta hipótesis, en los experimentos subsiguientes evaluaremos los niveles de estrés oxidativo mediante el análisis de parámetros celulares de disfunción metabólica, como, por ejemplo, el estado redox de las células, y los niveles de oxidación lipídica y de muerte celular, a distintos rangos de temperatura. Esta aproximación podría tener aplicabilidad clínica en el futuro, ya que existen modelos de hipotermia adaptables a pacientes humanos.

**Palabras clave:** Reprogramación neuronal directa, hipotermia, glía reactiva, estrés oxidativo, factores neurogénicos.

**Agradecimientos:** Este trabajo está siendo financiado por el programa Estatal de Promoción del Talento y Empleabilidad en I+D+i (RYC-2015-19185).

## CONTRIBUCIÓN DE NOX4 EN UN MODELO NEURODEGENERATIVO DE TAUPATÍA

PAULA TRIGO-ALONSO<sup>1,2</sup>, ENRIQUE LUENGO<sup>1,2</sup>, CRISTINA FERNÁNDEZ-MENDÍVIL<sup>1,2</sup>, IZASKUN BUENDIA<sup>1,2</sup>, SERGIO CANO-PEIRÓ<sup>1</sup>, HARALD SCHMIDT<sup>3</sup>, RAFAEL LEÓN<sup>1,2</sup>, MANUELA G. LÓPEZ<sup>1,2</sup>

1. Instituto Fundación Teófilo Hernando. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

2. Instituto de Investigación la Princesa. Hospital Universitario La Princesa Madrid, Spain.

3. Department of Pharmacology & Personalised Medicine, CARIM, Maastricht University, Universiteitssingel 50, 6229 ER Maastricht, The Netherlands.

Las enfermedades neurodegenerativas comparten mecanismos patológicos comunes tales como el estrés oxidativo o la inflamación crónica en los que las enzimas NADPH oxidasas (NOXs), entre otras, juegan un papel clave. Puesto que la inhibición de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) ha resultado neuroprotectora en modelos de isquemia cerebral y su contribución a la enfermedad de Alzheimer se desconoce actualmente, proponemos evaluar su inhibición como posible diana terapéutica. Para ello hemos generado modelos *in vitro* de taupatía con ácido okadaico—inhibidor de fosfatasa que genera hiperfosforilación de Tau-, además de inhibir NOX4 genéticamente, usando ratones knock-out para

NOX4, y farmacológicamente, con inhibidores de NOX4. Hemos tratado la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y con ácido okadaico y los inhibidores GKT136901 y VAS2870 y determinado que el efecto neuroprotector observado es mediado, al menos en parte, por la inhibición de NOX4. Además, la inhibición de NOX4 tras el tratamiento de ácido okadaico, en células gliales demostró una reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno. Finalmente, la inhibición genética y farmacológica de NOX4 en rodajas de hipocampo resultó protectora contra el ácido okadaico tanto en tratamientos agudos como crónicos. Pensamos que esta protección podría estar mediada por la ausencia de estrés oxidativo y desregulación inflamatoria. Consecuentemente, estos resultados ponen de manifiesto la implicación de la enzima NOX4 en el estado redox del cerebro y cómo su inhibición podría ser una estrategia a tener en cuenta para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a enfermedades altamente relacionadas con el estrés oxidativo como son las enfermedades neurodegenerativas.

**Palabras clave:** NADPH oxidasa 4 (NOX4), Enfermedad de Alzheimer, Estrés oxidativo, Taupatía e Inflamación.

**Agradecimientos:** Agradecemos la financiación del MINECO (REF-SAF2015-63936R y el constante apoyo del Instituto Fundación Teófilo Hernando.

## REGULACIÓN DE LA INGESTA EN EL MODELO MURINO 5XFAD DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: RESPUESTA A ESTÍMULOS OREXIGÉNICOS Y ANOREXIGÉNICOS

NIRA HERNÁNDEZ MARTÍN, ÁGATA SILVÁN ALCARAZ, NURIA LAUZURICA FERNÁNDEZ<sup>1</sup>, MIRIAM GARCÍA SAN FRUTOS<sup>1</sup>, VIRGINIA PLA REQUENA<sup>2</sup>, FERNANDO AGUADO TOMÁS<sup>2</sup>, TERESA FERNÁNDEZ AGULLÓ<sup>1</sup>

1. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, España

2. Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad degenerativa que cursa con deterioro cognitivo, pero también con alteraciones relacionadas con el peso corporal y la conducta alimentaria. Sin embargo, el hipotálamo que controla la regulación de la ingesta y otros procesos metabólicos es una estructura cerebral poco estudiada en esta patología. Las neuronas hipotalámicas que expresan proopiomelanocortina (POMC) liberan la hormona estimulante de melanocitos alfa (alfa-MSH) para suprimir el apetito, mientras que las que expresan el neuropéptido Y (NPY) lo promueven. Estudios previos del grupo en el modelo murino 5XFAD de la EA muestran que estos animales presentan menor peso corporal pero mayores niveles de ingesta diaria que sus correspondientes controles. Los cambios observados en la expresión hipotalámica de POMC y NPY, podrían indicar que las alteraciones en la ingesta estarían mediadas por un mal funcionamiento de la respuesta a estímulos anorexigénicos. El presente trabajo pretende profundizar en el conocimiento de las alteraciones en la regulación de la ingesta que acontecen en el ratón 5XFAD, centrándonos en el estudio de la respuesta a estímulos orexigénicos y anorexigénicos. Todos los experimentos fueron realizados con los ratones 5XFAD (AD) y sus correspondientes controles (WT) a 3 meses de edad. Se realizaron test de tolerancia a glucosa (GTT) e insulina (ITT), y se analizaron los niveles de insulina y leptina en plasma. También se estudió la ingesta basal; en respuesta a estímulos orexigénicos como la 2-deoxiglucosa (2DG) (500mg/kg, i.p.), la insulina (0,75 U/kg, i.p.) o el ayuno; y anorexigénicos como la glucosa (1000mg/kg, i.p.). Finalmente, se llevaron a cabo

ensayos inmunohistoquímicos para cuantificar alfa-MSH en el hipotálamo. No se encontraron diferencias en los niveles plasmáticos de insulina y leptina, ni en los GTT e ITT entre el grupo AD y WT. Con respecto a los experimentos de ingesta, si bien la respuesta a la 2DG, la insulina y el ayuno fue similar en ambos grupos experimentales, la inyección de glucosa redujo la ingesta en los ratones WT pero no en los AD. A nivel histológico, los ratones AD mostraron un menor marcaje de alfa-MSH en los núcleos paraventricular y dorsomedial hipotalámicos. En conjunto, el presente estudio muestra que en el modelo 5XFAD existen alteraciones en la respuesta alimentaria a señales anorexigénicas a los 3 meses de edad, que se pueden deber, al menos en parte, a cambios en el sistema de las melanocortinas.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer, 5XFAD, hipotálamo, ingesta.

**Agradecimientos:** El ratón 5XFAD fue proporcionado por el grupo de Dr. Julián Romero. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2013-48822-R y BFU2016-80868-R).

## IMPLICACIÓN DE CALHM1 EN LA NEUROTOXICIDAD SECUNDARIA A ISQUEMIA

JAVIER GARROSA JIMÉNEZ<sup>1,2</sup>, CRISTINA FERNÁNDEZ MENDÍVIL<sup>1,2</sup>, VALERIYA SIDELKIVSKA<sup>1,2</sup>, MANUELA GARCÍA LÓPEZ<sup>1,2,3</sup>, y MARÍA.F CANO ABAD<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Teófilo Hernando; <sup>2</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain. <sup>3</sup>Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de la Princesa, UAM, Madrid, Spain.

Los canales dependientes de voltaje y calcio, CALHM1 (Calcium homeostasis modulator 1), constituyen una familia de canales que se expresan en el sistema nervioso y en las papilas gustativas de los vertebrados. CALHM1 se expresa tanto en la membrana plasmática como retículo endoplasmático y su apertura se encuentra regulada por cambios de voltaje y variaciones en la concentración extracelular de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>). A concentraciones fisiológicas de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>, CALHM1 se encuentra en su estado cerrado, pero se puede abrir tras una fuerte despolarización. Sin embargo, la reducción del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> incrementa la probabilidad de apertura del canal. Por tanto, tanto el [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> como el voltaje regulan alostéricamente la apertura de CALHM1. Durante la isquemia cerebral se produce una despolarización de la membrana plasmática neuronal con la consiguiente liberación masiva de glutamato así como una sobreactivación de los astrocitos y microglía residentes en el parénquima cerebral. Estos tipos celulares, como consecuencia de su activación exacerbada liberan citoquinas proinflamatorias así como especies reactivas de oxígeno (ERO) que alterarán la homeostasis del tejido cerebral. Este estado inflamatorio junto con la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> promovida por glutamato, desencadena muerte neuronal durante un evento isquémico. Siendo CALHM1 un canal permeable a Ca<sup>2+</sup> durante una despolarización neuronal, planteamos la siguiente hipótesis: CALHM1 podría promover una propagación de la muerte neuronal en situación de isquemia, contribuyendo a un estado inflamatorio y oxidante en el tejido cerebral. Con el objetivo de validar nuestra hipótesis, empleamos un modelo de isquemia *in vitro* ya descrito: Privación de oxígeno y glucosa seguida de reoxigenación (POG-Reox) en rodajas de hipocampo extraídas de ratones *wild-type* (WT), heterocigotos (HT) y *knockout* para CALHM1 (*Calhm1*<sup>-/-</sup>). Tras la realización de dicho protocolo, procedimos a la medición tanto de la

viabilidad celular así como de los niveles de expresión de diferentes proteínas implicadas en la cascada isquémica e inflamatoria. Además, mediante el empleo de la sonda fluorescente H2DCFDA procedimos a la cuantificación de la producción de ERO tras el protocolo de POG-Reox. Los resultados obtenidos muestran que la ausencia, parcial o total de CALHM1, ejerce un efecto protector frente al estímulo isquémico mediante una reducción en la producción de ERO, así como a través de la inducción de proteínas como HIF-1 $\alpha$  y el receptor  $\alpha$ -7 nicotínico ( $\alpha$ -7 nAChR), los cuales están implicados en la supervivencia celular en situación de hipoxia y en la activación de rutas intracelulares con efecto antiinflamatorio y antioxidante, respectivamente. Estos resultados, indican que CALHM1 participa en la propagación de la muerte neuronal en situación de isquemia *in vitro* y la delección de CALHM1 resulta neuroprotectora.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado a través de los siguientes proyectos: (1) SAF2013-441080 del Ministerio de Economía y Competitividad, España, concedido a AGG (2) SAF2015-63936R concedido a M. G. López. (2) Proyecto Santander-UAM, 2016, concedido a MFCA. Instituto Fundación Teófilo Hernando por su continuo apoyo.

### EFFECTO DE POLIMORFISMOS EN LA FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA DEL ANTIDEPRESIVO AGOMELATINA EN VOLUNTARIOS SANOS

DANILO VIEIRA DE LARA, MIRIAM SAIZ-RODRÍGUEZ, CARMEN BELMONTE, PABLO ZUBIAUR PRECIOSO, DOLORES OCHOA, MANUEL ROMÁN, FRANCISCO ABAD-SANTOS

<sup>1</sup>Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, España

Agomelatina es un antidepresivo que tiene un mecanismo de acción atípico, actuando sinérgicamente como agonista de los receptores melatoninérgicos MT1 y MT2 y como antagonista serotoninérgico del receptor 5-HT<sub>2c</sub>. Estudios demuestran que la exposición sistémica a la agomelatina es altamente variable, así como su volumen de distribución. Es un fármaco altamente lipofílico que sufre metabolismo de fase I mayoritariamente. Actualmente, no hay pruebas suficientes para definir los factores que pueden predecir la respuesta a un medicamento utilizado para tratar la depresión. Los estudios farmacogenéticos pueden mejorar el tratamiento antidepresivo y ser útiles para explicar la variabilidad interindividual en la respuesta a los fármacos y así ayudar a predecir el resultado del tratamiento. **Objetivo:** Evaluar el efecto de los polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras del citocromo P450 (CYP) y el transportador glicoproteína-P (codificada por *ABCB1*) en la farmacocinética y farmacodinamia de agomelatina. 28 voluntarios sanos (16 hombres y 12 mujeres) que recibieron una dosis única de 25 mg de agomelatina fueron genotipados mediante de PCR a tiempo real para 11 variantes en los genes *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* y *ABCB1*. Las concentraciones plasmáticas se midieron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. El análisis estadístico univariante (ANOVA, T-test) y multivariante (regresión lineal) se realizó con el software SPSS 22.0, considerándose significativo  $p < 0,05$ . Los parámetros de farmacocinética de agomelatina fueron similares en hombres y mujeres. Los datos mostraron que la farmacocinética de la agomelatina se vio afectada por diferentes grupos étnicos. Los Caucásicos mostraron 49.8%

menor biodisponibilidad en comparación con el grupo Latino/Negro ( $p = 0.028$ ). Polimorfismos en *CYP1A2* 5347 T>C y el fenotipo metabolizador lento para *CYP2C9* se han asociado con cambios en la farmacocinética (aclaramiento y volumen de distribución) y farmacodinamia (frecuencia cardiaca) de agomelatina, pero no el gene *ABCB1*. Estos resultados demostraron la importancia de aspectos demográficos y genéticos en la respuesta a agomelatina, que pueden ayudar a mejorar el tratamiento antidepresivo.

**Palabras clave:** depresión, agomelatina, farmacogenética, *CYP1A2*, *CYP2C9*, *ABCB1*.

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a los voluntarios y al esfuerzo del personal de la Unidad de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario de la Princesa.

### EFFECTOS BENEFICIOSOS DEL TRATAMIENTO CON PARICALCITOL EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA CARDIACA EN RATONES

MARÍA TAMAYO<sup>1,2</sup>, LAURA MARTIN<sup>2</sup>, MARIA JOSÉ GARCÍA-PIEDRAS<sup>2,3</sup>, EDUARDO LAGE<sup>1</sup>, ALMUDENA VAL-BLASCO<sup>4</sup>, MARÍA FERNÁNDEZ-VELASCO<sup>4</sup>, CARMEN DELGADO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Madrid, España. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España. <sup>3</sup>Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, España. <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, España.

La insuficiencia cardíaca (IC) es una de las principales causas de morbilidad en todo el mundo. En diversas formas de IC, la sobrecarga producida sobre el corazón induce un remodelado cardíaco para compensar la mayor demanda hemodinámica. Aunque en un primer momento el aumento del tamaño del corazón es un mecanismo compensador, la sobrecarga sostenida puede conducir a una dilatación ventricular y una disminución de la función del ventrículo izquierdo (VI). Además, la densidad de algunas de las corrientes de K<sup>+</sup> de los cardiomiocitos disminuye, favoreciendo la aparición de anomalías en la repolarización que se traducen en una prolongación del intervalo QT lo que predispone a la aparición de arritmias. Existe evidencia experimental de que la vitamina D ejerce efectos cardioprotectores, pero los mecanismos implicados son poco conocidos. Para aportar nueva luz sobre estos mecanismos, utilizamos un modelo experimental de hipertrofia e insuficiencia cardíaca mediante constricción de la aorta transversa (TAC). Cuatro semanas después de la operación (IC establecida), los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal con el análogo de vitamina D paricalcitol (PC) (300 ng/kg/día) o vehículo, 3 veces por semana durante 5 semanas. La estructura y la función del VI se evaluaron mediante resonancia magnética a las 2, 4 y 9 semanas después de la operación. Previo al sacrificio se realizaron electrocardiogramas a los ratones y posteriormente, se sacrificaron y se aislaron los miocitos ventriculares para registrar las corrientes de K<sup>+</sup> (I<sub>tof</sub>, I<sub>Kur</sub> y I<sub>ss</sub>) utilizando técnicas de Patch-Clamp. El análisis de las imágenes de resonancia magnética mostró que la operación TAC aumentaba significativamente la masa del VI y los volúmenes a final de diástole y sístole y disminuía la fracción de eyección. El tratamiento con PC frenó significativamente el aumento de la masa y los volúmenes del VI y mejoró la EF, además se observó como la operación TAC inducía una reducción significativa en las corrientes de K<sup>+</sup>, mientras que el tratamiento con PC rescató I<sub>tof</sub> a niveles similares a los controles y mejoró significativamente I<sub>Kur</sub> pero no I<sub>ss</sub>. Finalmente, los electrocardiogramas mostraron una prolongación del intervalo QT en los ratones operados, que

se veía disminuida tras el tratamiento con PC. En conclusión, el tratamiento con PC tiene efectos beneficiosos sobre la IC al mejorar la función cardíaca y revertir el remodelado del VI, tanto a nivel estructural como celular, reduciendo la masa y los volúmenes del VI y mejorando la densidad de las corrientes de K<sup>+</sup>.

**Palabras clave:** *Insuficiencia Cardíaca, Vitamina D, Paricalcitol, Corrientes de K<sup>+</sup>.*

**Agradecimientos:** *Proyecto financiado por MINECO (SAF2014-57190-R) y Universidad Autónoma de Madrid (Contrato de Formación de Personal Investigador-FPI).*

## EFICACIA DEL CEMENTO ÓSEO CON RIFAMPICINA CONTENIDA EN MICROCÁPSULAS: ESTUDIO IN VIVO

IRENE ISABEL LÓPEZ TORRES<sup>1</sup>, PABLO SANZ RUÍZ<sup>1,2</sup>, FEDERICO NAVARRO GARCÍA<sup>3</sup>, ESTHER CARBÓ LASO<sup>1</sup>, ANA ISABEL FRAGUAS SÁNCHEZ<sup>4</sup>, RODRIGO PRIEGO SÁNCHEZ<sup>1</sup>, JAVIER VAQUERO MARTÍN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

<sup>2</sup>Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

<sup>4</sup>Departamento de Farmacia, Galénica y Tecnología Alimentaria, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

La infección tras la artroplastia es una complicación devastadora con pérdida de funcionalidad, riesgo de afectación sistémica e incidencia creciente. El uso de espaciadores de cemento óseo con antibióticos supone el gold estándar terapéutico pero la adición de determinados antibióticos se encuentra limitada por interferir con su fraguado. Este es el caso de la rifampicina, considerada piedra angular para el tratamiento de infecciones de origen estafilocócico, que son las más frecuentes, pero que al contacto con el cemento impide su completo fraguado disminuyendo su resistencia y haciéndolo inadecuado para su uso en la práctica clínica. Para proteger el proceso de fraguado del cemento se ha vehiculado la rifampicina dentro de microcápsulas de alginato. El objetivo del presente estudio es analizar la eficacia in vivo del cemento óseo con microcápsulas de rifampicina en el tratamiento de la infección periprotésica. Se emplearon 15 conejos hembra New Zeland White de 3kg a los que se colocó un implante tibial de acero inoxidable que posteriormente se infectó con 10<sup>5</sup>CFU de *S. aureus* ATCC 29213. Tras 1 semana de la inoculación se dividieron en dos grupos de experimentación. En el grupo C (7 conejos) se realizó un recambio en dos tiempos con colocación de un espaciador de cemento con gentamicina de uso habitual y en el grupo R (8 conejos) un espaciador con el mismo cemento con gentamicina al que se añadió un 12,5% de microcápsulas de rifampicina. A las 4 semanas de la implantación del espaciador se sacrificó a los animales y se tomaron muestras para cultivo microbiológico. Todos los animales se recuperaron de las cirugías sin incidencias. Se consiguió un fraguado completo del cemento con microcápsulas de rifampicina en un tiempo comparable a la práctica clínica habitual, dando lugar a espaciadores rígidos que permitieron la carga de la extremidad intervenida. En los cultivos microbiológicos no se registró crecimiento de *S. aureus* en el grupo R en las muestras de hueso y partes blandas, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo C con p=0,03 y 0,01 respectivamente. El cemento con microcápsulas de rifampicina es eficaz en el tratamiento de la infección periprotésica por *S. aureus*.

**Palabras clave:** *rifampicina; microencapsulación; infección periprotésica.*

## EL IMPACTO DE POLIMORFISMOS EN CYP Y ABCB1 SOBRE LA FARMACOCINÉTICA, FARMACODINAMIA Y SEGURIDAD DEL EFAVIRENZ EN VOLUNTARIOS SANOS

PABLO ZUBIAUR<sup>1</sup>, MIRIAM SAIZ-RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, CARMEN BELMONTE<sup>1</sup>, DOLORES OCHOA<sup>1</sup>, MANUEL ROMÁN<sup>1</sup>, FRANCISCO ABAD-SANTOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de farmacología clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España.

El efavirenz (EFV) es un inhibidor no nucleotídico de la transcriptasa inversa, utilizado como fármaco de primera línea en el tratamiento contra la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1). Se administra junto a inhibidores de la proteasa y/o integrasa, lo que se conoce como terapia antiretroviral combinada. Las isoformas CYP2B6 y CYP2A6 del citocromo p450 metabolizan EFV principalmente (77,5% y 22,5% respectivamente) con una contribución mínima de otras isoformas, como CYP3A4 o CYP3A5. Algunos polimorfismos en estas enzimas han sido relacionados con alteraciones en su función, lo que podría suponer concentraciones plasmáticas de EFV tóxicas o insuficientes. En este estudio, hemos evaluado el impacto de varios polimorfismos en estas enzimas, así como en la Glicoproteína-P (ABCB1/P-gp) sobre la farmacocinética, farmacodinamia y seguridad de EFV. Un total de 47 voluntarios sanos que recibieron una dosis de EFV (600 mg) en dos ocasiones fueron genotipados mediante PCR a tiempo real de once polimorfismos contenidos en los siguientes genes de enzimas o transportadores: CYP2B6, CYP2A6, CYP3A4, CYP3A5 y ABCB1. Los datos de farmacocinética, farmacodinamia y seguridad fueron obtenidos de dos ensayos de bioequivalencia. El análisis estadístico se llevó a cabo con SPSS v.21.0. Los hombres presentaron mayor área bajo la curva (AUC) y concentración máxima (C<sub>max</sub>) de EFV en comparación con las mujeres. Los portadores del alelo T de CYP2B6 G516T (rs3745274) presentaron un menor aclaramiento (Cl). Los sujetos con genotipo CYP2A6 rs28399433 A/A presentaron mayor AUC y menor volumen de distribución (V<sub>d</sub>). El genotipo T/T de ABCB1 C3435T (rs1045642) se asoció a mayor AUC y C<sub>max</sub> y menor V<sub>d</sub> en comparación con C/C o C/T. El aumento en la presión arterial diastólica (3h después de la toma de EFV) se correlacionó con el genotipo CYP2B6 rs4803419 C/T mientras que el aumento en la sistólica se asoció a CYP2A6 rs28399433 A/C. No se describieron asociaciones entre genotipos y la incidencia de efectos adversos. Este estudio ha permitido subrayar la importancia de CYP2A6 rs28399433 como factor condicionante de la farmacocinética y farmacodinamia de EFV y ha validado la relevancia de CYP2B6 G516T, acorde con la literatura. CYP2B6 rs4803419 podría condicionar la farmacodinamia de EFV. En referencia a ABCB1 C3435T, los datos obtenidos no concuerdan con trabajos anteriores, aunque la evidencia de los mismos es baja. La falta de reproducibilidad entre estudios implica la necesidad de estudios con tamaños poblacionales mayores.

**Palabras clave:** *efavirenz, CYP2B6, CYP2A6, ABCB1, polimorfismo.*

## NUEVOS ENFOQUES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE NUEVOS COMPUESTOS MULTIDIANA

P. DUARTE<sup>1,2</sup>, P. MICHALSKA<sup>1,2</sup>, I. BUENDIA<sup>1,2</sup>, R. LEÓN<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, España

<sup>2</sup>*Instituto de Investigación Sanitaria, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, 28006 Madrid, España, Email: rafael.leon@inv.uam.es*

Actualmente, no existe una terapia curativa para la enfermedad de Parkinson (EP), por ello encontrar un tratamiento efectivo y no sólo sintomático constituye un gran reto. La depleción de dopamina y destrucción selectiva de neuronas dopaminérgicas, junto con la presencia de depósitos de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, son algunas manifestaciones patológicas típicas. Por otra parte, el estrés oxidativo se relaciona en gran medida actualmente con la aparición y desarrollo de la enfermedad y constituye una importante diana para el desarrollo de nuevas moléculas. Se produce como consecuencia una desregulación en el procesamiento de proteínas, daño mitocondrial y neuroinflamación y estos factores, a su vez, conducen al aumento del propio estrés oxidativo, generando un bucle fisiopatológico que acelera la progresión de la EP. Teniendo en cuenta la complejidad de esta enfermedad multifactorial, hemos diseñado y sintetizado una pequeña biblioteca química de nuevos compuestos multidiana, con el objetivo de combinar varias actividades en una sola molécula: (i) Inducción del factor de transcripción Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*), dada su actuación como regulador maestro de la defensa antioxidante de las células; (ii) Inhibición selectiva de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B), en relación con su notable importancia para el control del metabolismo de la dopamina en la progresión de la enfermedad, una fuente importante de producción de estrés oxidativo; (iii) Capacidad neuroprotectora. La evaluación farmacológica de las moléculas recién sintetizadas ha mostrado un buen perfil en términos de las actividades deseadas. Esto nos ha permitido seleccionar un compuesto cabeza de serie para realizar futuras modificaciones estructurales, dirigidas principalmente a mejorar algunas de las propiedades incorporadas en el diseño y con el objetivo de desarrollar nuevos tratamientos efectivos para la EP.

**Palabras clave:** *estrés oxidativo, Parkinson, multifactorial, Nrf2, monoamino oxidasa*

**Agradecimientos:** *Agradecimiento al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por los contratos FPU 16/03977 a P.D., FPU 13/03737 a P.M., y Juan de la Cierva a I.B., y a la financiación recibida por parte de la Comisión Europea-ERC People (Marie Curie Actions) FP7 no. PCIG11-GA-2012-322156; al Instituto de Salud Carlos III (PI14/00372) y Fundación FIPSE (12-00001344-15) a R.L.*

#### **ADRENOMEDULLARY CHROMAFFIN CELLS FROM A RAT MODEL OF NEUROPATHIC PAIN UNDERGO CHANGES IN MEMBRANE RECEPTORS REMINISCENT OF THOSE OF DORSAL ROOT GANGLION CELLS**

**PAULA GARCÍA-SOCUÉLLAMOS.<sup>1</sup>; VIRGINIA SOLAR FERNÁNDEZ.<sup>1</sup>; ROCÍO BARTOLOMÉ-CABRERO.<sup>1</sup>; ANA GUILLÉN MARTÍNEZ.<sup>1</sup>; LUIS ALCIDES OLIVOS-ORÉ.<sup>1</sup>; MARÍA VICTORIA BARAHONA.<sup>1</sup>; JAVIER GUALIX.<sup>2</sup>; ROSA GÓMEZ-VILLAFUERTE.<sup>2</sup>; MARÍA TERESA MIRAS-PORTUGAL.<sup>2</sup>; ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO.<sup>1</sup> & MARINA ARRIBAS-BLÁZQUEZ.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Dept. Sec. Pharmacology and Toxicology;* <sup>2</sup>*Dept. Sec. Biochemistry & Molecular Biology. Veterinary Faculty. Universidad Complutense de Madrid*

We have previously investigated the contribution of the sympathoadrenal system to behavioral manifestations of neuropathic pain brought about by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve. Such a contribution is evidenced by the ability of surgical splanchnectomy and chemical adrenomedullectomy (PNMT inhibition) to revert mechanical allodynia in CCI rats. We presume that neuropathic pain acts as a powerful stressor inducing

important adaptations at the adrenal medulla level (increase in splanchnic nerve fibers, enhanced spontaneous synaptic activity, enlarged nicotinic currents...), which ultimately lead to an augmented release of catecholamines possibly affecting nociceptors to evoke pain. Here we have confirmed well described changes occurring in isolated dorsal root neurons from CCI rats consisting in the overexpression of purinergic P2X3 and P2X7 receptors. In those animals, P2X3 and P2X7 receptors mediate pain as demonstrated by the antiallodynic effect of P2X3 and P2X7 antagonists. Interestingly, endogenous and synthetic dinucleotide polyphosphates (AP<sub>4</sub>A, AP<sub>5</sub>A, IP<sub>5</sub>I) also activate, desensitize or antagonize P2X2/3 receptors and modulate nociceptive behaviour. Last, but most intriguing, functional responses mediated by P2X2/3, P2X7 and TRPV1 receptors are dramatically enhanced in chromaffin cells from neuropathic animals. These observations are reminiscent of the molecular changes characteristic of peripheral sensitization of nociceptors in a variety of pain conditions, and suggest that a similar phenomenon can occur in other tissues contributing to the clinical manifestations of neuropathic pain.

**Palabras clave:** *neuropathic pain, chromaffin cell, DRG, purinergic receptor.*

**Acknowledges:** *This work has been funded in part by BRADE (S2013/ICE-2958) from Comunidad de Madrid and BFU2014-53654-P from Ministerio de Economía y Competitividad.*

#### **LA PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> INHIBE LA SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub> VÍA RECEPTOR EP3 EN ASTROCITOS CEREBELOSOS**

**LUCÍA PANIAGUA HERRANZ, JUAN CARLOS GIL REDONDO, MARÍA JOSÉ QUEIPO GARCÍA, ESMERILDA GARCÍA DELICADO, RAQUEL PÉREZ SEN, MARÍA TERESA MIRAS PORTUGAL**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España. Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, UCM.*

La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en uno de los principales lípidos bioactivos que se acumulan en situaciones de inflamación o daño celular debido a la rápida inducción de la enzima ciclooxigenasa 2. Este lípido activa receptores específicos de membrana acoplados a proteínas G, los receptores EP1-EP4, mediando respuestas pro- o anti-inflamatorias en función del contexto celular. En estas situaciones se pueden liberar también nucleótidos que incluso contribuyen a la producción de la prostaglandina. En estudios anteriores describimos la inhibición selectiva de la señalización de los receptores de nucleótidos P2Y por la PGE<sub>2</sub> en macrófagos y fibroblastos, a través de la activación de las proteínas PKC y PKD. Teniendo en cuenta que macrófagos y fibroblastos participan en la regulación de la respuesta inmune así como en la remodelación tisular, un mecanismo similar podría estar ocurriendo en los astrocitos como respuesta a la neuroinflamación y la reparación cerebral. Analizamos la modulación de las respuestas celulares de los receptores P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub> por la PGE<sub>2</sub> en astrocitos de cerebelo de rata. Demostramos que la PGE<sub>2</sub> inhibe las respuestas de calcio intracelular provocadas por UTP y que ésta inhibición también modula la migración de los astrocitos inducida por el nucleótido. Además, la activación del receptor EP3 no solo inhibe estas respuestas sino que regula la fosforilación de las proteínas ERK y Akt inducidas por UTP. Sin embargo, la PGE<sub>2</sub> requiere la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico para modular la señalización del receptor P2Y. Asimismo, los efectos de la PGE<sub>2</sub> también ocurren en un contexto proinflamatorio, como se evidencia

en astrocitos estimulados con lipopolisacárido bacteriano (LPS).

**Palabras clave:** Astrocitos, calcio, receptores EP, receptores de nucleótidos P2Y y PGE<sub>2</sub>.

**Agradecimientos:** El trabajo ha sido financiado por MINECO, BFU 2014-53654-P, Red de excelencia Consolider-Ingenio Spanish Ion Channel Initiative" (BFU2015-70067RED) y por la Comunidad de Madrid (BRADE-CM S2013/ICE-2958).

## PAPEL NEUROPROTECTOR DE TIORREDOXINA HUMANA EN UN MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS

MARCOS PEÑA-NEVADO<sup>1</sup>, ANTONIO GARCÍA-GARCÍA<sup>1</sup>, FERNANDA GARCÍA-ALVARADO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Spain

El presente proyecto de investigación se enmarca en un programa de reposicionamiento de fármacos cuyo objeto es la búsqueda de un medicamento neuroprotector con indicación terapéutica en la enfermedad del Alzheimer (EA). Bajo este marco emergió la estrategia de mitigar el estrés oxidativo con tiorredoxina humana (TRX), que tiene actividad antioxidante y forma parte de un complejo que regula el estado redox. La TRX no generó citotoxicidad en cultivos primarios de células cromafines bovinas (CCB), pero no protegió a estas frente a la pérdida de viabilidad celular inducida por veratridina. Sin embargo, sí protegió a las CCB frente a la lesión producida por una combinación de rotenona y oligomicina (R/O); esta protección fue dependiente de concentración. Sin embargo en neuronas corticales de rata solo produjo protección frente a R/O a la concentración más alta. Se usó como control positivo la melatonina, un antioxidante hormonal, que también ofreció neuroprotección frente a R/O. La R/O produjo una elevación de radicales libres de oxígeno de 6 veces, que fue drásticamente reducida cuando las CCB se incubaron con TRX. Los experimentos sugieren que la TRX humana ejerce un claro efecto neuroprotector en CCB y en neuronas incubadas con R/O; dicho efecto está relacionado con su capacidad antioxidante. Estos resultados abren la puerta a un posible uso farmacoterapéutico de la TRX en enfermedades neurodegenerativas.

**Palabras clave:** tiorredoxina, rotenona, oligomicina, célula cromafín, neuronas corticales.

**Agradecimientos:** agradecemos al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación de este trabajo a través del proyecto SAF2016-78892-R, y con el continuado apoyo de la Fundación Teófilo Hernando.

## LA AUTO ADMINISTRACIÓN DE COCAÍNA AUMENTA EL TAMAÑO DE LAS SINAPSIS EN EL HIPOCAMPO DE LAS RATAS LEWIS

L. BLAZQUEZ-LLORCA<sup>1</sup>, M. MIGUÉNS<sup>1,2</sup>, M. MONTERO-CRESPO<sup>2,3</sup>, A. SELVAS<sup>1</sup>, J. DEFELIPE<sup>2,3</sup>, E. AMBROSIO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.

La adicción a la cocaína es un trastorno recurrente crónico que se asocia con cambios persistentes en los circuitos cerebrales. Se cree que los cambios duraderos en el comportamiento, como el aprendizaje, dependen de la

reorganización de las conexiones sinápticas y se ha sugerido que la adicción podría ser una especie de aprendizaje no adaptativo. Se han estudiado diferentes alteraciones en los circuitos mesocorticolímbicos debidas al tratamiento con cocaína, pero los efectos en el hipocampo no son bien conocidos. Por este motivo, se evaluaron los cambios inducidos por la cocaína en el neuropilo del *stratum radiatum* de la región de CA1 del hipocampo de las ratas Lewis (LEW), una cepa de rata que ha demostrado ser propensa a los efectos reforzadores de las drogas de abuso. Para este propósito, se usó la microscopía electrónica FIB / SEM (del inglés, focused ion beam / scanning electron microscope). Se trata de un microscopio de haz de iones focalizados con doble columna iónica y electrónica que sirve para estudiar posibles alteraciones en la organización sináptica. La tecnología FIB / SEM tiene la gran ventaja de permitir la adquisición de manera automática de grandes volúmenes de tejido a nivel ultraestructural y por tanto, que se pueda realizar un análisis tridimensional de diferentes elementos presentes en la muestra. La densidad sináptica, las características morfométricas y la distribución espacial de las sinapsis se examinaron con el programa EspINA. No se observaron cambios estadísticamente significativos en la densidad sináptica, ni de sinapsis asimétricas excitadoras ni de simétricas inhibitorias, tras la auto-administración de cocaína. Tampoco se observaron cambios en la distribución espacial de las sinapsis tras la auto-administración de la droga. Sin embargo, se observaron cambios en el tamaño de las sinapsis después de la auto-administración de cocaína, existiendo una mayor número de sinapsis más grandes tras esta conducta. Este hallazgo es importante porque el tamaño de la zona activa presináptica y la densidad postsináptica se correlaciona con la probabilidad de liberación sináptica y el número de receptores postsinápticos. Por lo tanto, los cambios en la morfología de las sinapsis están directamente correlacionados con los cambios en la función sináptica. Teniendo en cuenta nuestros resultados y los de trabajos morfológicos, electrofisiológicos y de comportamiento previos, podemos especular que las conexiones entre CA3 y CA1 podrían estar involucradas en potenciar las memorias contextuales inducidas por la droga durante el proceso de auto-administración de la cocaína.

**Financiación:** Ministerio de Ciencia e Innovación (PSI2016-80541-P); Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (Red de Trastornos Adictivos- RTA-RD16/020/0022 del Instituto de Salud Carlos III- y Plan Nacional sobre Drogas, 2016I073); Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid (S-2011/BMD-2308; Programa de Actividades I+D+I CANNAB-CM); UNED (Plan de Promoción de la Investigación e "Independent Thinking"); y Unión Europea (JUST/2013/DPIP/AG/4823-EU MADNESS).

## CHOLECYSTOKININ UP-REGULATES ADIPONECTIN GENE EXPRESSION IN WHITE ADIPOCYTES AND ENHANCES ADIPONECTIN PLASMA LEVELS IN RATS

ADRIÁN PLAZA, BEATRIZ MERINO, NURIA DEL OLMO, AND MARIANO RUIZ-GAYO.

Department of Pharmaceutical and Health Sciences. Facultad de Farmacia. Universidad CEU San Pablo. Madrid, Spain.

Cholecystokinin (CCK) has been shown to regulate postprandial triglyceride (TG) uptake by white adipose tissue (WAT) by a mechanism involving the activation of the angiotensin-like protein 4/lipoprotein lipase (LPL) axis. This newly characterized endocrine action suggests that CCK pathways are integral to mechanisms aimed at maintaining WAT homeostasis. Our goal was to investigate the role of CCK in regulating the expression of adiponectin, an adipokine endowed with auto/paracrine and endocrine functions,

pivotal for maintaining insulin responsiveness. The effect of acute and chronic CCK-8 (a bioactive fragment of CCK) on both adiponectin plasma levels and WAT gene expression was investigated in rats. The specificity of CCK-8 actions was characterized by using selective CCK-1 (CCK-1R) and CCK-2 receptor (CCK-2R) antagonists. *In vitro* experiments were carried out in engineered pre-adipocytes lacking either CCK-1R or CCK-2R. Acute treatment with CCK-8 (10 µg/kg) enhanced adiponectin gene expression (*Adipoq*) in subcutaneous WAT (Sc-WAT;  $p < 0.01$ ), while chronic CCK-8 (10 µg/kg, twice a day, 12 days) increased *Adipoq* expression both in Sc-WAT ( $p < 0.01$ ) and visceral WAT (Vis-WAT;  $p < 0.05$ ). The increment of *Adipoq* expression was accompanied by a raise of plasma adiponectin concentration ( $p < 0.05$  and  $p < 0.05$  after acute and chronic treatment, respectively). CCK-8 effects were specifically abolished by L-365,260, a selective CCK-2R antagonist. *In vitro* studies, revealed that CCK-8 (10 µM), induced *Adipoq* expression ( $p < 0.01$ ). This effect was also specifically blocked when CCK-2R expression was silenced. Our study demonstrates that CCK-2R activation promotes adiponectin synthesis in WAT and supports the concept that CCK-8 contributes to preserve WAT homeostasis. Otherwise, our data lead to hypothesize that CCK systems might be integral to mechanisms aimed at preserving insulin responsiveness.

**Key words:** *Adiponectin, cholecystokinin, white adipose tissue, adipocyte biology.*

**Funding:** *Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2012-35353; BFU2016-78556R), European Regional Development Fund, and Fundación Universitaria San Pablo-CEU. AP is supported by the postgraduate fellowship program of MINECO (BES-2012-063773).*

## EL ANTIDEPRESIVO SERTRALINA EJERCE EFECTO SOBRE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES

ALICIA MUÑOZ-MONTERO<sup>1</sup>, ISABEL GAMEIRO-ROS<sup>1</sup>, IRIS ALVÁREZ-MERZ<sup>1</sup>, ANDRÉS BARAIBAR<sup>1</sup>, CARMEN NANCLARES<sup>1</sup>, INÉS COLMENA<sup>1</sup>, LUIS GANDÍA<sup>1</sup>

*1 Universidad Autónoma de Madrid, Instituto Teófilo Hernando I+D del medicamento.*

Según la teoría monoaminérgica de la depresión (Schildkraut, 1965), esta enfermedad se relaciona con un déficit de monoaminas, fundamentalmente serotonina y noradrenalina, por lo que los fármacos antidepresivos tratan de aumentar los niveles de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica. Dado a los considerables efectos adversos que producían los antidepresivos tricíclicos, primeros fármacos usados para tratar la depresión, se desarrolló un nuevo grupo farmacológico más específico, los denominados "Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina" (ISRS). Por otro lado, la teoría colinérgica de la depresión lleva a pensar que el bloqueo de los receptores nicotínicos podría participar en el efecto de los antidepresivos. En este trabajo tratamos de caracterizar los efectos del ISRS sertralina sobre los receptores nicotínicos neuronales usando como modelo las células cromafines bovinas, las cuales expresan subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 7$  de los receptores nicotínicos. Mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas como la secreción en poblaciones o el patch clamp, hemos estudiado si la sertralina afecta a la secreción de catecolaminas y las estructuras celulares implicadas en este proceso secretor. Empleamos para ello el agonista fisiológico acetilcolina o una solución con alta concentración de potasio que produce una despolarización directa de las células. Al mismo tiempo, estudiamos el efecto de la sertralina en los incrementos transitorios de calcio citosólico en poblaciones celulares mediante la sonda fluorescente Fluo-4-AM. Los resultados obtenidos indican

que la sertralina produce una disminución en la secreción de catecolaminas de manera concentración-dependiente en células estimuladas con el agonista fisiológico acetilcolina, pero no con la solución despolarizante con alta concentración de potasio. Así mismo, produce un bloqueo concentración-dependiente en las corrientes iónicas a través de los receptores nicotínicos. Por tanto, los resultados apoyan que la sertralina está ejerciendo un bloqueo en los receptores nicotínicos, lo que podría suponer de interés viendo estos receptores como una nueva diana terapéutica para los fármacos antidepresivos.

**Palabras clave:** *Antidepresivo, sertralina, corrientes nicotínicas, catecolaminas, células cromafines.*

**Agradecimientos:** *MINECO FPU2016, SAF2016-78892, Fundación Eugenio Rodríguez Pascual y Fundación Teófilo Hernando.*

## VALIDACIÓN DE DIANAS FARMACOLÓGICAS DE ORIGEN INFLAMATORIO EN TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO

VÍCTOR FARRÉ-ALINS<sup>1,2,3</sup>, JULIANA MARTINS ROSA<sup>1,2,3</sup>, ALEJANDRA PALOMINO-ANTOLÍN<sup>1,2,3</sup>, PALOMA NARROS<sup>1,2,3</sup>, CRISTINA SÁNCHEZ CARABIAS<sup>4</sup>, MIGUEL SÁEZ ALEGRE<sup>4</sup>, ALFONSO LAGARES<sup>4</sup>, BORJA JESÚS HERNÁNDEZ-GARCÍA<sup>5</sup>, JAVIER EGEA<sup>1,2,3</sup>

*1 Instituto de Investigación Sanitaria (IIS-IP), Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid, España.*

*2 Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Madrid, Spain.*

*3 Instituto Teófilo Hernando, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.*

*4 Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España.*

*5 Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.*

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es una de las primeras causas de muerte y discapacidad en la población adulta joven de nuestra sociedad. Recientemente se le ha llamado la "epidemia silente", puesto que es un problema frecuente y las consecuencias de la patología se desconocen. En este contexto, la neuroinflamación que tiene lugar tras el TCE juega un papel crucial en el desarrollo de lesiones secundarias. Así, el objetivo de este estudio es analizar el efecto de compuestos que sean capaces de modular la respuesta inflamatoria en modelos *in vitro* de inflamación así como en un modelo *in vivo* de TCE. Hemos evaluado el efecto de MCC950 (inhibidor del inflamasoma y de la liberación de IL-1 $\beta$ ) en la liberación de IL-1 $\beta$  y en la activación de la vía TLR4 en cultivos primarios de glía tras estimulación con LPS y ATP. El compuesto redujo la liberación de IL-1 $\beta$ , mientras que no obtuvimos ningún cambio en los niveles de TNF- $\alpha$ , pro-IL1 $\beta$  y liberación de nitrógeno. Para evaluar el potencial efecto beneficioso de la inhibición del inflamasoma, usamos el modelo murino de TCE llamado "Closed Head Injury" (CHI). Tras la inducción de la lesión, evaluamos las funciones neurológicas del animal 1 y 24 horas después del TCE mediante el test "Neurological Severity Score" (NSS). Los animales tratados fueron inyectados intraperitonealmente con MCC950 (3 mg/kg ó 10 mg/kg) inmediatamente después del test de 1 hora. En animales control obtuvimos un valor de 7 a 1 hora, mientras que al día siguiente descendió a 5. Las dos dosis del compuesto mejoraron el estado de los animales, aunque solo fue significativo a 3 mg/kg (3.8). Para evaluar el daño de la barrera hematoencefálica (BHE) inyectamos de forma intraperitoneal el colorante Evans Blue, el cual tiñe las zonas del cerebro que tienen comprometida la BHE. El MCC950 3 mg/kg redujo el deterioro de la BHE tras el TCE. Finalmente, analizamos por inmunofluorescencia el estado de la microglía en los cerebros de los ratones con TCE. En el

hemisferio que había recibido el TCE observamos una activación de la microglía, hecho que no se producía en el hemisferio no dañado. Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos resultados, la respuesta inflamatoria podría ser una diana a considerar para tratar los efectos perjudiciales del TCE.

**Palabras clave:** traumatismo craneoencefálico, inflamación, biomarcadores, SAA1, inflamasoma.

**Agradecimientos:** Este estudio está financiado por la Fundación Mutua Madrileña, el Programa Miguel Servet (CP14/00008) del IS Carlos III, y el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (ISCIII/FEDER) (PI16/00735).

## NUEVOS COMPUESTOS MULTIDIANA QUIRALES DERIVADOS DE MELATONINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

SHEILA ABRIL<sup>1,2</sup>, PATRYCJA MICHALSKA<sup>1,2</sup>, IZASKUN BUENDIA<sup>2</sup>, ANA MARIA BRIONES<sup>1</sup>, JOSE CARLOS MENENDEZ<sup>3</sup>, MERCEDES SALAICES-SÁNCHEZ<sup>1</sup>, RAFAEL LEON<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Teófilo Hernando y Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid.

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario de la Princesa, 28006, Madrid.

<sup>3</sup> Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid

La enfermedad de Alzheimer es la más prevalente de las enfermedades neurodegenerativas según la Organización Mundial de la Salud con 35 millones de casos en todo el mundo. Actualmente no existe terapia efectiva para esta enfermedad considerada multifactorial, por lo que la nueva estrategia de ligandos multidiana parece prometedora. En este contexto, hemos diseñado nuevos compuestos para controlar el estrés oxidativo y neuroinflamación, combinando la inducción del factor de transcripción Nrf2, el restablecimiento de la función colinérgica y un efecto antioxidante, lo cual promovería la neuroprotección. Siguiendo una estrategia convergente-lineal y enantioselectiva de siete etapas, se ha sintetizado una nueva familia de quince moléculas con buenos rendimientos y excesos enantioméricos. Posteriormente, se han realizado diversos estudios farmacológicos incluyendo la evaluación de los compuestos como agentes captadores de radicales libres mediante el test ORAC; como inductores del factor de transcripción Nrf2 empleando un método luminiscente en la línea celular AREC32; como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa mediante el método de Ellman y como agentes neuroprotectores en un modelo *in vitro* de hiperfosforilación de tau en la línea celular SH-SY5Y. Todos los nuevos compuestos resultaron ser tan buenos captadores de radicales libres como la melatonina, así como inhibidores de acetilcolinesterasa. Sin embargo, sólo seis de las quince moléculas han mostrado incluir todas las propiedades deseadas, incluyendo la inducción de Nrf2 y neuroprotección. Por ello, siguiendo la línea del descubrimiento de fármacos, se pretende continuar y completar el perfil farmacológico para escoger el compuesto cabeza de serie para avanzar en estudios más complejos.

**Palabras clave** Química enantioselectiva, ligandos multidiana, enfermedad de Alzheimer.

**Agradecimientos:** Marie Curie Actions-FP7 (PCIG11-GA-2012-322156); Instituto de Salud Carlos III (PI14/00372), Fundación FIPSE (12-00001344-15) a R.L.; S.A., P.M. e I.B agradecen al MECO por los contratos FPU (FPU14/05224 y FPU13/03737) y contrato Juan de la Cierva. Agradecimiento al Instituto-Fundación Teófilo Hernando por su continuo apoyo.

## EFFECTOS DE UNA DIETA RICA EN ÁCIDO BUTÍRICO SOBRE LA MEMORIA ESPACIAL Y LA TRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA HIPOCAMPAL

A.B. SANZ\*, A. CONTRERAS\*, A. PLAZA, MV. CANO, B. MERINO, M. RUIZ-GAYO Y N. DEL OLMO

Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud, Facultad de Farmacia, Universidad CEU-San Pablo, Madrid, España.

\*Estos autores han contribuido por igual al trabajo presentado

Los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), derivados de la fermentación intestinal de la fibra alimentaria y contenidos en los productos lácteos, están cobrando un interés creciente en relación con sus posibles efectos beneficiosos en enfermedades degenerativas y problemas psicológicos. Los SCFA presentan receptores específicos en el cerebro y, en concreto, el ácido butírico, es además un inhibidor de la desacetilación de histonas (HDAC), mecanismo clave en algunos procesos de mejora de la memoria. Por estas razones, hemos estudiado el efecto a corto y largo plazo de una dieta enriquecida en tributirina (TB; tributirilglicerol) sobre la memoria espacial dependiente de hipocampo y los posibles cambios inducidos por la misma sobre la expresión de genes relevantes para la transmisión glutamatérgica hipocampal. Se utilizaron ratones macho C57BL/6J de cuatro semanas de edad, que fueron alimentados con una dieta estándar conteniendo 0-3% de TB (grupo control 0%; grupo 0,5% TB; grupo 1% TB; grupo 3% TB; n=7 durante 48 h (tratamiento agudo, a corto plazo) o durante 20 semanas (tratamiento crónico, a largo plazo). Se evaluó la memoria espacial mediante el análisis de la alternancia espontánea en el laberinto en Y una vez transcurridas 48 h (tratamiento agudo), así como al cabo de 9, 11, 13, 15, 17 y 19 semanas (tratamiento crónico). Una vez finalizado el tratamiento, los animales se sacrificaron y se procesaron los hipocampos para RT-PCR (receptores AMPA y NMDA, transportadores de glutamato Glt1, Glast, Glut1). Nuestros resultados muestran que el tratamiento crónico con ácido butírico parece tener efectos beneficiosos sobre la memoria espacial medida en el laberinto en Y en las edades más avanzadas de los animales mientras que el tratamiento agudo señala una tendencia a la mejoría en este tipo de memoria espacial en animales jóvenes. Además, tanto el tratamiento agudo como el crónico producen la modulación de la expresión génica hipocampal de los receptores y los transportadores glutamatérgicos valorados poniendo de manifiesto que este tipo de dietas tienen efecto sobre las dianas moleculares del hipocampo que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria.

**Palabras Clave:** ácido butírico, dieta rica en grasa, memoria, aprendizaje, transmisión sináptica hipocampal.

**Financiación:** Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2016-78556R), Fondo Europeo de Desarrollo Regional y Fundación Universitaria CEU-San Pablo. AC y AP son apoyados por los programas de becas de postgrado de la Universidad CEU-San Pablo y MINECO (BES-2012-063773), respectivamente.

## ¿QUÉ EFECTO TIENE LA DRONEDARONA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO? ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS HIPERTENSAS

LAIA PAZÓ-SAYÓS<sup>1</sup>, RAQUEL MARTÍN-OROPESA<sup>1</sup>, PILAR RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ<sup>3</sup>, ANA ARNALICH MONTIEL<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> CARMEN GONZÁLEZ GARCÍA<sup>3</sup>, BEGOÑA QUINTANA-VILLAMANDOS<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Anestesiología y Reanimación, Hospital Gregorio Marañón, Madrid

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, IISGM, Madrid



<sup>3</sup> Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid

<sup>4</sup> Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid

Nuestro grupo previamente demostró que la dronedarona tiene el potencial de revertir la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) inducida por la hipertensión arterial.<sup>1</sup> Nuestra hipótesis fue que uno de los mecanismos implicados podría ser la reducción del estrés oxidativo. Para ello, desarrollamos un índice global de estrés oxidativo (Oxy-Score) en un modelo experimental de hipertensión arterial. El animal empleado en el estudio fue la rata espontáneamente hipertensa (SHR), macho, adulta. Se establecieron dos grupos experimentales randomizados de ratas SHR según el tratamiento recibido: ratas tratadas con dronedarona (SHR-D, n=9) y ratas que recibieron placebo (SHR, n=9). Las ratas Wistar Kyoto (WKY, n=9) fueron usadas como controles normotensos. Tras 14 días de tratamiento se analizaron los siguientes biomarcadores de estatus oxidativo: carbonilos, tioles, capacidad antioxidante total (TAC), actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reducido (GSH). Calculamos un score global usando metodología ya descrita previamente<sup>2</sup> (análisis de la distribución normal de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, normalización y estandarización de los parámetros y cálculo del Oxy-Score usando la siguiente ecuación:  $\Sigma$  antioxidantes – daño oxidativo). El análisis de los datos se realizó mediante el test ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni. Todos los datos fueron expresados como media $\pm$ SEM y se consideró significativa  $P < 0.05$ . Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. No se observaron diferencias significativas respecto a los valores individuales. Sin embargo, tras analizar el Oxy-Score, se vieron diferencias interesantes entre SHR y SHR-D. El Oxy-Score de las ratas SHR fue negativo, lo que implica un predominio del daño oxidativo. Por otro lado, el Oxy-Score de SHR-D fue positivo, indicando un predominio de la capacidad antioxidante frente al daño oxidativo ( $p < 0.001$ ). La mejoría del estado global oxidativo tras tratamiento con dronedarona podría contribuir al efecto protector que ejerce el fármaco en la regresión de la HVI.

**Palabras clave:** Estrés oxidativo, Dronedarona, Hipertrofia, Ventricular Izquierda, Hipertensión Arterial.

**Agradecimientos:** Estudio financiado por FIS13/01261, PI16/02069 y Fondos FEDER.

### ALTERACIONES EN RASGOS RELACIONADOS CON LA ADICCIÓN TRAS LA EXPOSICIÓN CRÓNICA DE $\Delta$ 9-TETRAHIDROCANNABINOL EN LA ADOLESCENCIA: ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS Y NEUROIMAGEN

J. ORIHUEL, R. CAPELLÁN, M. UCHA, D. ROURA-MARTÍNEZ, E. AMBROSIO Y A. HIGUERA-MATAS.

Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología. Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid, España.

El objetivo de este estudio es realizar un perfilado de diferentes rasgos comportamentales, presentes en la etapa adulta, relacionados con el posterior desarrollo de trastornos de uso y abuso de sustancias que pudieran aparecer o alterarse tras el consumo crónico de  $\Delta$ 9-Tetrahidrocannabinol (THC) en la adolescencia; De igual manera, nos propusimos explorar las bases biológicas de estos cambios, mediante técnicas de neuroimagen y secuenciación masiva de RNA. Los sujetos experimentales fueron ratas Wistar (machos y hembras) que recibieron 9 inyecciones de THC (3 mg / kg) o su vehículo cada dos días durante su adolescencia (PND28-42). Durante la edad adulta (PND90 en adelante) se realizaron diferentes evaluaciones de la presencia de rasgos relacionados con la adicción en tres líneas de experimentación diferentes: 1. La capacidad de las claves condicionadas para influir en la respuesta instrumental (transferencia pavloviana a

instrumental -PIT-) y la impulsividad motora (2-CSRTT). 2. Aproximación pavloviana condicionada y la formación de hábitos. 3. Autoadministración de cocaína. También examinamos los efectos a largo plazo de esta exposición a cannabinoides en la estructura y el metabolismo del cerebro (MRI e in vivo [1H] -espectroscopia) y en la expresión genética en el Núcleo Accumbens Shell (RNA-seq). Los animales tratados con THC mostraron una facilitación en la adquisición de la autoadministración de cocaína. Los machos THC mostraron un aumento de la búsqueda compulsiva de la droga (asociada a descargas eléctricas). Las hembras expuestas al THC exhibieron un mayor consumo de cocaína durante la fase de acceso extendido y un patrón distinto de incubación de la búsqueda de la droga. Los machos expuestos al THC mostraron asimismo una PIT aumentada, pero disminuyeron la aproximación a las señales asociadas con la recompensa y la impulsividad motora. En cuanto a los efectos a nivel cerebral, se observó un aumento en el volumen del cuerpo estriado, niveles reducidos de glicerofosforilcolina-fosforilcolina cortical y cambios evidentes de integridad microestructural en el tálamo, los núcleos septales y el cuerpo estriado en animales expuestos al THC. Los análisis del transcriptoma mostraron que los genes diferencialmente expresados principalmente involucrados en el desarrollo cerebral, la axogénesis y el aprendizaje. Estos resultados muestran que una exposición leve al THC durante la adolescencia deja una marca persistente en el comportamiento, la estructura y función del cerebro durante la edad adulta, incluso después de un largo período libre de droga. Los cambios observados tienen un fuerte carácter sexodimórfico e implican una alteración de los patrones de búsqueda y consumo de drogas.

**Palabras clave:**  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol, MRI, RNAseq, adolescencia, adicción

**Agradecimientos:** Fundación BBVA (Becas Leonardo), PNSD 2017/042, RTA-RD16 / 020/0022 del Instituto de Salud Carlos III, Proyecto S-2011 / BMD-2308, Programa de Actividades I + D + I CANNAB-CM), Plan de Promoción de la Investigación UNED, Proyecto JUST / 2013 / DPIP / AG / 4823-EU MADNESS. A Rosa Ferrado, Luis Carrillo, Gonzalo Moreno y Alberto Marcos por la excelente asistencia técnica.

### INCREASING KYNURENINE BRAIN LEVELS REDUCES ETHANOL CONSUMPTION IN MICE BY INHIBITING DOPAMINE RELEASE IN NUCLEUS ACCUMBENS

PABLO GIMENEZ GOMEZ<sup>1,2,3</sup>, MERCEDES PEREZ HERNANDEZ<sup>1,2,3</sup>, MARIA DOLORES GUTIERREZ LOPEZ<sup>1,2,3</sup>, REBECA VIDAL CASADO<sup>1,2,3</sup>, CRISTINA ABUIN MARTINEZ<sup>1,2,3</sup>, ESTHER O'SHEA GAYA<sup>1,2,3</sup>, MARIA ISABEL COLADO<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre, 28041, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Red de Trastornos Adictivos del Instituto de Salud Carlos III, 28029, Madrid, Spain.

El etanol (EtOH) es la droga más consumida entre los jóvenes. En la adolescencia el consumo de EtOH se produce principalmente con un patrón de consumo intensivo denominado "binge drinking". Hemos relacionado la vía qinurenina, vía principal de metabolismo del triptófano, con el consumo de EtOH, concretamente nos hemos planteado si la inhibición de la qinurenina monoaminoxidasa (KMO) y el consiguiente aumento de ácido qinurenico (KYNA) puede reducir el consumo de etanol en un modelo animal de "binge drinking". Utilizamos dos modelos de consumo voluntario para estudiar el efecto de Ro 61-8048 (inhibidor selectivo de KMO) y de qinurenina (KYN), precursor de KYNA, sobre el consumo de EtOH. Realizamos microdialisis in vivo sobre el núcleo accumbens para medir los cambios en la dopamina extracelular en esta área implicada en el consumo. Finalmente se administró PNU120596, un modulador alostérico positivo de  $\alpha$ 7nAChR, receptor para el cual el ácido qinurénico (KYNA) es un antagonista, para relacionar estos

receptores con los cambios en el consumo. Ro 61-8048 produce un incremento de la concentración de KYN y de KYNA en plasma y en cerebro que se relaciona con una marcada disminución en el consumo y en la preferencia por EtOH. Comprobamos mediante microdiálisis in vivo que Ro 61-8048 previene el incremento en la concentración extracelular de dopamina inducida por EtOH en el núcleo accumbens. Ro 61-8048 no altera el consumo de agua, compuestos dulces y energéticos. Además, comprobamos, mediante el test de reconocimiento de objeto y el test de actividad locomotora, que Ro 61-8048 no modificaba la actividad locomotora ni producía alteraciones en la memoria. La modulación farmacológica de los niveles cerebrales de KYNA, podría constituir una herramienta terapéutica eficaz para reducir el abuso en modelos de exposición intensiva de etanol.

**Palabras Clave:** Ethanol, Via Kinurenina, Binge Drinking, Dopamina

**Agradecimientos:** MEC (SAF2013-40592-R y SAF2016-78864-R), MSSI (PNSD 2014I015 y PNSD 2017I017), ISCIII RETICS RTA (RD12/0028/0002 and RD16/0017/0021), (UCM 910258) y CAM S2010-BMD-2308; PGG es FPU.

## EFFECTO A LARGO PLAZO DEL ESMOLOL SOBRE EL REMODELADO CORONARIO EN UN MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL

R. MARTÍN-OROPESA<sup>1</sup>, L. PAZÓ-SAYÓS<sup>1</sup>, P. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ<sup>3</sup>, I. SOLCHAGA SÁNCHEZ<sup>1</sup>, M.C. GONZÁLEZ<sup>3</sup>, E. DELGADO-BAEZA<sup>2</sup>, B. QUINTANA-VILLAMANDOS<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Anestesiología y Reanimación, Hospital Gregorio Marañón, Madrid

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, IISGM, Madrid

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Madrid

<sup>4</sup> Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid

El esmolol es un betabloqueante de acción ultracorta ampliamente utilizado para tratar a pacientes con hipertensión arterial. Nuestro grupo ha demostrado en estudios previos que el tratamiento a corto plazo (48 h) con esmolol produce una regresión temprana en el remodelado vascular, aunque el efecto a largo plazo no se ha estudiado todavía. El objetivo de este estudio es investigar si este efecto se prolonga a lo largo del tiempo. Se estudiaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR) macho de 14 meses de edad, que se aleatorizaron en cuatro grupos: grupo SHR tratado con esmolol (300 µg/kg/min IV durante 48 h) que se estudió tras 7 días del tratamiento, grupo SHR tratado con esmolol que se estudió a los 30 días del tratamiento, y los dos grupos controles respectivos (SHR tratadas con placebo). Tras 7 y 30 días de finalizar el tratamiento, se obtuvieron segmentos de la arteria coronaria descendente anterior y se montaron en un miógrafo de alambre para el estudio de su función. La función vasodilatadora se evaluó con concentraciones crecientes de acetilcolina (ACh  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  mol/L) en segmentos precontraídos con 5 hidroxitriptamina (5-HT  $3 \times 10^{-7}$  mol/L). A continuación, se realizaron curvas dosis-respuesta con serotonina ( $3 \times 10^{-9}$  a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L) para evaluar la función vasoconstrictora. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba T de Student. Las respuestas relajantes se expresan como porcentaje de reducción en el estado preconstriCTOR de 5-HT. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  S.E.M. El esmolol mejoró significativamente la relajación dependiente del endotelio inducida por ACh en todas las concentraciones ensayadas tras 7 días de tratamiento. Se observaron también diferencias estadísticamente significativas a altas dosis de ACh tras 1 mes de tratamiento. El esmolol redujo significativamente la contracción de la arteria coronaria en

comparación con el control SHR a concentraciones más altas de 5-HT tras 7 días de tratamiento, sin embargo, este efecto no se mantuvo al mes de finalizar el tratamiento. El efecto de esmolol en la función de las arterias coronarias permanece a largo plazo tras finalizar el tratamiento, tanto a la semana como al mes.

**Palabras clave:** esmolol, hipertensión arterial, remodelado coronario

**Agradecimientos:** Este trabajo fue apoyado por una subvención de FIS 16/02069 y Fondos FEDER, España.

## PRESENTACIONES EN PÓSTER

TRITERPENES FROM CRATAEGUS AZAROLUS L.  
INHIBITED LPS-STIMULATED PRO-INFLAMMATORY  
RESPONSES THROUGH TLR4-NF-KB PATHWAYDJOU DI BOUKEROUIS<sup>1,2</sup>, IRENE CUADRADO<sup>3</sup>, ANGEL AMESTY<sup>1</sup>,  
DJEBBAR ATMANI<sup>2</sup>, SONSOLES HORTELANO<sup>4</sup>, ANA ESTEVEZ  
BRAUN<sup>1</sup>, BEATRIZ DE LAS HERAS<sup>3</sup>

*1*Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González (CIBICAN), Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Av. Astrofísico Francisco Sánchez, N° 2, 38296, La Laguna, Tenerife, Spain.

*2*Applied Biochemistry Laboratory, University of Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria. *3*Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

*4* Unidad de Inflamación y Cáncer, Área de Biología Celular y del Desarrollo, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra Majadahonda-Pozuelo, Km 2,200, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

A series of triterpenes (1-14) were isolated from the leaves of *Crataegus azarolus* L. (Rosaceae), a plant traditionally used by its anti-inflammatory properties. The aim of the present work was to investigate the effects of these triterpenes on Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammatory responses in J774 macrophages. All compounds except 1, 2 and 4 were non-cytotoxic. Compound 6 (euscafic acid), 9 (fupenic acid), 11 (oleanolic acid), 12 (maslinic acid), 13 (arjunic acid) and 14 (alphitolic acid) inhibited nitric oxide (NO) release in lipopolisaccharide (LPS)-stimulated macrophages, being compounds 9 and 12 the most active triterpenes (% inhibition 75.96 % and 63.49% at 20  $\mu$ M, respectively). Compound 9 and 12 significantly suppressed nitric oxide synthase (NOS-2) and cyclooxygenase (COX-2) protein expression. This inhibition was also confirmed at the transcriptional level by PCR analysis. Inflammatory cytokines (IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$ ) were downregulated in the presence of both compounds. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear transcription factor Kappa-B (NF- $\kappa$ B) signaling pathways were assessed by western blot assays. Degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  inhibitory protein was impaired in the presence of compounds 9 and 12. Moreover, a marked inhibition of p-38, ERK and JNK protein expression was also observed with these active triterpenes. In conclusion, triterpenes 9 and 12 significantly attenuated the pro-inflammatory response induced by LPS through TLR4 activation in macrophages. These effects are mediated by inhibition of MAPK and NF- $\kappa$ B activation.

**Key words:** anti-inflammatory activity, triterpenes, TLR4/NF- $\kappa$ B.

**Acknowledges:** to MINECO (SAF2015-65113-C2-1R) and EU Research Potential (FP7-REGPOT-2012-CT2012-31G37-IMBRAIM) for financing and gratitude to the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria, for a Predoctoral grant.

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROSTAGLANDINA  
SINTASA MICROSOMAL E1 (MPGES-1) EN EL DAÑO  
CARDIOVASCULAR ASOCIADO A OBESIDADBALLESTEROS C,<sup>1</sup> RODRIGUES-DIEZ R,<sup>1</sup> GONZALEZ-AMOR M,  
<sup>1,2,3</sup> SALAIRES M,<sup>1,2,3</sup> BRIONES AM.

*1*Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

*2*Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

*3*CIBER de Enfermedades Cardiovasculares

La prostaglandina Sintasa E1 (mPGES-1) es una isomerasa inducible responsable de la producción de prostaglandina E2 (PGE2) en condiciones inflamatorias. La PGE2 es un mediador

RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS PUPILOMÉTRICOS Y  
LA FARMACOGENÉTICA DE SUJETOS SANOS CON LA  
FARMACOCINÉTICA DE ARIPIPRAZOLDORA KOLLER<sup>1</sup>, CARMEN BELMONTE<sup>1</sup>, RUBIN LUBOMIROV<sup>3</sup>,  
MIRIAM SAIZ-RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, PABLO ZUBIAUR<sup>1</sup>, MANUEL ROMÁN<sup>1,2</sup>,  
DOLORES OCHOA<sup>1,2</sup>, ANTONIO CARCAS<sup>3</sup>, ANETA WOJNICZ<sup>1</sup>,  
FRANCISCO ABAD-SANTOS<sup>1,2</sup>

*Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa (IP), Madrid, Spain.*

*Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Madrid, España.*

La pupilometría se utiliza para la detección de la disfunción autonómica relacionada con numerosas enfermedades y la administración de fármacos. Las variantes genéticas en los genes del citocromo P450 (CYP2D6, CYP3A4), los receptores de dopamina (DRD2, DRD3), los receptores de serotonina (HTR2A, HTR2C) y el transportador ABCB1 (del inglés "ATP-binding cassette subfamily B") se han asociado previamente con la respuesta de aripiprazol. Evaluar si el aripiprazol afecta a la contracción de la pupila y la relación de este con la farmacocinética y la farmacogenética. Treinta y dos voluntarios sanos que recibieron una dosis oral única de 10 mg de aripiprazol fueron genotipados para 15 polimorfismos en los genes ABCB1, CYP2D6, DRD2, DRD3, HTR2A y HTR2C por PCR a tiempo real. Las concentraciones plasmáticas de aripiprazol y dehidro-aripiprazol se midieron por LC-MS/MS (del inglés "liquid chromatography tandem-mass spectrometry"). El examen de la pupila se realizó mediante pupilometría automatizada con el equipo "PRL 200 infrared pupillometer" (NeuroOptics, Irvine, CA, Estados Unidos). El aripiprazol causó la constricción de la pupila alcanzando esto su valor máximo de C<sub>max</sub>. Los portadores del alelo HTR2A rs6313 T y los sujetos con el genotipo C/T de HTR2C rs3813929 mostraron una velocidad de constricción máxima (del inglés MCV) y un diámetro máximo de pupila más altos. Además, los homocigotos Gly/Gly para DRD3 rs6280 mostraron valores de MCV significativamente menores. Los heterocigotos A/G para DRD2 rs6277 mostraron un tiempo total más largo que toma la pupila para recuperar el 75% de los valores iniciales del tamaño de reposo. Los metabolizadores intermedios de CYP2D6 mostraron un AUC, C<sub>max</sub> y T<sub>1/2</sub> más altos que los metabolizadores normales. Los homocigotos A/A para ABCB1 G2677T/A presentaron mayor T<sub>1/2</sub> en comparación con los homocigotos C/C. Los portadores del alelo C3435T T de ABCB1 y los sujetos C/T para C1236T mostraron un AUC mayor que los homocigotos C/C. El aripiprazol afecta la contracción de la pupila, lo que podría ser un efecto secundario mediado por los receptores de dopamina y serotonina. La pupilometría podría ser una herramienta útil para evaluar la actividad del sistema nervioso autónomo durante el tratamiento antipsicótico.

**Palabras clave:** pupilometría, farmacogenética, aripiprazol, dehidro-aripiprazol, farmacocinética

**Agradecimientos:** D. Koller está cofinanciado por la beca H2020 Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Network 721236. P. Zubiaur está cofinanciado por Consejería de Educación, Juventud y Deporte de Comunidad de Madrid y Fondo Social Europeo. Agradecemos a los voluntarios por su participación.

lipídico clave en el remodelado vascular asociado a diferentes patologías inflamatorias e implicado en la homeostasis del tejido adiposo (lipólisis, diferenciación, browning...). El tejido adiposo responde a señales metabólicas, siendo a su vez un órgano secretor de péptidos, hormonas y adipoquinas que, en situación de obesidad, participan activamente en alteraciones cardiovasculares como la disfunción endotelial y la rigidez arterial, y pueden modular la sensibilidad a insulina. El objetivo de este estudio es evaluar el papel de mPGES-1 en el desarrollo de obesidad y el daño cardiovascular asociado. Se ha desarrollado un modelo de obesidad inducida por dieta en ratones C57BL/6J mPGES-1+/+ (WT) y mPGES-1-/- (KO), en el que ambos grupos eran alimentados con una dieta estándar o una dieta rica en grasa (60% grasa) durante 13 semanas. Se analizaron las ganancias de peso y la función y la estructura vascular. La dieta rica en grasa indujo un incremento de peso significativamente superior en los ratones WT respecto a los KO. No se encontraron diferencias en la presión arterial, ni hipertrofia cardíaca entre los grupos. Sin embargo, la dieta alta en grasa indujo un incremento superior en los pesos de las grasas parda, abdominal y perirrenal en los ratones WT que en los KO. Además, en presencia de dieta alta en grasa, los ratones KO presentaban mejor sensibilidad a insulina y significativamente mejor tolerancia a la glucosa. Las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio de la aorta en presencia de tejido adiposo perivascular fueron mayores en el grupo KO Control respecto al WT Control. Sin embargo, en presencia de dieta alta en grasa, las arterias de los ratones KO mostraron un empeoramiento de dicha relajación con respecto al WT. No se han encontrado diferencias en la relajación independiente de endotelio entre los grupos. El análisis de la estructura de arterias mesentéricas de resistencia no mostró diferencias de rigidez entre los grupos. Nuestros datos sugieren que la ausencia de mPGES-1 mejora el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, así como en los cambios fenotípicos que acontecen a nivel corporal, visceral o de las grasas en situación de obesidad.

**Palabras clave:** mPGES-1, obesidad, función vascular.

**Agradecimientos:** Proyecto financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2016-80305P), Instituto de Salud Carlos III (PI13/01488; CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, CB16/11/00286), Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3676), Fondo Social Europeo (FSE), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y Roche-IdiPaz.

## MONOUNSATURATED FATTY ACIDS OLEIC AND PALMITIC PROTECT CULTURED ENDOTHELIAL CELLS AGAINST OXIDATIVE STRESS

VERONICA GIORDANI<sup>1</sup>, ELENA VEGA<sup>1</sup>, MARISOL FERNÁNDEZ-ALFONSO<sup>1</sup>, LUIS GOYA<sup>2</sup> AND OLGA PALOMINO<sup>1</sup>

*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain*

*<sup>2</sup>Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Science and Food Technology and Nutrition (ICTAN – CSIC), Madrid, Spain*

Increased intake of monounsaturated fats has shown beneficial effects in obese mice to improve metabolism and cardiovascular function. This improvement in health involves a direct anti-inflammatory effect of nutrients such as oleic and palmitic acids on tissue inflammation. Together with inflammation, another critical process that severely conditions cellular response is oxidative stress; indeed, an unbalanced redox status may be the cause or origin of many degenerative diseases including cardiovascular disease, type 2 diabetes and several types of cancer. To test the involvement of redox balance in the vascular health effects

of the monounsaturated fats, cell viability and different specific redox biomarkers were evaluated in cultured endothelial cells; i.e. concentration of reactive oxygen species (ROS), reduced glutathione (GSH) as the main reducing power in cells, and the activity of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) as main enzymes of the antioxidant defense system. EA.hy926 (EA) endothelial cells were used as cell culture model of vascular cells and tertbutyl-hydroperoxide as a cellular stressor to mimic a situation of oxidative stress. The results show that co- and pre-treatment of EA cells with realistic doses within the lower micromolar range (0.5 microM) of both monounsaturated fatty acids evoked a significant chemoprotective effect on EA cells viability against a chemically-induced oxidative stress by reducing ROS generation, restraining GSH depletion and regulating antioxidant enzymes activity. It can be concluded that acute treatment of EA cells with physiological doses of oleic and palmitic acids practically normalizes antioxidant defense system of endothelial cells in spite of the oxidative challenge. These results support a higher intake of monounsaturated fatty acids with the diet as a nutritional and pharmacological strategy against diseases for which oxidative stress has been implicated as a causal or contributing factor. Further experiments are needed to assess and define the mechanism of action of this biological activity in experimental animals previous to the potential test in humans in order to confirm these results in cell culture. Acknowledgements: This work has been supported by BFU2017-82565-C2-2-R. VG is Erasmus plus fellow.

**Keywords:** cardiovascular health, monounsaturated fats, oxidative stress, antioxidant defenses, natural antioxidants.

## REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 POR PROTEÍNAS FOSFATASAS DE ESPECIFICIDAD DUAL

MARÍA BENITO-LEÓN, ROSA GOMEZ-VILLAFUERTES, FELIPE ORTEGA, RAQUEL PEREZ-SEN, ESMERILDA G. DELICADO, JAVIER GUALIX, MARIA TERESA MIRAS-PORTUGAL

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.*

La expresión del receptor purinérgico P2X7 (P2X7R) en células de neuroblastoma se asocia con una tasa de crecimiento acelerada, angiogénesis, metástasis y mal pronóstico. Además, un aumento en la expresión del P2X7R aumenta la supervivencia de las células de neuroblastoma en condiciones restrictivas, incluidas la privación de suero o de glucosa. En estudios previos se identificó a la proteína de especificidad 1 (Sp1) como el principal factor de transcripción implicado en la expresión basal del gen P2rx7 en células de neuroblastoma. En este trabajo se ha caracterizado un nuevo mecanismo que regula la transcripción del gen P2rx7 en el que participan las fosfatasa de especificidad dual (DUSPs). Las fosfatasa DUSPs modulan la actividad de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) mediante la defosforilación de los motivos treonina-X-tirosina en sus dominios de activación. El tratamiento de las células de neuroblastoma con (E)-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (BCI), un inhibidor alostérico de las fosfatasa DUSP1 y DUSP6, produce un incremento significativo en la expresión del receptor P2X7 tanto a nivel transcripcional como proteico. Cabe destacar que DUSP6 es una fosfatasa dual citosólica de expresión constitutiva que principalmente defosforila ERK1/2, mientras que DUSP1 pertenece al subgrupo de fosfatasa nucleares inducibles por mitógenos o

estrés capaz de defosforilar principalmente p38 y JNK. El tratamiento con BCI aumenta la fosforilación de p38 y JNK, mientras que curiosamente se reduce la fosforilación de ERK1/2, sugiriendo que el BCI inhibe principalmente la actividad de DUSP1. Además, el aumento en la expresión de P2X7 inducido por BCI se bloquea por la inhibición de p38, mientras que la inhibición de JNK no parece estar implicada en dicho fenómeno. Cabe destacar que el aumento en la expresión de P2X7 mediado por BCI es independiente del factor nuclear Sp1, ya que el tratamiento con mitramicina, un fármaco que bloquea los sitios de unión de Sp1 al ADN, no modifica el efecto del BCI. De hecho, el tratamiento con BCI reduce los niveles de la proteína Sp1. En conjunto estos resultados sugieren que las células de neuroblastoma poseen un mecanismo alternativo a Sp1, probablemente dependiente del equilibrio p38-DUSP1, que regula a nivel nuclear la expresión del receptor P2X7 en función de las señales tróficas que reciban de su entorno.

**Palabras clave** Receptor P2X7, DUSP, BCI, MAPKs

**Agradecimientos:** Proyectos: MINECO (BFU 2014-53654-P), Fundación Ramón Areces (PR2018/16-02). MBL ha sido financiada por un contrato CAM-YEI en la convocatoria de 2016.

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CARACTERIZACIÓN POR HPLC DE EXTRACTOS DE LÍQUENES DEL CLADO CETRARIOIDE

AL-SAIFI V.<sup>1</sup>, GONZÁLEZ-BURGOS E.<sup>2</sup>, SIETEIGLESIAS V.<sup>2</sup>, DIVAKAR, P.K.<sup>2</sup>, GÓMEZ-SERRANILLOS M.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University College London, United Kingdom

<sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

Los líquenes son el resultado de una asociación simbiótica establecida entre un micobionte (hongo heterótrofo) y un fotobionte (cianobacteria o/y algas verdes unicelulares). El clado cetrarioide (familia Parmeliaceae) contiene 25 géneros y 149 especies. Los líquenes producen metabolitos secundarios propios, principalmente con estructuras aromáticas, que tienen gran interés farmacológico debido a sus propiedades antioxidantes, citotóxicas y antimicrobianas. El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de cinco especies del clado cetrarioide y caracterizar sus principales metabolitos secundarios. Las especies estudiadas fueron *Melanelia stygia* (L.) Essl., *Cetraria aculeata* (Schreber) Fr., *Nephromopsis laii* (A. Thell & Randlane) Saag & A. Thell, *Tuckermanopsis chlorophylla* (Willd.) Hale y *Cetrariella commixta* (Nyl.) A. Thell & Kärnefelt. La capacidad antioxidante de estas especies se evaluó mediante los ensayos ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno), DPPH (2, 2-Difenil-1-picrilhidrazilo) y FRAP (poder antioxidante de reducción férrica) y, el contenido de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu. El extracto metanólico de la especie *Melanelia stygia* mostró el mayor valor de ORAC (1,35  $\mu\text{mol}$  equivalentes Trolox/mg extracto) seguido de *Cetrariella commixta* (1,23  $\mu\text{mol}$  equivalentes Trolox/mg extracto). Estas dos especies presentaron el contenido de fenoles más alto con valores de 56,20  $\mu\text{g}$  ácido gálico/mg y 55,05  $\mu\text{g}$  ácido gálico/mg, respectivamente. Por otro lado, el extracto metanólico de *Tuckermanopsis chlorophylla* presentó la mayor actividad antioxidante mediante el método FRAP (17.12  $\mu\text{mol}$  Fe+2 eq/g muestra) y el método DPPH (IC50 1116  $\mu\text{m}/\text{ml}$ ). Estudios mediante HPLC revelaron que estas especies líquénicas presentan depsidonas, dépsidos y benzofuranos como principales constituyentes. Concretamente, en la especie *Melanelia stygia* se han identificado los compuestos

ácidos fumarprotocetrárico y ácido protocetrárico, en la especie *Cetrariella commixta* los ácidos alectorónico y colatólico y, en la especie *Nephromopsis laii* el ácido úsnico. Los resultados de este trabajo muestran que las especies estudiadas del clado cetrarioide son de interés por sus propiedades antioxidantes, teniendo especial interés farmacológico para la prevención y tratamiento de patologías asociadas a estrés oxidativo.

**Palabras clave:** líquenes, clado cetrarioide, antioxidantes, HPLC.

### EFFECTS OF SUB-CHRONIC DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOL ADMINISTRATION ON SCHEDULE-INDUCED DRINKING IN RATS

ESMERALDA FUENTES VERDUGO, GABRIELA E. LÓPEZ TOLSA GÓMEZ, RICARDO PELLÓN SUÁREZ DE PUGA, MIGUEL MIGUÉNS VÁZQUEZ

Departamento de Psicología Básica I, Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid, España.

Schedule-induced drinking (SID) reproduces an excessive behaviour pattern that has been proposed as an animal model to study compulsive spectrum disorders and to test the efficacy of traditional drugs that treat related symptoms. SID is developed when food-deprived rats are exposed to an intermittent food reinforcement schedule with continuous access to water. One distinctive feature that it presents is that this excessive water consumption is limited to a specific temporal location, immediately after food delivery. Cannabis plant derivatives are the most consumed illicit substances worldwide and delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) is the primarily component responsible for their major psychoactive effects. Currently, there is growing interest on its clinical application in the psychological disorders associated to compulsivity. However, little is known about the effects of THC on SID once it has been developed. The aim of this study was to explore the potential therapeutic properties of THC focusing in the effects on some of the specific features of this compulsive behaviour model. After SID acquisition, 0, 5 or 10 mg/kg of THC were i.p. administered to rats 23 hours before behavioural testing for 7 days. The results showed that THC treatment produced an increase of licking behaviour only with the 5 mg/kg dose, and reduced magazine entries with the two doses tested. Moreover, both THC doses affected the temporal distribution of licking behaviour. Thus, we conclude that THC treatment seem not to be a good approach to reduce compulsive behaviour, assessed with the SID task. Moreover, it could also have side effects such as alterations on temporal discrimination.

**Key words:** THC, schedule-induced behaviour, compulsivity, temporal discrimination

**Acknowledgements:** Financial support received by Spanish Government grant PSI2016-80082-P (Ministerio de Economía y Competitividad). And special thanks to the undergraduate student Raquel Pérez García for her collaboration in this work, and to Antonio Rey Vivancos for his technical assistance.

### ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CITOTÓXICA DE ESPECIES CRÍPTICAS EN HONGOS LIQUENIZADOS

GARRIDO HUÉSCAR E., GONZÁLEZ-BURGOS E., DIVAKAR, P.K., GÓMEZ-SERRANILLOS M.P.

Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

Los líquenes, simbioses entre hongos y algas y/o cianobacterias, son uno de los organismos vivos menos estudiados desde el punto de vista farmacológico. Las especies crípticas son aquellas morfológicamente similares, pero que presentan diferencias genéticas entre ellas. Estudios previos han demostrado que pueden existir diferencias cuali- y cuantitativas en la actividad de especies crípticas. Este trabajo se realiza sobre una nueva especie del género *Canoparmelia* (*C. "keniana"*) identificada recientemente empleando marcadores moleculares nucleares como *Internal transcribed spacer* (ITS) y *Large subunit* (LSU), y mitocondriales como *Short subunit* (mrSSU). Esta nueva especie *C. "keniana"* presenta características morfológicas similares a *Canoparmelia carolinana*. El objetivo de este estudio es evaluar la actividad antioxidante y citotóxica de ambas especies (*C. "keniana"* y *C. carolinana*), a fin de determinar si existen también diferencias en su actividad derivadas de cambios en su composición química. La actividad antioxidante se ha evaluado mediante los ensayos *in vitro* de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC), de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y de poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). Además, se ha determinado el contenido total de compuestos fenólicos por el ensayo Folin-Ciocalteu. En cuanto a la actividad citotóxica, se ha empleado el ensayo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), basado en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, en células HepG2 (cáncer de hígado) y MCF-7 (cáncer de mama). De ambas especies, *C. "keniana"* ha mostrado mayor actividad antioxidante en todos los ensayos. Así, los valores para el ensayo DPPH fueron IC<sub>50</sub> de 452.4 µg/mL y 1004.3 µg/mL para *C. "keniana"* y *C. carolinana*, respectivamente, para el ensayo ORAC fueron 5.3 µmol TE/mg de extracto *versus* 1.3 µmol TE/mg de extracto y para el ensayo de FRAP 21.6 µmol de Fe<sup>2+</sup> eq/g muestra *versus* 10.8 µmol de Fe<sup>2+</sup> eq/g muestra. La nueva especie *C. "keniana"* resultó tener mayor contenido de compuestos fenólicos que la especie *C. carolinana* (109,6 µg ácido gálico/mg *versus* 4.9 µg ácido gálico/mg). Por otro lado, *C. "keniana"* también ha mostrado presentar mayor actividad citotóxica en las dos líneas celulares empleadas siendo los valores de IC<sub>50</sub> 34.3 µg/mL para *C. "keniana"* y 45.3 µg/mL para *C. carolinana* en las células HepG2, y de IC<sub>50</sub> 38.2 µg/mL y 43.3 µg/mL, respectivamente, en las células MCF-7. En conclusión, la especie *C. "keniana"* tiene un mayor potencial antioxidante y citotóxico que *C. carolinana*. Estudios futuros irán encaminados a determinar los metabolitos secundarios responsables de esta actividad y a profundizar sobre los mecanismos de acción.

**Palabras clave:** *liquen, especie críptica, antioxidante, citotoxicidad.*

## PAPEL DE LA KINASA SGK 1.1 EN EL DOLOR NEUROPÁTICO

EVA MERCADO-DELGADO, CARLOS GOICOECHEA GARCÍA, EVA M<sup>a</sup> SÁNCHEZ-ROBLES

Área de Farmacología, Nutrición y Bromatología. Facultad Ciencias de la Salud. Universidad Rey Juan Carlos.

La proteína SGK1.1 es una quinasa que actúa exclusivamente en el Sistema Nervioso, modulando la corriente M de los canales de potasio. Ratones transgénicos SGK 1.1 expresan de forma constitutiva esta proteína, presentando una excitabilidad neuronal reducida y una menor sensibilidad a las convulsiones en un modelo de Epilepsia<sup>1,2</sup>. Valoramos las respuestas de estos ratones a estímulos nociceptivos agudos, con el fin de estudiar posteriormente el papel de esta

proteína en el dolor neuropático, como posible diana farmacológica. Caracterizar los umbrales basales a diferentes estímulos nocivos en ratones transgénicos SGK 1.1 Ratones SGK 1.1 y Wild Type (C57BL/6) machos y hembras de 2-3 meses de edad. La medición de umbrales nociceptivos a estímulos térmicos y químicos se realizó con los siguientes tests: Placa caliente a 50, 55 y 58 °C, Placa fría a 4 °C y Ácido acético 0,6% i.p. También se evaluó la actividad locomotora espontánea con un actímetro, durante 30 min. Los ratones SGK 1.1 muestran una nocicepción basal similar a los ratones control y una mayor actividad locomotora. Experimentos futuros irán encaminados a valorar la nocicepción en un modelo animal de dolor neuropático.

**Palabras clave:** SGK1.1, dolor agudo, ratón transgénico.

**Agradecimientos.** SAF2012-40075-C02-01 y Fundación Española del Dolor (PI2015-FED-002)

## EFFECTO DEL CONSUMO DE DIETAS RICAS EN ÁCIDOS GRASOS SATURADOS DE CADENA MEDIA O EN ω-6 EN PARÁMETROS CARDIOMETABÓLICOS Y FUNCIÓN CARDIOVASCULAR: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATAS

ANTONIO GONZÁLEZ<sup>1,2,3,4</sup>; PAULA MOSINSKA<sup>5</sup>; ESPERANZA HERRADÓN<sup>1,2,3,4</sup>; RAQUEL ABALO<sup>1,2,3,4</sup>; JAKUB FICHNA<sup>5</sup>; VISITACIÓN LÓPEZ-MIRANDA<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Área de Farmacología y Nutrición y Bromatología, Dpto. CC Básicas de la Salud. Facultad CC Salud, URJC. <sup>2</sup>Unidad Asociada I+D+i del Instituto de Química Médica (IQM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain. <sup>3</sup>Unidad Asociada I+D+i del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain. <sup>4</sup>Grupo de Excelencia Investigadora URJC-Banco de Santander-Grupo multidisciplinar de 18 investigación y tratamiento del dolor (i+DOL), Alcorcón, Spain. <sup>5</sup>Medical University of Lodz (Polonia).

Se ha demostrado que los aceites vegetales ricos en ácidos grasos saturados de cadena media (AGSCM), como el de coco (Cocos nucifera), que contiene un 59-62% de AGSCM, pueden mejorar el perfil lipídico y reducir el riesgo cardiovascular (Babu et al. 2014). Por otro lado, aceites con alto porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados ω-6 (AGPI) como el aceite de onagra (Oenothera biennis), aunque pueden ser beneficiosos para ciertas dolencias como el síndrome premenstrual, si se consumen en altas cantidades pueden ocasionar un aumento de la síntesis de moléculas proinflamatorias que puede desembocar en patologías como la aterosclerosis (Christie., 1999, Montserrat-de la Paz et al., 2014, Saini y Keum, 2018). Por ello, el objetivo de este estudio es conocer los efectos que el consumo de dietas con mayor contenido en aceite de coco y/o aceite de onagra ocasiona sobre diferentes parámetros cardiometabólicos, así como sobre la función cardiovascular. Se utilizaron ratas macho Wistar adultas de 250-300 g de peso. Los animales se dividieron en tres grupos experimentales (N=8 ratas/grupo), que se alimentaron durante 4 semanas con dieta control AIN93G (grupo control), dieta AIN93G con grasa parcialmente sustituida por aceite de coco (grupo coco) y dieta AIN93G con grasa parcialmente sustituida por aceite de onagra (grupo onagra). En estos tres grupos se valoró semanalmente peso corporal, ingesta de comida y agua. Al finalizar las cuatro semanas, se determinó el IMC y se valoró la presión arterial directa, se sacrificaron los animales, se recogió la sangre, y se realizaron experimentos *in vitro* en aorta para valorar la función arterial. Los parámetros valorados en plasma son glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL. Los animales de los dos grupos experimentales (coco y onagra) tuvieron un

comportamiento alimentario, ganancia de peso corporal e IMC similar a los del grupo control. Respecto a los parámetros valorados en plasma, mientras los niveles de glucosa, colesterol total, HDL y LDL fueron similares en todos los grupos, los triglicéridos fueron ligeramente superiores en el caso de los grupos coco y onagra, resultando en este último caso significativamente mayores. No hubo diferencias significativas en los niveles de presión arterial ni en la reactividad vascular de los tres grupos experimentales. El consumo de dietas con mayor contenido en aceite de coco o de onagra durante un corto periodo de tiempo no parece suponer un riesgo importante para la salud cardiovascular.

**Palabras clave:** Cardiovascular, perfil lipídico, aceite de coco, aceite de onagra.

**Agradecimientos:** Financiación: GEMD-Allergan. Apoyo técnico: Carmen Merino, Lorena Blanco (PEJ15/BIO/TL-0580).

### MEDIADORES LIPÍDICOS PRO-RESOLUTIVOS COMO POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN EL DAÑO VASCULAR EN HIPERTENSIÓN

LUCÍA SERRANO DÍAZ DEL CAMPO<sup>1</sup>, ANA B. GARCÍA-REDONDO<sup>1,2,3</sup>, MERCEDES SALAIRES<sup>1,2,3</sup>, ANA M. BRIONES<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain.

<sup>3</sup>CIBER de Enfermedades Cardiovasculares.

La disfunción endotelial y la rigidez vascular son las manifestaciones más tempranas de disfunción vascular en hipertensión. Diversos estímulos, como la angiotensina II (AngII), activan las células T CD4+, lo que desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias productoras de prostanoides o estrés oxidativo que contribuyen al daño vascular asociado a esta patología. Numerosos estudios sugieren que una resolución de la inflamación ineficaz, junto con la presencia de estímulos inflamatorios, podrían ser los responsables de la inflamación crónica asociada a un importante número de enfermedades. La administración de mediadores lipídicos pro-resolutivos ha demostrado efectos beneficiosos a nivel metabólico y en modelos de inflamación, sin embargo, existe muy poca información acerca del efecto de las resolvinas en la función vascular. Se utilizaron arterias mesentéricas de resistencia, aorta, y corazón de ratones C57BL/6J hipertensos por infusión de AngII (1,44mg/Kg/día durante 14 días) y sus correspondientes controles normotensos, tratados o no con resolvina D2 (100ng/25gr de ratón, ip, cada dos días). La presión sanguínea se midió por pletismografía de la arteria caudal. La reactividad vascular se midió mediante un miógrafo isométrico. El tratamiento con RvD2 previno el aumento de la presión arterial inducida por AngII. Asimismo, mejoró la hipertrofia cardíaca, la hipertrofia de la aorta y la incrementada respuesta contráctil a fenilefrina en aortas, en comparación a los ratones hipertensos inyectados con vehículo. Sin embargo, no mejoró las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio en aorta, aunque mostró una tendencia a mejorarlas en arterias de resistencia. Nuestros datos apuntan al posible papel protector de las resolvinas en el remodelado, e incrementada rigidez vascular y la hipertrofia cardíaca asociadas a la hipertensión.

**Palabras clave:** hipertensión, daño vascular, inflamación, resolvinas.

**Agradecimientos:** Proyecto financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2016-80305P), Instituto de Salud Carlos III (PI13/01488); CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, CB16/11/00286), Comunidad de Madrid (B2017/BMD-3676), Fondo Social Europeo (FSE), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y Roche-IdiPaz.

### LOS ANTIESPASMÓDICOS ANTICOLINÉRGICOS OTILONIO Y PINAVERIO PROVOCAN APOPTOSIS VIA MITOCONDRIAL EN NEURONAS CORTICALES DE RATA

F. GARCÍA-ALVARADO<sup>1,2</sup>, A.G. GARCÍA<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Teófilo Hernando, <sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, <sup>3</sup>DNS Neurociencia, Madrid, Spain.

En el marco de un programa de reposicionamiento de medicamentos colinérgicos en uso clínico en busca de propiedades neuroprotectoras, encontramos sorprendentemente que los espasmolíticos antimuscarínicos otilonio y pinaverio exhibieron efectos neurotóxicos en cultivos neuronales. Decidimos caracterizar dicha acción inesperada en cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata. Como era de esperar, el glutamato causó neurotoxicidad que se previno completamente por el bloqueador del receptor NMDA MK801; sin embargo, tanto el otilonio como el pinaverio aumentaron las acciones neurotóxicas del glutamato, un efecto que era insensible a MK801. Ni la catalasa antioxidante, el glutatión, la n-acetilcisteína ni la melatonina protegieron contra la neurotoxicidad del otilonio o el pinaverio. La neurotoxicidad fue dependiente del tiempo y de la concentración, exhibiendo CE<sub>50</sub> aproximada de 5 μM para ambos fármacos. Siete fármacos antimuscarínicos dotados de un amonio cuaternario, y otros 10 fármacos con diferentes actividades colinérgicas, que llevan en su molécula un amonio ternario no mostraron neurotoxicidad. Ambos fármacos causaron un bloqueo dependiente de la concentración de los transitorios de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> promovidos por K<sup>+</sup>, que lo que sugiere que otilonio y pinaverio estaban bloqueando los canales de calcio activados por voltaje (CCAV). La ciclosporina A, un bloqueador del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, evitó los efectos neurotóxicos, expresados en función de la fracción de células que sufren apoptosis. Además, el inhibidor de caspasa-9 y caspasa-3 Ac-LEHD-CHO mitigó la muerte neuronal apoptótica de ambos fármacos en aproximadamente un 50%. Los datos son compatibles con la hipótesis de que el otilonio y el pinaverio provocan la muerte neuronal al activar la vía de señalización intrínseca de la apoptosis mediada por la mitocondria. De interés fue el hecho de que no exhibieron citotoxicidad en células cromafines de tipo simpático ni en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Clínicamente, el efecto neurotóxico de otilonio y pinaverio podría tener consecuencias de seguridad en su uso clínico en enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, el hecho de que ambos fármacos poseen un amonio cuaternario y de que se administran por vía oral para tratar el síndrome del intestino irritable y otros procesos entéricos, apenas se absorberán y no cruzarán la barrera hematoencefálica. Además, el otilonio y el pinaverio se pueden usar como herramientas químicas para estudiar la apoptosis neuronal relacionada con el bloqueo de CCAV y con la vía intrínseca mediada por mitocondrias.

**Palabras clave:** otilonio, pinaverio, neuronas corticales, neurotoxicidad, apoptosis.

**Agradecimientos:** Agradecemos el apoyo continuado de la Fundación Teófilo Hernando, así como la colaboración de sus investigadores.

### NUEVO MÉTODO QUÍMICO PARA LA PREPARACIÓN DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS RETICULADOS (CLEAs) UTILIZADOS PARA LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DEL IBUPROFENO Y KETOPROFENO RACÉMICOS

OUSSAMA KHIARI<sup>1</sup>, CARMEN YUSTE CALVO<sup>3</sup>, NASSIMA BOUZEMI<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>. Dpto. de Química, Universidad Badji Mokhtar de Annaba (UBMA), Annaba, Argelia.

<sup>2</sup>. Dpto. de Química en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, España.

<sup>3</sup>. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), UPM, INIA, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España.

La resolución cinética enzimática es una alternativa eficaz que cumple con los principios de la Química Sostenible que está en pleno auge, actualmente reconocida por su alta selectividad y reproducibilidad y que permiten obtener principios activos enantiopuros. El estado en que se encuentra la enzima, preferentemente sólido, conlleva una etapa de inmovilización previa y es crucial para asegurar la estabilidad durante el proceso catalítico y por tanto obtener el resultado esperado. En nuestro trabajo describimos una nueva estrategia de inmovilización de enzimas que consiste en incorporar las partículas catalíticas dentro de un polímero sin dañar sus formas funcionales y sus propiedades catalíticas relativas a la resolución de mezclas racémicas. El catalizador obtenido se ha usado para la resolución cinética del ibuprofeno y ketoprofeno racémicos como sustratos modelo y así acceder a su forma enantiopura.

**Palabras clave:** inmovilización de enzimas, agregados enzimáticos reticulados, resolución cinética enzimática, catalizadores, forma enantiopura.

## LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL CANAL DE POTASIO KCa3.1 EN EL EPITELIO INTESTINAL DE RATÓN AFECTA A LA MOTILIDAD DUODENAL

**MARIANO RAMÓN GIMENEZ<sup>1</sup>, MARTA SOFÍA VALERO<sup>2,4,5</sup>, KÖHLER RALF<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad San Jorge. Zaragoza, España.

<sup>2</sup>Dpto. de Farmacología y Fisiología. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.

<sup>3</sup>ARAIID, Hospital Univ. Miguel Servet, Zaragoza, España.

<sup>4</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS-Aragón). Zaragoza, España.

<sup>5</sup>Instituto de Investigación Mixto Agroalimentario de Aragón (IA2). CITA-Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.

El canal de Potasio regulado por Calcio/Calmodulina de conductividad intermedia (KCa 3.1) está expresado en el epitelio intestinal donde supuestamente regula el potencial de membrana y así la secreción de cloro y agua hacia el lumen. Alteraciones en la función del canal se ha implicado en varias patologías inflamatorias intestinales. Es por ello que el canal KCa3.1 podría ser una diana farmacológica interesante para el tratamiento de patologías intestinales, incluso alteraciones en la motilidad gastrointestinal. Pero se desconoce si el canal KCa3.1 y sus funciones epiteliales regulan la motilidad intestinal. La hipótesis de este trabajo es que una sobre-función del canal en el epitelio causa un defecto en la secreción y contenido luminal afectando a la motilidad. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratones WT (n=12-16, grupo control) y ratones transgénicos sobre-expresando el canal KCa3.1 de forma condicional en el epitelio del duodeno intestino (n=12-16, grupo doxiciclina (dox)). Tras un tratamiento con dox (1mg/ml) en agua de bebida durante 10 días, para la inducción del gen, fueron sacrificados. Se realizó un estudio morfológico de los órganos y se recogieron segmentos de duodeno y colon para comprobar mediante miografía las contracciones espontáneas e inducidas sin o con el inhibidor de KCa3.1, TRAM-34 (10<sup>-4</sup> M). Los resultados del análisis morfológico mostraron un aumento en el área del duodeno (251%) y en

su volumen de contenido intestinal (72%) en el grupo dox frente al grupo control. Esta diferencia no se observó a nivel del colon. La miografía mostró una disminución en la amplitud (p=0,074) y en la frecuencia (p<0.01) de las contracciones espontáneas del duodeno de los animales transgénicos respecto al grupo control. Sin embargo, a nivel del colon los animales del grupo dox mostraron una disminución de la frecuencia (p<0.05) y un incremento en la amplitud (p<0.05) de la motilidad basal. La inhibición del canal KCa3.1 por TRAM-34, no modificó la motilidad basal en los animales control y normalizó las contracciones espontáneas de los animales sobre-expresados tanto a nivel de duodeno como de colon. En conclusión, la función excesiva del canal KCa3.1 en el epitelio duodenal aumenta el contenido de líquido intestinal y disminuye gravemente la motilidad de forma indirecta. Moduladores de KCa3.1 como Senicapoc<sup>TM</sup> pueden ser de utilidad de tratar enfermedades caracterizadas por excesiva secreción epitelial o diarreas, como en enfermedades infecciosas del intestino o en colitis ulcerosa.

**Palabras clave:** Músculo liso, gastrointestinal, KCa3.1

**Agradecimientos:** Servicios Científicos Técnicos del CIBA (IACS-Universidad de Zaragoza).

## EFEECTO DEL EXTRACTO DE *HELICHRYSUM STOECHAS* EN AORTA DE RATA

**MARTA SOFÍA VALERO<sup>1,2,3</sup>, JOSÉ MANUEL DEL RÍO<sup>4</sup>, CLARA ARAGONÉS<sup>1</sup>, MARTA CASTRO<sup>1,2,3</sup>, MIGUEL ÁNGEL PLAZA<sup>1,2,3</sup>, MARÍA PILAR ARRUEBO<sup>1,2,3</sup>, CARLOTA GÓMEZ-RINCÓN<sup>4</sup>, FRANCISCO LES<sup>4</sup>, VÍCTOR LÓPEZ<sup>3,4</sup>**

<sup>1</sup>Dpto. de Farmacología y Fisiología. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS-Aragón). Zaragoza, España.

<sup>3</sup>Instituto de Investigación Mixto Agroalimentario de Aragón (IA2). CITA-Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad San Jorge. Zaragoza, España.

*Helichrysum stoechas* es una planta utilizada en medicina tradicional, a la que se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, neuroprotectoras, antidiabéticas y antioxidantes. El objetivo de este estudio ha sido evaluar el efecto de *Helichrysum stoechas* en el sistema cardiovascular y determinar su mecanismo de acción. Para llevar a cabo este estudio se preparó un extracto metanólico mediante maceración en frío de *Helichrysum stoechas* (EHS) y se realizaron miografías, en un baño de órganos, a partir de aorta de rata. Se realizaron curvas dosis respuesta de EHS (0.01-3 mg/ml) sobre anillos de aorta precontraídos con fenilefrina (Phe, 10<sup>-6</sup> M) y con cloruro de potasio (KCl, 80 mM). Para estudiar el mecanismo de acción del EHS incubamos diferentes sustancias antes de la adición de Phe y del EHS. Las sustancias ensayadas fueron: L-NAME (10<sup>-5</sup> M), inhibidor de la óxido nítrico sintasa, indometacina (10<sup>-6</sup> M), inhibidor de la ciclooxigenasa, H-89 (200 nM), bloqueante de la proteína cinasa A (PKA) y Rp-8-Br-cGMPS (10<sup>-5</sup> M), inhibidor de la proteína cinasa G (PKG). Por otro lado, se estudió el papel del calcio extracelular en el efecto del EHS, para lo cual, los anillos de aorta se incubaron en un medio sin calcio y con el solvente, el EHS o el verapamilo (V, 10<sup>-6</sup> M). Posteriormente se realizó una curva dosis respuesta de CaCl<sub>2</sub>. Para investigar el papel del calcio intracelular, se incubaron los anillos con V y con la combinación de V más ruteín rojo (10<sup>-5</sup> M) o con heparina (50 mg/ml). El EHS produjo una respuesta relajante, dosis dependiente, en los anillos precontraídos con Phe y con KCl. La indometacina y el H-89 no tuvieron efecto sobre la respuesta del EHS. El L-



NAME y Rp-8-Br-cGMPs bloquearon la respuesta relajante del extracto. Por otra parte, el EHS bloqueó los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y los canales IP<sub>3</sub> localizados en el retículo sarcoplasmático. En conclusión, nuestro trabajo sugiere que el EHS produce una respuesta relajante en el músculo liso de aorta de rata. Este efecto está mediado por la vía NO/PKG/GMPc y por su capacidad para bloquear la entrada de calcio a la célula o su salida desde el retículo sarcoplasmático. Por tanto, el EHS podría tener un gran valor terapéutico para el tratamiento de la hipertensión arterial u otras patologías cardiovasculares.

**Palabras clave:** *Músculo liso, cardiovascular, óxido nítrico*

**Agradecimientos:** *Financiado por el Gobierno de Aragón (B61).*

## IMPLICATIONS OF PURINERGIC RECEPTORS IN DEPRESSION

VALERIYA SIDELKIVSKA, JAVIER GARROSA JÍMENEZ, MARTA MARTIN MARTINEZ, CARMEN OVEJERO, PILAR LÓPEZ GARCÍA, MANUELA GARCÍA LÓPEZ, MARÍA F. CANO-ABAD

1 Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento.

2 Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

3 Servicio de Farmacología Clínica, Instituto de Investigaciones Sanitarias La Princesa, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain.

Depression is a disorder that was reported to affect around 7% of the world's population. Major depressive disorder (MDD) is one of the most prevalent out of all of the depressive manifestations and affects many people in today's society. According to the World Health Organization, it affects over 300 million people of all ages and is one of the leading causes of disability across the world. Emerging evidences point out that inflammatory hypothesis seems to play a role in the pathophysiology of MDD. Among the different triggers of the molecular pathway of inflammatory, we focus the present research on the purinergic receptors, specifically the P2X7R. P2X7R is a ligand gated ion channel found peripheral monocytes, macrophages and microglia in the nervous system. These receptors have been shown to be involved in the inflammatory pathway via: (i) intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling; (ii) activation of the inflammasome and (iii) the interleukin 1 $\beta$  release. The current study investigated the relationship between the activated P2X7R and selected patients with MDD. Taking into account that P2X7R is involved in the inflammasome activation and its activation induces an elevation in the amount of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, we have started studying the Ca<sup>2+</sup> entry in monocytes derived from patients with MDD and healthy controls. For this purpose, we have isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC's) using a Ficoll gradient and seeding them into RPMI-1640 media. Using the intracellular Ca<sup>2+</sup> probe, Fura-2, we determined the Ca<sup>2+</sup> entry into the cytosol of ATP stimulated monocytes of the participants mentioned above. Preliminary results suggest that monocytes from MDD patients display lesser permeability of Ca<sup>2+</sup> after ATP stimulation when compared to healthy controls. This suggests the alteration in P2X7R activation and dysregulation in Ca<sup>2+</sup> homeostasis, in populations affected with MDD. For future studies, it would be interesting to see the role of the inflammatory cytokines in the pathophysiology of MDD.

## INHIBICIÓN DEL CANAL KV1.3 EN CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA POR UNA FAMILIA DE COMPUESTOS INDÓLICOS

MARÍA BAENA-NUEVO<sup>1,2</sup>, ALBA VERA-ZAMBRANO<sup>1,2</sup>, CAROLINA MARTÍNEZ-LAPERCHÉ<sup>3</sup>, CECILIA MUÑOZ-CALLEJA<sup>4</sup>, ISMAEL BUÑO<sup>3</sup>, JUAN M. ZAPATA<sup>2,5</sup>, GEMA PÉREZ-CHACÓN<sup>2,5</sup>, TERESA GONZÁLEZ<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, UAM, Madrid, España.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC-UAM, Madrid, España.

<sup>3</sup>Servicio de Hematología, Hospital G.U. Gregorio Marañón. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Madrid, España.

<sup>4</sup>Servicio de Inmunología, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España

<sup>5</sup>Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPaz), Madrid, España.

La leucemia linfática crónica (LLC) es la leucemia más común en países occidentales y se basa en la expansión clonal de células B. Esta enfermedad no dispone de cura y es muy común la aparición de resistencias farmacológicas. Previamente, hemos identificado el compuesto indol-3-carbinol (I3C) y su principal metabolito 3,3'-diindolilmetano (DIM), como compuestos activos con actividad farmacológica contra la LLC. El canal de potasio KV1.3 está implicado en la función de las células B y T controlando el potencial de la membrana plasmática, la entrada de Ca<sup>2+</sup> y la proliferación celular. Por ello, estos canales representan una nueva diana terapéutica contra la LLC. En este estudio hemos analizado si estos compuestos pueden actuar en parte modulando la función de KV1.3. Hemos medido la actividad y el efecto de los compuestos indólicos en los canales KV1.3 en las células LLC que son sensibles o resistentes a la citotoxicidad del I3C. Las corrientes fueron registradas por la técnica *patch-clamp* en su configuración de célula entera. Las comparaciones se realizaron mediante una prueba t-Student o Mann-Whitney, no paramétrica. La amplitud de la corriente KV1.3 en células LLC se correlaciona con su sensibilidad al efecto citotóxico del I3C; las células LLC resistentes al I3C (LLC-R) muestran una amplitud de corriente aproximadamente 2.5 veces mayor que las células sensibles (LLC-S). Tanto el I3C como el DIM inhibieron la corriente KV1.3 en las células LLC, siendo el DIM 4 veces más potente que el compuesto original. Sin embargo, el ácido indol-3-carboxílico (I3CA, compuesto no citotóxico) no inhibió la corriente KV1.3. Las células LLC-R muestran una amplitud de corriente KV1.3 mayor que las células LLC-S, lo que puede ser debido a la presencia de diferentes canalosomas en estas células. El efecto inhibitorio medido de los compuestos indólicos sobre la corriente KV1.3 correlaciona con su efecto citotóxico en las células LLC. Nuestros resultados sugieren que el canal KV1.3 podría estar implicado en los mecanismos de resistencia farmacológica de las células LLC y su inhibición podría estar relacionada con el efecto citotóxico de I3C y DIM, lo que abre nuevas vías al tratamiento de esta enfermedad.

**Palabras clave:** *Leucemia linfática crónica (LLC), KV1.3, indol-3-carbinol (I3C), 3,3'-diindolilmetano (DIM)*

**Agradecimientos:** *Financiado por MINECO (SAF2013-45800-R, SAF2016-75021-R, RD12/0042/0019, CB/11/00222) e ISCIII (PI12/01135 y PI16/00895).*

## BIG-DATA COMO HERRAMIENTA EN LA EXPLORACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL ABUSO DE DROGAS

MARCOS, A. , ORIHUEL, J. , ROURA-MARTÍNEZ, D. , UCHA, M., CAPELLÁN, R. HIGUERA-MATAS, A. , AMBROSIO, E.

Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED)

Internet y las tecnologías TICs han abierto un campo con nuevas aplicaciones y oportunidades, de las que el área de la salud lleva

beneficiándose varias décadas. Se abren, por ejemplo, nuevas fuentes donde obtener información y así poder tomar decisiones políticas o técnicas más fundamentadas. Las redes sociales y los términos empleados en los buscadores de internet pueden tener validez y ser un buen complemento a los datos procedentes de historias clínicas. En el área de la salud los sistemas de vigilancia todavía no han desplegado un gran panel de aplicaciones basadas en el Big Data, como si han hecho sectores como el marketing. Se cuenta con un campo todavía no suficientemente abordado que ofrece múltiples posibilidades para desarrollar en los próximos años. Por otro lado, actualmente nos encontramos ante una constante y cambiante incorporación a la sociedad de nuevas sustancias psicoactivas con uso recreativo, así como de cambios en los patrones de consumo de las drogas de abuso en general. Los sistemas de alerta a veces no cuentan con tiempo suficiente para valorar los riesgos, toxicidad y/o potencial adictivo derivados de estas transformaciones. Detectar con una mayor anticipación la aparición o cualquier variación en el patrón de consumo de estas sustancias podría apoyarse en técnicas de análisis de datos como el Big Data o la minería de datos. Es de gran interés, por tanto, identificar y explorar las posibles herramientas y fuentes de información de tipo social o epidemiológico para su posterior análisis e interpretación. El objetivo general ha sido identificar y describir las posibles fuentes de datos, herramientas o iniciativas ya implantadas, que sirviéndose de metodologías basadas en la ciencia del análisis de datos, pudieran ser muestren utilidad en cualquier aspecto práctico en el campo de las drogas de abuso. En particular, describir posibles aplicaciones, tanto de tipo predictivo, descriptivo o de búsqueda de tendencias, que ante la aparición de nuevas sustancias o variación de patrones de consumo de drogas ya presentes en un espacio geográfico determinado, permitan adelantar las alertas sanitarias.

## NOVEL HISPANOLONE DERIVATIVES WITH POTENTIAL ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

L. GONZÁLEZ-COFRADÉ,<sup>1</sup> I. CUADRADO,<sup>1</sup> S. ORAMAS-ROYO,<sup>2</sup> A. ESTÉVEZ-BRAUN,<sup>2</sup> S. HORTELANO,<sup>3</sup> B. LAS HERAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González. Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain.

<sup>3</sup>Unidad de Terapias Farmacológicas, Instituto de Investigaciones en Enfermedades Raras (IIER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Majadahonda, Madrid, Spain.

Diterpenes are bioactive natural products with great therapeutic potential and are considered very promising starting points for the development of new therapeutic agents. In this study, a series of seventeen novel hispanolone derivatives (N1-N17) were synthesized and evaluated for potential anti-inflammatory activity in J774A.1 macrophages. We focused on their potential as inhibitors of classical inflammatory pathways (NF- $\kappa$ B/MAPKs) and/or inflammasome activation. All compounds except N2 and N5 were non-cytotoxic, as revealed the MTT assay. To evaluate NF- $\kappa$ B pathway, macrophages were activated with lipopolysaccharide (LPS) in the absence or presence of diterpenes. Inhibitory effects of the non-toxic compounds on nitric oxide (NO) production were evaluated. Derivatives N1 and N12 were the most active (IC<sub>50</sub> in the range 10-20  $\mu$ M) and were selected for further evaluation. A significant inhibition of NOS-2 and COX-2 expression was observed by Western blot. NOS-2, COX-2 and inflammatory cytokines were also downregulated at the transcriptional level in the presence of both compounds. Moreover, the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ERK1/2, p38 and JNK was also reduced by pre-incubation with N1 and N12. We also investigated their potential as regulators of NLRP3 inflammasome. Cell

treatment with diterpenes N12, N13, N16 and N17 at 20  $\mu$ M significantly reduced IL-1 $\beta$  secretion in LPS/ATP or LPS/Nigericin stimulated macrophages. Western blot analyses also showed that these compounds inhibited IL-1 $\beta$  and cleaved caspase-1 protein expression. In conclusion, these results show the promising anti-inflammatory effects of some hispanolone derivatives, in particular N12, acting on a dual level. This diterpene not only inhibits NF- $\kappa$ B/MAPKs pathways, but also regulates inflammasome activation.

**Keywords:** Inflammation, diterpenes, NF- $\kappa$ B, MAPKs, inflammasome.

**Acknowledgments:** This study was supported by grant PI14/00055 and PI17/00012 from the FIS (ISCIII) to S. Hortelano and grant SAF2015-65113-C2-1-R from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) to A. Estévez Braun and B. las Heras.

## ACUTE AND CHRONIC INTAKE OF PALMITIC AND OLEIC ACID-ENRICHED DIETS DIFFERENTLY AFFECT THE EXPRESSION OF ADIPOCYTE-SPECIFIC GENES IN ADOLESCENT AND ADULT MICE

NARANJO V, PLAZA A, MERINO B, CONTRERAS A, CANO V, DEL OLMO N, AND RUIZ-GAYO M.

Department of Pharmaceutical and Health Sciences. Facultad de Farmacia. Universidad CEU-San Pablo. Madrid, Spain.

Dysfunctional adipose tissue, characterized by a deregulation of its lipogenic and lipolytic activities together with an altered pattern of adipokine production, is associated to the intake of highly saturated fat diets. In this study we aim at comparing the influence of two diets, containing either high or low saturated fat/unsaturated fat ratios, on the expression of adipocyte-specific genes. Otherwise the age-dependent impact of these diets was also investigated. Methods: The study was carried out in adolescent (4-week old) and adult (8-week old) C57BL/6J male mice, that received either a standard rodent chow (SD), a palmitic acid-enriched diet (PHFD; 60% SD + 40% palm oil containing 48% palmitic acid and 35% oleic acid), or an oleic acid-enriched diet (OHFD; 60% SD + 40% high-oleic sunflower oil containing 80% oleic acid and 4% palmitic acid) during either 48 h or 8 weeks. The expression of adipocyte-specific genes (adiponectin, leptin, aquaporin 7, hormone sensitive lipase, lipoprotein lipase, and PPAR $\gamma$ ) was analysed in both subcutaneous and visceral WAT by means of RT-PCR. Results: 1) In adolescent mice, 48 h PHFD repressed the expression of adiponectin, aquaporin 7, hormone sensitive lipase, lipoprotein lipase, and PPAR $\gamma$  genes in both subcutaneous and visceral WAT, while 48 h OHFD only down-regulated PPAR $\gamma$  and LPL gene expression in these tissues. Eight-week dietary treatment, both diets reduced adiponectin, hormone sensitive lipase, and PPAR $\gamma$  gene expression. Leptin gene expression was up-regulated by OHFD and repressed by PHFD. 2) In adult mice, 48 h PHFD only repressed adiponectin and PPAR $\gamma$  expression in visceral WAT, while OHFD was without effect regardless the WAT deposit analysed. After 8-week treatment, both PHFD and OHFD triggered similar effects. Thus adiponectin gene expression was down-regulated in both subcutaneous and visceral WAT, while PPAR $\gamma$  was only down-regulated in visceral WAT. Leptin expression was up-regulated in both tissues. Our data show that gene expression is more sensitive to short-term dietary treatments in adolescent than in adult animals. In contrast, an 8-week treatment seems to modulate gene expression in both adolescent and adult mice. In regard to diet composition, PHFD appears to be more aggressive than OHFD after short-term treatment. Nevertheless, 8-week PHFD and OHFD triggered similar effects. Our findings support the concept that the vulnerability of WAT to HFD is

more prominent in adolescent than in adult individuals. Moreover, PHFD seems to be more effective than OHFD during short-term treatment, although both diets have similar effects after long-term treatments.

**Keywords:** *palmitic, oleic, leptin, adiponectin, adipose.*

**Funding:** *Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2016-78556R), European Regional Development Fund, and Fundación Universitaria San Pablo-CEU. AC and AP are supported by the postgraduate fellowship programs of Universidad San Pablo-CEU and MINECO (BES-2012-063773), respectively.*

## ROLE OF CYANIDIN IN HUMAN NEURONAL MODELS: INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS

CÁSEDAS, GUILLERMO<sup>1</sup>; GONZÁLEZ-BURGOS, ELENA<sup>2</sup>; GÓMEZ-SERRANILLOS, MARÍA PILAR<sup>2</sup>; BENNET, AMBER<sup>3</sup>; SMITH, CARINE<sup>3</sup>; LES, FRANCISCO<sup>1</sup>; LÓPEZ, VÍCTOR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. *Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias de la salud, Universidad San Jorge, Zaragoza, Spain*

<sup>2</sup>. *Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.*

<sup>3</sup>. *Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica.*

Cyanidin is an anthocyanin whose derivatives are present in many berry-like fruits (blueberries, cherries, grapes, blackberries). Numerous studies have shown that cyanidin has antioxidant activity, as well as effects related to the prevention of diabetes and obesity. This study consists of assessing the effects of cyanidin in two cellular models of the central nervous system subjected to oxidative stress and inflammation. The cyanidin used for the different studies was acquired through Extrasynthese. The antioxidant activity of cyanidin was determined by oxygen radical absorbance capacity (ORAC). The cytotoxicity of cyanidin was evaluated in the two cellular models (SHSY-5Y and U-373) using the MTT and XTT methods. The response to inflammation in glial cells U-373 was obtained through a lipopolysaccharide (LPS) assay providing a concentration of 20 µM to astrocytes previously treated with different concentrations of cyanidin. On the other hand, the SHSY-5Y neuronal cells were pre-treated with the same concentrations of cyanidin and the oxidative stress was generated by exposing said cells to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) with a concentration of 100 µM. Different parameters such as cell viability, TBARS, ROS and cytokines were measured in the cells. The data analysis was performed using the GraphPad Prism v.6 program. The ORAC assay showed that cyanidin exerted high antioxidant activity and, therefore, justified the studies in both neuronal models. SHSY-5Y cells treated with the different concentrations of cyanidin showed a clear increase in viability and a decrease in oxidative stress with respect to the cells treated with the toxic. Cyanidin also had a protective effect on the astrocytes subjected to LPS toxicity, increasing its cellular viability and decreasing the production of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and MCP-1). In conclusion, it can be confirmed that cyanidin has great neuroprotective potential due to its antioxidant and anti-inflammatory actions.

**Palabras clave:** *Anthocyanin, natural product, LPS, antioxidant, neuroprotection.*

**Agradecimientos:** *Gracias a la Universidad Complutense de Madrid y a la University of Stellenbosch por la oportunidad de realizar estancias en sus laboratorios de investigación y a la Universidad San Jorge de Zaragoza por ayudar a la formación investigadora.*

## OF NMDA RECEPTORS: POSSIBLE INVOLVEMENT OF 5-HT<sub>1A</sub>, BUT NOT CB1 OR CB2 RECEPTORS

RODRIGUES, N.S.<sup>1</sup>; SONEGO, A. B<sup>1</sup>; SILVA, N.R<sup>1</sup>; GOMES, F.V<sup>2</sup>; GUIMARÃES, F.S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.*

<sup>2</sup>*Department of Neuroscience, University of Pittsburgh, Pittsburgh, USA.*

**Aims:** To evaluate whether repeated 7-day treatment with cannabidiol (CBD), a non-psychotomimetic phytocannabinoid with antipsychotic properties, could reverse the impairment in social interaction (SI) and novel object recognition (NOR) induced by MK-801 treatment for 14 days. We also investigated if CBD effects would be blocked by pretreatment with AM251, a CB1 receptor antagonist, AM630, a CB2 receptor antagonist, or WAY100635, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist. **Methods:** C57BL/6J mice received i.p. injections of MK-801 (0.5 mg/kg, twice a day) for 14 days. CBD (15, 30 or 60 mg/kg/daily) treatment began 24h after the end of the MK-801 treatment and lasted for 7 days. Forty-eight hours after the last injection animals were submitted to SI and, one day later, to the OR test. In another experiment the same protocol was used but the animals received an injection of AM251 (0.1 or 0.3 mg/kg), AM630 (0.1 or 0.3 mg/kg) or WAY100635 (0.1 or 0.3 mg/kg) 10 min before each CBD administration. **Results:** CBD (15 and 30 mg / kg) attenuated the impairments in the IS and RO tests induced by MK-801. This effect was blocked by WAY100635, but not by AM251 or AM630. **Conclusion:** These data suggest that CBD has antipsychotic properties by activating 5HT<sub>1A</sub> receptors and indicate that CBD could be an interesting alternative for the treatment of negative and cognitive symptoms of patients with schizophrenia.

**Key words:** *Cannabidiol, schizophrenia, MK-801, cognitive impairments*

**Financial support:** *CAPES, CNPq and FAPESP.*

## CANNABIDIOL TREATMENT REVERSES CHANGES IN A MODEL OF SCHIZOPHRENIA BASED ON ANTAGONISM



