

XXXIII CONGRESO NACIONAL DE LA SEF

PREMIO COMUNICACIONES ORALES

Ácidos grasos poliinsaturados de microalgas inhiben la producción de TNF- α en células THP-1 y reducen la inflamación intestinal en un estudio animal.

Ávila-Román FJ¹, Domínguez C¹, Talero E¹, de los Reyes C², Ortega MJ², Zubía E², García-Mauriño S³, Motilva V¹.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el cáncer es una enfermedad muy común y también difícil de tratar. En los últimos años, aunque se han producido muchos avances en la terapia anticancerosa, sin embargo las estadísticas indican que la incidencia es similar a la de hace 30 años. El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo más extendido en nuestro entorno después del de mama y el de pulmón. Además es común detectar este tipo de tumores en fases bastante avanzadas con diseminación y metástasis, siendo en torno a un 45% de ellas metástasis hepática¹. Hasta hace pocos años se pensaba que el cáncer se debía fundamentalmente a la alteración de 3 tipos de genes: oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores de ADN. Hoy se sabe que es un proceso más complicado y con la participación de muchos más genes; es más, aún sin mutación pueden presentarse alteraciones de tipo epigenético². Por otro lado, datos recientes han recuperado el interés del rol que juega la inflamación como proceso conductor de la progresión de enfermedades heterogéneas multifactoriales incluyendo la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD) y el cáncer de colon; numerosos estudios sugieren que la propia inflamación crónica es el factor etiopatogénico principal para desarrollar CCR asociado a IBD³.

Actualmente, existen bastantes fármacos en el mercado, como el 5-fluoruracilo y otros tantos en fase clínica de desarrollo. Sin embargo, los datos actuales indican que una de las fórmulas más eficientes para combatir el cáncer es mediante la quimioprevención, y en este sentido son de interés determinados componentes de la dieta con capacidad de neutralizar la acción de los radicales libres que se generan en el tracto intestinal (antioxidantes), o compuestos antiinflamatorios que favorecen el control del proceso inflamatorio crónico de pacientes con IBD, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ul-

cerosa. Entre las enzimas involucradas destacan la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), cuyos productos están asociados con procesos como la estimulación del crecimiento celular, angiogénesis y supresión de la inmunidad. Del mismo modo, determinadas citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), las interleucinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6), o el interferón gamma (IFN- γ) desempeñan un papel fundamental en la etiopatogénesis del CCR asociado a inflamación intestinal crónica⁴.

El mundo terrestre ha sido fuente tradicional para el desarrollo farmacológico aunque la necesidad de nuevas moléculas y el impacto de la biotecnología han ampliado el campo de la investigación. En los últimos años, el medio acuático se ha revelado como una fuente importante para nuevas moléculas y dentro de él las microalgas han mostrado su enorme potencial con interesantes aportaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, entre otras. En este sentido, se ha conseguido con éxito cultivar microalgas marinas, aunque por el momento son apenas 12 especies de las 30.000 conocidas; su carácter fotoautótrofo les hace tener requerimientos simples de crecimiento con gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, y con producción de diversos metabolitos. Estas y otras características hacen que las microalgas estén posicionadas como organismos con excelentes cualidades para la investigación de nuevas moléculas con interés farmacológico.

En nuestra esta investigación, a partir de un estudio bioguiado de actividad biológica con extractos y fracciones de una especie de microalga perteneciente al género *Nannochloris*, nos proporcionó tres ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) denominados OXILIPINAS, interesantes desde el punto de vista químico por su parecido con las prostaglandinas. Entonces, nos planteamos profundizar en sus efectos y meca-

1. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. **2.** Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Cádiz. **3.** Departamento de Bioquímica Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

nismos antiinflamatorios a través del abordaje de metodología *in vitro* (células THP-1 y HT-29) y de estudios *in vivo* con ratas Wistar que desarrollaban colitis por aplicación en el colon del hapetno TNBS. En este sentido, el factor de transcripción NFκB se ha perfilado en los últimos años como un agente principal para el control de la respuesta inflamatoria y de los procesos tumorales asociados; podemos decir con certeza que NFκB cumple un papel modulador en inflamación coordinando la expresión de numerosas citoquinas proinflamatorias, como son TNF-α o IL-8, y en la EII se ha demostrado una activación constitutiva del factor. Además existen evidencias que señalan a NFκB como agente colaborador en procesos de tumorigénesis; algunos genes con los que se le ha relacionado están implicados en ciclo celular (ciclina D1), angiogénesis (VEGF, IL-8, COX-2) y metástasis (MMP9). Al mismo tiempo hemos querido esclarecer una posible interacción de estos ácidos grasos con los receptores activados por proliferadores de peroxisomas o PPARs, en concreto con PPAR-γ por localizarse de forma específica en el colon y haber sido más ampliamente descrito por sus funciones reguladoras del sistema inmune.

METODOLOGÍA

Los ensayos de actividad anti-inflamatoria *in vitro* se realizaron sobre una línea de leucemia monocitaria humana (THP-1) transformada a macrófago, cuantificando la producción de TNF-α. Para ello, se realizó una incubación de 24 h con los compuestos a la dosis de 50 μM, previa a la estimulación de las células en cultivo. Posteriormente, los macrófagos fueron estimulados con 1 μg ml⁻¹ de lipopolisacárido (LPS) durante 24h. A continuación, se recolectaron los sobrenadantes llevándose a cabo su análisis por la técnica ELISA.

Con la línea HT-29 (células epiteliales de adenocarcinoma de colon humano) se procedió al estudio de localización del factor de transcripción NFκB5 y de la proteína PPAR-γ6 mediante inmunofluorescencia. Para ello, células crecidas en portas estériles se pre-trataron durante 24h con las oxilipinas (50 μM) y posteriormente se estimuló la migración del factor NFκB desde el citoplasma al núcleo mediante la adición de PMA (300 ng/mL) durante 1,5 horas. Para la medida de activación de PPAR-γ se realizó igualmente una incubación de 24h con los compuestos. La medida se llevó a cabo marcando ambas proteínas con anticuerpos monoclonales primarios (Cell Sig-

nalng); el anticuerpo secundario lo proporcionó Alexa Fluor 488 de Invitrogen y finalmente medio de montaje para fluorescencia de Dako. Las imágenes fueron tomadas mediante un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX61.

El estudio *in vivo* utilizó un liofilizado de la microalga completa y observamos el efecto a diferentes dosis (100 y 400 mg kg⁻¹) en un modelo de colitis ulcerosa aguda^{7,8}. Este modelo experimental da lugar a una inflamación localizada y alteraciones en el colon con características similares a las que han sido encontradas en enfermedades inflamatorias crónicas en humanos. Para este ensayo, se tomaron ratas Wistar macho de peso comprendido entre 150-200 g. La colitis fue inducida vía rectal con una única dosis (10 mg) de ácido trinitrobenzénicosulfónico (TNBS) disuelta en 0,25 ml de etanol 50% (v/v) y aplicada al tercer día de tratamiento con las oxilipinas. El quinto día de ensayo se procedió al sacrificio de los animales. Los grupos en estudio fueron: grupo control sano (Sham), grupo control con colitis (TNBS), y los grupos con colitis pero tratados con el liofilizado de *Nannochloris* a las dosis seleccionadas (N2-10 y N2-400). El estudio se completo con ensayos microscópicos en cortes de 5 μm procedentes de muestras incluidas en parafina, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Todos los protocolos llevados a cabo para este modelo siguieron las recomendaciones de la Unión Europea relativas a la experimentación animal (Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres compuestos puros de *Nannochloris* disminuyen significativamente la producción de TNF-α *in vitro*, sobre la línea THP-1 de macrófagos humanos, sin efecto alguno sobre la viabilidad celular (Figura 1).

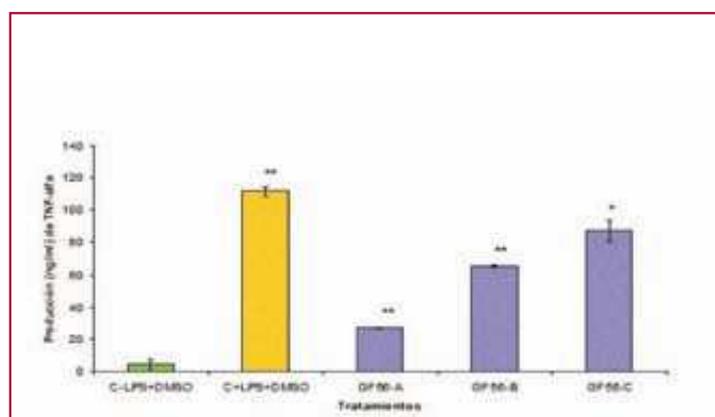


Figura 1. Estudio de producción de la citocina proinflamatoria TNF-α, mediante técnica de ELISA, en macrófagos diferenciados THP-1 y estimulados con LPS (1 μg/mL); respuestas tras la aplicación de las oxilipinas en estudio (50 μM; GF56-A, GF56B y GF56-C respectivamente). *p<0.05, **p<0.01.

La preincubación de las oxilipinas con la línea de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) causa la activación de PPAR- γ y su translocación al núcleo celular (Figura 2). Del mismo modo observamos un descenso de la presencia de NFkB en el núcleo de las células (Figura 3). Esto es relevante ya que estudios previos indican que ambas proteínas están involucradas en procesos infla-

matorios, si bien PPAR- γ es un elemento celular que inhibe las respuestas inflamatorias a través de la interacción con el factor de transcripción NFkB. De este modo se inhibe la transcripción de genes pro-inflamatorios productores de quimioquinas, citoquinas, y otros elementos claves en la activación inflamatoria y tumoral.

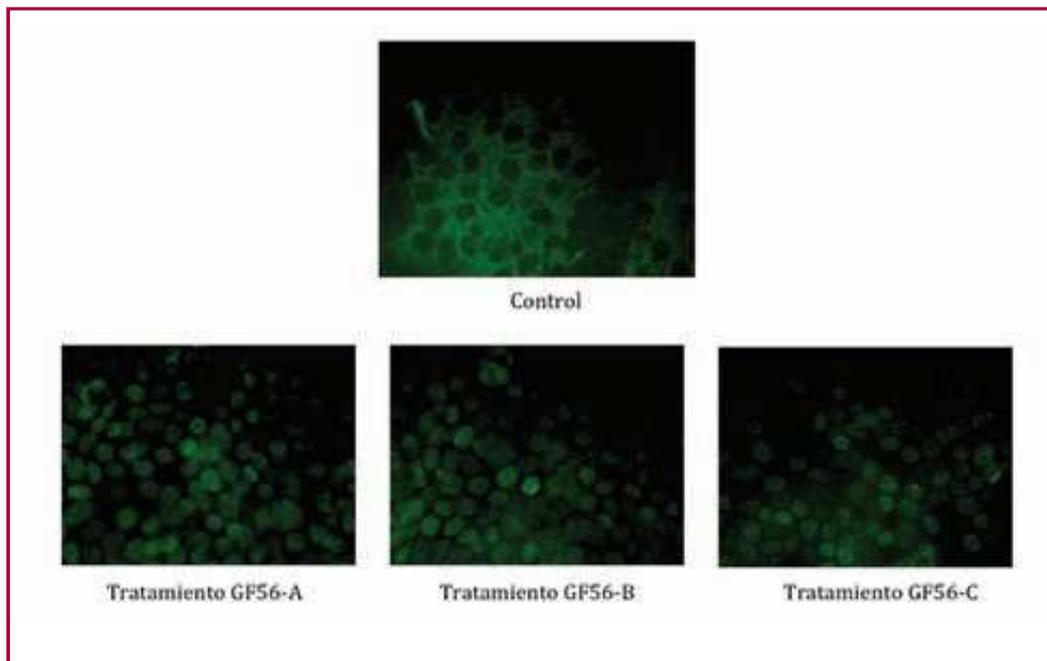


Figura 2. Imágenes representativas de la localización de PPAR- γ en células epiteliales HT-29 (procedentes de adenocarcinoma de colon humano) por inmunofluorescencia: localización citoplasmática/inactivo en el grupo control, y nuclear/activo en las células tratadas con las oxilipinas (50 μ M) aisladas de la microalga *Nannochloris* y denominadas GF56-A, GF56B y GF56-C respectivamente.

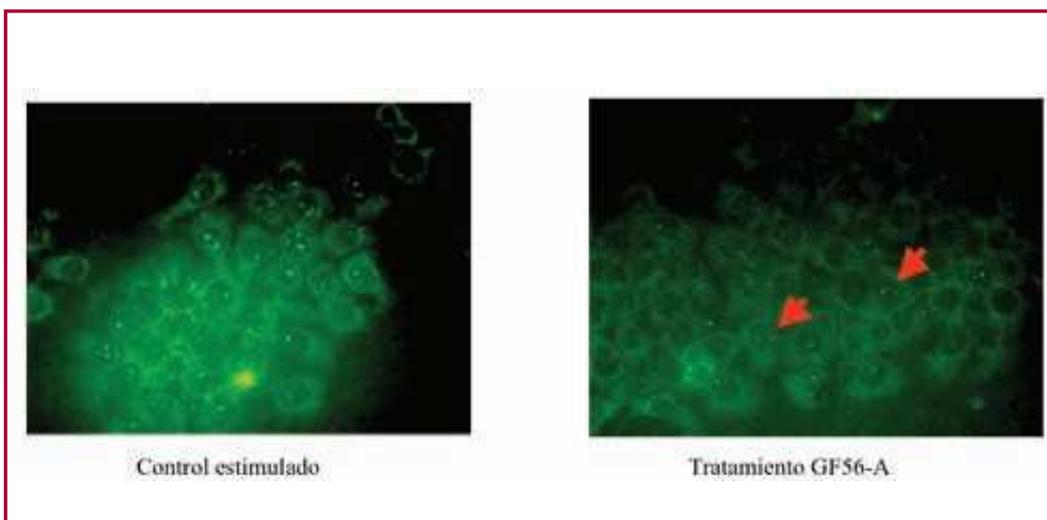
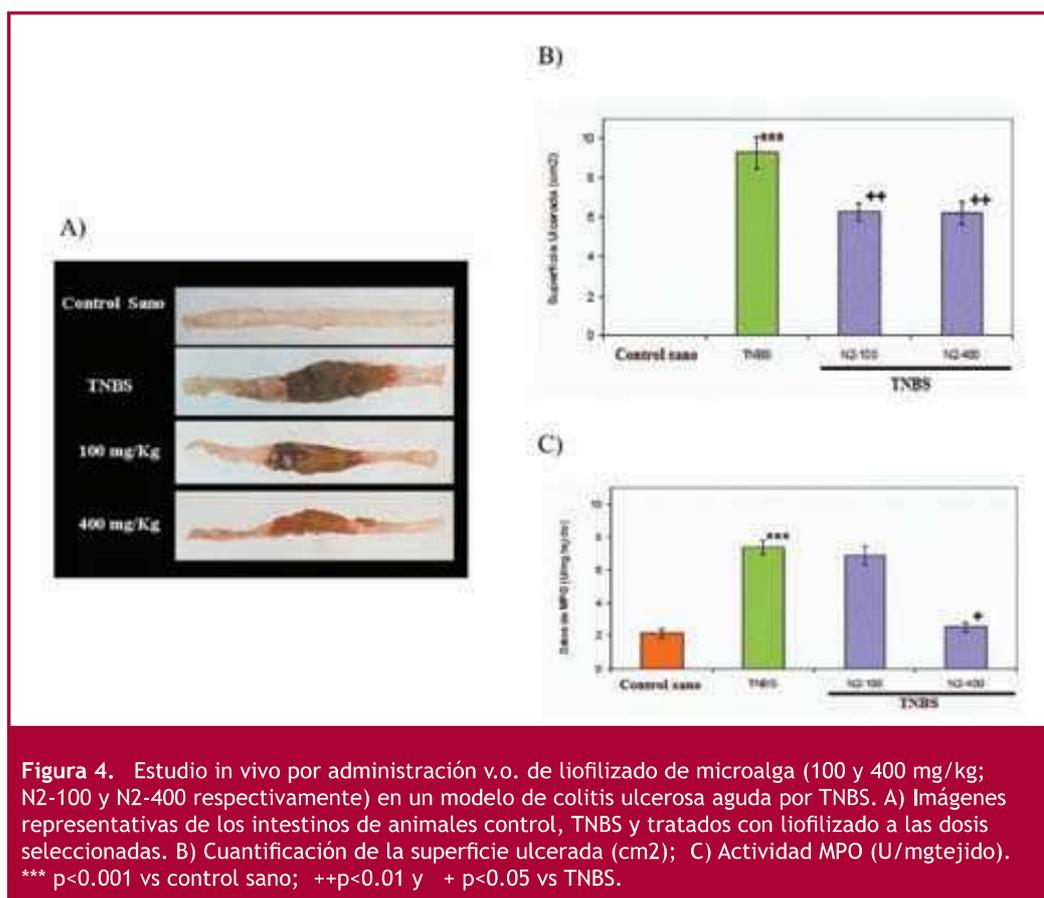


Figura 3. Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de activación del factor de transcripción NFkB en células HT-29. Las células fueron sometidas a un pretratamiento con las oxilipinas GF56-A, GF56-B y GF56-C (50 μ M) durante 24 horas y estimulación posterior con PMA (300 ng/mL, 90 min). Tras el tratamiento con los compuestos (mostramos la imagen de GF56-A ya que fue el compuesto más activo) se observa una importante disminución en la presencia del factor en el núcleo celular (flechas rojas).

El estudio de colitis inducida en rata mediante la aplicación del hapteno TNBS muestra que el liofilizado de *Nannochloris* disminuyó las alteraciones patológicas asociadas a una colitis aguda, lo que confirma la actividad antiinflamatoria de la microalga con una alta concentración lipídica y alta producción de oxilipinas. En la figura 4-A podemos observar cómo las dosis empleadas presentaban un mejor aspecto que el control TNBS con menor inflamación y superficie necrótica. La cuantificación de la superficie ulcerada del colon (Figura 4-B) muestra como ambas dosis de liofilizado disminuyen significativamente la superficie ulcerada (cm²). La actividad mieloperoxidasa (MPO), medida del infiltrado celular neutrofílico típico de un proceso inflamatorio, se vio reducida de manera significa-

tiva con la dosis mayor de liofilizado (Figura 4-C).

En la Tabla 1 se exponen los datos biológico-patológicos donde se muestran varios parámetros indicativos del estado de los animales, diarrea, y daño intestinal (adherencias y peso longitud de colon); observamos que ambas dosis utilizadas de liofilizado disminuyen significativamente la escala de adherencias y la de diarrea, signos relacionados con la enfermedad inflamatoria intestinal. Los resultados se confirmaron tras el estudio histológico en muestras de tejido incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina/eosina (Figura 5); los cortes histológicos mostraban un menor infiltrado neutrofílico con preservación de la estructura del epitelio glandular colónico a ambas dosis ensayadas.



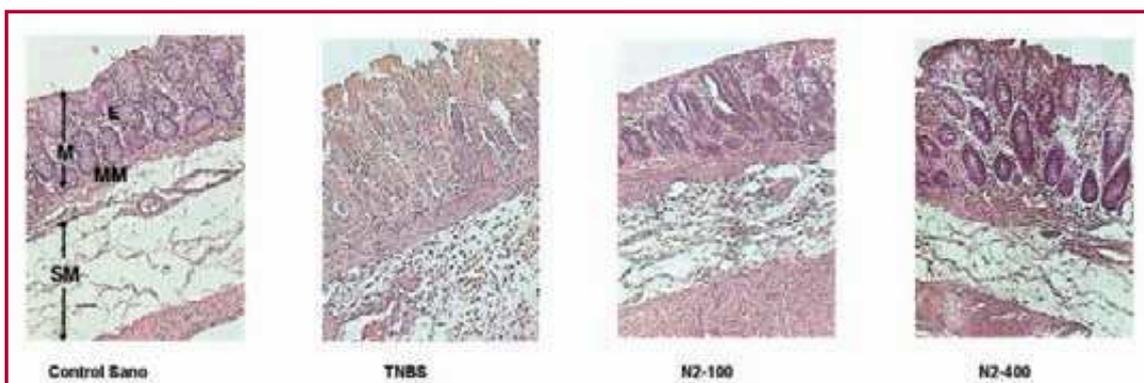


Figura 5. Estudio histológico, con cortes de 5 μ m, procedentes de muestras incluidas en parafina, y teñidas con hematoxilina-eosina. Grupos control, TNBS y grupos tratados con el liofilizado a las dosis seleccionadas (N2-100 y N2-400).

Tabla 1. Datos clínicos con resultado biológicos/patológicos observados en los animales control sanos (sano), control dañado con colitis (TNBS), y tratados con 100 y 400 mg/kg de liofilizado (N2-100 y N2-400). *** $p < 0.001$ y * $p < 0.05$ vs control sano; +++ $p < 0.001$ y ++ $p < 0.01$ vs TNBS.

Grupo	n	Variaciones de peso (g)	Adherencias del colon (Escala 0-2)	Diarrea (Escala 0-1)	Peso/longitud colon (g/cm)
Sano	8	19.75 \pm 4.00	0	0	0.08 \pm 0.004
TNBS	9	-12.90 \pm 0.09 ***	2.40 \pm 0.22 ***	1 ***	0.17 \pm 0.04 ***
TNBS+ N2-100	7	-8 \pm 0.22	1.88 \pm 0,13	0.63 \pm 0,18	0.14 \pm 0.006 *
TNBS+ N2- 400	6	-10 \pm 0.31	1.38 \pm 0.183 +++	0.38 \pm 0,18 ++	0.14 \pm 0.003

En resumen, nuestro estudio demuestra la potente actividad antiinflamatoria de las oxilipinas aisladas; esta es la primera vez que se muestran estos efectos en compuestos de obtenidos de microalgas. Sugerimos considerar la capacidad productiva de estos organismos y su utilización como

complementos dietéticos, o en medicamentos destinados a la prevención de patologías de índole inflamatoria y en el cáncer, cuando este se origina como consecuencia de un proceso inflamatorio crónico mal controlado (quimioprevención).

Bibliografía

- Gopalappa C, Aydogan-Cremaschi S, Das TK, Orcun S. Probability model for estimating colorectal polyp progression rates. *Health Care Manag. Sci.* 2011; 14: 1-21.
- Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; 8: 686-700.
- Motilva V, García-Mauriño S, Talero E, Illanes M. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin. *J. Pineal Res.* 2011; 51:44-60.
- Burstein E, Fearon ER. Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 464-7.
- Al-Halabi R, Chedid MB, Merhi RA, El-Hajj H, Zahr H, Schneider-Stock R, Bazarbachi A, and Gall-Muhtasib H. Gallotannin inhibits NF κ B signalling and growth of human colon cancer xenografts. *Cancer Biology & Therapy* 2011; 12: 59-68.
- Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts A, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nature Immunology*, Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nat. Immunol.* 2004; 5:104-12.
- Talero E, Sánchez-Fidalgo S, de la Lastra CA, Illanes M, Calvo JR, Motilva V. Acute and chronic responses associated with adrenomedullin administration in experimental colitis. *Peptides* 2008; 29: 2001-12.
- Bobin-Dubigeon C, Collin X, Grimaud N, Robert JM, Le Baut G, Petit JY. Effects of tumour necrosis factor- α synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 43: 103-10.

XXXIII CONGRESO NACIONAL DE LA SEF

PREMIO COMUNICACIONES ORALES

El uso de crucigramas como método de innovación docente en la asignatura de Farmacia Clínica

AJ. León-González, C. Martín-Cordero, M. Sánchez-Hidalgo

En el marco del Espacio Europeo de Educación Superior (EEES), el alumno adquiere un papel protagonista en el proceso de enseñanza. A fin de promover entre al alumnado destrezas como el aprendizaje autónomo, el trabajo en equipo o el manejo de nuevas tecnologías, cada vez es más frecuente el empleo en las aulas de métodos de innovación docente como el estudio de casos clínicos, el empleo de recursos periodísticos o el uso de juegos didácticos.

La actividad “CruciFarmaClin”, en la que se empleó el uso de crucigramas para fomentar el estudio de los principales conceptos de la asignatura de Farmacia Clínica y favorecer la relación entre los alumnos, ha sido valorada como una experiencia positiva entre los estudiantes de último curso de la Licenciatura de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

INTRODUCCIÓN

Desde que en el año 1999, 30 países suscribieron la declaración de Bolonia y sentaron las bases para el desarrollo del EEES, las Universidades españolas, incluida la Universidad de Sevilla y las del resto de Europa se encuentran ante el reto de adaptar sus sistemas de enseñanza universitaria a este nuevo marco internacional (Fernández-Arévalo y cols., 2010), fundamentado en los principios de calidad, movilidad, diversidad y competitividad. Esta reciente entrada en vigor supone un cambio en el planteamiento de la enseñanza universitaria, que afecta al papel otorgado al profesor, a los alumnos y al diseño y organización curricular de las titulaciones. Ello supone una serie importante de cambios destinados principalmente a la consecución de competencias y destrezas, en donde debe potenciarse el aprendizaje autónomo del alumno para que a lo largo de su vida desarrolle el LLL (Long Life Learning) y otros aspectos como el nuevo papel de los materiales didácticos que fomenten el trabajo en equipo, el aprendizaje basado en problemas (ABP) y el estudio de casos que lo preparen para ser un buen profesional a la sociedad (García-Asuero, 2011). No obstante, para poder tutorizar a los estudiantes en este nuevo rol de “aprender a aprender” es imprescindible el uso de las nuevas tecnologías y se han de buscar constantemente metodologías docentes que se adapten a tales fines docentes.

para desarrollar capacidades mediante una participación activa y afectiva de los alumnos, por lo que en este sentido el aprendizaje se transforma en una experiencia feliz” (Cedeño, 1995). En esta línea, el crucigrama, que inicialmente empezó como un pasatiempo, fue adquiriendo características que le permitieron ser clasificado no sólo como entretenimiento, sino como herramienta didáctica que desarrolla habilidades que mejoran la capacidad de comprensión de las personas que acostumbran resolverlos; así pues, este elemento lúdico comenzó a ser usado con fines educativos y pasó a formar parte de una gama extensa de materiales didácticos y de apoyo en los procesos pedagógicos.

La implementación del crucigrama, uno de los juegos de puzzle más comúnmente empleados en el proceso de enseñanza-aprendizaje (Crossman y cols., 1983) retoma el concepto conocido como “tecnología educativa” descrito por Ogald y Barvadid definido como “el conjunto de procedimientos o métodos, técnicas, instrumentos y medios, derivados del conocimiento científico, organizados sistemáticamente en un proceso, para el logro de objetivos educativos” (Ogald y Barvadid, 1992). Es un elemento valioso para el profesorado en sus funciones específicas de planeación, conducción y evaluación. Los crucigramas, no son sólo una ayuda orientada a facilitar la intervención pedagógica del profesorado en las aulas y el aprendizaje del alumnado, son también la expresión de una determinada concepción de la enseñanza y del aprendizaje (Lomas,

1. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. hidalgosanz@us.es

1999). Asimismo, los crucigramas influyen en el desarrollo cognitivo y social, así como en las habilidades académicas, pues mejoran la atención y concentración, y promueven la búsqueda intensa de estrategias para la solución de problemas, poniendo a trabajar la mente y produciendo un desarrollo de la inteligencia en el proceso de enseñanza-aprendizaje.

Dados los buenos resultados obtenidos mediante el empleo de otros juegos didácticos en otras asignaturas de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, como el juego "Farma-Trivial" en la asignatura de Farmacología y Farmacoterapia I de nuestro Departamento y el testimonio de otros docentes en diversas Universidades (Gras Ávila y cols., 2009), durante el curso 2010-11 se realizó por primera vez la actividad "Crucifarmaclin", cuyo impacto en la docencia de la asignatura de Farmacia Clínica evaluamos en el presente trabajo.

METODOLOGÍA

En este trabajo de innovación docente se pretendió evaluar la eficacia de los crucigramas como herramienta didáctica para incrementar el interés por el aprendizaje y fortalecer el conocimiento de los conceptos fundamentales de la asignatura Farmacia Clínica mediante la elaboración y resolución de crucigramas. Entre las competencias que se persiguieron alcanzar con este proyecto se encuentran: i) La comunicación escrita, ii) capacidad de sintetizar conceptos, iii) capacidad de liderazgo, iv) trabajo en equipo, v) competitividad y motivación por el éxito.

Concretamente esta actividad de innovación docente fue llevada a cabo en la asignatura de Farmacia Clínica de la Licenciatura de Farmacia de la Universidad de Sevilla durante el curso académico 2010-11. En ella participaron un

total de 32 alumnos de último curso acogidos al EEES que se dividieron en diez grupos de trabajo. Para la confección de los crucigramas se empleó el programa informático EclipseCrossword® que se descarga gratuitamente a través de: <http://www.eclipsecrossword.com>. Una vez descargado e instalado se prosigue a la elaboración del crucigrama. En la figura 1 se muestra un ejemplo de crucigrama. En total fueron generados un total de diez crucigramas generales aleatorios conteniendo todas las temáticas tratadas en el programa de la asignatura. Una vez confeccionado el crucigrama, el software te permite imprimirlo, subirlo a la plataforma virtual o descargártelo.

Fase de desarrollo:

En esta estrategia docente, cada grupo realizó ocho definiciones de las temáticas seleccionadas por el profesor del programa general de la asignatura de Farmacia Clínica. El vencimiento para el envío por correo electrónico de las definiciones al profesor fue de una semana antes a la partida. A partir de las definiciones propuestas por los estudiantes y previa corrección por el profesor se generaron los crucigramas generales conteniendo todas las temáticas del programa de la asignatura. La partida se llevó a cabo el último día de clase y el objetivo de la misma fue que el grupo demostrara sus conocimientos resolviendo el crucigrama en el menor tiempo posible.

Fase de evaluación:

Para la evaluación de dicha actividad, se otorgó una máxima puntuación de 0.5 puntos que se sumó a la nota del examen final al grupo que resolvió correctamente el crucigrama en el menor tiempo posible. El resto de alumnos participantes fueron evaluados según el número de aciertos.

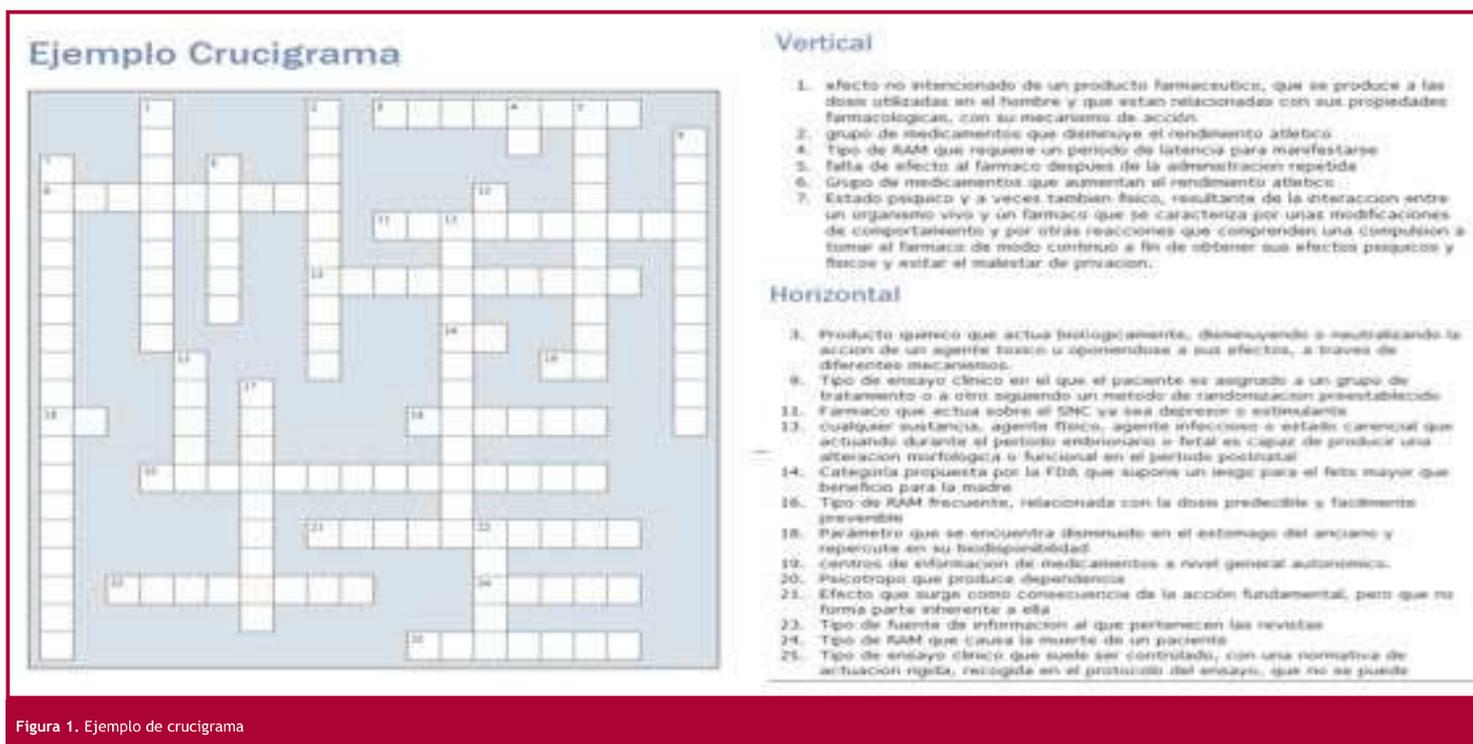


Figura 1. Ejemplo de crucigrama

Fase de Resolución:

Las soluciones fueron presentadas en clase y subidas a la plataforma virtual WebCT de la Universidad de Sevilla. Las definiciones sin resolver y los errores más frecuentes fueron discutidos en clase.

RESULTADOS

Al término de la actividad, se procedió a solicitar a los alumnos participantes su evaluación en relación al uso de crucigramas como herramienta de innovación docente mediante la elaboración de una encuesta anónima en las que se les hacía una serie de preguntas y empleándose una escala comprendida entre 1 y 5.

Los resultados obtenidos en relación a diversos aspectos relacionados con la metodología empleada por el profesor, tales como novedad, organización y seguimiento, son recogidos en la figura 2, llegándose a alcanzar una puntuación de 4.25, 3.8 y 4.0, respectivamente, en una escala propuesta del 1 al 5. Otros aspectos relevantes del desarrollo de la actividad como la promoción de la participación del alumnado, la ayuda que supone a la hora de estudiar la asignatura, el trabajo en equipo y el ambiente propicio durante el desarrollo de la fase final fueron también valorados de forma positiva.

El grado de satisfacción obtenido tras la participación en esta actividad de innovación docente fue de 4 puntos en una escala de 1-5. Alrededor del 88% consideraron adecuado el método de evaluación empleado por el profesor. Asimismo, los alumnos puntuaron con 4.38 el grado de satisfacción del uso de dicha actividad en comparación con otro tipo de actividades complementarias realizadas durante el curso académico.

Entre los aspectos más valorados de la actividad de innovación docente propuesta por el profesor, los alumnos participantes destacaron la nota y el entretenimiento, seguido muy de cerca de la fomentación al estudio.

Finalmente, prácticamente la totalidad de los alumnos encuestados (95%) consideraron interesante incluir esta actividad en cursos posteriores.

CONCLUSIÓN

Sin duda, existen bases que demuestran el beneficio del uso del crucigrama como herramienta didáctica en el proceso de enseñanza-aprendizaje (Akl y cols., 2010; Weisskirch, 2006; Childers, 1996), ya que es un elemento que despierta en el alumno habilidades que le permitirán el perfeccionamiento de sus capacidades en la toma de decisiones. El desarrollo de la capacidad de análisis en períodos breves de tiempo y en condiciones cambiantes, ayuda a fomentar los hábitos y habilidades profesionales para la evaluación de la información técnica y la toma de decisiones colectivas.

En esta actividad de innovación docente se ha observado una buena respuesta al uso de crucigramas como herramienta para el aprendizaje de la asignatura de Farmacia clínica por parte de los alumnos de último curso de la Licenciatura de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Esta metodología docente involucra al estudiante en el proceso de aprendizaje y supone un interesante método para adquirir los conocimientos de la materia, ya que genera entusiasmo entre los alumnos y de esta manera se estimula el proceso cognitivo orientado al estudio de la Farmacia Clínica.

Entre los aspectos más valorados por los estudiantes participantes están el reflejo que ha tenido sobre la nota final y el entretenimiento que supone una actividad de carácter lúdico con sus compañeros de clase, seguido de la ayuda al estudio.

En la aplicación de esta propuesta innovadora casi todos los estudiantes participantes encuestados valoraron muy positivamente esta iniciativa y recomendaron que se continuara realizando en los próximos años.

Bibliografía

1. Akl, E., Pretorius, R., Sackett, K., Erdley, W., Bhoopathi, P., Alfarah, Z., & Schünemann, H., (2010). The effect of educational games on medical students' learning outcomes: A systematic review. *Medical Teacher*, 32 (1), 16.
2. Alvarado, J.C., Moreira, E.N., Barbosa, P.C., Burlan, J.B., Gelfuso, M.V., Thomazini, D., Vieira, A. S. B., Cavalcante, M. D. S. y Bello Cruz, J. G., (1995). Los juegos didácticos en la motivación de la clase de consolidación. *Pedagogía (Cuba)*, 958.
3. Cedeño, M., (1995). Juegos y materiales didácticos para la educación integral en salud de niños y adolescentes. *Pedagogía (Cuba)*, 95.
4. Childers, C. D. (1996). Using crossword puzzles as an aid to studying sociological concepts. *Teaching Sociology*, 24, 231-35.
5. Crossman, E.K., Crossman, S. M. (1983). The crossword puzzle as a teaching tool. *Teaching of Psychology*, 10, 98-99.
6. Fernández-Arévalo, M., Delgado Quintana, M.O., García López, I., García Márquez, J.A., Saborido Ceballos, A., Vega Pérez, J.M. (2010). Impacto del Plan Piloto para el EEES en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. *Ars Pharm*, 51 (2), 479-486
7. García-Asuero, A. (2011) The White Book of the Title of Grade in Pharmacy: land of arrival or point of departure. *Quo vadis Pharmacy?*, *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 77 (3), 25-32.
8. Gras Ávila, E., Rojo Cordero, P., Ros Rodríguez, JM., Encinas Cerezo, MT., y Gilbert Santos, JA. (2011) Farmacología, juegos y b-learning en el Campus Virtual. In VI Jornada Campus Virtual UCM. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 215-220.
9. Weisskirch, R. (2006). An analysis of instructor-created crossword puzzles for student review. *Collage Teaching*, 54 (1), 198-202.

Diterpenos labdánicos antiinflamatorios aumentan la supervivencia de ratones con endotoxemia.

Irene Cuadrado¹, Florencia Cidre², Sandra Herranz², Ana Estevez-Braun³, Beatriz de las Heras¹ y Sonsoles Hortelano².

INTRODUCCIÓN

La respuesta inflamatoria sistémica secundaria a infección se denomina sepsis. La incidencia y morbilidad de la sepsis han aumentado notablemente en los últimos veinte años, siendo una de las principales causas de muerte. Durante el inicio de la sepsis los macrófagos constituyen la primera línea de defensa frente a la infección a través de la unión entre los PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) y los receptores Toll-like (TLRs). Como consecuencia de esta unión se activa una compleja cascada de señalización que induce la producción de mediadores proinflamatorios como óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), citoquinas y activación del fenotipo fagocítico. Todo ello contribuye al shock séptico, fallo multiorgánico y finalmente a la muerte. (1)

La activación en el macrófago del receptor TLR4 por el lipopolisacárido (LPS) produce el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88, que facilita finalmente la activación del complejo TAK-1 (Transforming growth factor β -activated kinase-1), induciendo la fosforilación de MAP Kinasas e I κ B kinasas (IKK) (2-4). Esta vía de

señalización produce la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, coordinando la inducción de genes que codifican numerosos mediadores inflamatorios (5). Por todo ello, la excesiva activación de los TLRs puede ser causa de numerosas patologías. En este contexto, modular la respuesta inducida por patógenos o la sobreproducción de mediadores proinflamatorios es una estrategia terapéutica en muchas enfermedades inflamatorias crónicas, entre ellas la sepsis.

Los productos naturales constituyen una fuente potencial en el desarrollo de nuevos medicamentos. Entre ellos, los terpenos son un grupo químico que han demostrado tener propiedades antiinflamatorias y antiinfecciosas. (6) Recientemente nuestro grupo ha evaluado una serie química de 9 diterpenos labdánicos derivados del labdaneidol. Algunos compuestos de esta serie mostraron propiedades antiinflamatorias al inhibir la liberación de determinados mediadores como NO y PGE2 en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (7). En este trabajo hemos seleccionando el diterpeno metil éster del ácido labdanólico (LAME) para profundizar en su mecanismo de acción antiinflamatoria (Figura 1).

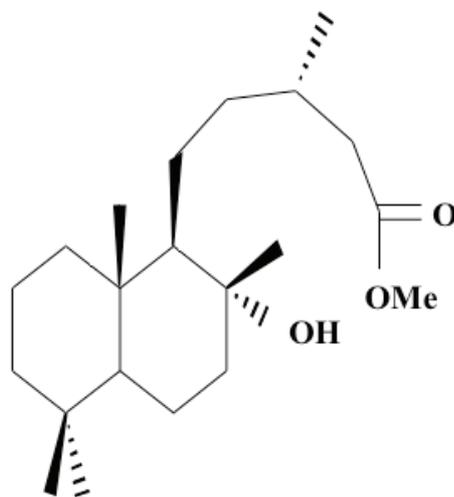


Figura 1. Estructura química del diterpeno metil éster del ácido labdanólico (LAME)

1. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid. **2.** Unidad de Inflamación y Cáncer. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. **3.** Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González". Universidad de La Laguna, Tenerife.

MÉTODOS

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratones Balb/c, con inyección previa de tioglicolato al 10% (8) y se mantuvieron a una confluencia de $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$ en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 2% de penicilina/estreptomina. La inducción de shock endotoxémico se llevó a cabo en ratones Balb/c (6-8 semanas), libres de patógenos que recibieron una inyección intraperitoneal de LPS de *E. coli* (10 mg/kg) en ausencia y presencia de LAME (20 mg/kg), monitorizando la supervivencia durante 7 días. A los 90 minutos de la inyección de LPS, se extrajeron muestras de sangre para evaluar los cambios en los niveles séricos de citoquinas (TNF- α , IL-6). Se siguieron los principios bioéticos de la Declaración de Helsinki.

RESULTADOS

El primer paso fue evaluar la viabilidad celular en macrófagos peritoneales de ratón en presencia de este compuesto, mediante ensayo MTT y técnicas de citometría de flujo. El tratamiento con LAME a dosis crecientes (0-100 μM), no produjo disminución de la viabilidad celular hasta una concentración de 10 μM , concentración que utilizamos en los sucesivos experimentos. Para confirmar los efectos antiinflamatorios observados con este compuesto, determinamos mediante Western blot la expresión de las enzimas proinflamatorias NOS-2 y COX-2 en macrófagos peritoneales. En células estimuladas con LPS y tratadas con LAME la expresión de ambas enzimas está inhibida, siendo el efecto sobre la enzima NOS-2 más marcado. Además, realizamos el análisis del RNAm de ambas enzimas mediante PCR cuantitativa y los resultados obtenidos sugerían que LAME inhibía la inducción de ambas enzimas a nivel transcripcional.

La activación de NF- κB desempeña un papel relevante en la respuesta inflamatoria, por lo que evaluamos el efecto de LAME sobre los niveles citosólicos de la proteína I $\kappa\text{B}\alpha$ en macrófagos activados con LPS a distintos tiempos. La fosforilación de I $\kappa\text{B}\alpha$ estaba aumentada en presencia de LPS e inhibida tras el tratamiento con LAME. Así mismo se observó inhibición de la translocación del factor NF- κB al núcleo. El estudio mediante microscopía confocal de

la localización subcelular de I $\kappa\text{B}\alpha$ y I $\kappa\text{B}\beta$ en macrófagos activados confirmó la inhibición de la degradación de proteínas I κB en presencia de LAME.

El siguiente paso fue determinar mediante Western blot el estado de activación de distintas MAPKs (ERK, JNK y p-p38). El tratamiento de las células con LPS provocó una fosforilación marcada de estas enzimas, mientras que los niveles de estas proteínas estaban disminuidos en presencia de LAME. Los niveles de las formas totales de estas enzimas permanecieron constantes.

El hecho de que LAME mostrara inhibición tanto de la vía de activación de MAPKs como del factor de transcripción NF- κB , nos llevó a analizar su acción sobre TAK-1, diana anterior en la vía de señalización por LPS. LAME también inhibía la fosforilación de TAK-1.

Además, determinamos mediante PCR cuantitativa y ELISA los niveles de otros mediadores inflamatorios como IL-6, TNF- α e IP-10, observando que también estaban reducidos en presencia de LAME.

Finalmente, quisimos confirmar la actividad antiinflamatoria de LAME in vivo en un modelo de endotoxemia en ratón. Los resultados obtenidos indicaron que LAME aumentaba la supervivencia de los animales tratados con el compuesto, lo que sugería una acción protectora de este diterpeno frente a la muerte por sepsis. Estos datos fueron corroborados cuando determinamos los niveles séricos de las citoquinas, TNF- α e IL-6 en los animales tratados, observando una disminución significativa de los mismos.

CONCLUSIONES

El diterpeno LAME objeto de estudio en el presente trabajo inhibe la respuesta inflamatoria en macrófagos, mediante inhibición transcripcional de la expresión de las enzimas NOS-2 y COX-2 y de la liberación de citoquinas (TNF- α , IL-6). LAME inhibe la activación de distintas MAPKs (JNK y ERK), así como la enzima TAK-1 y la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κB (Figura 2). El tratamiento con LAME aumentó significativamente la supervivencia de animales con endotoxemia, con reducción de los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias.

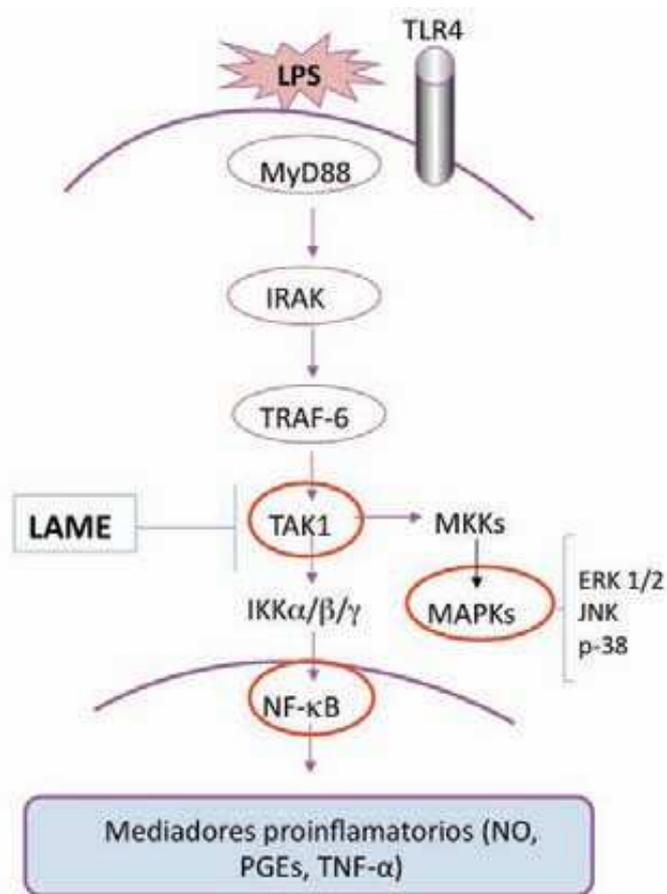


Figure 2. Modelo propuesto del efecto antiinflamatorio de LAME

Bibliografía

- Schnare, M; Barton, G.M.; Holt, A.C.; Takeda, K.; Akira, S.; Medzhitov, R.: Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 2001; 2: 947-950.
- Kawai, T.; Akira, S.: TLR signaling. *Cell Death Differentiation*, 2006; 13: 816-825.
- Keating, S.E.; Maloney, G.M.; Moran, E.M.; Bowie, A.G.: IRAK-2 Participates in multiple Toll-like Receptor signaling pathways to NF-κB via activation of TRAF6 ubiquitination. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282: 33435-33443.
- Takaesu, G.; Ninomiya-Tsuji, J.; Kishida, S.; Li, X.; Stark, G.R.; Matsumoto, K.: Interleukin-1 (IL-1) Receptor-Associated Kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 2001; 21: 2475-2484.
- Gomez, P.F.; Pillinger, M.H.; Attur, M.; Marjanovic, N.; Dave, M.; Park, J.; Bingham, C.O.; III, Al Mussawir, H.; Abramson, S.B.: Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 2005; 175: 6924-6930.
- de las Heras, B.; Hortelano, S.: Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflammation and Allergy Drug Targets*, 2009; 8: 28-39.
- Giron, N.; Perez-Sacau, E.; Lopez-Fontal, R.; Amaro-Luis, J.M.; Hortelano, S.; Estevez-Braun, A.; de las Heras, B.: Evaluation of labdane derivatives as potential anti-inflammatory agents. *European Journal of Medical Chemistry*, 2010; 45: 3155-3161.
- Zeini, M.; Traves, P.G.; Lopez-Fontal, R.; Pantoja, C.; Matheu, A.; Serrano, M.; Bosca, L.; Hortelano, S.: Specific contribution of p19(ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *The Journal of Immunology*, 2006; 177: 3327-3336.