



## **XLIII LECCIÓN CONMEMORATIVA**

**JIMÉNEZ DÍAZ**

Madrid, 19 Mayo 2011

**“Metabolismo, metabolómica  
y el descubrimiento de nuevos  
biomarcadores y medicinas”**

**Prof. José M Mato**  
CIC bioGUNE



Muchas gracias a todos por venir. Me emociona ver tanta gente y reconocer tantas caras de amigos y colaboradores, es un honor. También es un honor que la Fundación Conchita Rábago me haya concedido este premio. Impartir la Lección Conmemorativa Jiménez Díaz es un premio especial para mí. Yo inicié mi formación científica aquí con Manuel Serrano Ríos, en su laboratorio del Instituto de Investigaciones Médicas. No conocí a Jiménez Díaz pero me beneficié de su legado. El Instituto de Investigaciones Médicas de la Fundación Jiménez Díaz era una isla dentro del sistema hospitalario español que ofrecía una oportunidad única para iniciarse en la investigación biomédica. Un pequeño grupo de químicos, biólogos y médicos iniciamos nuestra carrera científica en la Fundación hace 40 años. Creo que este premio es también un reconocimiento a esa generación, que se ha convertido en sexagenaria sin darse cuenta, de la que formo parte.

Mi estancia en la Fundación Jiménez Díaz fue una experiencia inolvidable. Tuve la suerte de conocer a personas que han significado mucho para mí, tanto profesional como personalmente. De algunas personas que conocí entonces no me podría olvidar hoy, como Ángeles García Pardo que hacía el doctorado en el departamento de Inmunología. Hicimos una gran amistad, que aún perdura, y que se extendió a nuestros cónyuges y más tarde también a mis hijos. También trabé una amistad entrañable con Manuel Oya, un hombre que amaba la vida y que falleció inesperadamente hace unos años, y con Isabel Valverde, con quien mantuve una estrecha relación personal y profesional durante mi segunda etapa en la Fundación, y con Luís Hernando, con quien siempre me ha gustado conversar y de quien he aprendido muchas cosas. Y por supuesto con Manuel Serrano Ríos, un hombre extraordinario que me ofreció su amistad y me transmitió su pasión por conocer y el interés en el estudio del metabolismo.

El metabolismo es la suma de todas las reacciones químicas que tienen lugar en un organismo vivo, proporcionándole la energía necesaria para mantener su estructura, moverse, crecer, desarrollarse y reproducirse. La idea de que el metabolismo refleja la salud de un individuo es muy antigua, se remonta por lo menos a la Antigua Grecia. Las llamadas *cartas de la orina* fueron ampliamente utilizadas en la Edad Media. Estas cartas relacionaban el color, olor y sabor de la orina con diversas condiciones médicas. El color, olor y sabor de la orina tienen, por supuesto, un origen metabólico.

El primero en poner de manifiesto en la ciencia moderna la relación existente entre enfermedad y metabolismo fue Sir Archibald Garrod. Hace cien años Garrod demostró que algunas condiciones como la alcaptonuria, la cistinuria o el albinismo tienen como causa un error del metabolismo. En 1924, Otto Warburg demostró que las células tumorales metabolizaban la glucosa de manera distinta a las normales. Observó que las células tumorales tienden a metabolizar la glucosa a lactato independientemente de que haya poco o mucho oxígeno disponible. Las células normales, sin embargo, metabolizan glucosa a lactato sólo cuando el oxígeno disponible es escaso y requieren una fuente rápida de ATP, como en el músculo al hacer un esfuerzo físico. A este proceso se



le llama glucólisis aeróbica. Durante las siguientes décadas cientos de enfermedades metabólicas de origen hereditario fueron descubiertas. En general se trata de enfermedades raras. Es decir, enfermedades que afectan a un número muy reducido de individuos. Pero también se han asociado diversas enfermedades complejas, como el síndrome metabólico, las enfermedades hepáticas y cardiovasculares, y más recientemente el cáncer, a defectos en el metabolismo de los lípidos, carbohidratos, amino ácidos y la fosforilación oxidativa. Estos estudios, sin embargo, apenas han proporcionado marcadores diagnósticos o predictivos de la enfermedad, y en casi ningún caso han conducido a la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Identificar marcadores metabólicos que permitan prevenir y diagnosticar de forma temprana la enfermedad es una estrategia obligatoria para conseguir un sistema sanitario sostenible.

El desarrollo durante las dos últimas dos décadas de nuevas tecnologías de resonancia magnética nuclear (RMN) y de espectrometría de masas (MS), junto al progreso de las técnicas de estadística para el análisis de múltiples sets de datos, han permitido la determinación y modelización de los cambios en los niveles de cientos de productos del metabolismo en fluidos biológicos y tejidos, un área del metabolismo que ha recibido el nombre de metabolómica. Estas huellas o perfiles metabólicos, a modo de modernas *cartas de la orina*, ofrecen nuevas oportunidades para la identificación de marcadores de riesgo de padecer enfermedades complejas. La metabolómica también es esencial para el diagnóstico y la estratificación de pacientes, y por consiguiente un paso necesario para avanzar en el desarrollo de una medicina personalizada. Finalmente, mediante la identificación de rutas metabólicas alteradas en la enfermedad, la metabolómica puede revelar nuevas dianas terapéuticas.

Hoy voy a referirme a esta evolución de la bioquímica desde el metabolismo a la metabolómica, y al descubrimiento de nuevos biomarcadores y medicinas a través de mi historia personal. Yo hice la tesis doctoral con Theo Konijn en la Universidad de Leiden, en Holanda. Theo fue un brillante científico que se había formado con dos de los más importantes biólogos de la evolución y el desarrollo estadounidenses de la segunda mitad del siglo XX, Kenneth Raper, de la Universidad de Wisconsin, y John Bonner, de la Universidad de Princeton. Theo Konijn trabajaba en *Dictyostelium discoideum*, un organismo eucariótico que usa esporas para reproducirse. Este organismo pasa la mayor parte de su vida como amebas que se alimentan de bacterias, pero cuando se acaba el alimento, agregan formando un organismo multicelular que diferencia en esporas soportadas por un tallo de células muertas. Incidentalmente este es un ejemplo de que en Biología, en momentos de necesidad, la mejor solución es el socialismo. Las amebas de *D. discoideum*, al igual que otros muchos organismos eucarióticos, no pueden sintetizar el ácido fólico que necesitan para crecer, sino que obtienen esta vitamina de las bacterias de las que se alimentan. Theo demostró que el ácido fólico secretado por las bacterias atraía a las amebas de *D. discoideum*. Es decir, este microorganismo ha aprovechado la pérdida de la capacidad de sintetizar ácido fólico para desarrollar un nuevo mecanismo que le permite mejorar su capacidad de buscar alimento. Konijn también demostró que para



agregar, las amebas de *D. discoideum* secretan al medio AMP cíclico, una molécula que normalmente se encuentra en el interior de las células pero que en este caso sirve de sustancia quimiotáctica.

Mi trabajo de investigación en Leiden consistió en identificar la ruta de señalización iniciada por el AMP cíclico en las amebas de *D. discoideum*. Cuando llegué al laboratorio de Theo, hacía casi diez años que se había descubierto la actividad quimiotáctica del AMP cíclico pero aún nadie había conseguido saber como respondían las células a esta molécula. Tuve suerte, en dos años identifiqué que el AMP cíclico extracelular producía un aumento intracelular de GMP cíclico que mediaba la respuesta quimiotáctica en *D. discoideum*. La razón por la que nadie había examinado hasta entonces lo que ocurría con los niveles de GMP cíclico después de añadir AMP cíclico era, simplemente, que el dogma reinante en ese momento era que ambos nucleótidos cíclicos tenían funciones antagonistas. Estos trabajos con *D. discoideum*, que publicamos en los *Proc Natl Acad Sci USA*, me enseñaron que el metabolismo no es simplemente un conjunto de reacciones químicas que sirven para proporcionar a un organismo la energía necesaria para mantenerle vivo, sino que el metabolismo, además, regula procesos biológicos fundamentales tales como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular.

En 1982 pasé un año sabático en los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) en Bethesda, en el laboratorio de Elliott Schiffmann, trabajando sobre la quimiotaxis en neutrófilos. Elliott había descubierto un pequeño péptido, que era secretado por las bacterias, con potente actividad quimiotáctica en neutrófilos. El plan inicial era investigar si alguno de los mecanismos que había identificado en *D. discoideum* eran aplicables a los neutrófilos. Sin embargo, acabamos trabajando sobre el metabolismo de la metionina durante la quimiotaxis. En este cambio de planes influyeron de manera decisiva dos personas que conocí en los NIH, Giulio Cantoni y Julius Axelrod. Giulio Cantoni en los años 50 había resuelto una pregunta fundamental en bioquímica: el mecanismo de las reacciones de metilación. En el interior de las células se producen cientos de reacciones de metilación que son esenciales para regular múltiples procesos biológicos como la expresión génica o la eliminación de sustancias tóxicas. Giulio aisló y determinó la estructura de la S-adenosilmetionina (SAME), demostrando que esta molécula era el donante de grupos metilo. Julius Axelrod había sido galardonado con el Premio Nobel de Medicina en 1970 por sus descubrimientos concernientes con la síntesis, metabolismo y almacenaje de los neurotransmisores, un proceso donde las reacciones de metilación juegan un papel fundamental.

Al regresar a España mi trabajo se centró en el estudio de la interrelación entre el metabolismo de la metionina, la enfermedad del hígado graso y el carcinoma hepatocelular. ¿Por qué la metionina? ¿Por qué el hígado? Como aminoácido esencial la metionina no se sintetiza en los humanos, por lo tanto hemos de ingerir metionina o proteínas que la contengan. Aproximadamente el 50% de la metionina que ingerimos con los alimentos se cataboliza en el hígado. En 1947 Kinsell y cols. demostraron que en pacientes cirróticos el metabolismo de la metionina está notablemente reducido. Kinsell había concluido que esta



alteración del metabolismo de la metionina era consecuencia de la cirrosis. Posiblemente Kinsell no conocía los trabajos de Best, Tucker y Eckstein, y du Vigneaud realizados entre 1920 y 1930 demostrando que una dieta deficiente en metionina, colina y ácido fólico (tres nutrientes esenciales que comparten una misma ruta metabólica conocida con el nombre de ciclo de la metionina o de la metilación) inducía la formación de hígado graso en ratas. A diferencia de Kinsell, mi hipótesis era que la deficiencia en el metabolismo de la metionina en la cirrosis no era sólo una consecuencia de la enfermedad sino que contribuía asimismo al inicio y progresión de la enfermedad hepática.

Mi primer objetivo cuando regresé a la Fundación Jiménez Díaz fue determinar donde se producía la deficiencia en el metabolismo de la metionina en la cirrosis hepática en humanos. En mamíferos toda la metionina que ingerimos y no es utilizada en la síntesis de proteínas se metaboliza formando SAME, la molécula que Giulio Cantoni había descubierto en 1953. Así que lo primero que hicimos fue determinar la actividad de la enzima responsable de la síntesis de SAME, la metionina-adenosiltransferasa (MAT), en muestras de hígado de individuos con función hepática normal y con cirrosis hepática. En 1988, publicamos en la revista *Hepatology* un trabajo demostrando que la actividad de la enzima MAT se encontraba marcadamente disminuida en pacientes cirróticos con independencia de la etiología de la enfermedad. Antonio Martín-Duce, Carmen Cabrero y Pablo Ortiz, tres de mis primeros estudiantes de doctorado, fueron los co-autores de este trabajo. Demostramos también que la actividad de la enzima fosfatidiletanolamina metiltransferasa (PEMT), una reacción de transmetilación importante en la síntesis de VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) y por consiguiente en el metabolismo hepático de los triglicéridos, se encontraba también marcadamente disminuida en la cirrosis hepática.

Estos resultados demostraban que en la cirrosis hepática el metabolismo de la metionina estaba inhibido a varios niveles, lo cual explicaba por qué el metabolismo de este aminoácido se encuentra marcadamente reducido en estos pacientes. A continuación publicamos una serie de trabajos en los que demostramos que el tetracloruro de carbono, un agente que produce inflamación, estrés oxidativo y cirrosis, induce en ratas la inactivación de la enzima MAT hepática. También demostramos que el tratamiento de estos animales con SAME previene la inactivación de la enzima MAT y disminuye el daño hepático producido por esta molécula. La mayoría de estos trabajos fueron realizados por Fernando Corrales, María Pajares y Gregorio Varela-Moreiras en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), el centro adonde me había trasladado a finales de los años 80. A continuación, en colaboración con Juan Rodés y Juan Caballería, del hospital Clínic de Barcelona, llevamos a cabo un ensayo clínico, que publicamos en el *Journal of Hepatology*, en el que demostramos que el tratamiento con SAME reduce la mortalidad en pacientes con cirrosis alcohólica. Actualmente la SAME se comercializa en una docena de países para el tratamiento de la insuficiencia hepática.



Estos resultados apoyaban la hipótesis de que la inhibición de la síntesis de SAME en la cirrosis contribuía a la progresión de la enfermedad hepática. Para demostrar que la deficiencia en la síntesis de SAME también juega un importante papel en el inicio de la enfermedad, decidimos generar un ratón knockout deficiente en la síntesis hepática de SAME. Para ello tuvimos primero que clonar el gen que codifica la enzima MAT hepática, un trabajo que realizó Luís Álvarez, un investigador post doctoral que se había incorporado a mi laboratorio a finales de los años 80. Hay en el hígado tres enzimas con actividad MAT, que reciben el nombre de MATI, MATII y MATIII. Las enzimas MATI y MATIII son productos de un mismo gen, denominado *MAT1A*, mientras que la enzima MATII está codificada por un segundo gen denominado *MAT2A*. Un tercer gen, llamado *MAT2B* codifica una proteína denominada MAT $\beta$  que se une a MATII regulando su actividad. En 1996 Luís Álvarez y Beatriz Gil, una estudiante de doctorado del laboratorio, observaron que *MAT1A* se expresa casi exclusivamente en el hígado adulto mientras que *MAT2A* se expresa en todos los tejidos, incluido el hígado aunque en este órgano la expresión de *MAT2A* es muy pequeña. Ese mismo año Shelly Lu, de la Keck School of Medicine en la Universidad del Sur de California en los Ángeles, demostró que en los tumores hepáticos se produce una reprogramación de la expresión de los genes que codifican las enzimas MAT. Es decir, se inhibe la expresión de *MAT1A* y se activa la expresión de *MAT2A* y *MAT2B*. En el año 2001, publicamos conjuntamente con Shelly Lu un trabajo en los *Proc Natl Acad Sci USA* en el que demostrábamos que los ratones *MAT1A* knockout deficientes en la síntesis hepática de SAME tienen hipermetioninemia y desarrollan de forma espontánea hígado graso y carcinoma hepatocelular. Estos resultados, realizados en mi laboratorio de la Universidad de Navarra adonde me había trasladado en 1997, establecieron de forma definitiva el papel fundamental de la alteración del metabolismo de la metionina en el inicio y progresión de la enfermedad del hígado graso y su progresión a carcinoma hepatocelular. Posteriormente, en colaboración con Conrad Wagner, de la Universidad de Vanderbilt en Nashville, y con M Luz Martínez-Chantar, del CIC bioGUNE en Bizkaia, hemos generado otro modelo de ratón, deficiente en el catabolismo de la SAME, que ha confirmado esta hipótesis.

La enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD) es una enfermedad frecuente que está asociada con la obesidad y la diabetes. Debido al aumento de la obesidad y la diabetes, NAFLD es la enfermedad hepática más frecuente tanto en adultos como en niños en los países con un estilo de vida occidentalizado. La prevalencia de NAFLD en adultos en estos países es entre el 20% y el 30%, una cifra que aumenta hasta el 90% en las personas con obesidad mórbida. NAFLD varía desde la simple acumulación de triglicéridos en el hígado (esteatosis hepática) a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que se caracteriza por la presencia de esteatosis con inflamación, necrosis y fibrosis. NASH es una enfermedad progresiva que puede acabar en cirrosis, fracaso hepático y carcinoma hepatocelular en una proporción importante de pacientes. Consecuentemente, en comparación con la esteatosis, los pacientes con NASH tienen una mayor mortalidad hepática. La prevalencia de NASH en la población general es entre el 2% - 3%, una cifra que aumenta hasta el 40% en las personas con obesidad mórbida. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de



diferenciar entre estatois y NASH. El diagnóstico de NASH se hace en la actualidad mediante biopsia hepática. La biopsia hepática, sin embargo, es una técnica invasiva, cara, no exenta de subjetividad ni de complicaciones. Debido a estas limitaciones, la búsqueda de biomarcadores no invasivos de NASH se ha convertido en un área prioritaria de la investigación en hepatología.

La acumulación excesiva de grasa en el hígado se puede estimar mediante una variedad de técnicas de imagen, como la ecografía, la tomografía computacional (CT), y la imagen por resonancia magnética (MRI). Ninguna de estas técnicas, sin embargo, es capaz de distinguir entre NASH y esteatosis. La metabolómica, es decir el análisis cuantitativo de cientos de metabolitos simultáneamente mediante técnicas de MS y RMN, permite asociar perfiles metabólicos a distintas situaciones fisiológicas y fisio-patológicas. Mediante la aplicación de estas técnicas a los modelos de NAFLD a los que me acabo de referir hemos identificado en mi laboratorio del CIC bioGUNE, adonde me trasladé en 2003, en colaboración con Jonathan Barr de OWL Genomics en Bizkaia, perfiles o huellas metabólicas en el suero comunes a ratón y humanos que permiten distinguir entre NASH y esteatosis. Más recientemente hemos identificado perfiles metabólicos séricos que distinguen entre pacientes con NASH y esteatosis que dependen del índice de masa corporal (IMC). Estos resultados no sólo posibilitan el diagnóstico de NASH de una manera no invasiva, con mayor precisión, más barata y sin problemas secundarios, sino que indican que los mecanismos moleculares implicados en la formación del hígado graso y su evolución a NASH no son únicos, sino que varían dependiendo del IMC. En otras palabras, estos datos demuestran que el mecanismo por el que una persona sin sobrepeso desarrolla NASH es diferente al que tiene lugar en un paciente obeso, y ambos son distintos al mecanismo por el que una persona con obesidad mórbida desarrolla NASH. Estos resultados abren la interesante posibilidad de desarrollar terapias personalizadas para el tratamiento de NASH basadas en la información proporcionada por los estudios metabolómicos .

Son legión los estudiantes, post-doctorales y colaboradores con los que he realizado el trabajo de investigación que acabo de exponer. Pero hoy mis palabras de agradecimiento están dedicadas a Cristina. Durante 40 años no sólo ha hecho la mayor parte del trabajo de criar a nuestros hijos y mantenernos a todos unidos, sino que se ha desarraigado en numerosas ocasiones para acompañarme a través de dos continentes, cuatro países y media docena de ciudades. Su apoyo emocional y el entorno familiar estable que ha proporcionado han sido fundamentales para mi y mi trabajo. Gracias.