24

MONOGRAFÍAS DR. ANTONIO ESTEVE

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES COMO DIANA FARMACOLÓGICA

J.M. Baeyens • A. Zorzano

FUNDACION DR. ANTONIO ESTEVE

© 1999, Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2. E-08032 Barcelona.
Teléfono: 93 436 84 05; Fax: 93 450 48 99

Depósito legal: B.- 41.988-96
Coordinación y producción:
Ediciones Doyma, S.A.
Travesera de Gracia, 17-21. E-08021 Barcelona
Impreso en España por Gráficas Almogávares
Printed in Spain

La Fundación Dr. Antonio Esteve contempla como objetivo prioritario el estímulo del progreso de la terapéutica por medio de la comunicación y la discusión científica. La Fundación quiere promover la cooperación internacional en la investigación farmacoterapéutica y, a tal fin, organiza reuniones internacionales multidisciplinarias donde grupos reducidos de investigadores discuten los resultados de sus trabajos. Estas discusiones son recogidas en las publicaciones de los Esteve Foundation Symposia. Otras actividades de la Fundación Dr. Antonio Esteve incluyen la organización de reuniones dedicadas a la discusión de problemas de alcance más local y publicadas en el formato de la presente monografía. La Fundación participa también en conferencias, seminarios, cursos y otras formas de apoyo a las ciencias médicas, farmacéuticas y biológicas y, con carácter bienal, concede un premio al mejor artículo publicado por un autor español dentro del área de la farmacoterapia.

Tanto la introducción como los artículos y discusiones de la presente monografía recogen la opinión de los correspondientes autores, por lo que la Fundación Dr. Antonio Esteve no se hace necesariamente partícipe de su contenido.

AGRADECIMIENTOS

La Fundación Dr. Antonio Esteve desea expresar su agradecimiento a Marcel Brosa por el diseño del programa *System Chair* y su adaptación técnica para la gestión informática de la moderación de las mesas redondas que dan lugar a la edición de estas monografías, así como a Pere Gavaldà y a sus colaboradores por su contribución en las distintas fases de dicho proceso.

Transducción de señales como diana farmacológica

J.M. Baeyens y A. Zorzano

Introducción 9

A. García de Herreros

Regulación de la adhesión intercelular y de la movilidad de células intestinales 11

A.M. Planas, C. Justicia, M. Soriano, A. Estrada y O. Sanz

Mecanismos moleculares implicados en la isquemia y excitotoxicidad cerebral 21

R. Jaén, M. Pérez-Morán y R. Borges

Mecanismos moleculares implicados en la secreción de catecolaminas por las glándulas suprarrenales 31

F. Mayor, Jr.

Mecanismos de regulación de receptores acoplados a proteínas G 41

R. Maldonado

Mecanismos moleculares implicados en la dependencia opiácea 49

J.C. Leza, B. Cuéllar, I. Lizasoain, M.A. Moro y P. Lorenzo

Papel del óxido nítrico en la abstinencia opiácea 55

I. Sáenz de Tejada y Gorman

El óxido nítrico en la erección: del laboratorio a la aplicación clínica 73

P. Kaliman, J. Canicio y A. Zorzano

Identificación de vías intracelulares implicadas en la diferenciación muscular 81

V. Sánchez Margalet, J. Santos Álvarez y C. González Yanes

Señalización del receptor de pancreastatina: *cross-talk* con el receptor de insulina 89

R. Bartrons

Antiinflamatorios no esteroides en la prevención del cáncer de colon 99

A. Muñoz y C. Caelles

Potencial farmacológico de inhibidores de la *Jun N-Terminal Kinase* (JNK) 109

J. Moscat y M.T. Díaz Meco

Nuevas dianas terapéuticas en la transducción de señales por proteincinasas C 117

Relación de participantes

José Manuel Baeyens

Departamento de Farmacología
y de Terapéutica
Facultad de Medicina.
Universidad de Granada
Avda. de Madrid, s/n
18012 Granada

Ramon Bartrons

Unitat de Bioquímica. Departament
de Ciències Fisiològiques
Divisió de Ciències de la Salut.
Universitat de Barcelona
Campus de Bellvitge.
Freixa Llarga, s/n
08907 L'Hospitalet de Llobregat.

Ricardo Borges

Departamento de Medicina Física
y Farmacología
Facultad de Medicina. Universidad
de La Laguna
38071 La Laguna

Fèlix Bosch

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona

Oriol Bulbena

Departamento de Bioanalítica Médica
Instituto de Investigaciones Biomédicas
de Barcelona. CSIC-IDIBAPS
Jordi Girona, 18-26
08034 Barcelona

Antonio Celada

Departament de Fisiologia Animal
Facultat de Biologia. Universitat
de Barcelona
Avda. Diagonal, 645
08028 Barcelona

Valentín Ceña

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina. Universidad
Miguel Hernández
Campus de San Juan. Apdo. Correos 374
03080 Alicante

Sergio Erill

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona

Vicente Felipo

Instituto de Investigaciones
Citológicas
Fundación Valenciana
de Investigaciones Biomédicas
Amadeo de Saboya, 4
46010 Valencia

Eduardo Fernández Segura

Departamento de Biología
Celular
Facultad de Medicina. Universidad
de Granada
Avda. de Madrid, s/n
18012 Granada

Antonio García de Herreros

Unitat de Biologia Cel.lular
i Molecular
Institut Municipal d'Investigació
Mèdica
Dr. Aiguader, 80
08003 Barcelona

Agustina García Sánchez

Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular
Institut de Biologia Fonamental
Villar Palasí.
Universitat Autònoma
de Barcelona
Campus de Bellaterra
08193 Bellaterra

Amadeu Gavaldà

Departamento
de Farmacología
Almirall-Prodesfarma, S.A.
Cardener, 68-74
08024 Barcelona

Perla Kaliman

Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular
Facultat de Biologia. Universitat
de Barcelona
Avda. Diagonal, 645
08028 Barcelona

Juan Carlos Leza

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina.
Universidad Complutense
de Madrid
Avda. Complutense
28040 Madrid

Rafael Maldonado

Departamento de Neurofarmacología
Facultad de Ciencias de la Salud
y de la Vida
Universitat Pompeu Fabra
Doctor Aiguader, 80
08003 Barcelona

Federico Mayor, Jr.

Departamento de Biología Molecular
y Centro de Biología Molecular
"Severo Ochoa"
(CSIC-UAM)
Universidad Autónoma de Madrid
Canto Blanco
28049 Madrid

Jorge Moscat

Laboratorio GlaxoWellcome-CSIC
de Biología Celular y Molecular
Centro de Biología Molecular
"Severo Ochoa"
(CSIC-UAM)
Universidad Autónoma de Madrid
Canto Blanco
28049 Madrid

Alberto Muñoz

Instituto de Investigaciones
Biomédicas
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas
Arturo Duperier, 4
28029 Madrid

Manuel Palacín

Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona
Avda. Diagonal, 645
08028 Barcelona

Anna M. Planas

Departamento de Farmacología
y Toxicología
Instituto de Investigaciones
Biomédicas de Barcelona.
CSIC-IDIBAPS
Jordi Girona, 18-26
08034 Barcelona

Gabriel Pons

Departament de Ciències
Fisiològiques II
Unitat de Bioquímica.
Facultad de Medicina
Campus de Bellvitge.
Freixa Llarga, s/n
08907 L´Hospitalet de Llobregat.

Enrique Portillo

Departamento de Farmacología
y de Terapéutica
Facultad de Medicina.
Universidad de Granada
Avda. de Madrid, s/n
18012 Granada

Gonzalo Romero

Unidad de Biología Molecular.
División de Biología
Laboratorios Dr. Esteve, S.A.
Avda. Mare de Déu de
Montserrat, 221
08041 Barcelona

Iñigo Sáenz de Tejada y Gorman

Fundación para
la Investigación
y el Desarrollo en Andrología
(FI + DA)
Antonio Robles, 4, 9.º C
28034 Madrid

Joan Sallés

Departamento de Farmacología
Facultad de Farmacia.
Universidad País Vasco
Los Apraiz, 2
01006 Vitoria-Gasteiz

Víctor Sánchez Margalet

Departamento de Bioquímica
Clínica
Hospital Universitario Virgen
Macarena
Avda. Fedriani, 3
41071 Sevilla

Ramon Trullàs

Unidad de Neurobiología.
Departamento de Bioanalítica
Médica
Instituto de Investigaciones
Biomédicas de Barcelona.
CSIC-IDIBAPS
Jordi Girona, 18-26
08034 Barcelona

Pere Ventayol

Laboratori de Neurofarmacologia
Departament de Biologia.
Universitat Illes Balears
Ctra. de Valldemosa km 7,5
07071 Palma de Mallorca

Francesc Ventura

Departament de Ciències
Fisiológiques II Humanes
i Nutrició
Unitat de Bioquímica.
Facultat d'Odontologia
Campus de Bellvitge.
Feixa Llarga s/n
08907 L´Hospitalet de Llobregat.

Antonio Zorzano

Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular
Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona
Avda. Diagonal, 645
08028 Barcelona

Introducción

Los trabajos y debates presentados en esta monografía son el fruto de una reunión científica que, patrocinada por la Fundación Dr. Antonio Esteve, tuvo lugar a mediados de 1998 en Barcelona y permitió el intercambio de ideas entre investigadores españoles que proceden de campos de conocimiento diversos (bioquímica, farmacología o fisiología, entre otros) y que utilizan abordajes experimentales muy diferentes (desde estudios en células aisladas o en cultivo hasta análisis epidemiológicos), pero que comparten un mismo presupuesto teórico. Esta idea común implica que identificar los acontecimientos que se producen en una célula (y sus repercusiones fisiopatológicas) como consecuencia de la llegada de información procedente de otra, no sólo nos ayuda a conocer mejor el funcionamiento de nuestro organismo, sino que permite identificar puntos de actuación potencial para la búsqueda de nuevos fármacos que ayuden al tratamiento de las enfermedades que nos afectan.

La comunicación entre células implica el intercambio de moléculas de señalización (neurotransmisores, hormonas, etc.) que actúan sobre receptores específicos situados en la membrana plasmática o en el interior celular. En numerosas enfermedades se produce una alteración, primaria o adaptativa, en los mediadores químicos que cumplen la función de mensajeros intercelulares o en sus receptores celulares. Por tanto, no debe extrañar que durante muchos años la estrategia fundamental de la farmacología en la búsqueda de nuevos fármacos consistiera en identificar moléculas que, o bien modularan la cantidad del mediador químico circulante (aportando el propio mensajero o sus precursores, modificando la actividad de las enzimas encargadas de su síntesis o degradación), o bien actuaran directamente sobre los receptores para estos mediadores (activándolos o bloqueándolos).

Durante el último cuarto de siglo ha tenido lugar un extraordinario avance en la caracterización de los procesos bioquímicos celulares encargados de promover la respuesta a los mediadores químicos intercelulares. Se ha puesto de manifiesto que las proteínas receptoras de estos mediadores, en realidad, son sólo el comienzo de toda una cascada de acontecimientos celulares que implican a distintos sistemas transductores (p. ej., proteínas G) y efectores celulares (enzimas, segundos mensajeros o canales iónicos). Estos sistemas, a su vez, participarán en la regulación del grado de fosforilación de distintas proteínas celulares (mediante cinasas y fosfatasas) o en la modulación de la transcripción génica, por poner sólo algunos ejemplos. Por otra parte, cada vez existen más evidencias de la alteración de algunos de estos procesos bioquímicos en enfermedades que afectan al ser humano. Estos hechos representan todo un mundo de posibilidades para la búsqueda de nuevos fármacos que, al interferir con tales procesos, puedan ser útiles en terapéutica. Existen algunos ejemplos de fármacos de uso clínico que actúan modulando la concentración intracelular de segundos mensajeros (p. ej., los inhibidores de las fosfodiesterasas) o el funcionamiento de algunos sistemas efectores celulares (p. ej., los bloqueadores de los canales del sodio o del calcio dependientes de voltaje) pero, desde luego, son una minoría comparados con el número de fármacos que actúan modulando los efectos de los mediadores químicos intercelulares.

Resulta llamativo que entre los pocos fármacos que se empleaban a principios de siglo y todavía tienen bastante uso clínico se encuentren varios productos que actúan sobre los sistemas de transducción de señales, como las xantinas, los nitratos, los digitálicos o los anestésicos locales. Por tanto, parece que reorientar la búsqueda de nuevos fármacos hacia sustancias que tengan como diana tales sistemas puede ser extraordinariamente productivo para la farmacología.

Entre los objetivos de la Fundación Dr. Antonio Esteve se encuentra promover el intercambio multidisciplinario de conocimientos. Los participantes en esta reunión consideramos éste como uno de los mayores logros del encuentro y queremos dejar constancia de nuestro agradecimiento a la Fundación y a su Director, el Prof. Sergio Erill, por haberlo hecho posible.

J.M. Baeyens* y A. Zorzano**
*Departamento de Farmacología
y de Terapéutica. Universidad de Granada.
**Departament de Bioquímica i Biologia
Molecular. Universitat de Barcelona.

Introducción

Los trabajos y debates presentados en esta monografía son el fruto de una reunión científica que, patrocinada por la Fundación Dr. Antonio Esteve, tuvo lugar a mediados de 1998 en Barcelona y permitió el intercambio de ideas entre investigadores españoles que proceden de campos de conocimiento diversos (bioquímica, farmacología o fisiología, entre otros) y que utilizan abordajes experimentales muy diferentes (desde estudios en células aisladas o en cultivo hasta análisis epidemiológicos), pero que comparten un mismo presupuesto teórico. Esta idea común implica que identificar los acontecimientos que se producen en una célula (y sus repercusiones fisiopatológicas) como consecuencia de la llegada de información procedente de otra, no sólo nos ayuda a conocer mejor el funcionamiento de nuestro organismo, sino que permite identificar puntos de actuación potencial para la búsqueda de nuevos fármacos que ayuden al tratamiento de las enfermedades que nos afectan.

La comunicación entre células implica el intercambio de moléculas de señalización (neurotransmisores, hormonas, etc.) que actúan sobre receptores específicos situados en la membrana plasmática o en el interior celular. En numerosas enfermedades se produce una alteración, primaria o adaptativa, en los mediadores químicos que cumplen la función de mensajeros intercelulares o en sus receptores celulares. Por tanto, no debe extrañar que durante muchos años la estrategia fundamental de la farmacología en la búsqueda de nuevos fármacos consistiera en identificar moléculas que, o bien modularan la cantidad del mediador químico circulante (aportando el propio mensajero o sus precursores, modificando la actividad de las enzimas encargadas de su síntesis o degradación), o bien actuaran directamente sobre los receptores para estos mediadores (activándolos o bloqueándolos).

Durante el último cuarto de siglo ha tenido lugar un extraordinario avance en la caracterización de los procesos bioquímicos celulares encargados de promover la respuesta a los mediadores químicos intercelulares. Se ha puesto de manifiesto que las proteínas receptoras de estos mediadores, en realidad, son sólo el comienzo de toda una cascada de acontecimientos celulares que implican a distintos sistemas transductores (p. ej., proteínas G) y efectores celulares (enzimas, segundos mensajeros o canales iónicos). Estos sistemas, a su vez, participarán en la regulación del grado de fosforilación de distintas proteínas celulares (mediante cinasas y fosfatasas) o en la modulación de la transcripción génica, por poner sólo algunos ejemplos. Por otra parte, cada vez existen más evidencias de la alteración de algunos de estos procesos bioquímicos en enfermedades que afectan al ser humano. Estos hechos representan todo un mundo de posibilidades para la búsqueda de nuevos fármacos que, al interferir con tales procesos, puedan ser útiles en terapéutica. Existen algunos ejemplos de fármacos de uso clínico que actúan modulando la concentración intracelular de segundos mensajeros (p. ej., los inhibidores de las fosfodiesterasas) o el funcionamiento de algunos sistemas efectores celulares (p. ej., los bloqueadores de los canales del sodio o del calcio dependientes de voltaje) pero, desde luego, son una minoría comparados con el número de fármacos que actúan modulando los efectos de los mediadores químicos intercelulares.

Resulta llamativo que entre los pocos fármacos que se empleaban a principios de siglo y todavía tienen bastante uso clínico se encuentren varios productos que actúan sobre los sistemas de transducción de señales, como las xantinas, los nitratos, los digitálicos o los anestésicos locales. Por tanto, parece que reorientar la búsqueda de nuevos fármacos hacia sustancias que tengan como diana tales sistemas puede ser extraordinariamente productivo para la farmacología.

Entre los objetivos de la Fundación Dr. Antonio Esteve se encuentra promover el intercambio multidisciplinario de conocimientos. Los participantes en esta reunión consideramos éste como uno de los mayores logros del encuentro y queremos dejar constancia de nuestro agradecimiento a la Fundación y a su Director, el Prof. Sergio Erill, por haberlo hecho posible.

J.M. Baeyens* y A. Zorzano**
*Departamento de Farmacología
y de Terapéutica. Universidad de Granada.
**Departament de Bioquímica i Biologia
Molecular. Universitat de Barcelona.

Regulación de la adhesión intercelular y de la movilidad de células intestinales

Antonio García de Herreros

Unitat de Biologia Cel.lular i Molecular. Institut Municipal d'Investigació Mèdica. Barcelona.

La diferenciación de las células intestinales se encuentra acoplada a la migración en las criptas intestinales

La cripta intestinal, la unidad proliferativa del intestino, es un sistema dinámico perfectamente regulado, en el que la diferenciación, proliferación y migración celular se hallan estrechamente acopladas[1]. Los cuatro tipos celulares maduros presentes en este epitelio (enterocitos, células mucosecretoras, células enteroendocrinas y células de Paneth) se originan a partir de una célula multipotencial, situada hacia la base de la cripta. Excepto en el caso de las células de Paneth, que migran en dirección opuesta, la génesis de estos tipos celulares se produce mediante un proceso de diferenciación continuo, durante el cual las células migran formando bandas verticales desde la base de la cripta hacia la parte superior de ésta y, posteriormente, a lo largo del villus hasta ser exfoliadas[1]. La proliferación se encuentra restringida a los dos tercios inferiores de la misma; una vez llegado a ese nivel, las células se encuentran terminalmente diferenciadas y son plenamente funcionales. En este proceso de migración y diferenciación, la capacidad de las células de establecer contactos con las células vecinas o con la matriz basal desempeña un papel crucial; por ejemplo, varios experimentos han demostrado alteraciones en la formación de las criptas cuando se incrementa o se disminuye de modo artificial la adhesión intercelular[2] (fig. 1).

Es evidente que la comprensión de una manera precisa de cómo se regulan estos procesos tiene especial importancia. Basta para ello recordar que las alteraciones en estos procesos son necesarias para la génesis de los tumores de colon, una de las principales causas de mortalidad ligada al cáncer en el mundo occidental[4]. El tratamiento de esta enfermedad no ha experimentado avance alguno en los últimos 30 años, ya que por el momento no ha sido posible hallar ningún fármaco que presente una eficiente actividad contra los tumores de este origen in vivo[5].

El estudio de los procesos de diferenciación y proliferación se ha visto tradicionalmente perjudicado por la falta de métodos reproducibles para el cultivo de células del epitelio intestinal y por el fenotipo muy indiferenciado que presentaban las líneas celulares colorrectales[6,7]. Sin embargo, durante los últimos años se han descrito varias líneas, obtenidas a partir de tumores que, en cultivo, tras alcanzar la confluencia experimentan un proceso de diferenciación semejante al que se produce en la cripta y adquieren un fenotipo semejante al de células mucosecretoras o enterocíticas maduras. Entre estas células cabe destacar las subpoblaciones M6 y M3 obtenidas a partir de la línea celular HT-29, por selección en condiciones de estrés[8]. Las células así seleccionadas son capaces de formar complejos de adhesión intercelular (uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas) y originar una monocapa de células polarizadas, con un borde en cepillo bastante bien estructurado. Por esta razón, estas células han sido utilizadas como modelo para estudiar in vitro la regulación de la diferenciación intestinal.

La diferenciación de líneas celulares intestinales se bloquea por la activación de PK-Cα

Utilizando las HT-29 M6 como modelo de trabajo se han identificado varios factores que afectan a su diferenciación. En primer lugar, se ha determinado que la adición de ésteres de forbol como el PMA impide que estas células formen contactos adecuados y bloquea la aparición del fenotipo diferenciado[9]. La adi-

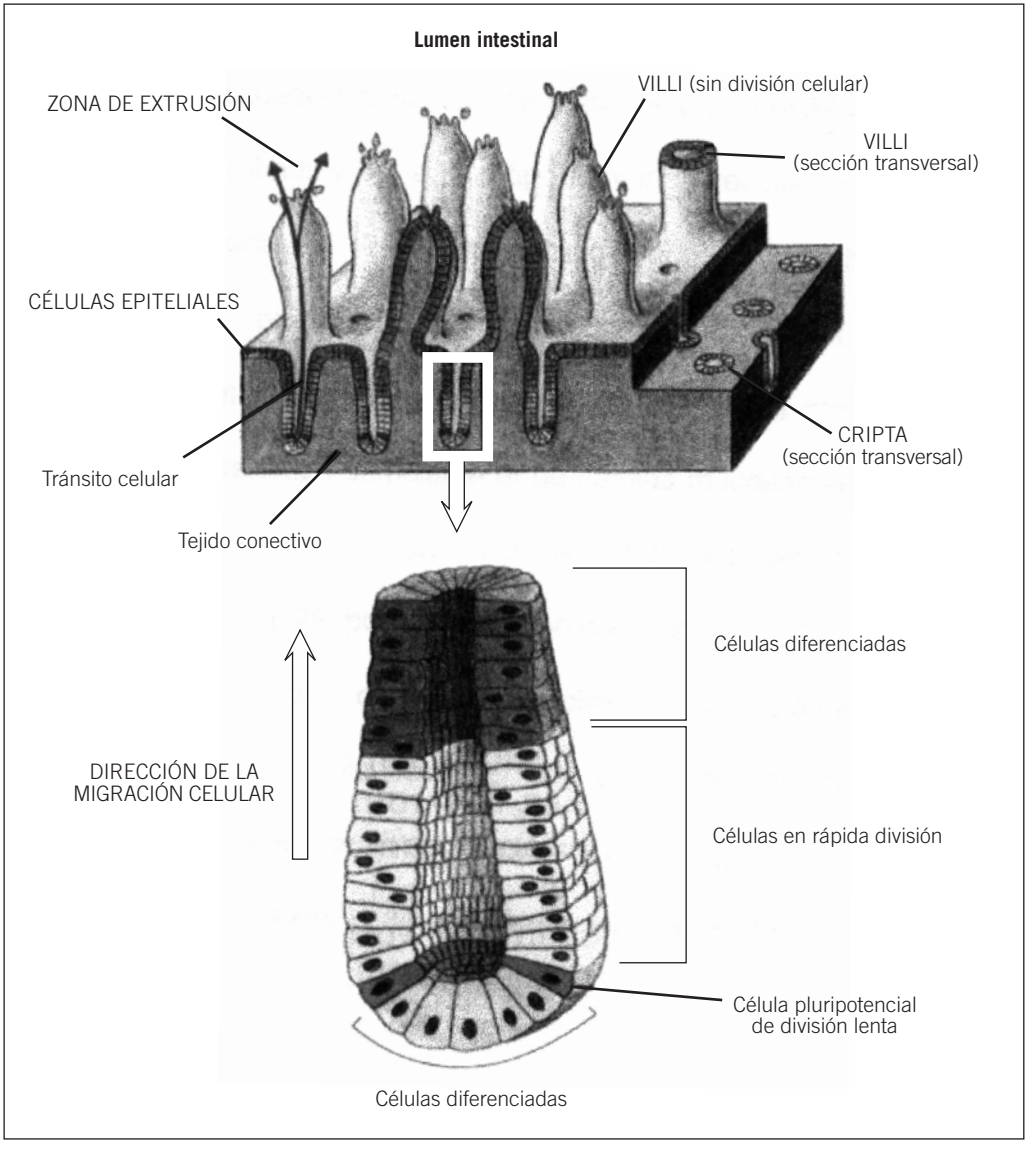


Fig. 1. Esquema del epitelio intestinal en el que se observa el tránsito cripta-villus (Tomada de Alberts et al[3].)

ción de este compuesto induce cambios celulares que han sido denominados *scattering* o dispersión; estos cambios consisten en pérdida de los contactos intercelulares, incremento de la adhesión a la matriz, incremento de la movilidad celular y, en general, adquisición de una morfología más fibroblastoide[10]. El efecto de *scattering* no es algo específico de células intestinales sino que el PMA lo induce también en otros tipos celulares epiteliales[11]. Otros factores, entre los que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es el de efecto más general, causan también el *scattering* de las células epiteliales[11].

El PMA es un activador específico de una familia de proteincinasas colectivamente deno-

minadas proteincinasa C (PK-C)[12]. Esta familia está compuesta por, al menos, 10 miembros agrupados en tres subfamilias: PK-C convencionales (cPK-C), nuevas (nPK-C) o atípicas (aPK-C); de éstos, los ocho miembros de las subfamilias c y nPK-C pueden ser activados por el PMA[13]. Se ha podido demostrar que la activación de la isoforma cPK-Cα es suficiente para inducir el proceso de *scattering*; la introducción de un mutante activado de esta isoforma causa la adquisición de un fenotipo fibroblastoide semejante al obtenido tras tratamiento con PMA[14]. Sin embargo, no se puede descartar que alguna de las otras isoformas de PK-C sensibles a PMA y presentes en estas células (nPK-C ε y η) pueda contribuir a este efecto, ya que se ha detectado la transactivación de otras formas de PK-C en las células transfectadas con el mutante activado de cPK-Cα (Llosas et al, resultados no publicados).

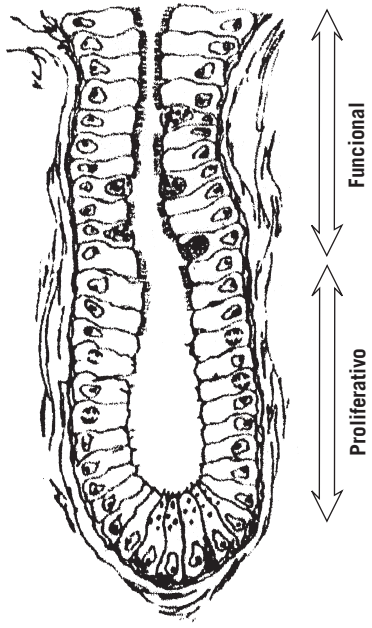
Además de inducir el *scattering* de las células HT-29 M6, el PMA, como la transfección del mutante de cPK-Cα, ejerce otro efecto aparentemente no relacionado: disminuye la velocidad de proliferación[10,14-16]. A diferencia del *scattering*, que ocurre en más tipos celulares epiteliales, este efecto es específico de las líneas celulares intestinales y parece estar relacionado con la inducción de p21cip1 y p27kip1, inhibidores de la proteincinasa dependiente de ciclinas[17]. Experimentos de tumorogénesis realizados en ratones atímicos refieren que los dos efectos observados (*scattering* e inhibición del crecimiento) se reproducen también en los tumores, y requieren un diferente grado de activación de esta enzima. Así, los clones que poseen una elevada actividad cPK-Cα son incapaces de formar tumores, mientras que los que contienen valores moderados de esta enzima originan tumores de menor tamaño y con características anatomopatológicas más invasivas[14].

¿Cómo encajan nuestros resultados dentro de un papel de la PK-C en la carcinogénesis colónica? Ciertos datos epidemiológicos habían sugerido que alguno de los miembros de esta familia podían desempeñar un papel relevante en el proceso de carcinogénesis colónica[18]. Existían, además, resultados que sugerían que alteraciones en la actividad de esta familia de enzimas podían estar relacionadas con el proceso de transformación maligna en humanos, actuando de manera diferente en los estadios tempranos y tardíos de este proceso. Así, en modelos experimentales de carcinogénesis se han detectado cambios que sugieren que una activación de la PK-C en los adenomas causa una depleción posterior de esta actividad[19,20]. Nuestros resultados indican que una activación moderada de la PK-C puede desempeñar un papel en la modulación de los contactos celulares. En condiciones normales esta modulación sería necesaria para que las células pudiesen modificar sus contactos con las células vecinas y migrar a lo largo de la cripta; una activación no regulada impediría iniciar el proceso de tumorogénesis. En células en la parte superior de la cripta la activación de la PK-Cα sería necesaria para bloquear el crecimiento celular; es en esta zona en la que se ha encontrado una asociación mayoritaria de esta isoforma con la membrana plásmática, indicativa de su activación[16]. En tumores avanzados, la depleción de esta enzima induciría el crecimiento incontrolado de células en compartimientos donde no lo haría normalmente (fig. 2).

Proteínas tirosincinasas regulan la función de la E-cadherina

La aparición del fenotipo de *scattering* es consecuencia de cambios coordinados en varias propiedades celulares como son una mayor afinidad hacia la matriz extracelular, una adhesión intercelular disminuida y una movilidad incrementada. A su vez, las modificaciones en estas propiedades de las células son consecuencia de alteraciones aparecidas en las moléculas que ejercen un papel importante en su regulación; así, por ejemplo, la pérdida de adhesión intercelular se asocia, y probablemente se debe, a una disminución en la funcionalidad de la E-cadherina[10]. Ésta es una proteína transmembrana responsable, a través de interacciones homotípicas, del establecimiento de las uniones adherentes, los complejos de unión que se establecen con más rapidez en células epiteliales[21]. Al tratar las células HT-29 M6 con PMA se produce la pérdida de funcionalidad de la E-cadherina que deja de ser capaz de interaccionar con el citosqueleto de actina[22]. En este proceso influyen proteínas tirosincinasas, puesto que inhibidores de estas enzimas (como la herbimicina), incrementan la asociación de E-cadherina con el citosqueleto y, por tanto, su funcionalidad, mientras que los inhibidores de las fosfoproteína-fosfatasas (como el ortovanadato) la disminuyen[22].

Varias proteínas tirosincinasas se han relacionado con la regulación de la E-cadherina.



Actividad	Papel fisiológico	Alteraciones tumorigénicas
Alta	Parada del crecimiento **(diferenciación)**	Depleción (crecimiento alterado)
Baja	Control de la función de la E-cadherina adhesión intercelular, migración **(migración)**	Aumento moderado de actividad (menor funcionalidad de la E-cadherina) (adhesión intercelular)

Fig. 2. Papel fisiológico de la cPK-Cα en la diferenciación y migración de las células intestinales y de sus alteraciones en procesos carcinogénicos.

Los datos más consistentes se refieren al producto del gen *v-src*; así, la transformación producida por este gen incrementa la fosforilación tanto de la beta como de la p120-catenina[23,24]. En las células HT-29 M6, la pérdida de los contactos celulares inducida por PMA se ve precedida por un incremento en la actividad del análogo celular de *v-src*, p60c-src, concomitantemente a la fosforilación de p120-catenina[20]. No se detectan cambios en el contenido en fosfotirosina de betacatenina, probablemente a causa de la elevada presencia de esta modificación en células HT-29 M6. En paralelo a la fosforilación se detectó un cambio en la asociación de E-cadherina por estas proteínas; en condiciones de control esta proteína se encuentra asociada en gran medida a betacatenina e inapreciablemente a p120-catenina; tras la fosforilación, estas proporciones se invierten[22]. Estos resultados, unidos a otros datos obtenidos en células transformadas con *v-ras*[25], han sugerido un modelo según el cual la funcionalidad de la E-cadherina, que depende de su interacción con alfacatenina y, a través de ésta, con el citosqueleto, está controlada por la fosforilación[26]. En ausencia de estímulos, la E-cadherina estaría unida a la betacatenina que actuaría de puente para su interacción con la alfacatenina; tras la fosforilación, en residuos de tirosina (indicada como PY en el esquema expuesto en la fig. 3), la afinidad de la E-cadherina hacia la p120-catenina se incrementaría y ésta desplazaría a la betacatenina del complejo, provocando la pérdida de la asociación de la E-cadherina con el citosqueleto[26]. Este modelo, basado en un cambio en afinidades relativas, dista de estar probado; una posibilidad que no lo alteraría demasiado consistiría en que la entrada de la p120-catenina en el complejo causase, no el desplazamiento de la betacatenina, sino sólo la pérdida de la interacción con la alfacatenina. En cualquier caso, la validación de este modelo requerirá la determinación de las constantes de asociación de la E-cadherina por las cateninas, tanto cuando éstas se en-

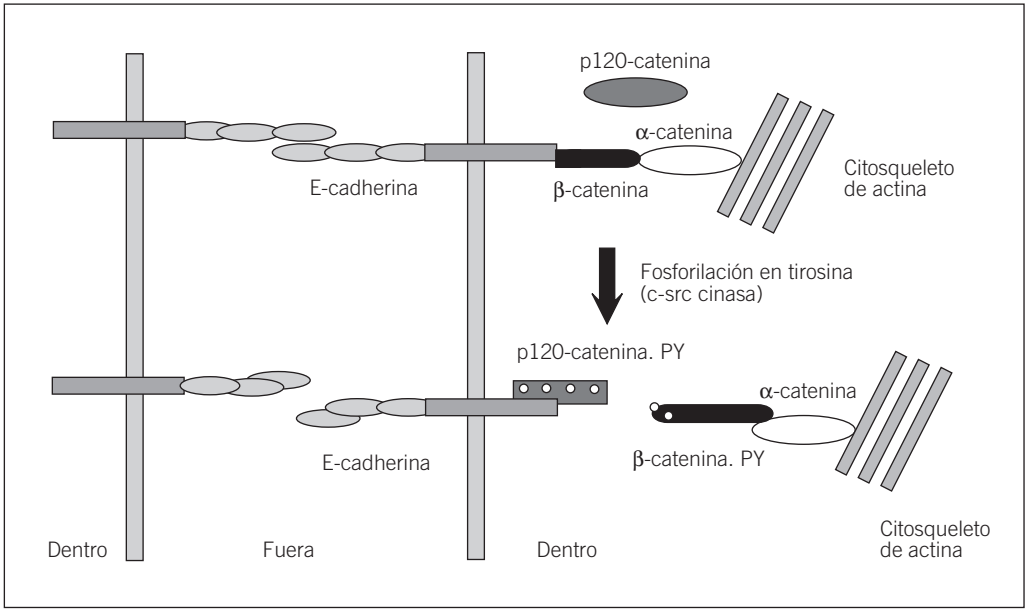


Fig. 3. Regulación de la asociación de la E-cadherina con el citosqueleto de actina mediante fosforilación en tirosina de cateninas.

cuentren fosforiladas en tirosina como en estado basal. Estudios de este tipo se encuentran ya en marcha en nuestro laboratorio utilizando proteínas recombinantes; mediante este sistema ya se ha podido determinar que la afinidad del fragmento citosólico de la E-cadherina hacia la betacatenina es mucho mayor que hacia la p120-catenina (Piedra y Duñach, resultados no publicados) (fig. 3).

La betacatenina actúa como factor transcripcional

Recientemente se ha podido demostrar que, además de ejercer un papel crucial en la formación y regulación de los contactos adherentes, la betacatenina también actúa como activador transcripcional. Diversos estudios, realizados inicialmente en *X. laevis* y *D. melanogaster* y completados en células humanas, indican que la betacatenina puede translocarse al núcleo, unirse a un factor transcripcional de la familia LEF-1 (en el intestino, hTCF-4) y activar la transcripción de una serie de genes aún desconocidos[27-29]. La capacidad de la betacatenina de trasladarse al núcleo se encuentra en función de las concentraciones de esta proteína que se encuentran en el citosol no asociadas a E-cadherina, valores que dependen principalmente de la velocidad de degradación de esta proteína. La estabilidad de la betacatenina está controlada por fosforilación en residuos de serina y treonina, modificación que realiza la proteincinasa GSK-3[27-29]. La capacidad de esta enzima para fosforilar residuos específicos de la betacatenina está muy delicadamente regulada; se ha demostrado que puede ser bloqueada por una cadena de reacciones iniciada por un factor extracelular (wnt en células eucariotas) y que requiere la acción acopladora de una proteína denominada APC[27-29].

La importancia de este nuevo papel de la betacatenina como coactivador transcripcional viene resaltada por el hecho de que esta actividad parece ser esencial para el desarrollo de los tumores de colon, cualquiera que sea su estadio. Así, mutaciones de APC que impiden que la betacatenina se degrade son un acontecimiento muy habitual en los tumores de colon (más del 85%); esta lesión parece ser la iniciadora del proceso de carcinogénesis colónico[30]. En un amplio porcentaje del 15% de los tumores restantes, en los que no se ha detectado lesión en APC, aparecen mutaciones en la betacatenina, que impiden que la proteína sea fosforilada en Ser/Thr y degradada[31]. Esto hace que, comparados con los tejidos

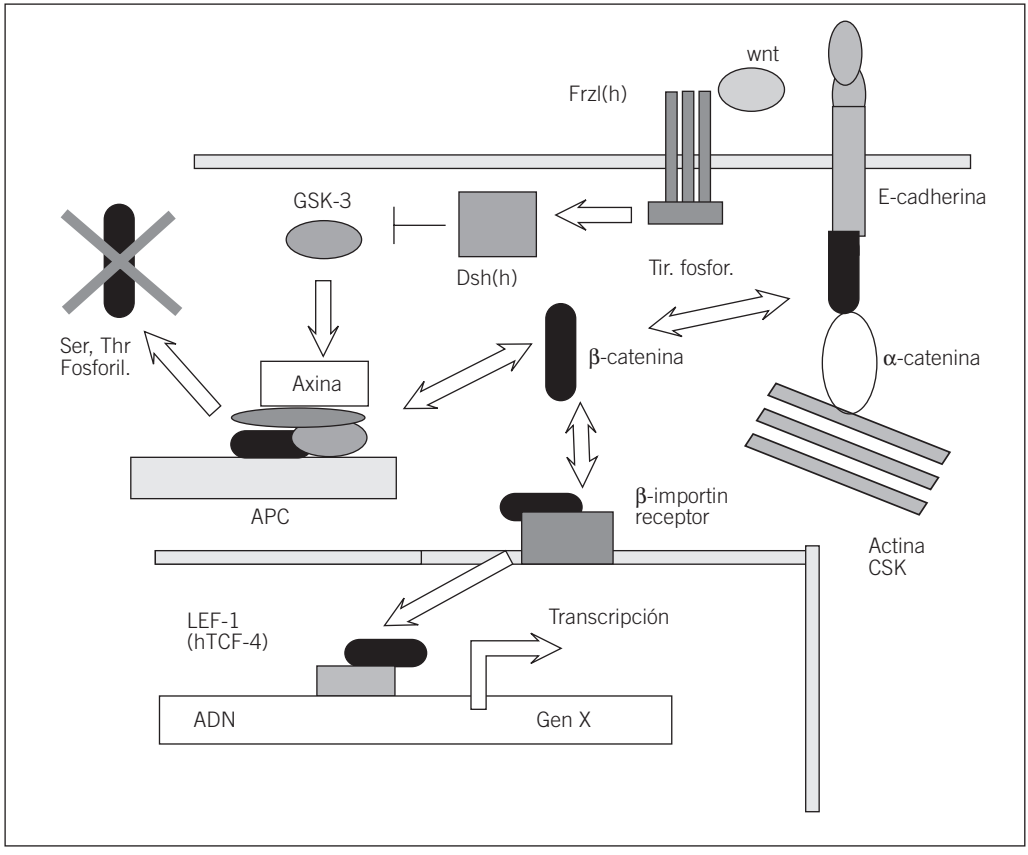


Fig. 4. Efectores del papel de la betacatenina como activador transcripcional.

normales, una gran mayoría de los tumores de colon (líneas celulares derivadas de ellos) posean concentraciones elevadas de betacatenina y una mayor presencia de esta proteína en el núcleo (Fabre et al, resultados no publicados).

Es también interesante destacar que la entrada de la betacatenina en el núcleo se realiza de una forma atípica, ya que se efectúa de manera independiente de las proteínas transportadoras clásicas (importinas)[32]. Los datos más recientes sugieren que la betacatenina interacciona con el mismo receptor que las importinas presentes en los poros nucleares[32] (fig. 4).

En las células HT-29 M6, la activación prolongada de la cPK-Cα induce la translocación al núcleo de la betacatenina. Este efecto no se debe a un incremento en las concentraciones de esta proteína puesto que estas células no son capaces de degradar la betacatenina ya que la proteína APC que expresan está mutada. La translocación al núcleo de la betacatenina se acompaña de un incremento de la actividad transcripcional mediada por betacatenina, determinada mediante ensayos de transfección transitoria de un gen *reporter* bajo la expresión de un promotor con secuencias de unión para hTCF-4. El mismo efecto se ha encontrado en otras líneas celulares intestinales con valores bajos de E-cadherina, como SW-480 (Baulida et al, resultados no publicados). Estos datos indican que la actividad transcripcional mediada por betacatenina está sujeta a regulación aun en ausencia de APC e introducen un elemento más de control en el esquema anteriormente descrito; es posible que la unión de la betacatenina al receptor nuclear también esté modulada de una manera directa. Otra posibilidad a ser considerada es

que el PMA incremente la accesibilidad de la betacatenina a los receptores debido a su menor interacción con otras proteínas.

El gran interrogante de este modelo continúa consistiendo en identificar a los genes cuya transcripción está siendo modulada in vivo por el complejo betacatenina-hTCF-4. En nuestro laboratorio se está procediendo a este estudio utilizando como sistema células SW-480, que poseen alta actividad transcripcional del complejo betacatenina-hTCF-4 y células SW-480 en las que esta actividad ha sido bloqueada mediante la introducción ectópica de una forma truncada de este factor transcripcional (ΔhTCF-4), que carece del dominio de unión para la betacatenina. La introducción de este mutante es capaz de disminuir entre seis y ocho veces la actividad basal del complejo en estas células en ensayos de expresión transitoria; en transfecciones estables las disminuciones son más modestas (tres-cuatro veces), lo que puede ser interpretado como que es necesario un cierto nivel de transcripción mediada por este complejo para que las células puedan sobrevivir en cultivo (Baulida et al, resultados no publicados). En consonancia con estos datos, la sobreexpresión de APC en células HT-29 y en otras líneas intestinales induce apoptosis[33].

Un gen candidato a ser regulado por betacatenina-hTCF-4 es la E-cadherina. Se ha propuesto que el incremento en transcripción mediada por betacatenina estaría relacionado con la transición epitelio-mesénquima y la desaparición de esta proteína que aparece frecuentemente en los tumores[34,35]. Sin embargo, varios datos indican que si la betacatenina está regulando negativamente la transcripción de la E-cadherina, no lo hace directamente. En primer lugar, la desaparición de la E-cadherina no es un acontecimiento temprano en el desarrollo de los tumores, a diferencia de la mutación de APC y el incremento en transcripción[36]. Tampoco se ha encontrado en la zona del promotor de la E-cadherina murina responsable de la especificidad de linaje epitelial la presencia de secuencias claras de unión de hTCF-4[37]. Por último, en los clones caracterizados en nuestro laboratorio en los que se ha disminuido la actividad transcripcional mediada por betacatenina tras la expresión de ΔhTCF-4 no se observa un aumento concomitante en E-cadherina, aunque la funcionalidad de esta proteína parece menor. Sin embargo, no puede descartarse que la betacatenina esté actuando en consonancia con otros estímulos, por ejemplo, factores de crecimiento, para estimular la expresión de un gen que actúe como represor de la transcripción de la E-cadherina.

Agradecimiento

Agradezco a mis colaboradores Eduard Batlle, Santiago Roura, Javier Verdú, David Domínguez, Maria del Mont Llosas, Silvia Gómez, Josep Baulida, Francesc Alameda, José A. Piedra y Mireia Duñach sus ideas y consejos, así como la realización de los experimentos presentados en este artículo. El trabajo de laboratorio ha sido financiado por la Fundación Ramón Areces, la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF94-1008 y SAF97-0080) y la Comissió Interdepartamental de Recerca i Tecnologia (ayuda GRQ 93-9301 concedida a la Unitat de Biologia Cel.lular i Molecular).

BIBLIOGRAFÍA

1. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties: lessons for and from the crypt. Development 1990; 110: 1.001-1.020.
2. Gordon JI, Hermiston ML. Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. Curr Opin Cell Biol 1994; 6: 795-803.
3. Alberts BA, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. Nueva York: Garlang, 1983; 911.
4. Parker S, Tong T, Bolden S, Wingo P. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 1996; 46: 5-27.
5. Bailar JC, Gornik HL. Cancer undefeated. N Engl J Med 1997; 336: 1.569-1.574.
6. Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. En: Field M, Frizzel RA, editores. Handbook of physiology. The gastrointestinal system. Intestinal absortion and secretion. Am Physiol Soc 1991; 4: 223-255.
7. Neutra M, Louvard D. Differentiation of intestinal cells in vitro. En: Matlin KS, Valentich J, editores. Functional epithelial cells in culture. Nueva York: Alan Liss, 1991; 363-398.
8. Lesuffleur T, Barbat A, Luccioni C, Beaumatin J, Clair M, Kornowski A et al. Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted cells. J Cell Biol 1991; 115: 1.409-1.418.
9. García de Herreros A, Fabre M, Batlle E, Balagué C, Real FX. The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate blocks differentiation of Ht-29 human colon cancer cells. J Cell Sci 1993; 105: 1.165-1.172.
10. Fabre M, García de Herreros A. Phorbol-ester-induced scattering of HT-29 human intestinal cells is associated to downmodulation of E-cadherin. J Cell Sci 1993; 106: 513-522.

11. Rosen EM, Nigam SK, Goldberg ID. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. J Cell Biol 1994; 127: 1.783-1.787.
12. Dekker LV, Palmer RH, Parker PJ. The protein kinase C and protein kinase C related gene families. Curr Opin Struct Biol 1997; 5: 396-402.
13. Newton A. Regulation of protein kinase C. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 161-167.
14. Batlle E, Verdú J, Domínguez D, Llosas MM, Díaz V, Loukili N et al. Protein kinase C-α activity inversely modulates invasion and growth of intestinal cells. J Biol Chem 1998; 273: 15.091-15.098.
15. Choi PM, Tchou-Wong KM, Weinstein IB. Overexpression of protein kinase C in HT-29 colon cancer cells causes growth inhibition and tumor suppression. Mol Cell Biol 1990; 10: 4.650-4.657.
16. Saxon ML, Zhao X, Black JD. Activation of protein kinase c isozymes is associated with postmitotic events in intestinal epithelials cells in situ. J Cell Biol 1994; 126: 747-763.
17. Frey MR, Saxon ML, Zhao X, Rollins A, Evans SS, Black JD. Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21waf/cip1 and p27kip1 and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells. J Biol Chem 1997; 272: 9.424-9.435.
18. Weinstein IB. Cancer prevention: recent progress and future opportunities. Cancer Res 1990; 51 (Supl): 5.080-5.085.
19. Baum CL, Wali RK, Stirin MD, Bolt MJG, Brasitus TA. 1,2-dimethylhydrazine-induced alterations in protein kinase C activity in the rat preneoplasic colon. Cancer Res 1990; 50: 3.915-3.920.
20. Wali RK, Frawley BP, Hatmann S, Roy HK, Khare S, Scaglione-Sewell B et al. Mechanism of action of chemoprotective ursodeoxycholate in the azoxymethane model of rat colonic carcinogenesis: potential roles of protein kinase C α, βII and ζ. Cancer Res 1995; 55: 5.257-5.264.
21. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. Curr Opin Cell Biol 1993; 5: 806-811.
22. Skoudy A, Llosas MM, García de Herreros A. Intestinal HT-29 cells with dysfunction of E-cadherin show increased pp60src activity and tyrosine phosphorylation of p120-catenin. Biochem J 1996; 317: 279-284.
23. Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT. Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. Mol Cel Biol 1989; 9: 629-638.
24. Behrens J, Vakate L, Winterhague E, VanRoy F, Mareel MM, Birchmeier W. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/β-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-src gene. J Cell Biol 1993; 120: 757-766.
25. Kinch MS, Clark GJ, Der CJ, Burridge K. Tyrosine phosphorylation regulates the adhesion of ras-transformed breast epithelia. J Cell Biol 1995; 130: 461-471.
26. Daniel JM, Reynolds AB. Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. Bioessays 1997; 19: 883-891.
27. Cavallo R, Rubenstein D, Peifer M. Armadillo and dTCF: a marriage made in the nucleus. Curr Opin Genet Dev 1997; 7: 459-466.
28. Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. Biochem Biopyhs Acta 1997; 1.332: F127-F147.
29. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signalling: a common theme in animal development. Genes & Devep 1997; 11: 3.286-3.305.
30. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 1996; 87: 159-170.
31. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B et al. Activation of β-catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in β-catenin or APC. Science 1997; 275: 1.787-1.790.
32. Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM. Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β-catenin. Curr Biol 1998; 8: 181-190.
33. Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 7.950-7.954.
34. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrman BG, Kemler R. Nuclear localization of β-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. Mech Dev 1996; 59: 3-10.
35. Dale TC. Signal transduction by the wnt family of ligands. Biochem J 1998; 329: 209-223.
36. Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S et al. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. Am J Pathol 1991; 139: 17-23.
37. Faraldo ML, Rodrigo I, Behrens J, Birchmeier W, Cano A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocytes cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. Mol Carcinog 1997; 20: 33-47.

DISCUSIÓN

A.M. Planas: Esta entrada de la betacatenina al núcleo, ¿está siempre asociada a una situación patológica, es decir, no ocurre en condiciones fisiológicas?

A. García de Herreros: En las criptas normales sólo observamos presencia de betacatenina nuclear en una célula situada cerca de la base de la cripta, que podría ser la célula ma-

dre. De hecho, APC sólo se expresa en los dos tercios superiores de la cripta y no se expresa en la parte inferior. También se puede apreciar la presencia de betacatenina nuclear en algunos casos de alteraciones preneoplásicas.

J. Moscat: En primer lugar, los experimentos realizados expresando PK-Cα, ¿habéis intentado realizarlos también con la expresión de un mutante que carezca de actividad enzimática? Lo pregunto porque la expresión de PK-Cα muchas veces produce efectos independientes de su actividad enzimática como, por ejemplo, la activación de la fosfolipasa D. En segundo lugar, en los experimentos con PMA y dado que se trata de una molécula bastante artificial, ¿cuál es el estímulo fisiológico real que estáis estudiando?

A. García de Herreros: Con PK-Cα negativo no obtuvimos clones estables, los clones morían enseguida. Probablemente esto se deba a que las células requieran un cierto nivel de PK-Cα para adherirse y ser capaces de sobrevivir. Con otras PK-C hemos observado efectos parciales. Por ejemplo, si sobreexpresamos PK-Cε se obtiene un fenotipo ligeramente parecido al de *scattering*, pero no se detiene el crecimiento. Si sobreexpresamos PK-Cη ocurre lo contrario, el fenotipo es igual pero las células proliferan más despacio. Por tanto, no podemos descartar que el efecto pudiera deberse a una transactivación. En cuanto a tu segunda pregunta, nuestra idea al utilizar PMA en estas células se basa en una serie de experimentos descritos hace tiempo, en los que Harry Wenstein, epidemiólogo molecular, y otros autores posteriormente, trataron de involucrar a la PK-Cα en la carcinogénesis. Se fundamenta en que, en pacientes con cáncer de colon, la dieta rica en grasas podría constituir un factor de riesgo tumoral, ya que la presencia de diacilglicerol en estas dietas parece actuar como activador fisiológico. De hecho, parte de este efecto puede también observarse en estas células con PMA cuando se añade diacilglicerol en cantidades muy altas.

A. Muñoz: ¿Consigues reproducir los efectos de TPA o de PMA con algún factor de crecimiento, por ejemplo? En segundo lugar, y dada la importancia de las mutaciones en el p53 o en la vía de RAS en el cáncer de colon, ¿existe alguna interacción con este sistema?

A. García de Herreros: Mi respuesta a la primera pregunta es: no en estas células. No hemos podido conseguir a la vez *scattering* y parada del crecimiento. Sólo hemos observado uno u otro efecto, pero no los dos a la vez. Sobre la segunda cuestión, cabría mencionar que nuestra idea se fundamenta en que la activación del APC es un efecto inicial. Se sabe que la expresión de p53 bajo el control de un promotor en el intestino de animales transgénicos no induce el desarrollo de ningún tipo de proliferación celular. Creemos que el APC y la betacatenina generan más células madre o generan células que están fijadas en un compartimiento determinado y que son capaces de proliferar sin migrar. Es decir, una mutación en RAS en una célula normal no fijada hace proliferar más deprisa células que ya proliferan rápido, y conducirá a la migración y el desprendimiento celular sin producir ningún tipo de alteración. Pero si se incrementa el número de células que son capaces de proliferar sin migrar se crea un nuevo foco de cripta y se generan más células madre, lo que favorece que mutaciones posteriores que afecten a su velocidad de proliferación sean capaces de incidir sobre su capacidad carcinogénica.

Mecanismos moleculares implicados en la isquemia y excitotoxicidad cerebral

Anna M. Planas, Carles Justicia, Marc Soriano, Anna Estrada y Olga Sanz

Departamento de Farmacología y Toxicología. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona. CSIC. IDIBAPS. Barcelona.

Introducción

Durante un episodio de isquemia cerebral se produce una interrupción o reducción del flujo sanguíneo y, en consecuencia, del aporte de glucosa y de oxígeno a las células neurales afectadas. En el núcleo de la zona isquémica, es decir, la zona que sufre la disminución más importante de flujo sanguíneo, se desarrolla un infarto con signos de necrosis manifiestos a las 24 h. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo también se observan alteraciones de la morfología celular en las zonas colindantes, puesto que el tamaño de la lesión aumenta progresivamente según se va desarrollando el infarto cerebral en los días que siguen al episodio isquémico[1]. Se ha propuesto que en la isquemia se producen fenómenos de excitotoxicidad mediada por receptores de glutamato[2]. Por esta razón, los cambios en la señalización intracelular que ocurren previamente a la muerte neuronal podrían ser similares tanto en la penumbra como en situaciones de excitotoxicidad. En este sentido, estudiaremos determinadas señales intracelulares tanto en la penumbra isquémica como en modelos de excitotoxicidad, tras inyección de ácido caínico en rata, para dilucidar la implicación de determinadas vías de señalización intracelular en respuesta a la agresión, y su posible relación con la muerte o supervivencia celular.

Tanto la isquemia como la excitotoxicidad provocan cambios en el patrón de expresión génica con la inducción de genes que normalmente no se expresan. Dentro de este grupo examinaremos la expresión del gen que codifica para la proteína de estrés celular denominada Hsp70 (72 kD, *Heat shock protein*)[3-12], el protooncogén c-*fos*[9,12-15] y el gen de la ciclooxigenasa 2[9,16,17]. Hsp70 pertenece a una extensa familia de proteínas, denominadas HSP, altamente conservadas en eucariotas[18], que entre otras funciones tienen la de acompañar a otras proteínas para permitir su plegamiento, ensamblaje y translocación a través de membranas[19-23]. Algunos miembros de la familia HSP están expresados de forma constitutiva, mientras que otros como la Hsp70 se inducen en situaciones de estrés. Múltiples evidencias experimentales indican que en dichas condiciones las HSP ejercen un efecto protector[18-20,24]. Dicho efecto podría estar mediado por la unión de HSP a proteínas desnaturalizadas que se generan en condiciones de estrés celular[25].

El c-*fos* está implicado en la regulación de la transcripción génica y participa en procesos celulares fundamentales, ya que transporta señales citoplasmáticas hacia el núcleo donde interacciona con el ADN[26]. Frecuentemente la inducción del gen c-*fos* se puede correlacionar con incrementos de la actividad eléctrica y metabólica de las células[27]. Por ello, la expresión de c-Fos se puede utilizar como marcador de la actividad neuronal[28,29]. La ciclooxigenasa (Cox) es una enzima que metaboliza el ácido araquidónico a prostanoides. Existen evidencias experimentales que sugieren que el metabolismo del ácido araquidónico contribuye a los efectos neurotóxicos que se producen después de la isquemia, durante el período de reperfusión[30]. Se ha caracterizado a dos genes de la Cox: Cox-1, que está expresado de forma constitutiva, y Cox-2, que es inducible en respuesta a la inflamación[31]. La Cox-2 se induce también en neuronas mediante estimulación eléctrica[32], convulsiones[9,33] e isquemia[9,16,17].

Material y métodos

Se han utilizado ratas macho adultas (250-320 g de peso corporal) de la cepa Sprague-Dawley (Iffa-Credo, Lyon, Francia). El trabajo con animales de experimentación se ha realizado bajo las normas vigentes en España y de

Este trabajo se ha realizado con un Proyecto del Fondo de Investigaciones Sanitarias (97/0490).

acuerdo con las directrices de la Unión Europea (86/609/CEE, 24 de noviembre de 1986). Causamos una isquemia cerebral focal transitoria (1 h) por oclusión intraluminal de la arteria cerebral media (ACM) en la rata, como se ha descrito previamente[34,35]. Los controles fueron animales sometidos a la operación quirúrgica pero a los que sólo se les ocluyó la ACM durante un período de tiempo inferior a 1 min. Los estudios de excitotoxicidad se llevaron a cabo mediante administración intraperitoneal de ácido caínico (9 mg/kg de peso corporal), como hemos descrito anteriormente[5,6]. Los controles recibieron una inyección de suero fisiológico. La hibridación in situ se llevo a cabo utilizando oligonucleótidos de ADN específicos para Hsp70[5,6], c-*fos*[12] y Cox-2[16], marcados con [^{33}P]- o [^{32}P]-dATP (Amersham o New England Nuclear), como hemos descrito con anterioridad. Para los estudios de hibridación in situ se utilizaron cortes de tejido congelado. Para los estudios de inmunohistoquímica se realizó perfusión intracardíaca de los animales utilizando paraformaldehído al 4% en tampón fosfato. Los cortes de tejido se obtuvieron con un vibratomo y la inmunohistoquímica se realizó mediante la técnica de flotación[6,9,11,16]. El anticuerpo anti-Hsp70 es un anticuerpo monoclonal (Oncogene) que se usa a la dilución de 1:200. El anticuerpo contra c-Fos es policlonal (Santa Cruz Biotechnology, K4) que se usa a una dilución de 1:1.500. Finalmente, el anticuerpo contra Cox-2 es un anticuerpo monoclonal (Affinity) que se usa a una dilución de 1:100 o 1:200.

Resultados

Modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata

La isquemia puede conducir al desarrollo de un infarto cerebral en función de la magnitud de reducción de la irrigación y de la duración del período isquémico[1]. En un episodio de isquemia de 1 h, hemos determinado las variaciones relativas de flujo sanguíneo con el fin de conocer si existe una relación entre la disminución del flujo en la superficie de la corteza cerebral y el volumen de infarto cerebral resultante. Las variaciones relativas de flujo sanguíneo se pueden monitorizar continuamente y de forma poco invasiva mediante flujometría por láser-Doppler[35]. En este modelo experimental de isquemia transitoria en rata determinamos el flujo sanguíneo en una zona periférica de la corteza cerebral y obtenemos una disminución de un 70 ± 6% respecto al valor basal, que se mantiene constante durante el período de oclusión de la ACM y que se recupera durante la reperfusión. Además, la reducción de flujo es consistente y reproducible entre individuos. Como resultado, se desarrolla un infarto que afecta a la zona parietal de la corteza cerebral y el núcleo estriado de forma reproducible entre animales (fig. 1). Estudiando el valor de flujo sanguíneo durante la isquemia y el volumen de infarto resultante a los 7 días, hemos encontrado una relación entre ambos parámetros, de manera que la disminución de flujo sanguíneo permite estimar cuál será el tamaño del infarto resultante[35].

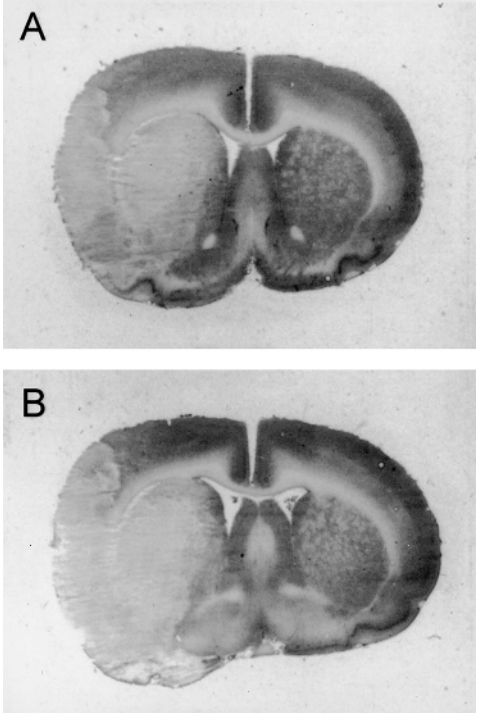


Fig. 1. Cortes coronales de cerebro de rata 24 h después de oclusión de la arteria cerebral media. En A y B se observan dos niveles diferentes. El lado izquierdo de las imágenes (ipsilateral respecto a la arteria ocluida) aparece más pálido en la zona en la que se manifiesta el infarto. En esta zona se observa un aumento de volumen respecto al lado derecho (control) debido a la formación de un edema considerable. Tinción con violeta de cresilo.

Excitotoxicidad por administración de ácido caínico

El ácido caínico es un agente excitatorio y neurotóxico que actúa sobre el subtipo cainato de receptor de glutamato y que posee un importante efecto convulsionante[36]. Una hora después de la administración se manifiestan convulsiones tónico-clónicas en el 75% de los animales. La evaluación histopatológica a los 4 días revela una lesión cerebral con pérdida neuronal sólo en aquellos animales que han manifestado signos de convulsión. Se observa una pérdida neuronal considerable en la corteza piriforme, la capa piramidal (campos CA1 y CA3) y el hilus del hipocampo y, en menor grado, en la amígdala y el tálamo.

Inducción de Hsp70

La isquemia provoca inducción del ARNm Hsp70 en el lado del cerebro ipsilateral al de oclusión de la ACM. El ARNm se detecta a partir de 30 min después del episodio isquémico durante el período de reperfusión del tejido (fig. 2). Una franja estrecha de tejido que envuelve al núcleo isquémico presenta el mayor nivel de expresión del ARNm. Más adelante, entre las 8 y las 24-48 h, se observa en esta zona la expresión de la proteína Hsp70 en neuronas que presentan un aspecto morfológico normal. Se ha propuesto que esta franja de tejido con neuronas que expresan Hsp70 corresponde a la zona de penumbra[37,38]. En el núcleo isquémico la proteína Hsp70 se localiza en unas pocas neuronas, astrocitos, y microglía y células endoteliales. Los valores de Hsp70 disminuyen a partir de las 24-48 h, hasta que a los 7 días apenas se detecta la proteína.

La administración de ácido caínico causa inducción del ARNm y proteína Hsp70 en el cerebro de rata[4-6,8]. Ambos se detectan sólo en las ratas que previamente han manifestado convulsiones. A las 2,5 h después de la administración de ácido caínico ya se detecta una inducción considerable de ARNm[5], que aumenta a las 5 h[6]. Las regiones cerebrales que expresan este ARNm son mayoritariamente la corteza piriforme y entorinal, las zonas CA1 y CA3 de la capa de neuronas piramidales del hipocampo, los complejos amigdaloide y subicular, así como la corteza parietal y temporal. La proteína Hsp70 se detecta a las 6, 12 y 24 h posteriores a su administración (fig. 3) siguiendo un patrón regional similar al del ARNm[4-6].

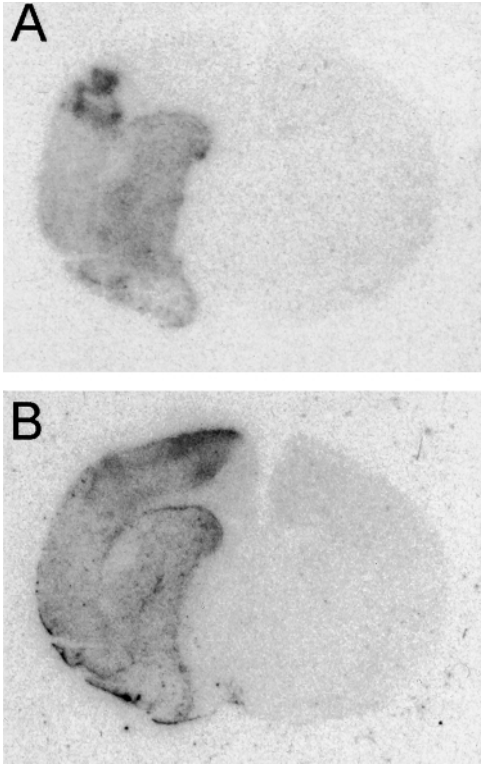


Fig. 2. Expresión de ARNm hsp70 *(A) y* c-fos *(B) mediante hibridación in situ en cortes de cerebro consecutivos a los 30 min después de 1 h de isquemia. Hsp70 se induce principalmente en la corteza parietal y estriado. La inducción ocurre de forma tenue en la zona de infarto y más intensamente en la zona de penumbra situada entre el núcleo isquémico y el tejido no lesionado. Comparativamente, la expresión de* c-fos *abarca una zona más extensa que incluye zonas más alejadas del infarto, como la corteza frontal, donde la inducción es mayor.*

En general, las neuronas que expresan Hsp70 poseen una morfología normal según se observa mediante inmunohistoquímica, que revela un marcaje similar al de la tinción de Golgi (fig. 4). Se detecta una expresión neuronal de Hsp70 en la corteza piriforme, a las 6 h posteriores a su administración, pero no a las 24 h, ya que en este tiempo dicha zona presenta una lesión con pérdida neuronal importante. Este es un ejemplo de expresión de ARNm y proteína en neuronas que pueden morir después de la lesión. Sin embargo, neuronas que expresan Hsp70 en otras zonas del cerebro sobrevivirán ya que, por ejemplo, en la corteza

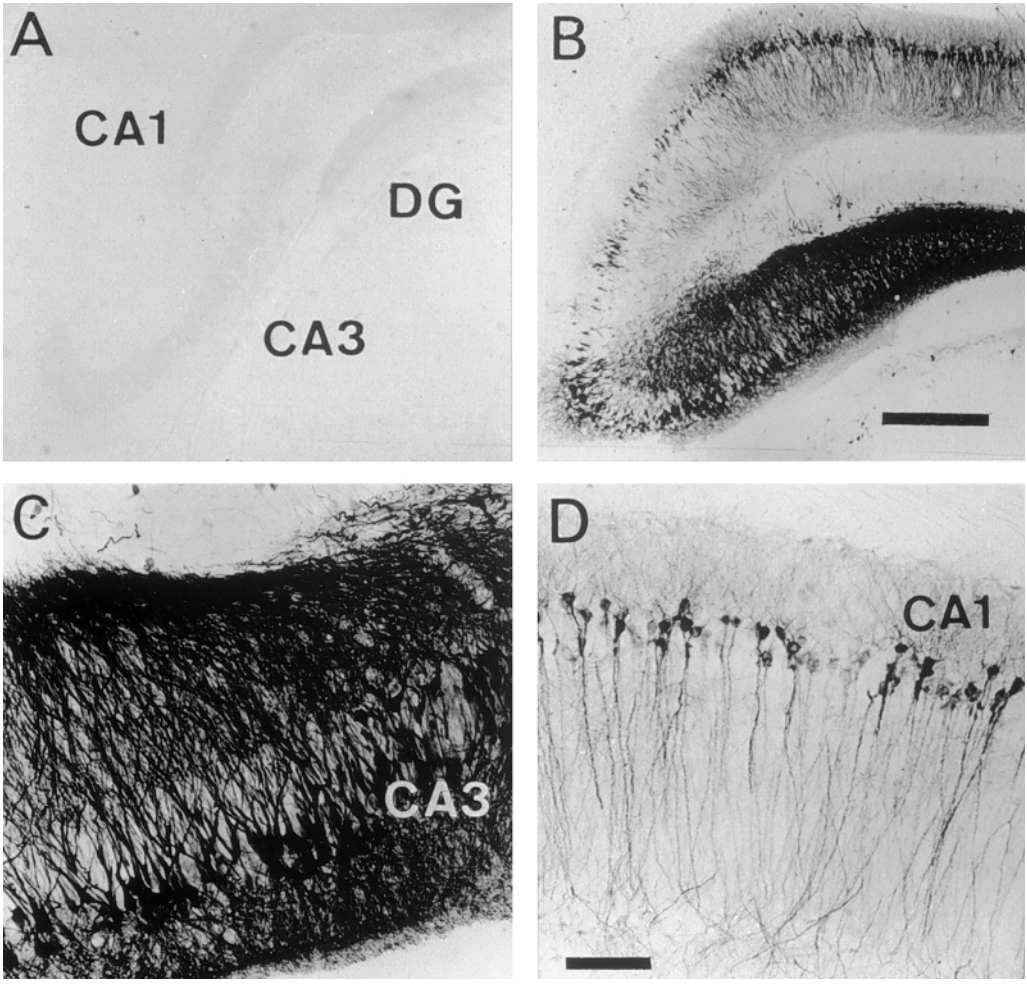


Fig. 3. Expresión de la proteína Hsp70 en el hipocampo de rata control (A), y 24 h después de la administración de ácido caínico (B-D). El ácido caínico induce una intensa expresión de Hsp70 en CA3 y CA1. Estas zonas sufren una importante pérdida neuronal; DG: giro dentado; CA1 y CA3: zonas de la capa piramidal. Escala: A y B, 500 µm; C y D, 100 µm.

parietal existe una abundante expresión de Hsp70 y en cambio no se observan signos morfológicos de lesión[5,6]. Sin embargo, a los 4 y 7 días, el patrón de distribución regional de la Hsp70 se ve modificado porque la proteína ha viajado a otras regiones mediante transporte axonal[4].

Inducción de c-fos

El c-*fos* es un gen inducible que normalmente no se expresa en el cerebro en condiciones fisiológicas. Sin embargo, después de un episodio de isquemia focal de 1 h de duración se detecta ARNm c-*fos* en la zona irrigada por la ACM ya a los 30 min, aumenta hasta 1 h y después decae a las 2-4 h. A partir de este momento queda una inducción baja de *c-fos* en las áreas adyacentes al núcleo isquémico. La proteína c-Fos se detecta en el núcleo de las células, ya que es un factor de transcripción que normalmente adquiere una distribución nuclear. De forma similar al ARNm, hemos detectado la proteína c-Fos en

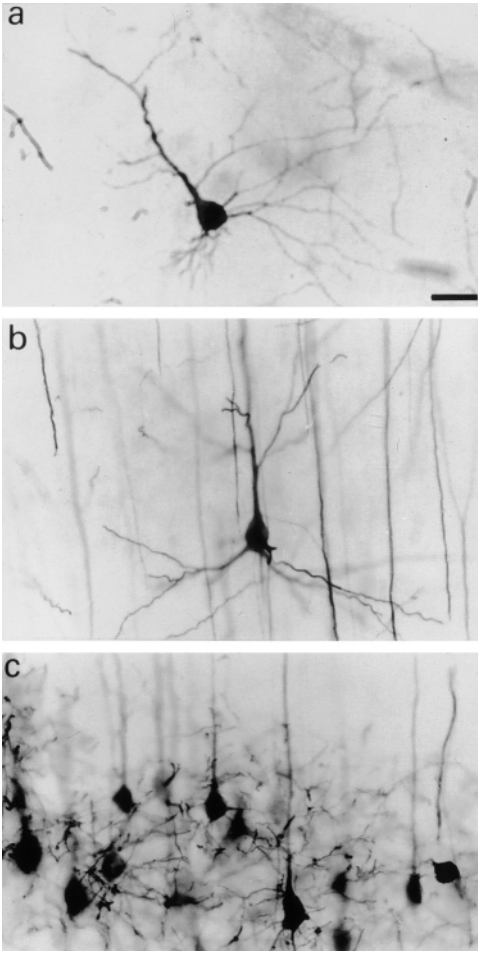


Fig. 4. Neuronas corticales que expresan Hsp70 24 h después de administración de ácido caínico. Las diferentes imágenes corresponden a capas corticales en la zona de la corteza parietal: (a) capa II; (b) capa IV, y (c) capa VI. La corteza cerebral no sufre lesión histológica. Escala 25 µm.

células situadas en la zona más afectada por la isquemia a las 6 h. Sin embargo, a las 24 h, sólo se detecta c-Fos en células localizadas en zonas perifocales respecto al núcleo isquémico. Comparada con la distribución de Hsp70, c-Fos no suele expresarse en las mismas células, y aunque hemos visto que Hsp70 podría demarcar la zona de penumbra, c-Fos se sitúa más lejos de la zona de infarto. La administración de ácido caínico también provoca inducción de c-Fos mayoritariamente en células que no expresan Hsp70. Aun así, a tiempos cortos después de la isquemia o administración de ácido caínico (horas) se observa de forma ocasional y transitoria una coexpresión de Hsp70 y c-Fos en algunas pocas células[9].

Inducción de Cox-2

En ratas control se observan unos valores muy bajos del ARNm y proteína Cox-2 en la corteza cerebral, capa granular del giro dentado y zona CA3 de la capa piramidal. Un episodio de isquemia focal produce la inducción de Cox-2 en el lado ipsilateral al de oclusión de la ACM. El ARNm inducido se detecta ya a los 30 min después de un episodio de 1 h de isquemia, o bien después de convulsión provocada por ácido caínico. Tanto el ARNm como la proteína están localizados principalmente en zonas perifocales al núcleo[9,16]. Seis horas después de la agresión sólo se observa colocalización de Cox-2 y Hsp70 en unas pocas células. Sin embargo, a las 24 h no existe colocalización entre Cox-2 y Hsp70. En cambio, Cox-2 y c-Fos están expresadas en las mismas células, aunque c-Fos es una proteína nuclear y Cox-2 citoplasmática[9].

Discusión

Un episodio de isquemia cerebral focal provoca la inducción de Hsp70 en neuronas, astrocitos, microglía y endotelio, de acuerdo con lo observado en estudios previos[8,11,37,38]. Kinouchi et al[38] han propuesto un modelo según el cual se puede establecer un grado de sensibilidad celular a la isquemia en función de la expresión de Hsp70. Así, las neuronas serían las células neurales más sensibles capaces de expresar Hsp70 después de un episodio isquémico de baja intensidad. Les seguirían las células gliales y, finalmente, las endoteliales. Las neuronas situadas en la zona de la penumbra isquémica son las que presentan los mayores valores de expresión de Hsp70. La zona de penumbra[39,40] circunda el núcleo isquémico y sufre sólo una pequeña reducción del flujo sanguíneo. En esta zona, el metabolismo energético sostiene unos valores mínimos suficientes como para mantener determinadas funciones celulares vitales como, por ejemplo, el gradiente transmembrana. Sin embargo, estos mínimos no son suficientes para mantener la actividad eléctrica. Así, se producen cambios importantes tanto intra como extracelulares y algunas neuronas pueden morir a medi-

da que transcurre el tiempo[41]. La zona de penumbra posee, por esta razón, un especial interés desde el punto de vista farmacológico, ya que la pérdida neuronal que sufre no ocurre de forma tan inmediata como la que se produce en el núcleo isquémico y es, por tanto, mucho más susceptible de responder a tratamientos farmacológicos[42]. Se ha propuesto que la Hsp70 ejerce un efecto protector sobre las neuronas de la penumbra[43]. Sin embargo, numerosos trabajos concuerdan en que la proteína Hsp70 puede ser necesaria, aunque en algunos casos no es suficiente para asegurar la supervivencia celular[8]. De todas formas, la potenciación de la expresión de Hsp70 en las neuronas de la penumbra isquémica podría prevenir o atenuar la muerte celular en esta zona.

La administración sistémica de ácido caínico provoca una intensa expresión del ARNm y proteína Hsp70 en diferentes regiones cerebrales. Comparando las regiones en las que se induce el gen *hsp70* con las zonas que desarrollan muerte celular después de administración de ácido caínico se observa que no existe una correlación clara. Por tanto, la expresión del ARNm *hsp70* no predice si la célula va o no a morir[5,8,9].

El MK-801, un antagonista no competitivo del receptor NMDA, puede prevenir la inducción de Hsp70 en ciertas regiones cerebrales después de administración de ácido caínico[6] o de un análogo del ácido iboténico[7]. El MK-801 inhibe la expresión de Hsp70 inducida por el ácido caínico en la corteza y el tálamo, lo que podría representar la correlación neural del efecto anticonvulsionante que posee este antagonista NMDA. Estos resultados indican que la expresión de Hsp70 inducida por fenómenos de excitotoxicidad está mediada, al menos en parte, por receptores NMDA. De forma similar, se ha descrito que el MK-801 reduce el nivel de inducción de c-Fos[13,14] y también de Cox-2[33] después de la isquemia o de convulsiones, de lo que se deduce que la expresión de estos genes está mediada en parte por receptores NMDA y, por tanto, la inducción génica después de administación de ácido caínico debe producirse de forma transináptica.

La expresión de Cox-2 y c-Fos ocurre en neuronas que sobreviven a la isquemia (zonas perifocales como son la corteza frontal y cingulado) o excitotoxicidad (neocórtex y giro dentado del hipocampo). Además, la expresión de c-Fos y Cox-2 se observa también en zonas que desarrollan muerte neuronal después de la administración de ácido caínico (corteza piriforme y capa piramidal del hipocampo).

Cox-2 se induce en neuronas que expresan c-Fos. Sin embargo, se desconoce si estos dos fenómenos están relacionados entre sí. En el núcleo de las células, c-Fos interacciona con miembros de la familia *Jun* y forma complejos heterodiméricos capaces de unirse a las secuencias AP-1 del ADN y así modular la transcripción de otros genes[26]. En el promotor del gen de la Cox-2 se ha descrito la presencia de una secuencia similar a AP-1 junto con otros elementos reguladores[44,45], que pueden contribuir en mayor o menor grado a impulsar la inducción de Cox-2.

Este trabajo sugiere que c-Fos, Cox-2 y Hsp70 se expresan como resultado de la respuesta celular a un entorno alterado. La expresión indica sensibilidad celular pero no el devenir de la células afectadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjö BK. Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. Brain Res 1992; 89: 67-78.
2. Procter AW. Can we reverse ischemic penumbra? Some mechanisms in the pathophysiology of energy-compromised brain tissue. Clin Neuropharmacol 1990; 13 (Supl 3): 34-39.
3. Armstrong JN, Plumier JCL, Robertson HA, Currie RW. The inducible 70,000 molecular weight heat shock protein is expressed in degenerating dentate hilus and piriform cortex after systemic administration of kainic acid to the rat. Neuroscience 1996; 74: 685-693.
4. Ferrer I, Planas AM. Induction of heat-shock protein 70 messenger RNA and protein following systemic kainate injection in the rat: evidence of protein axonal transport. Neuroscience 1995; 69: 1.111-1.118.
5. Planas AM, Soriano MA, Ferrer I, Rodríguez-Farré E. Regional expression of inducible heat shock protein-70 mRNA in the rat brain following administration of convulsant drugs. Mol Brain Res 1994; 27: 127-137.
6. Planas AM, Soriano MA, Ferrer I, Rodríguez-Farré E. Kainic acid-induced heat shock protein-70 mRNA and protein expression is inhibited by MK-801 in certain rat brain regions. Eur J Neurosci 1995; 7: 293-304.
7. Planas AM, Ferrer I, Rodríguez-Farré E. NMDA receptors mediate heat shock protein induction in the mouse brain following administration of the ibotenic acid analogue AMAA. Brain Res 1995; 700: 289-294.
8. Planas AM, Soriano MA, Estrada A, Sanz O, Martín F, Ferrer I. The heat shock stress res-

ponse after brain lesions: Induction of 72 kDa heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition. Prog Neurobiol 1997; 51: 607-636.
9. Sanz O, Estrada A, Ferrer I, Planas AM. Differential cellular distribution and dynamics of HSP70, cyclooxygenase-2, and c-Fos in the rat brain after transient focal ischemia or kainic acid. Neuroscience 1997; 80: 221-232.
10. Soriano MA, Tortosa A, Planas AM, Rodríguez-Farré E, Ferrer I. Induction of HSP70 mRNA and HSP70 protein in the hippocampus of the developing gerbil following transient forebrain ischemia. Brain Res 1994; 653: 191-198.
11. Soriano MA, Planas AM, Rodríguez Farré E, Ferrer I. Early 72-kDa heat shock protein induction in microglial cells following focal ischemia in the rat brain. Neurosci Lett 1994; 182: 205-207.
12. Soriano MA, Ferrer I, Rodríguez Farré E, Planas AM Expression of c-fos and inducible hsp-70 mRNA following a transient episode of focal ischemia that had non-lethal effects on the rat brain. Brain Res 1995; 670: 317-320.
13. Gass P, Spranger M, Herdegen T, Bravo R, Köck P, Hacke W et al. Induction of FOS and JUN proteins after focal ischemia in the rat: differential effect of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. Acta Neuropathol 1992; 84: 545-553.
14. Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M. Spatiotemporal induction of immediate early genes in the rat brain after limbic seizures: effects of NMDA receptor antagonist MK-801. Eur J Neurosci 1993; 5: 933-943.
15. Welsh FA, Moyer DJ, Harris VA. Regional expression of heat shock protein-70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain. J Cereb Blood Flow Metab 1992; 12: 204-212.
16. Planas AM, Soriano MA, Rodríguez-Farré E, Ferrer I. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein following transient focal ischemia in the rat brain. Neurosci Lett 1995; 200: 187-190.
17. Collaço-Moraes Y, Aspey B, Harrison M, De Belleroche J. Cyclo-oxygenase-2 messsenger rNA induction in foocal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 1.366-1.372.
18. Lindquist S. The heat-shock response. Annu Rev Biochem 1986; 55: 1.151-1.191.
19. Pelham HRB. Speculations on the functions of major heat shock and glucose-regulated proteins. Cell 1986; 46: 959-961.
20. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. Cell 1991; 66: 191-197.
21. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. Nature 1992; 355: 33-45.
22. Georgopoulos C, Welch WJ. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. Annu Rev Cell Biol 1993; 9: 601-634.
23. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. Science 1993; 259: 1.409-1.410.
24. Rordorf G, Koroshetz WJ, Bonventre JV. Heat shock protects cultured neurons from glutamate toxicity. Neuron 1991; 7: 1.043-1.052.
25. Ananthan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock proteins. Science 1986; 232: 522-524.
26. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. Ann Rev Neurosci 1991; 14: 421-451.
27. Sharp FR, González MF, Sharp JW, Sagar SM. c-fos expression and (14C)-2-deoxyglucose uptake in the caudal cerebellum of the rat during motor/sensory cortex stimulation. J Comp Neurol 1989; 284: 621-636.
28. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. Science 1988; 240: 1.328-1.331.
29. White LE, Price JL. The functional anatomy of limbic status epilepticus in the rat. I. Patterns of 14C-deoxyglucose uptake and Fos immunoreactivity. J Neurosci 1993; 13: 4.787-4.809.
30. Nakagomi T, Sasaki T, Kirino T, Tamura A, Noguchi M, Saito I et al. Effect of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. Stroke 1989; 20: 925-929.
31. Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E et al. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. Arch Biochem Biophys 1993; 307: 361-368.
32. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. Neuron 1993; 11: 371-386.
33. Chen J, Marsh T, Zhang JS, Graham SH. Expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following kainate treatment. NeuroReport 1995; 6: 245-248.
34. Soriano MA, Ferrer I, Rodríguez Farré E, Planas AM. Apoptosis and c-Jun in the thalamus of the rat following cortical infarction. NeuroReport 1996; 7: 425-428.
35. Soriano MA, Sanz O, Ferrer I, Planas AM. Cortical infarct volume is dependent on the ischemic reduction of perifocal cerebral blood flow in a three-vessel intraluminal MCA occlusion/reperfusion model in the rat. Brain Res 1997; 747: 273-278.
36. Lothman EW, Collins RC. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. Brain Res 1981; 218: 299-318.
37. Li Y, Chopp M, Garcia JH, Yoshida Y, Zhang ZG, Levine SR. Distribution of the 72-kD heat-shock protein as a function of transient focal ce-

rebral ischemia in rats. Stroke 1992; 23: 1.292-1.298.
38. Kinouchi H, Sharp FR, Hill MP, Koistinaho J, Sagar SM, Chan PH. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab 1993; 13: 105-115.
39. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia. The ischemic penumbra. Stroke 1981; 12: 723-725.
40. Obrenovitch TP. The ischemic penumbra: twenty years on. Cerebrovasc Brain Metab Rev 1995; 7: 297-323.
41. Selman WR, Ricci AJ, Crumrine RC, LaManna JC, Ratcheson RA, Lust WD. The evolution of focal ischemic damage: a metabolic analysis. Metab Brain Dis 1990; 5: 33-44.
42. Planas AM. Alteraciones de la membrana celular y de la síntesis de proteínas en modelos experimentales de isquemia cerebral: implicaciones farmacológicas para el tratamiento de la patología isquémica. Neurología 1997; 12: 405-417.
43. Li Y, Chopp M, Zhang ZG, Zhang RL, García JH. Neuronal survival is associated with 72-kDa heat shock protein expression after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. J Neurol Sci 1993; 120: 187-194.
44. Sirois J, Levy LO, Simmons DL, Richards JS. Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. J Biol Chem 1993; 268: 12.199-12.206.
45. Xie W, Merrill JR, Bradshaw WS, Simmons DL. Structural determination and promoter analysis of the chicken mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase gene and genetic mapping of the murine homolog. Arch Biochem Biophys 1993; 300: 247-252.

DISCUSIÓN

V. Ceña: Resulta un poco sorprendente que MK-801 sea capaz de proteger de alguna forma o de inhibir la expresión de *heat shock protein* (HSP) tras la administración de caínico. ¿Se ha comprobado experimentalmente que están incrementados los valores de secreción de glutamato tras la administración de ácido caínico?

A.M. Planas: No puedo responderte con toda certeza con qué técnicas, pero otros autores han demostrado que se produce un incremento de glutamato tras la administración de ácido caínico. Además de inhibir la expresión de HSP, MK-801 también inhibe la expresión de *c-fos* y de Cox-2. De ello se deduce que podría estar interfiriendo sobre algún aspecto de la propagación de la actividad eléctrica cerebral.

V. Ceña: Mi segunda pregunta tiene que ver con el papel que puede desempeñar la expresión de Hsp70 en la cadena de acontecimientos que tras la isquemia conducen a la muerte neuronal, especialmente en la zona de penumbra, donde se expresa Hsp70, y por la trascendencia que puede tener desde el punto de vista terapéutico. Si bien la Cox-2 parece claro que va a producir secundariamente un incremento de radicales libres, ¿dónde encajaría la Hsp70 en esta cadena de acontecimientos?

A.M. Planas: Este es un tema muy interesante. A través de experimentos in vitro, se ha observado que la existencia de proteínas desnaturalizadas en una célula desencadena la activación del *head shock factor*, que actuaría como promotor de la HSP activando la expresión del ARNm, lo que favorece la síntesis proteica. En nuestras células, los cambios isquémicos generan desnaturalización de proteínas y, por tanto, se induce Hsp70. La HSP podría contribuir a que las proteínas permanezcan estables, de forma que no se degraden ante una situación adversa del entorno. Aunque parece que el papel de la HSP es muy importante para asegurar la supervivencia de la célula, probablemente no sea el único elemento responsable. Si la expresión de HSP en la penumbra se demuestra que es muy significativa, verdaderamente tendría gran interés disponer de herramientas farmacológicas, hasta el momento inexistentes, que contribuyeran a incrementar dicha expresión.

R. Bartrons: Cada vez en más modelos experimentales y en diferentes tejidos se está demostrando que la isquemia induce apoptosis. ¿Habéis estudiado si realmente la muerte en la primera zona es apoptótica? En segundo lugar, me gustaría destacar unos resultados publicados recientemente* donde

*Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-κB activation. *Science* 1996; 274: 1.383-1.385.

inhibidores de ciclooxigenasa producían una disminución de la neurotoxicidad inducida por glutamato y donde se postulaba que este hecho probablemente estaba relacionado con la inhibición de NFκ-B. ¿Habéis estudiado si la inducción de Cox-2 puede frenarse mediante la presencia de estos inhibidores?

A.M. Planas: No hemos efectuado estos estudios, aunque justamente ahora estamos iniciando una serie de trabajos con NFκ-B que no se han presentado por disponer únicamente de resultados preliminares. Es evidente el interés que supone analizar el efecto de los inhibidores, sobre todo orientado a la posibilidad de prevenir los efectos secundarios que ocurren durante la reperfusión del tejido y que acontecen de una manera más lenta que la lesión isquémica en sí.

Respecto a la primera pregunta, se podría discutir extensamente sobre si la muerte es apoptótica o necrótica. En el modelo de isquemia global en gerbos, podríamos decir que la muerte neuronal tiene más de apoptosis que de necrosis, aunque tampoco responde al patrón clásico de muerte celular programada. Quizá las definiciones de necrosis y apoptosis sean dos extremos entre los cuales encontramos un abanico de diferentes situaciones que pueden llevar a la muerte. En la zona de isquemia focal pienso que existe un componente necrótico muy importante, un gran edema y una considerable gliosis. En cambio, en la zona de penumbra donde la muerte ocurre de una forma más progresiva antes de morir de una forma apoptótica podría producirse un intento de respuesta ante un entorno adverso.

J.C. Leza: En vuestro modelo experimental, ¿habéis estudiado si existe colocalización, por ejemplo, con iNOS y cuál sería la participación temporal de los dos sistemas?

A.M. Planas: No lo hemos estudiado específicamente, aunque creo que también deberíamos analizar la posible relación con NFκ-B. A pesar de haber centrado mi presentación en los acontecimientos que se producen a corto plazo después de la isquemia, lógicamente deberíamos pensar también en la participación de otros elementos y sistemas como, por ejemplo, la respuesta glial, que también estamos estudiando, que tienen lugar de una forma mucho más progresiva. Evidentemente que la activación de NOS puede desempeñar algún papel, aunque lo desconocemos en este momento.

R. Maldonado: ¿Sabéis si el aumento de expresión de *c-fos* tiene alguna relevancia funcional específica, o bien se trata simplemente de un marcador de cambios en la actividad metabólica?

A.M. Planas: Inicialmente pensábamos que podía ser marcador de muerte celular, pero observamos que también se expresaba en algunas células que no sufrían necrosis ni apoptosis. Actualmente creemos que la expresión de *c-fos* junto con otros elementos, pero no por sí sola, puede tener significación funcional en el proceso de muerte celular.

J.M. Baeyens: Los bloqueadores de los canales del calcio dependientes de voltaje mejoran tanto las convulsiones como determinados fenómenos isquémicos. ¿Conocéis si en animales pretratados con dichos compuestos se altera la expresión de estas proteínas?

A.M. Planas: En trabajos realizados por el grupo del Dr. Juan Serratosa del Departamento de Farmacología de nuestro centro de investigación se sugiere que la expresión de *c-fos* podría estar relacionada con la activación de canales de calcio. Esto no ocurre, sin embargo, con la HSP. Analizando varios agentes convulsionantes que actuaban a diferentes niveles, sólo observamos inducción de HSP cuando la lesión era suficientemente importante como para llegar a producir muerte neuronal, sin que ello pudiera asociarse a canales o receptores conocidos. Desde un punto de vista puramente intuitivo, parece que la HSP únicamente se expresaría en células excitatorias, porque se ha evidenciado en neuronas piramidales tanto del hipocampo como de la corteza cerebral.

Mecanismos moleculares implicados en la secreción de catecolaminas por las glándulas suprarrenales

Ruth Jaén, Manuel Pérez-Morán y Ricardo Borges

Departamento de Medicina Física y Farmacología.
Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Tenerife.

Introducción

La exocitosis es un proceso que consiste en la fusión de una vesícula citoplasmática con la membrana celular y es el más común de los métodos que utilizan las células para secretar sustancias al exterior y para renovar su membrana. La exocitosis es un proceso celular universal que abarca desde las levaduras hasta las neuronas. La mayor parte de los neurotransmisores son liberados por exocitosis.

Las células cromafines de la médula suprarrenal constituyen un excelente modelo para el estudio de la neurosecreción. Estas células liberan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) al torrente sanguíneo en respuesta a estímulos estresantes como el frío, el ejercicio, el miedo o las situaciones de hipoglucemia, de hipotensión o de alergia. Las catecolaminas antagonizan gran parte de estas acciones deletéreas inducidas por mediadores como la histamina o la bradicinina y nos protegen en las situaciones de estrés.

En particular, el uso de las células cromafines se ha revelado como un excelente método para el estudio del fenómeno exocitósico.

Los mecanismos moleculares implicados en la respuesta secretora se han ido dilucidando a lo largo de los últimos 35 años y constituyen un hermoso ejemplo de cómo el avance de la ciencia ha ido cambiando nuestra visión de la biología celular. A lo largo de los años sesenta y setenta se fueron estableciendo los requerimientos iónicos necesarios para desencadenar la secreción. Así, se supo que era el calcio el único elemento cuya presencia era necesaria (y suficiente) para que el proceso tuviera lugar. Tal es la dependencia del calcio que se acuñó el término acoplamiento excitación-secreción por la analogía con la contracción muscular[1]. El papel crucial del calcio se vio reforzado cuando se comenzaron los experimentos con células permeabilizadas. A finales de la década de los setenta, Baker y Knight descubrieron que si las células cromafines eran sometidas a descargas eléctricas de alto voltaje en la membrana de éstas se producían unos poros por los que podían difundir iones y pequeñas moléculas[2].

El uso de células permeabilizadas ha venido sirviendo para dilucidar algunos mecanismos moleculares implicados en el funcionamiento de la maquinaria secretora. Así, el concurso de la sinaptobrevina se estableció tras comprobarse que las toxinas botulínica y tetánica inhibían la secreción[3,4]. El papel de las distintas proteincinasas C, A y G se ha ido esclareciendo mediante la comparación entre los efectos sobre células intactas y permeabilizadas[5-7].

La llegada de las técnicas de *patch-clamp* con sus variantes ha servido para el estudio de los canales iónicos y la exocitosis por los métodos de capacitancia. La circunstancia de que la pipeta provoque el rápido dializado del citosol permite la aplicación de sustancias al interior celular y establecer su papel en el fenómeno secretor[8].

Buena parte de nuestro conocimiento, no obstante, está llegando de la mano de la biología molecular y de las técnicas de hibridación in situ[9].

Una característica que ha permitido el espectacular avance reciente sobre el esclarecimiento del fenómeno secretor es su universalidad. Buena parte de las proteínas implicadas en la exocitosis comparten papel en todas las células[10].

Acoplamiento excitación-secreción. La señal del calcio

Dos son los tipos de estímulos que recibe la médula suprarrenal: la descarga de los nervios esplácnicos y las sustancias secretagogas que llegan por vía hemática. La acetilcolina es el principal mediador de los nervios esplácnicos que, actuando sobre receptores nicotínicos,

produce la despolarización de la célula con la apertura de canales voltaje-dependientes para Na^+ y Ca^{2+}. La entrada de este último ion va a poner en marcha el proceso exocitósico.

El receptor nicotínico adrenomedular es del tipo neuronal[11] y su estimulación por fármacos agonistas va seguida de una rápida desensibilización (fig. 1). Las respuestas secretoras mediadas por receptores nicotínicos son enteramente dependientes del Ca^{2+} extracelular.

Diversas sustancias como la histamina[12,13], la bradicinina[12], la muscarina[13] o la angiotensina II[12] estimulan la secreción mediante la movilización adicional de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares. La capacidad de estos reservorios es pequeña si se compara con otras células como las musculares. Dependiendo de su localización, los reservorios intracelulares pueden mantener la secreción celular, durante unas decenas de segundos, en ausencia de calcio extracelular[13-15].

Los receptores para estas sustancias están acoplados a proteínas G y median sus respuestas mediante la movilización de inositoles fosfatos y la translocación de la PKC. Sin embargo, los ésteres de forbol que estimulan directamente la PKC potencian la secreción mediada por estímulos despolarizantes (agonistas nicotínicos o soluciones ricas en potasio), no alteran las mediadas por bradicinina y abolen las respuestas secretoras inducidas por histamina, angiotensina II o muscarina[12]. Estas observaciones ponen de manifiesto importantes diferencias en los mecanismos de transducción aparentemente similares.

La movilización del Ca^{2+} intracelular mediante cafeína o IP_3 ha sido utilizada para dilucidar el papel de estos reservorios. La cafeína provoca la liberación de catecolaminas de manera independiente del Ca^{2+} extracelular[13]. La forma en la que los rerservorios se recargan de Ca^{2+}, corrientes capacitativas, es aún poco conocida porque se desconoce el mediador que la pone en marcha, pero esta recarga ocurre en muy pocos segundos.

El papel fisiológico que los distintos canales de calcio desempeñan en la secreción fue objeto de amplio estudio en un reciente número de estas monografías[16], por lo que no nos parece oportuno volver a ahondar en el tema.

Las concentraciones intracelulares del Ca^{2+} vuelven a sus valores normales utilizando los mismos mecanismos de todas las células eucariotas: recaptación (calciosomas, retículo endoplásmico, mitocondrias y gránulos cromafines), intercambio Na^+-Ca^{2+} y la bomba de Ca^{2+} (ATPasa).

Las técnicas amperométricas nos ofrecen una "visión", a tiempo real, del fenómeno exocitósico

Nosotros hemos utilizado para nuestros estudios primordialmente este tipo de técnicas. La amperometría se basa en la detección electroquímica de los productos liberados. Muchas sustancias se oxidan instantáneamente si se les aplica un potencial eléctrico positivo. En nuestro caso, cada molécula de catecolamina produce dos electrones que son captados por el propio electrodo con el que se aplica el potencial. Los electrodos suelen construirse de carbón y pueden ser de gran tamaño, para estudios de superfusión de células o de glándulas suprarrenales[17-20], o muy finos con los que pueden fabricarse microsensores de muy pocos micrómetros de diámetro. La adquisición de señales se lleva a cabo mediante un potenciostato; éste es un amplificador modificado para mantener constante un potencial sobre el electrodo, lo cual permite ajustar el potencial de oxidación, en este caso, para las catecolaminas[21].

Las catecolaminas se almacenan en altísimas concentraciones, superiores a 500 mM, en el interior de los denominados gránulos cromafines. Unas 10.000 de estas estructuras vesiculares se encuentran distribuidas en el citoplasma de las células, aunque sólo una porción de ellas está lista para liberar su contenido. Las catecolaminas presentes en la médula suprarrenal son suficientes para, de liberarse, provocar la muerte del animal. Es, pues, imprescindible que las células cuenten con precisos mecanismos de control[22].

La secreción puede estimularse aplicando un secretagogo (una sustancia que estimula la secreción: acetilcolina, histamina, bario o soluciones despolarizantes) en la cercanía de la célula. En pocas décimas de segundo pueden observarse, en el osciloscopio, una serie de deflecciones que se corresponden con la oxidación de las catecolaminas liberadas por exocitosis desde los gránulos cromafines. Estas deflecciones, o espigas, poseen una morfología muy variable y es necesario realizar un análisis poblacional de varios cientos de espigas para inferir la concentración de los componentes solubles. De esta forma, se ha estimado la concentración de catecolaminas en torno a 550 mM.

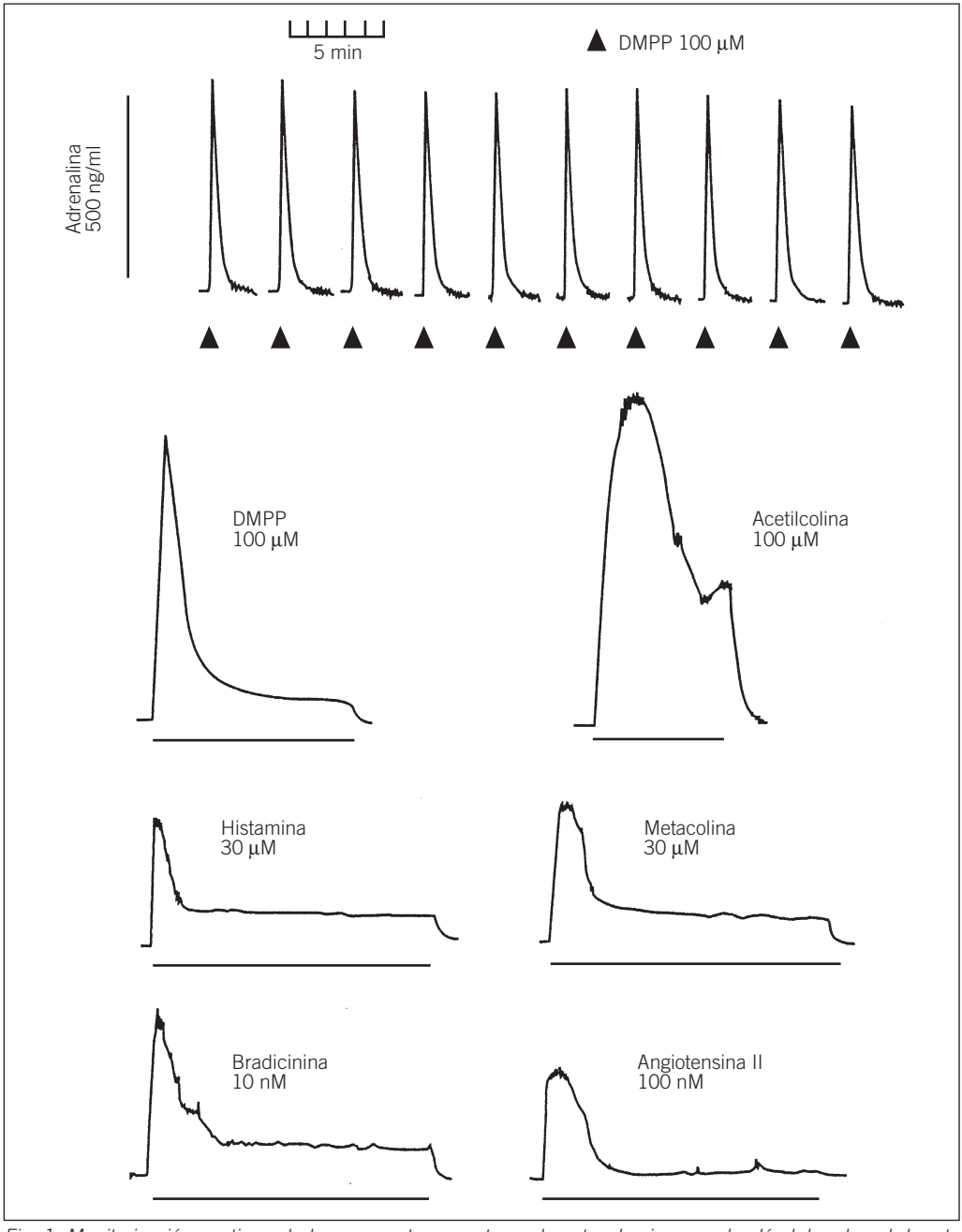


Fig. 1. Monitorización continua de las respuestas secretoras de catecolaminas por la glándula adrenal de rata perfundida. Se exponen algunos registros típicos obtenidos con detección electroquímica. En la parte superior se demuestra la reproducibilidad de las respuestas ante estímulos nicotínicos de corta duración (DMPP, dimetil-fenilpiperazinio) durante 10 s cada 8 min. En los trazos inferiores se observa la respuesta secretora ante diversos agonistas aplicados durante el tiempo señalado con la barra horizontal fina. La barra superior señala el tiempo (5 min) y la vertical la calibración en ng/ml de adrenalina.

Sabemos que el ATP (trifosfato de adenosina) se almacena en una proporción fija cuatro veces inferior, es decir unos 130 mM. Si además consideramos la alta cantidad de calcio (80 mM) y la presencia de proteínas, ascorbato y péptidos, no deja de parecer asombrosa la capacidad de almacenamiento que poseen estas pequeñas organelas[23,24].

Último estadio de la exocitosis. El poro de fusión. Papel de la matriz intragranular

Una vez que el gránulo se ha unido a la membrana puede ocurrir o no la exocitosis, ya que, si bien el proceso de acercamiento requiere de Ca^{2+} y de ATP, este último sólo depende del Ca^{2+}. Estudios con amperometría evidencian la presencia de un "pie" que es observable en un 30-50% de las espigas de secreción[23] (fig. 2). Durante unos 10 ms se forma un poro de fusión que une el espacio extracelular con el lumen granular. Este poro va a permitir la salida de la fracción de catecolaminas no complejadas (44 mM) calculándose que unas 34.000 moléculas pasan por el poro en cada ms. Se ha estimado en un 10% la adrenalina contenida en el gránulo que se encuentra en este estado libre.

El diámetro estimado del poro de fusión es de unos 2 nm, aproximadamente los valores estimados para un canal iónico. La naturaleza química de este poro de fusión, proteica o lipídica, sigue siendo materia de controversia. Se ha demostrado recientemente que la fusión puede ser reversible y que puede no producirse la exocitosis total[24].

El poro de fusión va a permitir la entrada de agua y de otros iones extracelulares al interior provocando el brusco hinchamiento y el ensanche del poro de fusión hasta formar una imagen en Ω, para posteriormente verter el contenido completamente al exterior. Sólo van a permanecer unidas a la membrana algunas fracciones de proteínas como la DBH o las cromograninas.

El gel compuesto por proteínas, ATP y catecolaminas se termina de disociar a continuación. La exocitosis transcurre en unos 10-30 ms y se liberan unas 350.000 moléculas de catecolaminas.

La altísima concentración de solutos intragranulares mencionada anteriormente permite calcular la osmolaridad en unos 800 mOsm. Esta hipertonicidad llevaría al hinchamiento del gránulo y a su rotura. Es plausible la presencia de mecanismos de complejación de los solutos entre sí formando una matriz que es visible a la microscopia electrónica.

Durante los últimos años se ha especulado acerca del papel fisiológico de la matriz intragranular. Su principal componente es la cromogranina A, una proteína acídica (pKa 5,5) que se libera en su práctica totalidad tras la exocitosis. Algunos de sus fragmentos poseen una potente actividad biológica[25], aunque no está demasiado clara la existencia de mecanismos de corte específico operantes. Sin embargo, la presencia de la matriz intragranular es común a muchas células, aunque su naturaleza química sea variable. Así, los mastocitos utilizan un gel de heparán sulfato para formar complejos de histamina y serotonina. El hecho de que ambos tipos celulares, mastocitos y cromafines, se comporten de manera similar ante cambios de temperatura, ambiente iónico[26] o cambios osmóticos[27] hace pensar que las cromograninas desempeñan un papel importante en el almacenamiento de las catecolaminas.

Recientemente se ha postulado que es posible que la matriz intragranular no limite su papel a la asociación pasiva de sus componentes solubles y que pueda ejercer un papel funcional en el equilibrio fracción libre/complejada. En este sentido, se ha descrito la presencia de un receptor para IP_3 en la membrana granular acoplado a la cromogranina A[28]. De ser así, es posible que un mediador celular pudiera alterar el grado de unión de las catecolaminas y el ATP a la matriz proteica. La cantidad de catecolaminas por gránulo no se alteraría, pero sí la velocidad en que éstas serían liberadas al medio externo. En una sinapsis esto se traduciría en un incremento de la concentración con la que el neurotransmisor llega a la neurona postsináptica y, por tanto, un incremento de la eficiencia sináptica.

El ciclo vital de los gránulos cromafines

Debido a que contienen proteínas de gran tamaño, los gránulos cromafines sólo pueden ser fabricados en el trans-Golgi aunque alcanzan su maduración una vez liberados al citoplasma. El proceso de maduración se lleva a cabo de una parte acidificando el contenido granular hasta un pH 5,5 y por otra recargándose de catecoles, purinas, ATP, ascorbato y, probablemente, péptidos. De igual forma, los gránulos constituyen un amplio reservorio de calcio cuyo papel fisiológico está aún por establecer.

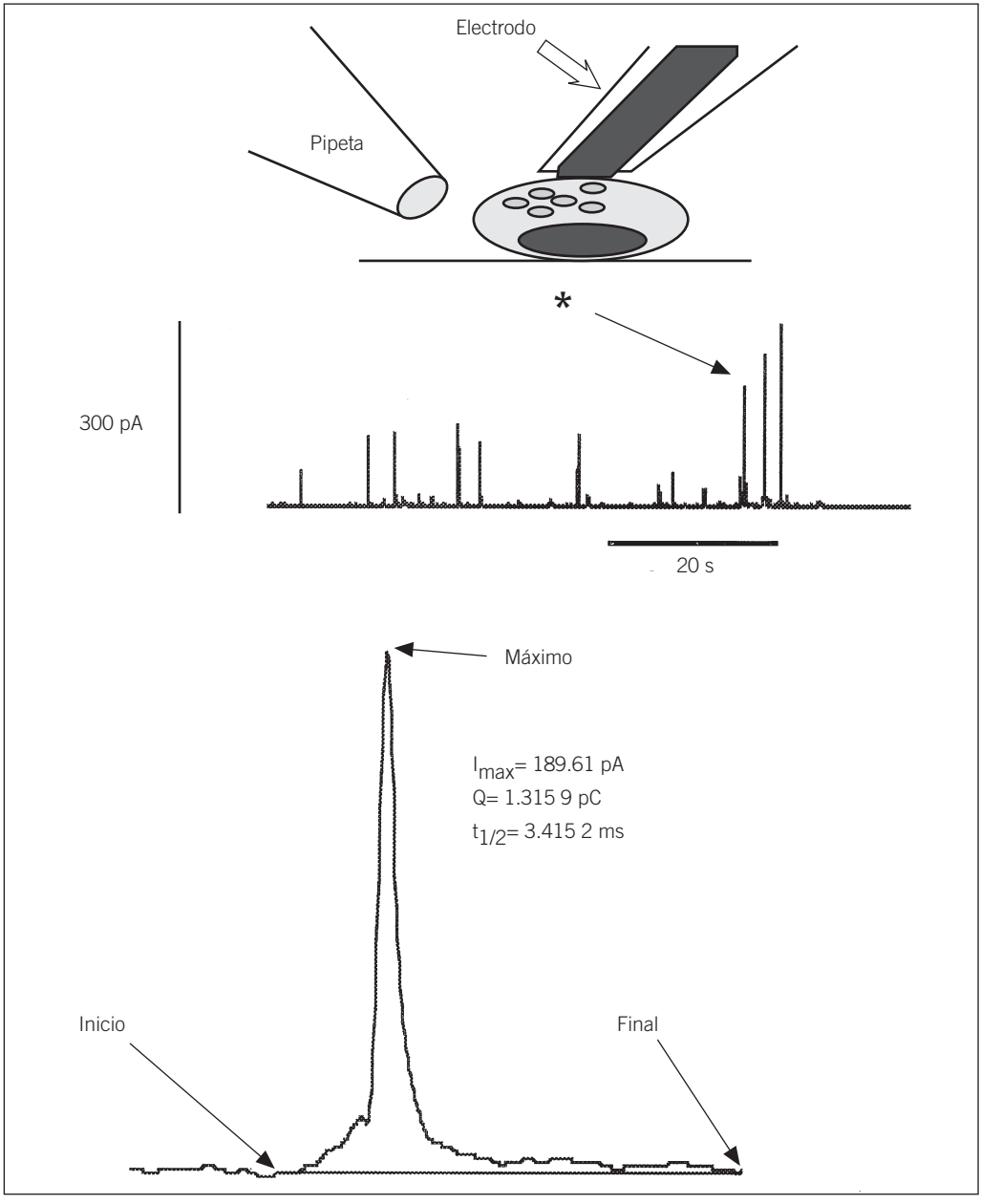


Fig. 2. Registro amperométrico de la respuesta exocitótica de una célula cromafín bovina. En el trazado superior se observa un registro obtenido tras la aplicación de Cl2Ba 5 mM durante 5 s. La secreción se evidencia en forma de espigas cuya morfología nos ofrece información acerca de los mecanismos de almacenamiento y de liberación. En la parte superior se expone la situación del electrodo y en la parte inferior un registro amplificado de la espiga señalada con el asterisco. De cada espiga se obtienen una serie de parámetros básicos: I_{max}, $t_{1/2}$ y Q, que se corresponden con la concentración de catecolaminas liberadas, la velocidad de secreción y la cantidad de aminas presentes en el gránulo. Las barras de calibración indican la corriente de oxidación (en nA) y el tiempo (en ms).

Como mencionábamos anteriormente, una fracción importante de gránulos (aproximadamente el 70%) no son susceptibles de ser liberados. De los restantes se distinguen al menos dos poblaciones en virtud de su capacidad para ser liberados.

Las células cromafines poseen un armazón de citosqueleto formado por fibras de actina que previene el acceso de los gránulos a la membrana plasmática[29]. La presencia de calcio facilita, además de la exocitosis, el movimiento de vesículas desde un compartimiento al otro[30]. El proceso de desensamblaje del armazón de actina, aunque sigue siendo objeto de debate, parece estar mediado por una proteína activada por calcio, la escinderina[9], que corta la actina. Esta reacción está acelerada por la proteincinasa C y el ATP, ya que los ésteres de forbol la favorecen y la ausencia de ATP la impide. De cualquier manera, el desensamblaje de la actina puede ser condición necesaria, pero no suficiente para la secreción.

Estudios llevados a cabo con técnicas amperométricas y de capacitancia permiten distinguir dos[31] o tres[32] diferentes poblaciones de gránulos en virtud de su rapidez para secretar. Un primer grupo de gránulos, estimado en unos 20, puede ser liberado casi de inmediato y podríamos denominarlo de liberación ultrarrápida[32], y un segundo grupo de pocos cientos de gránulos lo hace en pocos segundos[30-32]. La exocitosis de ambos grupos de gránulos sólo requiere de la elevación del calcio. Existe, no obstante, una gran controversia acerca de la concentración de calcio necesaria para producir la exocitosis. Mientras las pruebas bioquímicas apuntan a valores bajos, unos 1-15 μM[2,33], datos recientes parecen evidenciar que el enorme gradiente extra-intracelular unido a la baja difusión del calcio[34] pueden llevar a crear microdominios de alto calcio (varios cientos de μM) en donde se producirían "zonas calientes" de secreción[35,36]. El resto de los gránulos precisa ser transportado hacia la vecindad de la membrana, proceso que requiere Ca^{2+} y ATP, y los gránulos se liberan a lo largo de decenas de segundos[30].

El gránulo, una vez secretado, es retraído hacia el interior celular y sus membranas son recicladas para formar nuevos gránulos. Este proceso, denominado endocitosis, tiene por objeto mantener la superficie de la membrana constante y ahorrar materiales. La endocitosis es, a su vez, un proceso dependiente del calcio. No obstante, el gránulo recuperado retiene gran parte de sus componentes de membrana, puede recaptar catecolaminas e, incluso, volver a secretar si se aplica un estímulo secretagogo lo suficientemente intenso[37]. En su viaje de vuelta al Golgi estas vesículas, recubiertas de clatrina, pueden fundirse con lisosomas formando endosomas, grandes vesículas claras presentes en el citoplasma. Estas grandes vesículas claras se aprecian claramente tras la estimulación intensa de la célula.

En las células cromafines se distingue otra clase de vesículas, las vesículas claras pequeñas. Éstas son muy abundantes en neuronas simpáticas y en la línea de feocromocitoma[38] (un tumor de células cromafines) de rata PC12. El ciclo celular y, sobre todo, la función de estas vesículas, continúan siendo un tema oscuro.

El complejo de fusión

Toda una larga serie de proteínas han sido implicadas en el disparo y regulación de la exocitosis. A lo largo de la última década este rompecabezas parece haber ido acomodando sus piezas. No obstante, estamos muy lejos de conocer cómo funciona realmente. Aunque no existe un consenso sobre dónde ubicar cada una de las proteínas, en la figura 3 se expone un esquema acerca de cómo concebimos el complejo de fusión en la actualidad. Antes de la llegada del gránulo a su "punto de atraque" en la membrana celular, precisa de una proteína dependiente de GTP, la Rab 3A, sita en la membrana del gránulo de la que se disociará antes de la fusión. El NSF (*n-ethylmaleimidesensitive factor*) está íntimamente acoplado a las SNAP (α, β y γ) antes de asociarse al SNARE (receptor para SNAP). El SNARE esta compuesto por una serie de proteínas cuya función continúa aún sin establecerse. Las principales son la sinaptobrevina y la sinaptotagmina presentes en la membrana granular y la SNAP-25 y la sintaxina que lo están en la cara interna de la membrana plasmática[39].

La sinaptobrevina es el sustrato de actuación de las toxinas botulínica y tetánica. La sinaptotagmina parece ser el sensor de calcio que desencadena la exocitosis. En las terminaciones nerviosas simpáticas parece asociarse a los canales de calcio tipo N[40], pero la colocalización no está tan clara en la célula cromafín donde, además, el canal N no parece estar implicado en la secreción de catecolaminas[20].

La sinaptofisina es la más abundante de las proteínas de la membrana granular. Su función, sin embargo, continúa siendo un miste-

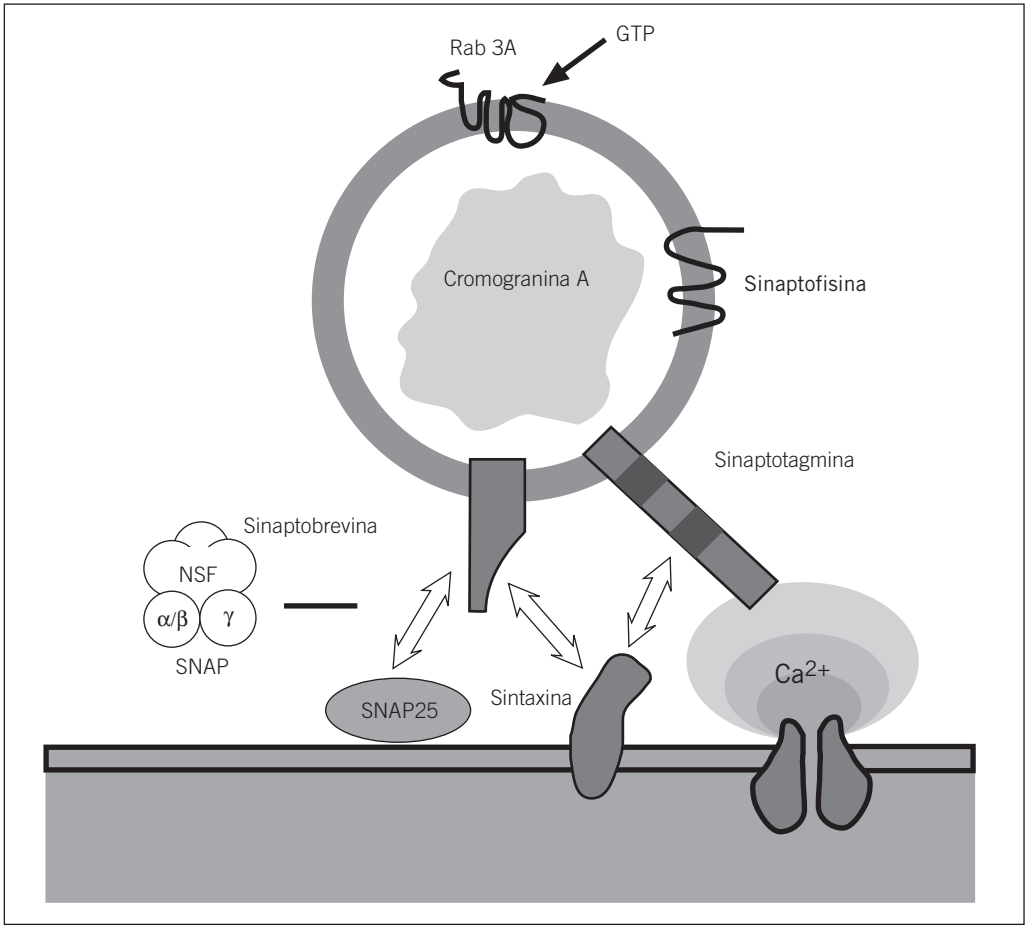


Fig. 3. Complejo de fusión. Se representan algunas de las proteínas putativas que intervienen en el proceso de atraque y fusión del gránulo cromafín. El tipo de canal del calcio y su posible colocalización son objeto de debate.

rio. Su capacidad para formar poros en membranas lipídicas ha hecho postular la hipótesis de que se trata de la iniciadora del poro de fusión. También se ha especulado con su participación en el proceso de endocitosis[39] (fig. 3).

BIBLIOGRAFÍA

1. Douglas WW, Rubin RP. The role of calcium in the secretory response of adrenal medulla to acetylcholine. J Physiol 1961; 159: 40-57.
2. Knight DE, Baker PF. Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. J Memb Biol 1982; 68: 107-140.
3. Knight DE, Tonge DA, Baker PF. Inibition of exocytosis in bovine adrenal medullary cells by botulinum toxin type D. Nature 1985; 317: 719-721.
4. Penner R, Neher E, Dreyer F. Intracellularly injected tetanus toxin inhibits exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. Nature 1986; 324: 76-78.
5. Knight DE, Baker PF. The phorbol ester TPA increases the affinity of exocytosis for calcium in "leaky" adrenal medullary cells. FEBS Lett 1983; 160: 98-100.
6. Morita K, Dohi T, Kitayama S, Tsujimoto A. Mechanism of cyclic AMP facilitation of stimulation-evoked catecholamine release in adrenal chromaffin cells. 1. Evidence for enhancement of evoked increase in cytosolic free Na+ con-

centration by cyclic AMP elevation. Neurochem Int 1991; 19: 81-85.
7. Burgoyne RD, Handel SE. Activation of exocytosis by GTP analogues in adrenal chromaffin cells revealed by patch-clamp capacitance measurement. FEBS Lett 1994; 344: 139-142.
8. Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. J Physiol 1982; 331: 599-635.
9. Trifaró JM, Vitale ML. Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. Trends Neurosci 1993; 16: 466-472.
10. Ferro-Novick S, Jahn R. Vesicle fusion from yeast to man. Nature 1994; 370: 191-193.
11. Boulter J, O'Shea-Greenfield A, Duvoisin RM, Connally JG, Wada E, Jensen A et al. α3, α5 and β4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gen cluster. J Biol Chem 1990; 265: 4.472-4.482.
12. Álvarez C, Lorenzo C, Santana F, Borges R. Interaction between G-protein-operating receptors eliciting secretion in rat adrenals. Biochem Pharmacol 1997; 53: 317-325.
13. Finnegan JM, Borges R, Wightman RM. Comparison of cytosolic Ca^{2+} and exocytosis response from single rat and bovine chromaffin cells. Neuroscience 1996; 3: 833-846.
14. Borges R. Ionic mechanisms involved in the secretory effects of histamine in the rat adrenal medulla. Eur J Pharmacol 1993; 241: 194-198.
15. O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ, Burgoyne RD. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cell from video imagen of fura2. EMBO J 1989; 8: 401-411.
16. García AG, editor. Farmacología de los canales iónicos. Monografías Dr. Antonio Esteve, n.º 17. Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve, 1995.
17. Borges R, Sala F, García AG. Continuous monitoring of catecholamine release by cat adrenals. J Neurosci Meth 1986; 16: 289-300.
18. Borges R. Histamine H1 receptor activation mediates the preferential release of adrenaline in the rat adrenal gland. Life Sci 1994; 54: 631-640.
19. Cheek TR, Burgoyne RD. Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. FEBS Lett 1986; 207: 110-114.
20. López MG, Albillos A, De la Fuente MT, Borges R, Gandía L, Carbone E et al. Localized L-type calcium channels control exocytosis in cat chromaffin cells. Plügers Arc 1994; 427: 348-354.
21. Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy R, Kawakoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ et al. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 10.754-10.758.
22. Borges R. The rat adrenal gland in the study of the control of catecholamine secretion. Sem Cell Develop Biol 1997; 8: 113-120.
23. Schroeder TJ, Borges R, Finnegan JM, Pihel K, Amatore C, Wightman RM. Temporary resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. Biophys J 1996; 70: 1.061-1.068.
24. Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Álvarez de Toledo G, Lindau M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. Nature 1997; 389: 509-512.
25. Helle KB, Serck-Hanssen M, Aardal S. Functional aspects of the adrenal medullary chromogranins. Neuro Int 1993; 4: 353-360.
26. Pihel K, Travis ER, Borges R, Wightman RM. Exocytotic release from individual granules exhibits similar properties at mast and chromaffin cells. Biophys J 1996; 71: 1.633-1.640.
27. Borges R, Travis ER, Hoechsttetler SE, Wightman RM. Effects of external osmotic pressure on vesicular secretion from bovine adrenal medullary cells. J Biol Chem 1997; 272: 8.325-8.331.
28. Blondel O, Bell GI, Seino S. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, secretory granules and secretion in endocrine and neuroendocrine cells. Trends Neurosci 1995; 18: 157-161.
29. Martin TFJ. Stages of regulated exocytosis. Trends Cell Biol 1997; 7: 271-276.
30. Neher E, Zucker RS. Multiple calcium-dependent processes related to secretion bovine chromaffin cells. Neuron 1993; 10: 21-30.
31. Parsons TD, Coorssen JR, Horstmann H, Almers W. Docked granules, the exocytic burst and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. Neuron 1995; 15: 1.085-1.096.
32. Horrigan FT, Bookman RJ. Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. Neuron 1994; 13: 1.119-1.129.
33. Morgan A, Burgoyne RD. Common mechanisms for regulated exocytosis in the chromaffin cells and the synapse. Sem Cell Develop Biol 1997; 8: 141-149.
34. Sala F, Hernández Cruz A. Ca^{2+} diffusion modeling in spherical neuron: relevance of buffering properties. Biophys J 1990; 57: 313-324.
35. Schroeder JT, Jankowski JA, Senyshyn J, Holz RW, Wightman RM. Zones of exocytosic release on bovine adrenal medullary cells in culture. Biol Chem J 1994; 24: 17.215-17.220.
36. Robinson IM, Finnegan J, Monck J, Wightman RM, Fernández JM. Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 2.474-2.478.
37. Von Grafenstein H, Borges R, Knight DE. The effect of botolinium toxin type D on the triggered

and constitutive exocytosis/endocytosis cycles in cultures of bovine adrenal medullary cells. FEBS Lett 1986; 298: 118-122.
38. Nimomiya Y, Kishimoto T, Yamazawa T, Hiroshi I, Miyashita Y, Kasai H. Kinetic diversity in the fusion of exocytotic vesicles. EMBO J 1997; 16: 929-934.
39. LLona I. Synaptic like microvesicles: do they participate in regulated exocytosis? Neurochem Int 1995; 3: 219-226.
40. Sheng ZH, Retting L, Cook T, Catterall WA. Calcium-dependent interaction of N-type calcium channel with the synaptic core complex. Nature 1996; 379: 451-454.

DISCUSIÓN

V. Ceña: Cuando has hablado del efecto de la temperatura, aparte de que a 37 ºC se disocia mucho mejor el complejo granular, hay otra serie de cambios que ocurren en la célula. Por ejemplo, la temperatura de transición de fase de la membrana para la célula cromafín bovina es de 31 ºC, lo que significa que a 37 ºC la membrana es mucho más fluida y se facilitan mucho más los fenómenos de fusión. Existe también la probabilidad de que el sistema SNAP-SNARE, a la hora de facilitar los fenómenos de fusión, funcione mejor a 37 ºC. En primer lugar, ¿qué parte considerarías que es relevante, en cuanto a la disociación del complejo de la matriz del gránulo, una vez que ha sido producida la exocitosis? Y, en segundo lugar, ¿qué valor le darías a una mejoría temperatura-dependiente de los mecanismos moleculares que llevan a la exocitosis?

R. Borges: El incremento del número de espigas secretoras observado tras el cambio de temperatura es probablemente dependiente de modificaciones ejercidas sobre la maquinaria secretora. Estos cambios pueden ser la aceleración del transporte de gránulos hasta la membrana celular e igualmente incrementar la afinidad de los mismos por el complejo de fusión, teoría del SNARE. Sin embargo, nosotros estamos observando un notable incremento en la propia velocidad de expulsión del contenido intragranular. Resulta difícil pensar que estos cambios sean motivados por factores extragranulares como el SNARE. La hipótesis que nos parece más plausible sería la de una interacción directa sobre la constante de disociación de las catecolaminas con la matriz proteica intragranular.

A. Zorzano: ¿Hasta qué punto las proteínas sintaxinas, SNAP-25, etc., son específicas y exclusivas de las vesículas secretoras? ¿Se encuentran también en otros compartimientos endosomales?

R. Borges: El gran número de proteínas que existen hace casi imposible responder de una forma general a esta pregunta. La exocitosis, tanto la constitutiva como la inducible, es dependiente de casi todas las proteínas que se han descrito. Algunas de ellas también participan en la fusión de organelas dentro de la célula, de forma independiente de los mecanismos de exocitosis. Por esta razón, creo que la fusión es un fenómeno lo suficientemente general como para que la totalidad de las proteínas estén implicadas de una forma bastante universal.

A. Zorzano: Has comentado que estas vesículas proceden del aparato de Golgi y no de endosomas. ¿Qué evidencia experimental apoya dicha afirmación?

R. Borges: Los gránulos poseen proteínas grandes y péptidos para los que no existen transportadores en la membrana del gránulo, lo que obliga a pensar que proceden del aparato de Golgi. También en neuronas simpáticas, donde existe transporte axoplásmico, se observa este transporte en vesículas densas o los gránulos, lo que conlleva a pensar que sea tributario a esta vía. Sin embargo, están descritas las *sinaptic-like vesicles,* estas vesículas pequeñas recubiertas inicialmente de clatrina, que probablemente sean producto bien de la endocitosis o bien de endosomas situados cerca de la membrana celular, refiriéndonos a neuronas largas.

V. Sánchez Margalet: ¿Habéis estudiado el posible papel del ATP y de algunos de los péptidos, incluida la proteína de cromogranina, que se hallan a tan alta concentración?

R. Borges: Lo primero que llama la atención es la estequiometría tan fija 1/4, que da la impresión de que, de alguna manera, el ATP, la cromogranina y las catecolaminas están interactuando de una forma bastante estequimétrica también. Mi opinión, que no he podido contrastar, es que este ATP se puede llegar a hidrolizar de forma espontánea, aunque sea en un bajo porcentaje. Cambios bruscos de pH y de la concentración del calcio pueden llegar a hidrolizar el ATP e incrementar estas fuerzas de disociación. Los experimentos de

temperatura, los realizados con angiotensina II, o simplemente aquellos en los que se aumenta la cantidad de IP_3, refuerzan esta hipótesis.

V. Sánchez Margalet: Dado que las células cromafines poseen receptores purinérgicos, mi pregunta se refería concretamente a si existían estudios del posible papel de estas sustancias una vez se han secretado.

R. Borges: Se sabe que la activación de los receptores purinérgicos inhibe la secreción. Sin embargo, el problema radica en la dificultad de depletar los gránulos de ATP sin inducir la muerte de la célula.

J.M. Baeyens: Me consta que habéis trabajado con PKC pero, en cambio, no has hablado de fenómenos de fosforilación y de su implicación sobre la liberación.

R. Borges: Aunque realizamos algunos estudios con proteincinasa C sobre la transducción receptorial, he preferido no abordar este tema por tratarse de una línea de investigación complementaria para nuestro grupo. Sin embargo, me gustaría destacar que resulta curioso, por ejemplo, observar que tras la incubación de células con concentraciones muy bajas de cualquiera de los ésteres de forbol, las respuestas secretoras inducidas por potasio se incrementan. Sin embargo, los ésteres de forbol no afectan a las respuestas secretoras inducidas por bradicinina mientras que estos activadores de la PKC abolen las respuestas a la histamina, a la angiotensina II o a la metacolina. Esto nos llamó mucho la atención, y nos llevó a pensar que probablemente estemos hablando de distintas dianas dentro de la célula. Estos experimentos los realizamos en glándulas perfundidas y es muy difícil hacer bioquímica en estas condiciones.

Mecanismos de regulación de receptores acoplados a proteínas G

Federico Mayor, Jr.

Departamento de Biología Molecular y Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM.
Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) constituyen la más importante superfamilia de receptores de membrana plasmática, y median las acciones de numerosas hormonas, neurotransmisores, quimioquinas y estímulos sensoriales. La activación de este tipo de receptores conduce a la interacción con proteínas G heterotriméricas específicas, que se disocian en subunidades α y $\beta\gamma$, que a su vez modulan la actividad de diferentes efectores de membrana plasmática, como adenilil ciclasas, fosfolipasas, canales iónicos, etc. Más recientemente se ha puesto de manifiesto que los GPCR modulan también vías de cinasas mitogénicas, lo que refuerza el amplio espectro de acciones fisiológicas mediadas por este tipo de receptores, y el interés en conocer con detalle sus mecanismos de activación y desactivación[1-3]. En efecto, una característica general de estos receptores es que poseen complejos mecanismos de regulación que modulan su capacidad de respuesta, y que son esenciales en la integración de señales celulares y en procesos de plasticidad y desensibilización. Estos mecanismos de regulación pueden afectar a su expresión, a su funcionalidad y a su localización subcelular.

El trabajo realizado por diversos grupos en los últimos 12 años ha puesto de manifiesto la existencia de dos familias de proteínas que desempeñan un papel clave en la rápida modulación de la funcionalidad y la dinámica intracelular de receptores tras la activación por agonistas. En primer lugar, la familia de cinasas de GPCR, denominadas GRK (*G protein-coupled Receptor Kinases*), que fosforilan a estos receptores de forma dependiente de agonista[4-6]. En segundo lugar, las proteínas desacoplantes denominadas arrestinas, que se unen a los receptores que han sido fosforilados por GRK, impidiendo de esta forma la transducción de la señal desde aquél a las proteínas G heterotriméricas[6,7]. Posteriormente, se inicia un proceso de internalización transitoria de receptores que permite su desfosforilación y reciclaje funcional[5,8]. Este complejo entramado regulatorio es, por tanto, parte esencial del sistema de transducción de señales al interior celular.

El papel esencial de las GRK y arrestinas en la modulación de la función de GPCR sugiere que cambios en su expresión y/o actividad afectarán a la eficacia de los sistemas de transducción y podrán tener trascendencia fisiopatológica, lo que constituye la hipótesis fundamental del proyecto de investigación de nuestro laboratorio. El desarrollo de esta hipótesis requiere un incremento sustancial del conocimiento de los mecanismos moleculares de regulación de la funcionalidad y de la expresión de GRK y arrestinas, así como de sus papeles en diversos procesos fisiológicos, lo que permitirá también la identificación de nuevas dianas y estrategias terapéuticas.

Procesos de desensibilización de receptores acoplados a proteínas G

La desensibilización homóloga se define como la pérdida de respuesta de un receptor a sucesivas estimulaciones por su propio ligando. Utilizando inicialmente el modelo del adrenoceptor β_2 (β_2AR), se comprobó que la desensibilización promovida por sus agonistas implica muy principalmente a serina/treonina cinasas que fosforilan específicamente la forma activada del receptor. La primera de estas cinasas que se identificó se denominó βARK (β-*adrenergic receptor kinase*)[9]. La fosforilación mediada por βARK per se no desacopla al receptor de la proteína G, sino que más bien promueve la unión de un factor citosólico, la proteína β-arrestina, que forma parte de una familia de proteínas moduladoras[7]. La asociación

La investigación en el laboratorio del autor está financiada por el Ministerio de Educación y Cultura (DGICYT/PM95-0033) y la Unión Europea. El Centro de Biología Molecular recibe una ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

de la β-arrestina es la responsable final del desacoplamiento, al impedir la interacción del receptor con la proteína G y bloquear así la transducción de la señal[4,5]. A este proceso de desacoplamiento sigue una rápida internalización transitoria del receptor en estructuras endocíticas, cuyo posible papel se ha sugerido que puede ser permitir la desfosforilación del receptor y su reciclado en estado funcional a la membrana plasmática (proceso de resensibilización), como se discutirá posteriormente.

A raíz de estos datos se empezó a comprobar que mecanismos de regulación muy similares operan en otros receptores acoplados a proteínas G. Además del sistema paralelo que rige en la retina (con la rodopsina, la rodopsina cinasa y la arrestina), se ha demostrado que βARK puede fosforilar y regular diversos receptores, como adrenoceptores α_2, muscarínicos, de sustancia P, de trombina, de angiotensina, receptores de aromas y otros muchos[4-6]. Estos datos, junto con la reciente caracterización de distintas cinasas relacionadas con βARK, que constituyen la denominada familia multigénica GRK, permite sugerir que todos los receptores acoplados a proteínas G tendrán mecanismos de regulación similares.

Familia de cinasas de receptores acoplados a proteínas G

Como ya se ha mencionado, βARK fue el primer miembro clonado de esta familia, y se denomina actualmente GRK2. Hasta el momento, se han identificado y clonado 6 GRK en mamíferos, y dos homólogos en *Drosophila* y en *C. elegans*[7-10]. La mayoría de las GRK, con la excepción de GRK1, que se expresa en retina y pineal y GRK4 (que se expresa mayoritariamente en testículo y células germinales), tienen un amplio patrón de expresión.

Las GRK comparten un dominio catalítico central de 272 aminoácidos homólogo a otras serina-treonina cinasas y difieren tanto en un extremo N-terminal de 183-188 residuos de funciones aún poco conocidas como en un dominio C-terminal de dimensión más variable y que contiene sitios de modificación postraduccional y regiones implicadas en la interacción con la membrana plasmática y con otras proteínas[10]. En efecto, puesto que sus sustratos conocidos, los GPCR, se encuentran en la membrana plasmática, otro aspecto importante a considerar es cómo las GRK se asocian o translocan a la membrana. La rodopsina cinasa (GRK1) posee en su extremo C-terminal el motivo CAAX que dirige su isoprenilación incorporando un grupo farnesilo. GRK2 y GRK3 poseen un dominio de interacción con las subunidades βγ de las proteínas G (residuos 546-670) que contiene un dominio de homología a pleckstrina (pH, residuos 553-651), presente en muchas proteínas de citosqueleto y proteínas señalizadoras[11]. Dado que las subunidades βγ están constitutivamente asociadas con las membranas a través del grupo geranilgeranilo de la subunidad γ, la unión de GRK2 con βγ sería el mecanismo seleccionado para el anclaje de estas cinasas. Esto permitiría un control muy exacto de localización de estas proteínas en un punto concreto de la membrana y en el momento en el que se necesitan, ya que la disponibilidad de subunidades βγ libres respondería a la activación de una población de receptores dada. Así mismo, la presencia de βγ estimula la actividad de GRK2[5,10].

El segmento de aminoácidos 643-673 de GRK2 parece ser crítico para la unión de Gβγ, y un péptido sintético correspondiente a esa secuencia bloquea la interacción entre ambas proteínas[12]. Por otra parte, se ha referido que el dominio N-terminal de la región de homología a pleckstrina interacciona con fosfatidilinositolbisfosfato (PIP2) y otros fosfolípidos. Datos muy recientes sugieren que la unión de lípidos y Gβγ al dominio C-terminal de GRK2 aumenta sinérgicamente la actividad de la cinasa y que ambos anclajes son precisos para una correcta localización de GRK2 en la membrana plasmática[13,14]. El conjunto de los datos parece sugerir que existen múltiples niveles de interacción que cooperan para la activación y translocación a la membrana de GRK2 tras la interacción del receptor con un agonista.

De hecho, la situación parece ser aún más compleja. Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que una fracción muy significativa de GRK2 está asociada a membranas internas microsomales en distintos tejidos y líneas celulares, lo que plantea nuevas preguntas sobre las funciones fisiológicas de esta cinasa[15,16]. Utilizando cinasa recombinante en sistemas reconstituidos, nuestro laboratorio ha encontrado que GRK2 se asocia con alta afinidad, como proteína periférica y mediante interacciones electrostáticas a una proteína integral de las membranas microsomales, de forma similar a su asociación transitoria con la membrana plasmática[17]. Es muy importante destacar que aunque las proteínas G endógenas de las membranas microsomales son capaces de estimular la actividad de GRK2 unida, las

subunidades βγ no parecen ser el principal componente de las membranas responsables de la unión de GRK2. A diferencia de lo que ocurre con las subunidades βγ, para las que GRK2 parece tener un sitio de unión en la zona C-terminal (véase anteriormente), nuestros datos indican que el extremo N-terminal de la cinasa sería el responsable de su interacción con membranas microsomales[17,18]. En definitiva, nuestros resultados sugieren la existencia de proteínas de anclaje adicionales para GRK2 y definen un nuevo dominio funcional en esta cinasa. En cuanto a otras GRK, GRK5 posee un dominio C-terminal rico en aminoácidos básicos y polares que promoverían su asociación a membranas a través de interacciones iónicas con grupos negativamente cargados de los fosfolípidos. Por último, GRK6 se modifica por palmitoilación en su región C-terminal, modulando así su asociación a membrana[10].

Además de los mecanismos descritos, la actividad y dinámica intracelular de las GRK, particularmente de la mejor conocida GRK2, podría estar modulada por su asociación con otras proteínas o mediante fosforilación por otras cinasas. Así, muy recientemente se ha descrito la fosforilación de GRK2 y GRK5 por PKC, lo que alteraría su actividad modulando su interacción con la membrana plasmática[4]. Datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que la fosforilación de GRK2 por otro tipo de cinasas será también importante para su papel en la célula.

Por otra parte, datos recientes indican que GRK2 es capaz de asociarse a microtúbulos y de fosforilar tubulina[19], lo que aumenta el horizonte de sus funciones celulares. Por último, nuestro laboratorio ha identificado recientemente la existencia de un factor proteico citosólico capaz de modular la actividad de GRK2 (Ruiz-Gómez et al, en preparación). En resumen, la existencia de múltiples y complejos mecanismos de regulación de la actividad y la localización subcelular de GRK2 concuerda con un papel esencial de esta cinasa en la señalización mediada por GPCR.

Familia de proteínas desacoplantes de receptores acoplados a proteínas G: arrestinas y β-arrestinas

Las arrestinas desempeñan un papel clave en los procesos de desensibilización de GPCR, al interaccionar con el receptor fosforilado por GRK y desacoplar la señal de las proteínas G. La arrestina fue el primer miembro de la familia identificado y clonado. Es la proteína soluble más abundante en los segmentos externos de los fotorreceptores y su asociación a rodopsina fosforilada por la GRK1 bloquea completamente la señalización mediada por el receptor lumínico. Posteriormente se identificaron proteínas homólogas en sistemas distintos al visual, clonándose β-arrestina 1 y β-arrestina 2, de los que se conocen distintas variantes por *splicing* alternativo[7]. Los miembros de la familia de las arrestinas presentan una gran homología de secuencia, compartiendo un 45% de identidad en la región correspondiente a los residuos 16-349 de la arrestina. La mayor divergencia en la familia se concentra en el extremo C-terminal de las distintas variantes polipeptídicas, lo que probablemente determine su distinta sensibilidad a efectos reguladores, fosforilación u otras modificaciones postraduccionales[6].

Frente a los datos de que se dispone en el caso de GRK2 y otras GRK, se sabe muy poco acerca de los mecanismos implicados en modular la actividad o la localización subcelular de las arrestinas, lo que constituye un campo de gran atractivo para la investigación.

GRK2 y arrestinas e internalización de receptores acoplados a proteínas G

La presencia de agonistas induce, además del desacoplamiento funcional descrito entre receptores y proteínas G, un secuestro o internalización transitorio de receptores que en distintos casos se ha comprobado que tiene lugar en vesículas endosómicas cubiertas por clatrina. Sin embargo, no todos los GPCR tendrían que seguir esta vía endocítica[5,6,8].

El papel funcional del secuestro ha sido controvertido. Datos recientes indican que la internalización de receptores es una etapa necesaria en la desfosforilación y reciclado de GPCR previamente fosforilados por GRK y desacoplados por arrestinas. Krueger et al[20] han identificado una GPCR-fosfatasa, miembro de la familia de fosfatasas PP2A, que colocaliza con el βAR en endosomas durante la internalización promovida por agonista, y que puede actuar gracias a los cambios conformacionales que induce en el receptor el bajo pH intraluminal de las vesículas endocíticas, lo que explicaría el requerimiento de la internalización para la resensibilizacion. Así, el proceso de desensibilización en su conjunto resultaría del equilibrio entre los fenómenos de desacoplamiento y de reciclaje[5,8].

De hecho, datos muy recientes indicarían que tanto las arrestinas como GRK2 podrían

actuar como adaptadores moleculares entre el GPCR y proteínas implicadas en internalización. Un posible modelo para el proceso de internalización se basaría en la fosforilación del receptor por GRK2 en respuesta a agonista, lo que promovería el reclutamiento de β-arrestina, que a su vez actuaría como adaptador, acoplando el complejo a la maquinaria de la vía endosómica ya que es capaz de interaccionar in vitro con clatrina, un componente clave de las vesículas cubiertas[21,22]. Sin embargo, la situación puede ser más compleja, ya que, muy recientemente, nuestro grupo ha observado que GRK2, además, colocaliza con β_2AR internalizado[23]. Por tanto, es posible que GRK2 desempeñe también un papel de adaptador o de modulador del proceso de internalización.

La consecuencia funcional y fisiológica más importante que emerge de estas observaciones es que GRK y arrestinas desempeñan un papel central tanto en el proceso de desensibilización de GPCR como disparando y controlando su reciclaje y resensibilización. Así, la velocidad y el grado de desensibilización y secuestro de un determinado receptor dependerá del complemento celular y/o la actividad de GRK y de arrestinas, como recientemente se ha referido para adrenoceptores β, m_2 muscarínicos o CCR5 de quimiocinas[5,24,25]. Todos estos datos refuerzan el papel central de GRK y arrestinas en la modulación de GPCR, e indican que cambios fisiológicos o patológicos en sus valores o actividad podrán modificar la eficacia de la transducción de señales.

Mecanismos de regulación de la expresión de GRK

De lo tratado hasta ahora se deduce claramente el interés por conocer las señales y mecanismos que gobiernan la expresión de los miembros de estas familias de proteínas reguladoras en distintos tipos celulares y circunstancias fisiológicas. Nuestro laboratorio está interesado especialmente en los mecanismos que regulan la actividad transcripcional del gen GRK2 humano, así como en la estabilidad de estas proteínas en las células. Así, como se indica posteriormente, hemos investigado cómo diversos estímulos modulan la actividad del promotor de GRK2 en células del sistema cardiovascular. Por otra parte, hemos podido determinar que los valores celulares de GRK2 están estrechamente y rápidamente regulados en cunato a la degradación proteolítica por la vía del proteasoma. Es muy interesante destacar que la activación de GPCR aumenta la ubiquitinación y la velocidad de degradación de GRK2, lo que indica la importancia fisiológica de un adecuado control del complemento celular de esta cinasa (Penela et al, en prensa).

Funciones fisiológicas de GRK2

Sistema cardiovascular

Los GPCR median acciones de mensajeros esenciales para la función del sistema cardiovascular, que constituyen la diana de múltiples fármacos utilizados en el tratamiento del fallo cardíaco congestivo, la angina de pecho, o la hipertensión, enfermedades muy frecuentes y que constituyen un objetivo sanitario de primer orden. Dado que las proteínas reguladoras GRK son piezas clave del entramado regulatorio que modifica la eficacia de la transducción a través de GPCR, la hipótesis de que cambios en la actividad y/o expresión de estas proteínas sean de especial importancia fisiológica en el sistema cardiovascular resulta atractiva. Los principales datos que apoyan esta hipótesis son los siguientes:

1. La capacidad de GRK2 y otras GRK de fosforilar GPCR implicados en la función cardiovascular: β_1 y β_2 adrenérgicas, α_2-adrenérgicas, α_{1B}-adrenérgicas, angiotensina AT_1, endotelina ET-A y ET-B, etc.[5,10,26].

2. La participación de mecanismos de desensibilización de receptores en la etiología y progresión de ciertas enfermedades cardiovasculares. Así, la desensibilización de adrenoceptores β es un factor importante en pacientes con fallo cardíaco congestivo o en hipertensión[5], y se han detectado alteraciones en los valores de cierta isoforma de GRK en esas situaciones patológicas, y en otras asociadas a hipertrofia cardíaca[27-29].

3. Ratones transgénicos que sobreexpresan GRK2 presentan una importante reducción en la contractilidad cardíaca en respuesta a agonistas. Por otra parte, la sobreexpresión de un fragmento C-terminal de la cinasa que actúa como inhibidor de GRK2 endógena, incrementa la contractilidad basal y en respuesta a agonistas[30]. Todo ello confirma un importante papel de GRK2 como regulador de la función cardíaca in vivo.

4. La disrupción del gen GRK2 en ratones conduce a la muerte de los ratones homozigotos entre los días embrionarios 9 y 14, siendo el principal rasgo fenotípico una importante hi-

poplasia del miocardio[31]. Esto sugiere un papel esencial para esta cinasa en el crecimiento y la diferenciación de las células de corazón.

Todos estos datos parecen apuntar a un relevante papel de las proteínas reguladoras GRK y arrestinas en la función y disfunción del sistema cardiovascular. En este sentido, nuestro laboratorio está intentando investigar los estímulos que gobiernan la expresión de GRK2 en distintos tipos celulares cardiovasculares. Hemos podido comprobar que vías de señalización estimuladas por mensajeros "vasoconstrictores" (angiotensina, catecolaminas a través de adrenoceptores α_1 o endotelinas) aumentan la actividad transcripcional del promotor del gen GRK2 humano en células de músculo liso de aorta de rata, mientras que la transcripción disminuye en la presencia de citocinas proinflamatorias (Ramos-Ruiz y Mayor, enviado). El mejor conocimiento de los mecanismos que regulan la expresión de GRK ayudará a entender sus alteraciones en circunstancias patológicas y al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Papel de GRK en la regulación de receptores de quimiocinas

Los estudios de expresión tisular de las diversas GRK y arrestinas indicaron una notable expresión de GRK2, GRK3, GRK5 y GRK6 en leucocitos y distintas líneas celulares de origen mieloide y linfoide[4,32]. Se planteaba, por tanto, qué tipo de receptores constituirían la diana de regulación en estos tipos celulares. En los últimos años se han identificado numerosos GPCR que están presentes en estas células y que desempeñan un papel fundamental en procesos de respuesta inmune e inflamatoria, mediando las respuestas de mensajeros quimioatrayentes, como fMLP o C5a, o de distintos tipos de quimiocinas[33].

La activación del receptor es el paso que inicia la respuesta celular necesaria para la migración de las células en respuesta al gradiente de quimiocinas. La desensibilización del receptor también se ha propuesto como un proceso esencial para la correcta migración de la célula a través del gradiente de mensajero[34], pero se conoce muy poco tanto acerca de la transducción de la señal como de los mecanismos moleculares de desensibilización de estos receptores, especialmente los receptores de quimiocinas CC.

La abundancia e importancia funcional de los receptores de quimiocinas, y el potencial papel clave de la desensibilización en procesos de migración celular, les hace unos candidatos muy atractivos para el estudio de sus mecanismos de regulación, y se convierten en los principales candidatos para explicar los altos niveles de expresión de GRK y arrestinas en leucocitos. En los últimos 3 años, diversos laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado la capacidad de GRK2 y GRK3 de fosforilar receptores de IL-8, fMLP y de CC-quimiocinas como CCR2b y CCR5[24,34-37]. Por tanto, parece confirmarse que las proteínas GRK desempeñan un papel importante en la modulación de la respuesta de monocitos y linfocitos a quimiocinas. Otro aspecto de interés en este sentido es que estudios muy recientes indican que las quimiocinas también se producen por células no hematopoyéticas del sistema nervioso central, y que receptores de quimiocinas se expresan en astrocitos y células microgliales e incluso en neuronas; por tanto, cabe especular que estos mensajeros quimiotácticos desempeñan también un papel en las reacciones inflamatorias en el sistema nervioso, de gran importancia en situaciones patológicas[24].

BIBLIOGRAFÍA

1. Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1996; 36: 429-459.
2. Clapham DE, Neer EJ. G protein βγ subunits. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997; 37: 167-203.
3. Della Rocca GJ, Van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. J Biol Chem 1997; 272: 19.125-19.132.
4. Chuang TT, Iacovelli L, Sallese M, DeBlasi A. G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. Trends Pharmacol Sci 1996; 17: 416-421.
5. Mayor F Jr, Penela P, Ruiz-Gómez A. Role of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) and arrestins in β-adrenergic receptor internalization. Trends Cardiovasc Med 1998; 8: 235-241.
6. Böhm SK, Grady EF, Bunnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G protein-coupled receptors. Biochem J 1997; 322: 1-18.
7. Sterne-Marr R, Benovic JL. Regulation of G protein-coupled receptors kinases and arrestins. Vitam Hormones 1995; 51: 193-234.
8. Koenig JA, Edwardson JM. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci 1997; 18: 276-287.

9. Benovic JL, DeBlasi A, Stone WC, Caron MG, Lefkowitz RJ. β-adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. Science 1989; 246: 235-246.
10. Lohse MJ, Krasel C, Winstel R, Mayor F Jr. G-protein-coupled receptor kinases. Kidney Intn 1996; 49: 1.047-1.052.
11. Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Sarasate M. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. Trends Biochem Sci 1993; 18: 343-347.
12. Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. The binding site for the bg subunits of heterotrimeric G proteins on the β-adrenergic receptor kinase. J Biol Chem 1993; 268: 8.256-8.260.
13. Pitcher JA, Touhara K, Payne E, Lefkowitz RJ. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β2-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with Gβγ subuntis and lipid. J Biol Chem 1995; 270: 707-710.
14. DebBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, Hosey MM. G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein βγ subunits. J Biol Chem 1996; 272: 22.552-22.562.
15. García-Higuera I, Mayor F Jr. Rapid desensitization of neonatal rat liver β-adrenergic receptors. A role for β-adrenergic receptor kinase. J Clin Invest 1994; 93: 937-943.
16. García-Higuera I, Penela P, Murga C, Egea G, Bonay P, Benovic JL et al. Association of the regulatory β-adrenergic rceptor kinase with rat liver microsomal membranes. J Biol Chem 1994; 269: 1.348-1.355.
17. Murga CA, Ruiz-Gómez I, García-Higuera I, Kim CM, Benovic JL, Mayor F Jr. High affinity binding of β-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation. J Biol Chem 1996; 271: 985-994.
18. Murga C, Esteban N, Ruiz-Gómez A, Mayor F Jr. The basal subcellular distribucion of β-adrenergic receptor kinase is independent of G-protein βγ subunits. FEBS Letters 1997; 409: 24-28.
19. Pitcher JA, Hall RA, Daaka Y, Zhang J, Ferguson SSG, Hester S et al. The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin. J Biol Chem 1998; 273: 12.316-12.324.
20. Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization: regulation of β2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. J Biol Chem 1997; 272: 5-8.
21. Goodman OB, Krupnick JG, Santoni F, Gurevich VV, Penn RB, Cagnon AW et al. β-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β2-adrenergic receptor. Nature 1996; 383: 447-450.
22. Goodman OB, Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL, Keen JH. Arrestin/clathrin interaction. J Biol Chem 1997; 272: 15.017-15.022.
23. Ruiz-Gómez A, Mayor F, Jr. β-adrenergic receptor kinase (GRK2) colocalizes with β-adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. J Biol Chem 1997; 272: 9.601-9.604.
24. Aragay AM, Ruiz-Gómez A, Penela P, Sarnago S, Elorza A, Jiménez-Sáinz MC et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. FEBS Lett 1998; 430: 37-40.
25. Ménard L, Ferguson SSG, Zhang J, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG et al. Synergistic regulation of β2-adrenergic receptor sequestration: Intracellular complement of β2-adrenergic receptor kinase and β-arrestin determine kinectics of internalization. Mol Pharmacol 1997; 51: 800-808.
26. Palczewski K. GTP-binding-protein coupled receptor kinases: two mechanistic models. Eur J Biochem 1997; 248: 261-269.
27. Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Loshe MJ. Altered expression of β-adrenergic receptor kinase and β1-adrenergic receptors in the failing human heart. Circulation 1993; 78: 454-463.
28. Gros R, Benovic JL, Tan CM, Feldman RD. G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. J Clin Invest 1997; 99: 2.087-2.093.
29. Choi D-J, Walter JK, Hunter JJ, Rockman HA. Mechanism of β-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased β-adrenergic receptor kinase. J Biol Chem 1997; 272: 17.223-17.229.
30. Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA et al. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. Science 1995; 268: 1.350-1.353.
31. Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK et al. Esential role of β-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 12.974-12.979.
32. De Blasi A, Parruti G, Sallese M. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of β-adrenergic receptor kinases 1 and 2. J Clin Invest 1995; 95: 203-210.
33. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. Annu Rev Immunol 1994; 12: 593-633.
34. Franci C, Gosling J, Tsou C-L, Coughlin SR, Charo IF. Phosphorylation by a G protein-coupled kinase inhibits signaling and promotes internalization of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor. J Immunol 1996; 157: 5.606-5.612.
35. Aramori I, Zhang J, Ferguson SSG, Bieniasz PD, Cullen BR, Caron MG. Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an

HIV-1 co-receptor. EMBO J 1997; 16: 4.606-4.616.
36. Prossnitz ER. Desensitization of N-formylpeptide receptor-mediated activation is dependent upon receptor phosphorylation. J Biol Chem 1997; 272: 15.213-15.219.
37. Aragay AM, Mellado M, Frade JMR, Martín AM, Jiménez-Sáinz MC, Martínez AC et al. Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 95: 2.985-2.990.

DISCUSIÓN

J. Moscat: ¿Es el mutante cinasa inactivo de GRK2 dominante negativo?

F. Mayor: Se puede comportar como dominante negativo si se tiene cuidado con los niveles de expresión. Este patrón de desensibilización que aparece con receptores de quimiocinas transfectados no se observa cuando se expresa el mutante K220R. El K220R contiene dominios de homología a plextrina y sitios de unión a subunidades βγ de las proteínas G que pueden interferir también en los procesos de señalización celular.

J. Moscat: ¿Habéis estudiado si se comporta como el mutante de β-arrestina que bloquea la internalización y la activación de MAPcinasa?

F. Mayor: Estamos realizando actualmente estos experimentos, aunque todavía no disponemos de resultados concluyentes.

R. Borges: El receptor β (β_1) es el típico ejemplo de receptor acoplado a la adenilato ciclasa. ¿Existe algún tipo de regulación por proteincinasa A?

F. Mayor: Efectivamente, estos receptores pueden ser también modulados por fosforilación por proteincinasas. Lo que todavía no se conoce del todo es si existe algún tipo de fosforilación jerárquica, en el sentido de que la fosforilación previa por GRK o por proteincinasa A, modifique la acción de otras cinasas. De todas maneras, existe otra posible acción de estas cinasas sobre los mecanismos de regulación, actuando sobre la expresión de estas proteínas. Se sabe, por ejemplo, que la β-arrestina incrementa su expresión en presencia de dibutiril-AMPc. Por otra parte, se sabe que efectivamente ésteres de forbol aumentan la expresión de GRK, lo que indicaría que pueden modularse. Se trataría, pues, de mecanismos que indirectamente modularían la señal, actuando sobre la actividad o la expresión de estos receptores.

J.M. Baeyens: Desde el punto de vista de la tolerancia opiácea, poder bloquear el efecto de GRK o de β-arrestina creo que sería clave. ¿Hay alguna herramienta que atraviese la membrana y sea capaz de producir este tipo de bloqueos?

F. Mayor: Por el momento no se conoce ningún inhibidor específico de GRK2 o de β-arrestinas. Se sabe que los polianiones, como la heparina, pueden inhibir in vitro la GRK2, pero no existen herramientas permeables a la membrana. Otra aproximación para bloquear estas proteínas podría ser, por ejemplo, el empleo de ratones transgénicos que sobreexpresan la zona C-terminal de la cinasa. Esto, en principio, inhibiría su translocación a la membrana y su actuación, inhibiendo la desensibilización. También se han realizado intentos con terapia génica en conejos, mediante adenovirus acoplados a esta construcción. Sin embargo, se debe tener en cuenta que este fragmento C-terminal de la cinasa puede inhibir también subunidades βγ de las proteínas G, lo que ejercería una acción muy inespecífica. Probablemente haya que conocer mejor la relación estructura-función de GRK2 para intentar diseñar algún otro tipo de inhibidores.

J.M. Baeyens: Los bloqueadores de receptores acoplados a proteína G producen una regulación al alza de sus receptores tras la administración crónica. ¿Existe alguna explicación sobre el papel de la GRK o de la β-arrestina en estas situaciones y su posible efecto, por ejemplo, sobre la internalización del receptor? De hecho, uno de los problemas de los bloqueadores dopaminérgicos en el tratamiento de la esquizofrenia es que producen una regulación al alza de los receptores dopaminérgicos, la cual genera problemas clínicos como consecuencia del tratamiento. Sería muy interesante, pues, conocer cuáles son los mecanismos implicados en este proceso y, por tanto, poder modularlo.

F. Mayor: Aunque se dispone de algunos experimentos realizados en corazón de cerdos tratados con antagonistas de los adrenoceptores β en los que se ha observado que pueden modular los valores de GRK2, creo que es preciso conocer con más detalle cómo se re-

gula la expresión de estas proteínas. Por tanto, lo que comentas es una posibilidad muy interesante pero sobre la cual todavía no existe una respuesta en la actualidad.

A. García de Herreros: Durante el desarrollo habéis visto que las GRK se expresan específicamente en las zonas de migración. Especulando sobre su posible papel, ¿crees que podrían estar involucrados negativamente en la migración de las células de esta zona, actuando a través de los receptores de quimiocinas?

F. Mayor: Es una posibilidad realmente muy interesante. En general, los mecanismos de desensibilización pueden ser relevantes en situaciones de seguimiento de gradientes quimiotácticos, es decir, cuando una célula se pone en movimiento hacia una determinada diana. Además, esta célula ha de ser capaz de corregir su trayectoria y sería en este momento cuando los mecanismos de *on/off* sucesivos podrían desempeñar un papel primordial. Es curioso observar que las GRK en general se expresan preferentemente en leucocitos, en espermatozoides y también en determinadas células migratorias durante algunos períodos embrionarios (datos todavía sin publicar). Esto sugiere esta posible relación entre receptores de sustancias quimiotácticas, la función de estas proteínas y los procesos generales de migración. Sin embargo, también existen algunos datos negativos al respecto. Si se mutan los lugares de fosforilación por esta cinasa en algunos receptores de quimiocinas, el posterior estudio de quimiotaxis que ha analizado únicamente la capacidad de migración, ha evidenciado que mantienen su capacidad migratoria. Tal vez convendría analizar también los posibles cambios de dirección en los gradientes quimiotácticos.

A. Zorzano: Me ha parecido entender que en el extremo C terminal de BARK-1 el dominio de unión $\beta\gamma$ es también un dominio PH. Desde este punto de vista, ¿tienes idea de si puede haber algún tipo de *cross-talk* entre BARK-1 o BARK-2 y PI-3 cinasa?

F. Mayor: Existe un dominio de homología plextrina que se solapa parcialmente con el dominio de unión de $\beta\gamma$. Estudios de otros grupos sugieren que la parte N-terminal del dominio de homología a plextrina interacciona con PIP-2 mientras que la zona más terminal es más relevante en cuanto a su unión a $\beta\gamma$, y que ambas interacciones de una forma sinérgica modulan la actividad de la cinasa. La posibilidad de relaciones entre PI-3 cinasa y GRK-2 resulta interesante por varias razones: por la interacción de modulación por productos de PI-3 cinasa sobre la actividad GRK-2 y por otras derivaciones también en el contexto del papel de arrestinas y de la propia GRK-2 en la transducción de señales. En este momento estamos trabajando en intentar ver posibilidades de interacción entre PI-3 cinasa y algunos de los componentes del sistema que he mencionado.

V. Sánchez Margalet: Volviendo al tema de regulación de GRK-2, parece que la subunidad α es más importante para la activación y, sin embargo, hay un dominio PH en $\beta\gamma$ que podría ser responsable de la localización. ¿Hay algún tipo de especificidad por parte de las diferentes familias de proteínas G, y en concreto con diferentes combinaciones de subunidades α y $\beta\gamma$?

F. Mayor: Por un lado, me gustaría precisar que el efecto sobre las GRK por parte de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G es un efecto sobre la actividad, fundamentalmente porque permite la translocación de la cinasa desde el citosol a la membrana. En este sentido las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G únicamente regulan GRK2 y GRK3, que son las que tienen este dominio. No está claro si existe una especificidad de determinadas combinaciones de subunidades $\beta\gamma$ que sean más o menos eficaces en producir estos efectos. Por otro lado, he comentado el efecto que puede tener la cotransfección de ciertas subunidades α, no sobre la actividad sino sobre la expresión, sobre la actividad transcripcional del promotor del gen GRK2. No se ha descrito un efecto directo de interacción entre las α y estas GRK.

V. Sánchez Margalet: Dada la reciente publicación de datos sobre animales transgénicos que sobreexpresan α_q en tejido miocárdico y que presentan hipertrofia cardíaca, ¿crees que el efecto hipertrófico podría deberse a la sobreexpresión de GRK y de arrestina, secundario a la sobreexpresión de α_q?

F. Mayor: Creo que, efectivamente, es una posibilidad muy interesante. Los animales que sobreexpresan α_q presentan unas características de frecuencia cardíaca y una alteración en el patrón de desensibilización de algún tipo de receptores acoplados a proteínas G en los que pensamos que un factor que pudiera contribuir es la alteración secundaria en los valores de GRK-2.

Mecanismos moleculares implicados en la dependencia opiácea

Rafael Maldonado

Departamento de Neurofarmacología. Facultad de Ciencias de la Salud y de la Vida. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

Introducción

La morfina y sus derivados constituyen un grupo de fármacos conocidos con la denominación de opiáceos. Estos compuestos poseen propiedades farmacológicas de un gran interés terapéutico y han sido ampliamente utilizados en clínica para el tratamiento de diferentes cuadros dolorosos. Así, los opiáceos son los fármacos analgésicos más eficaces de entre todos los existentes. Sin embargo, la administración repetida de estos compuestos produce una serie de modificaciones en el organismo que originan el desarrollo de fenómenos de dependencia y de tolerancia a la mayor parte de sus respuestas farmacológicas. Estos procesos se desarrollan como consecuencia de los cambios adaptativos celulares y moleculares que se producen en el sistema nervioso central en respuesta a la presencia repetida del opiáceo, y que persisten durante un largo período de tiempo incluso después de la interrupción del tratamiento.

Se han realizado múltiples estudios para investigar los mecanismos neurobiológicos implicados en los fenómenos adaptativos que originan los procesos de dependencia a los opiáceos. Una primera hipótesis sugirió la existencia de una disminución en el número y/o afinidad de los receptores opioides en respuesta a la presencia continua del fármaco en la hendidura sináptica. Este fenómeno ha sido claramente observado en cultivos celulares que poseen dichos receptores tras la administración de agonistas opioides[1,2]. Sin embargo, dicho proceso se observó raramente en los estudios realizados in vivo[2-5]. Además, en las escasas ocasiones en las que se obtuvo esta subsensibilización in vivo resultó difícil relacionarla con el desarrollo de la tolerancia y la dependencia, ya que éstas estuvieron limitadas a algunas estructuras cerebrales y tan sólo tras ciertas condiciones particulares de tratamiento opiáceo[6-8].

Otra hipótesis para explicar la implicación del sistema opioide endógeno en los fenómenos de dependencia está basada en los efectos de la administración crónica de opiáceos sobre la biosíntesis de péptidos opioides. Según esta teoría, durante el desarrollo de la tolerancia y la dependencia opiácea se generarían ciertos fragmentos peptídicos a partir de los propios precursores de los péptidos opioides endógenos o bien a partir de otros precursores que poseerían propiedades opuestas a los opioides. Estos fragmentos peptídicos disminuirían las respuestas farmacológicas de los opiáceos, participando así en la expresión de la abstinencia[9-11].

Mecanismos de transducción del sistema opioide

Los cambios producidos en el propio receptor opioide o sobre la síntesis y degradación de los péptidos opioides endógenos no parecen tener una gran relevancia en los procesos de tolerancia y dependencia. En efecto, los fenómenos adaptativos que se producen en el sistema opioide endógeno durante el desarrollo de la dependencia opiácea tienen lugar principalmente en los sistemas de segundo mensajero acoplados al receptor opioide, incluyendo entre otros las proteínas G y diversas enzimas transmembranarias e intracelulares[12]. Así, la activación de los receptores opioides a través de su interacción con una proteína G produce la inhibición de una enzima transmembranaria, la adenilciclasa, responsable de catalizar la síntesis de AMPc. La inhibición de esta enzima es el punto de partida de toda una cascada de acontecimientos intracelulares que incluyen la inhibición de enzimas proteincinasas y la fosforilación de múltiples proteínas citoplasmáticas y nucleares que son el sustrato de dichas cinasas. El efecto inhibitorio crónico producido por la presencia continuada del opiáceo induce una hipertrofia compensatoria que afecta a la mayor parte de estos mensajeros intracelulares ligados a los receptores opioides[12,13].

Las primeras observaciones acerca de una activación del sistema AMPc durante la absti-

nencia opiácea fueron realizadas a partir de estudios sobre cultivos de células híbridas de neuroblastoma/glioma NG 108-15[14]. Un incremento en las concentraciones de AMPc[15], así como en la actividad proteincinasa[16] también se observó en el cerebro durante la abstinencia a opiáceos. Estudios posteriores han evaluado las estructuras cerebrales que se encuentran específicamente implicadas en estos cambios adaptativos. La dependencia opiácea produce una hipertrofia del sistema ligado al AMPc principalmente en el *locus coeruleus*, donde se observan modificaciones compensatorias en las proteínas G[17] y en las actividades adenilciclasa y proteincinasa[18]. Algunas de estas modificaciones también pudieron ser observadas en otras estructuras, como el núcleo *accumbens*[19] y el estriado[20]. En el *locus coeruleus* también se encontraron modificaciones compensatorias en diferentes proteínas que resultan fosforiladas por las proteincinasas, incluyendo proteínas citoplasmáticas, proteínas del citosqueleto que controlan la talla y la forma de las neuronas, y factores de transcripción que regulan la expresión genómica de la célula[12]. Diversos estudios han referido que estos cambios en los sistemas de mensajeros son en parte responsables de la aparición de los fenómenos de tolerancia y dependencia opiácea[12].

Gracias a los avances en las técnicas de biología molecular, recientemente ha sido posible el desarrollo de una serie de líneas de ratones transgénicos con deficiencias en los genes que codifican determinados receptores o mensajeros intracelulares. La utilización de dichos animales ha permitido realizar importantes avances en el estudio del sustrato biológico de la dependencia opiácea. Así, mediante el empleo de técnicas de recombinación homóloga se han conseguido ratones en los que se han suprimido los genes responsables de la expresión de ciertos receptores opioides (receptores μ y κ), monoaminérgicos (receptores dopaminérgicos D_2) o de factores de transcripción relacionados con las respuestas intracelulares de los opiáceos (CREB: *cAMP-responsive element-binding protein*).

Ratones deficientes para el receptor μ

El empleo de ratones transgénicos con deficiencias en el gen que codifica el receptor opioide μ ha permitido clarificar su papel en la dependencia opiácea[20]. Así, las respuestas analgésicas inducidas por la administración aguda de morfina resultaron completamente abolidas en esta línea de ratones transgénicos. La morfina tampoco tuvo propiedades reforzantes tras su administración repetida en estos animales. Estos efectos reforzantes de los opiáceos se encuentran íntimamente ligados a su capacidad para inducir el componente psíquico de la dependencia[21]. Por otra parte, el tratamiento crónico con morfina no desarrolló ninguna manifestación comportamental (signos somáticos y vegetativos de la abstinencia) ni bioquímica (elevación de la actividad adenilciclasa en el estriado) de dependencia opiácea en ratones con deficiencias en dichos receptores. Así pues, estos receptores opioides μ resultan imprescindibles no sólo para el desarrollo de la dependencia morfínica sino también para la expresión de las principales respuestas farmacológicas inducidas por este opiáceo.

Ratones deficientes para el receptor κ

Por otra parte, recientemente ha sido posible desarrollar ratones transgénicos deficientes en el gen que codifica el receptor opioide κ[22]. Las respuestas analgésicas inducidas por la administración aguda de morfina, así como las repuestas reforzantes inducidas tras su administración repetida, no se vieron modificadas en los ratones deficientes en dichos receptores. Sin embargo, la expresión de los signos somáticos de la dependencia opiácea resultaron moderamente reducidos en estos animales. Dicho resultado sugiere que los receptores κ opioides desempeñan un papel modulador en la expresión de la dependencia opiácea. Además, las respuestas analgésicas, locomotoras y motivacionales inducidas por el agonista κ selectivo U-50488H resultaron completamente abolidas en los animales deficientes en los receptores κ[22].

Ratones deficientes para el factor CREB

La participación de los factores de transcripción ha sido estudiada mediante el empleo de ratones transgénicos deficientes en el factor CREB. La eliminación del gen que codifica el factor de transcripción CREB[23] no modificó las respuestas farmacológicas inducidas por la administración aguda de morfina, en particular la actividad analgésica. Sin embargo, los efectos producidos por la administración crónica de opiáceos se vieron claramente alterados[24]. Así, el desarrollo de la tolerancia a la actividad analgésica de la morfina está disminuido, y también se observó una redución en la expresión

de los signos somáticos y vegetativos de la abstinencia opiácea. No obstante, ciertas manifestaciones bioquímicas asociadas a la abstinencia no se vieron modificadas por la supresión de CREB. Así, durante la abstinencia se observa un incremento en la expresión de los genes precoces, c-*fos* y c-*jun*, en ciertas estructuras cerebrales como el *locus coeruleus* y en el sistema límbico. La expresión de estos genes precoces y el incremento en la actividad de la enzima adenilciclasa producido durante la abstinencia opiácea no se vieron modificados en los animales con deficiencia de CREB. El factor de transcripción CREB desempeña, pues, un papel importante en las manifestaciones comportamentales de la abstinencia, aunque no parece participar en los efectos analgésicos producidos por la administración aguda de morfina. Los resultados bioquímicos en la actividad adenilciclasa sugieren que el mecanismo por el que CREB participa en los procesos de dependencia parece ser independiente de los mensajeros ligados al AMPc. Los sistemas intracelulares que participan en dicho mecanismo no han sido aún identificados y su conocimiento ayudará sin duda a esclarecer el sustrato biológico de estos procesos de dependencia.

Otros sistemas implicados

Otros sistemas de neurotransmisión diferentes del sistema opioide endógeno se encuentran también implicados en los cambios adaptativos responsables del desarrollo de la dependencia opiácea. Estos sistemas van a controlar a través de un mecanismo heterólogo la respuesta del organismo durante el proceso de dependencia. Así, se han descrito diversos cambios durante el desarrollo de la dependencia, sobre todo en los sistemas dopaminérgico, noradrenérgico, serotonérgico, colinérgico, GABAérgico y peptidérgico. La participación de ciertos mecanismos heterólogos, en particular del sistema dopaminérgico, también ha podido ser evaluada gracias al empleo de ratones transgénicos. Así, los efectos producidos por el tratamiento agudo y crónico con morfina fueron investigados en ratones deficientes en los receptores dopaminérgicos D_2[25], que han sido recientemente generados mediante la técnica de recombinación homóloga[26]. La supresión de los receptores dopaminérgicos D_2 no modifica las respuestas analgésicas y motoras inducidas por la administración aguda de morfina, ni el desarrollo de la dependencia física tras el tratamiento crónico con opiáceos. Sin embargo, los efectos reforzantes producidos por la morfina resultaron completamente abolidos en estos animales. Las propiedades reforzantes de un estímulo natural, la comida, no se vieron modificadas en los ratones con deficiencia en receptores dopaminérgicos D_2. Así pues, los receptores dopaminérgicos D_2 están selectivamente implicados en las propiedades reforzantes de los opiáceos y no parecen desempeñar un papel importante en otras respuestas agudas o crónicas inducidas por estos fármacos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Law PY, Hom DS, Loh HH. Down-regulation of opiate receptor in neuroblastome x glioma NG 10815 hybrid cells. J Biol Chem 1984; 259: 4.096-4.104.
2. Law PY, Hom DS, Loh HH. Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma x glioma NG 108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment: a multiple-step process. Mol Pharmacol 1982; 22: 1-4.
3. Chang KJ, Eckel RW, Blanchard SG. Opioid peptides induced reduction of enkephalin receptors in cultured neuroblastome cells. Nature 1982; 296: 446-448.
4. Puttfarken PS, Cox BM. Morphine-induced desensitization and down-regulation at mu-receptor in 7315C pituitary tumor cells. Life Sci 1989; 45: 1.937-1.942.
5. Zadina JE, Kastin AJ, Kersh D. TYR-MIF and hemorphin can act as opiate agonist as well as antagonist in the guinea pig ileum. Life Sci 1992; 51: 869-885.
6. Werling LL, McMahon PN, Cox BM. Selective changes in mu-opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 6.393-6.397.
7. Morris BJ, Herz A. Control of opiates receptor number in vivo: simultaneous kappa-receptor down-regulation and mu-receptor up-regulation following chronic agonist/anatgonist treatment. Neuroscience 1989; 29: 433-442.
8. Rothman RB. A review of the role of anti-opioid peptides in morphine tolerance and dependence. Synapse 1992; 12: 129-138.
9. Hammonds RG, Nicholas P, Li CH. Beta-endorphin (1-27) is an antagonist of beta-endorphin analgesia. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 1.389-1.393.
10. Nicolas P, Hammonds RG, Li CH. Beta-endorphin analgesia is inhibited by synthetic analogs of beta-endorphin. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 3.074-3.077.
11. Bronstein DM, Przewlocki R, Akil H. Effects of morphine treatment on pro-opio-melanocortin systems in rat brain. Brain Res 1990; 519: 102-111.
12. Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. J Neurosci 1992; 12: 2.439-2.450.

13. Collier HOJ. Cellular site of opiate dependendence. Nature 1980; 283: 625-630.
14. Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. Proc Natl Acad Sci USA 1975; 72: 3.092-3.096.
15. Collier HOJ, Francis DL. Morphine abstinence is associated with increased brain cyclic AMP. Nature 1975; 255: 159-162.
16. Clark AG, Jovic R, Ornellas MR. Brain microsomal protein kinase in the chronically morphinized rat. Biochem Pharmacol 1972; 21: 1.989-1.990.
17. Nestler EJ, Erdos JJ, Terwilliger R, Duman RS, Tallman JF. Regulation of G-proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. Brain Res 1989; 476: 230-239.
18. Nestler EJ, Tallman JF. Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. Mol Pharmacol 1988; 33: 127-132.
19. Tewilliger RZ, Beitner-Johnson D, Severino KA, Crain SM, Nestler EJ. A general role for adaptations in G proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. Brain Res 1991; 548: 100-110.
20. Matthes HWD, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ-opioid-receptor gene. Nature 1996; 383: 819-823.
21. Koob GF, LeMoal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. Science 1997; 278: 52-58.
22. Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A et al. Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances the sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. EMBO J 1998; 17: 886-897.
23. Hummler E, Cole TJ, Blendy JA, Ganss R, Aguzzi A, Schmid W et al. Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 5.647-5.651.
24. Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J et al. A mutation in the CREB gene strongly reduces the withdrawal syndrome in morphine dependent mice. Science 1996; 273: 657-659.
25. Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature 1997; 388: 586-589.
26. Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A et al. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. Nature 1995; 377: 424-428.

DISCUSIÓN

A. Muñoz: ¿Por qué esperabais que fuese tan importante CREB en la expresión de *c-jun* y *c-fos*, cuando no parece ser el principal factor que influye en la expresión de estos dos genes?

R. Maldonado: Si bien está claro que no es importante en la expresión de c-*jun,* sí que podríamos esperar una cierta participación en la de c-*fos.* La idea inicial parte de varios estudios que sugieren la existencia de una correlación entre la actividad del *locus coeruleus* y la expresión comportamental de la abstinencia. Nosotros utilizábamos este marcador de c-*fos* para comprobar cuál era la actividad del *locus coeruleus* durante el proceso de la abstinencia. La administración de clonidina, producto que reduce la sintomatología de la abstinencia, produce también una disminución de la actividad de las neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus.* Nosotros esperábamos que posiblemente, si había esta disminución de la expresión de la abstinencia, también podría haber una disminución en la expresión de c-*fos.*

A. Muñoz: ¿Sabéis si los animales CREB –/– tienen alterados los niveles de actividad, de cantidad de proteína o de fosforilación del CBP o de las CREM?

R. Maldonado: CREM está regulado al alza, pero en el caso de CBP lo desconozco.

F. Mayor: Puesto que está descrito que en animales que carecen de CREB se ven alterados toda una serie de procesos de memoria a largo plazo, incluso de memoria de contexto, ¿no se puede pensar que esto modifique algunos de los comportamientos que vosotros analizáis?

R. Maldonado: En los resultados que hemos presentado no, porque se trata de estudios de dependencia física, donde no participa la memoria. Pero en experimentos muy recientes, que esperamos se publiquen en breve, se ha observado la preferencia de plaza con animales deficientes en αδ-CREB. Ni en los animales con deficiencias ni en los animales de genotipo normal se observó ningún tipo de modificación de las propiedades reforzantes inducidas por morfina, cocaína ni por comida,

como estímulo natural. En primer lugar, se concluye que en estas condiciones CREB no desempeñarían un papel relevante en las propiedades reforzantes inducidas por dichos estímulos. Y, en segundo lugar, el déficit de memoria inducido en estos animales no sería lo suficientemente importante para que el animal sea incapaz de relacionar estos estímulos con el compartimiento asociado. Cabe añadir que los déficit de memoria se analizaron en estudios de memoria espacial y que aparecieron sólo en ciertas condiciones experimentales particulares, por lo que no se trata de un déficit generalizado. En los últimos estudios realizados con el doble mutante, es decir, un alelo carece de $\alpha\delta$ y el otro alelo carece de $\alpha\beta\delta$, no se observan diferencias relevantes en cuanto a la memoria. Por tanto, actualmente se cuestiona la importancia que en un principio se propuso de CREB para estos procesos de memoria. Si bien posiblemente participa, parece ser que su trascendencia es menor de la que se sugirió al principio.

F. Mayor: En vuestro modelo experimental, ¿se sabe si los distintos agonistas opiáceos promueven diferentes patrones de desensibilización?

R. Maldonado: Nosotros no hemos trabajado sobre este tema, pero el grupo de Erik Nestler sí que ha realizado estudios de este tipo, y parece que existe una implicación de la proteína GRK y de la arrestina en los procesos de dependencia. A pesar de todo, no se dispone todavía de estudios concluyentes al respecto.

V. Ceña: Es sabido que al final, el efecto gratificante de la morfina se basa en la activación de una serie de circuitos eléctricos. ¿Se ha estudiado si se modifica significativamente la transmisión sináptica en el síndrome de abstinencia, en experimentos con rodajas de hipocampo donde está mantenida la estructura entre las neuronas?

R. Maldonado: Se dispone de los datos derivados de experimentos in vivo que reflejan la existencia de un incremento del *firing* en el *locus coeruleus* como consecuencia de la abstinencia. Sin embargo, dicho incremento no aparecía en los primeros estudios sobre abstinencia realizados con rodajas del *locus coeruleus*. Fue posteriormente cuando el grupo de Aghajanian* comprobó la existencia de cierto aumento del *firing* en rodajas del *locus coeruleus*, aunque constataron que era inferior al observado mediante estudios in vivo. Por esta razón, se cree que existen unas aferencias excitadoras que participan también en este proceso de activación del *locus coeruleus* durante la abstinencia y se sugiere particularmente la participación del núcleo paragigantocelularis a través de sus proyecciones glutamatérgicas hacia el *locus coeruleus*. Por tanto, nos hallamos ante un mecanismo intrínseco al *locus coeruleus* representado por los fenómenos adaptativos que se producen en la organización intracelular y, por otra parte, ante un fenómeno extrínseco al *locus coeruleus* derivado del incremento de la liberación de glutamato proveniente del núcleo paragigantocelularis.

V. Ceña: Puesto que parecen estar implicados en la propagación del impulso y en la transmisión sináptica, ¿se podría sugerir que la diana final de todos los procesos bioquímicos que conducen al síndrome de abstinencia fuera precisamente la modificación de la actividad de canales iónicos?

R. Maldonado: No me atrevería a hablar de diana final, pero, evidentemente, se trataría de una de las dianas más importantes. Para explicar la dependencia creo que no nos podemos basar en un sistema exclusivo. Además de la participación del sistema homólogo opioide, también se producen modificaciones heterólogas, como en la dopamina, noradrenalina, péptidos antiopioides, etc. El resultado de los cambios en toda esta serie de sistemas va a dar lugar en su conjunto al proceso de la abstinencia, con la participación de determinados canales iónicos en algunos de ellos.

V. Ceña: Lógicamente me refería a los canales iónicos como un todo.

J.M. Baeyens: Nosotros tenemos datos publicados acerca de que el bloqueo de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L inhibe la abstinencia, mientras que la estimulación de canales de potasio sensibles al ATP inhibe la abstinencia.

R. Trullás: En los mutantes de CREB, ¿habéis estudiado otros factores de transcripción además de c-*fos* y c-*jun*? En segundo lugar, y también en estos animales, ¿se observan alteraciones motoras que pudiesen explicar los déficit en aprendizaje espacial en otros modelos?

R. Maldonado: Hemos estudiado animales deficientes en CREM y, al igual que otros autores, no hemos observado modificación alguna en la gravedad de la abstinencia. Respecto a tu

*Kogan JH, Nestler EJ, Aghajanian GK. Elevated basal firing rates and enhanced responses to 8-Br-cAMP in *locus coeruleus* in brain slices from opiate-dependent rats. *Eur J Pharmacol* 1992; 211: 47-53.

segunda pregunta, se observa una ligera disminución de la actividad locomotora horizontal, aunque difícilmente esto puede interferir en el resultado de la abstinencia, puesto que observamos cambios en todos los parámetros y no sólo en el *jumping*. En cuanto al déficit de memoria espacial, y tratándose de una deficiencia motora tan mínima, tampoco creo que desempeñe un papel importante en el déficit de memoria espacial.

A.M. PLANAS: La abstinencia como síndrome tiene muchos componentes. ¿Hasta qué punto esta serie de parámetros que analizáis son suficientemente representativos del síndrome de abstinencia como para afirmar que no existe en estos animales?

R. MALDONADO: Simplemente constatamos que la expresión somática de la abstinencia está disminuida, sin que esto signifique una abolición de la misma. Por estudios realizados previamente perfectamente estandarizados y aceptados en la actualidad, sabemos que en el ratón existen una serie de signos que están claramente relacionados con la intensidad de la abstinencia, como son el *jumping* y la pérdida de peso. Por nuestros estudios, podemos afirmar que ambos se encuentran disminuidos de una manera notable en estos animales.

J.M. BAEYENS: Con referencia a los ratones con deficiencia de receptores μ_1 naturales, algunos autores han demostrado que en dichos animales algunos agonistas μ producen analgesia. Mi primera pregunta sería, ¿vuestros ratones presentan deficiencias en μ_1 y μ_2? Y, en segundo lugar, ¿observáis los mismos resultados con otros agonistas μ?

R. MALDONADO: Mi opinión es que en los animales que presentan deficiencias de una manera natural existe una disminución en la población de receptores μ sin alcanzarse una abolición total de receptores. Nosotros hemos realizado bastantes estudios con nuestros animales *knock-out* deficientes en receptores μ utilizando diferentes agonistas μ. Hay dos tipos de construcciones: unos *knock-out* que proceden del exón 1, con los que hemos trabajado, y otros *knock-out* del exón 2 que han sido utilizados por otros autores. Todos los grupos estamos de acuerdo en que la morfina no tiene ningún tipo de acción analgésica en animales *knock-out* procedan del exón 1 o del exón 2. Sin embargo, con heroína, morfina-6-glucurónido y 6-acetilmorfina los resultados son algo contradictorios en función de los modelos experimentales utilizados.

Papel del óxido nítrico en la abstinencia opiácea

Juan Carlos Leza, Beatriz Cuéllar, Ignacio Lizasoain, M.ª Ángeles Moro y Pedro Lorenzo

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina.
Universidad Complutense. Madrid.

Introducción

En general, los tratamientos farmacológicos de larga duración inducen cambios perdurables en las funciones celulares (en los procesos de síntesis y liberación de neurotransmisores, en los receptores o canales, en los mensajeros intracelulares e incluso cambios en su genoma)[1]. En el caso de los opiáceos estas modificaciones ocurren tanto en neuronas opioides como en células que están bajo la influencia de éstas. La expresión de estos cambios en respuesta a la exposición crónica a opiáceos es el desarrollo de tolerancia y dependencia de sus efectos.

Los opiáceos son fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de las situaciones dolorosas de intensidad de moderada a grave, y a menudo es necesaria su administración crónica. De esta forma, el desarrollo de tolerancia a su efecto analgésico y a otros efectos es muy frecuente. Aunque aparece muy raramente en la clínica, es posible que este "nuevo ambiente" tras el uso crónico sea roto de manera brusca. Entonces aparece el síndrome de abstinencia.

Describiremos algunos términos básicos que ayudarán a entender este "nuevo ambiente" y los acontecimientos que siguen a su ruptura. Las drogas de abuso se definen clásicamente como sustancias que pueden producir dependencia física, psicológica o ambas, y su administración crónica es definida como adicción[2]. *Tolerancia* representa la reducción de los efectos de la droga tras la administración repetida de ésta a dosis iguales, o la necesidad de incrementar las dosis para que aparezcan los mismos efectos. *Dependencia* se define como un estado que se manifiesta por alteraciones físicas o psicológicas tras el cese de la droga. Por último, *drogadicción* se define como un constructo biológico, psicológico y conductual cuyo dato fundamental es el uso compulsivo de la sustancia, a pesar de que las consecuencias adversas son muy evidentes incluso para el propio sujeto[3]. Los mecanismos bioquímicos o moleculares de estas tres fases son todavía objeto de intensa investigación. El propósito de este artículo es presentar las evidencias que señalan un importante papel regulador de la vía aminoácidos excitadores (AAE):L-arginina:óxido nítrico (NO) en la modulación de la cascada de fenómenos que preceden al síndrome de abstinencia y concurren en él.

El síndrome de abstinencia no es una situación dramática en términos de mortalidad (excluyendo violencia o traumatismos), pero el conocimiento de los mecanismos que llevan a la dependencia y a la abstinencia es esencial para prevenir el círculo vicioso *abuso-abstinencia-recaída*. Las fuertes respuestas psicológicas y conductuales tras la abstinencia contribuyen a la recaída, y evitar la abstinencia es seguramente una de las principales causas por las que los adictos continúan la administración crónica de la sustancia.

Obviamente, este comportamiento que se autoalimenta no es la única causa de la dependencia. Las drogas de abuso son "reforzadores" muy potentes. La capacidad reforzadora positiva de las drogas refleja su potencia para producir dependencia psicológica y numerosas evidencias sugieren que existe un circuito localizado principalmente en al área tegmental ventral y el *nucleus accumbens,* que es común para la mayoría de las drogas de abuso[3,4].

Los mecanismos bioquímicos implicados en el desarrollo de la dependencia física y el síndrome de abstinencia no están absolutamente esclarecidos. Existen numerosos sistemas implicados en este fenómeno[5]: agentes que actúan a través de receptores opioides (opiáceos exógenos o péptidos opioides), péptidos no opioides, inhibidores de peptidasas o encefalinasas, neurotransmisores (serotonina, catecolaminas, adenosina, aminoácidos excitadores [AAE] o inhibidores), bloqueadores de los canales de calcio, agentes que modifican los sistemas de se-

gundos mensajeros (AMPc y GMPc), inmunomoduladores, etc. Uno de los sistemas implicados más recientemente es el NO. En esencia, los datos disponibles hasta el momento indican que el NO está implicado en los procesos de dependencia y abstinencia, pero todavía no está claro si se trata de una causa o de una consecuencia de otros procesos. Comenzaremos por presentar algunos aspectos básicos de la abstinencia a opiáceos, y posteriormente exploraremos las evidencias que demuestran que la vía metabólica AAE:NO está implicada en la dependencia física a opiáceos.

El síndrome de abstinencia a opiáceos

Como hemos comentado previamente, la definición clásica de adicción requiere por lo general la evidencia de que existe dependencia física. Experimentalmente, la única vía para identificar si una sustancia produce dependencia física es el estudio del síndrome de abstinencia[6]. En humanos, el síndrome de abstinencia se describe por una mezcla de ansiedad, disforia y deseo de droga, acompañado de evidentes síntomas somáticos. El síndrome de abstinencia es, por lo general, fácil de reproducir en el laboratorio, administrando un antagonista o cesando bruscamente la administración de la droga. En la mayoría de los estudios se utilizan roedores. En la tabla I se presentan los signos y síntomas de abstinencia más evidentes en varias especies animales.

Existen numerosas evidencias de que se trata de un síndrome influido por múltiples mecanismos[7]: *a)* la complejidad del curso temporal, comienzo y duración del síndrome (por lo general en dos fases: primera, estimuladora, y segunda, depresora); *b)* la diversidad de aproximaciones terapéuticas que han demostrado algún efecto antiabstinencia, y *c)* la localización de múltiples sustratos neuroanatómicos de la dependencia física.

Las áreas anatómicas que participan en el síndrome de abstinencia han sido ampliamente estudiadas mediante inyecciones intracerebrales de antagonistas opiáceos o lesionando ciertas vías nerviosas en animales morfinodependientes. Uno de los trabajos más relevantes fue el de Maldonado et al[8], en el que inyectaron metilnaloxonio en áreas cerebrales muy concretas de ratas con dependencia a la morfina. Los núcleos más sensibles fueron el *locus coeruleus* y la sustancia gris periacueductal. Sin embargo, la expresión de la mayoría de los signos del síndrome de abstinencia tiene un sustrato anatómico múltiple. Existen también otros síntomas periféricos de tipo secretor (diarrea, salivación, lagrimeo y rinorrea) que pueden provocarse tras la administración central de un antagonista[9,10], lo que indica que, además de estructuras periféricas, existe una participación importante de estructuras centrales (médula espinal) en los efectos periféricos[11].

El *locus coeruleus* es un pequeño núcleo que contiene la mayor parte de los cuerpos neuronales de neuronas noradrenérgicas del

TABLA I
SÍNTOMAS Y SIGNOS DE ABSTINENCIA OPIÁCEA EN VARIAS ESPECIES[5]

Ratón	*Rata*	*Humano*
Hiperactividad Salto Pérdida de peso Hipotermia Micción Diarrea Sacudidas Temblor Movimientos estereotipados	Hiperactividad Salto Pérdida de peso Hipotermia Micción Diarrea Sacudidas Lagrimeo Ptosis Castañeteo de dientes Priapismo Salivación Contracturas abdominales Movimientos estereotipados Agresividad Rinorrea	Deseo de droga, ansiedad, llanto, congestión nasal, sudor, bostezos, dificultad para dormir, midriasis, piloerección, temblor, "flashes" de frío y calor, dolores óseos y musculares, anorexia, insomnio, náuseas, vómitos, diarreas, contracturas abdominales, HTA, hipertermia, hiperpnea, pérdida de peso, eyaculaciones espontáneas

sistema nervioso central[12], además de poseer una gran densidad de receptores opioides[13]. Tanto las proyecciones aferentes como las eferencias de este núcleo están muy extendidas por todo el sistema nervioso central[14,15].

Durante la abstinencia precipitada por naloxona en animales con dependencia de morfina se observa una activación de las neuronas del *locus coeruleus*[16]. Este incremento en la actividad se correlaciona directamente con los síntomas de abstinencia y coexiste con un incremento en el recambio de noradrenalina en el *locus coeruleus* y en sus áreas de proyección[17,18]. El primer estudio de Aghajanian[16] demostró también que la estimulación del autorreceptor adrenérgico α_2 por clonidina suprimía los cambios inducidos por la abstinencia. Las primeras (y todavía útiles) aproximaciones terapéuticas no sustitutivas del tratamiento de la abstinencia incluían clonidina y otros estimulantes α_2. Estas evidencias sugirieron que la hiperactividad noradrenérgica mediaba la expresión de la mayoría de los componentes del síndrome de abstinencia a morfina en áreas del sistema nervioso central inervadas por el *locus coeruleus*.

Este incremento en la transmisión noradrenérgica durante el síndrome de abstinencia ocurre también en la periferia[19,20] y es responsable de algunos síntomas periféricos que pueden ser utilizados como índice de abstinencia (p. ej., incremento de la presión arterial)[21].

Regulación aminoacidérgica del locus coeruleus

La "tormenta noradrenérgica" que ocurre en el *locus coeruleus* durante la abstinencia opiácea puede verse influida por otros sistemas neurotransmisores. Una parte sustancial de la hiperactividad coerulear inducida por la abstinencia opiácea es mediada por un *input* aminoacidérgico al *locus coeruleus*, que se describió por estudios electrofisiológicos y neuroanatómicos[22,23]. Se han descrito también otras relaciones entre los sistemas noradrenérgico y aminoacidérgico en distintas áreas cerebrales que controlan la presión arterial[24] o la función neuroendocrina[25,26].

Tras estas primeras descripciones, también se demostró que el incremento en la liberación de AAE (glutamato y aspartato) ocurría dentro del *locus coeruleus* durante el síndrome de abstinencia[27]. Por otra parte, el hecho de que la hiperactividad de las neuronas coeruleares fuera más pronunciada en modelos in vivo que in vitro (rebanadas de *locus coeruleus*)[28] indicaba la existencia de neuronas aferentes al *locus coeruleus* que controlaban esta hiperactividad, que serían desconectadas en la preparación de rebanadas. Varios estudios demostraron que la activación de estas neuronas era controlada por una amplia red de conexiones aminoacidérgicas, principalmente desde el núcleo *paragiganto-cellularis* (PGi) y el núcleo *prepositus hypoglossi* (PHi)[22,29,30] y otras, posiblemente desde la lámina I de la médula espinal[31]. La regulación aminoacidérgica puede partir también del propio *locus coeruleus*. De hecho, Fung et al[32] describieron tres tipos de neuronas coeruleares en rata y ratón: las que son positivas a la inmunotinción con tirosina hidroxilasa, las que son inmunorreactivas para glutamato, y las que se tiñen con los dos antígenos.

Así mismo, la regulación aminoacidérgica del *locus coeruleus* durante el síndrome de abstinencia puede ser regulada a su vez por otros sistemas neurotransmisores: el incremento de la transmisión serotonérgica atenúa el componente glutamatérgico del síndrome de abstinencia en el *locus coeruleus*[28]. Una de las cuestiones que quedan por resolver es si los AAE pueden regular también los cambios en otras áreas fuera del *locus coeruleus*.

El hecho de que la estimulación del receptor NMDA en células cerebelosas iba seguido de la liberación del factor relajante de origen endotelial (EDRF)[33], identificado a posteriori como NO[34], y la posterior identificación de la NO sintasa en el tejido cerebral[35], llevó al establecimiento de la vía AAE:L-arginina:NO. El principal mecanismo de transducción del NO es la formación de GMPc, el cual puede modificar la liberación de neurotransmisores en otras neuronas[36,37] (fig. 1). Veamos, en resumen, cuál es el significado fisiopatológico de esta vía en el sistema nervioso central.

La vía AAE/L-arginina/NO en el sistema nervioso central

El NO, que es sintetizado por la enzima NO sintasa (NOS), es un importante mensajero inter e intracelular. La NOS cataliza la oxidación del aminoácido L-arginina a NO más citrulina (equimolecular). Esta enzima fue identificada en un principio en el endotelio vascular[38,39], pero también desempeña un importante papel en otros tejidos como el sistema nervioso central y periférico[40]. Existen dos clases de NOS, dependiendo de la sensibilidad al calcio: las constitutivas (dependientes del calcio, princi-

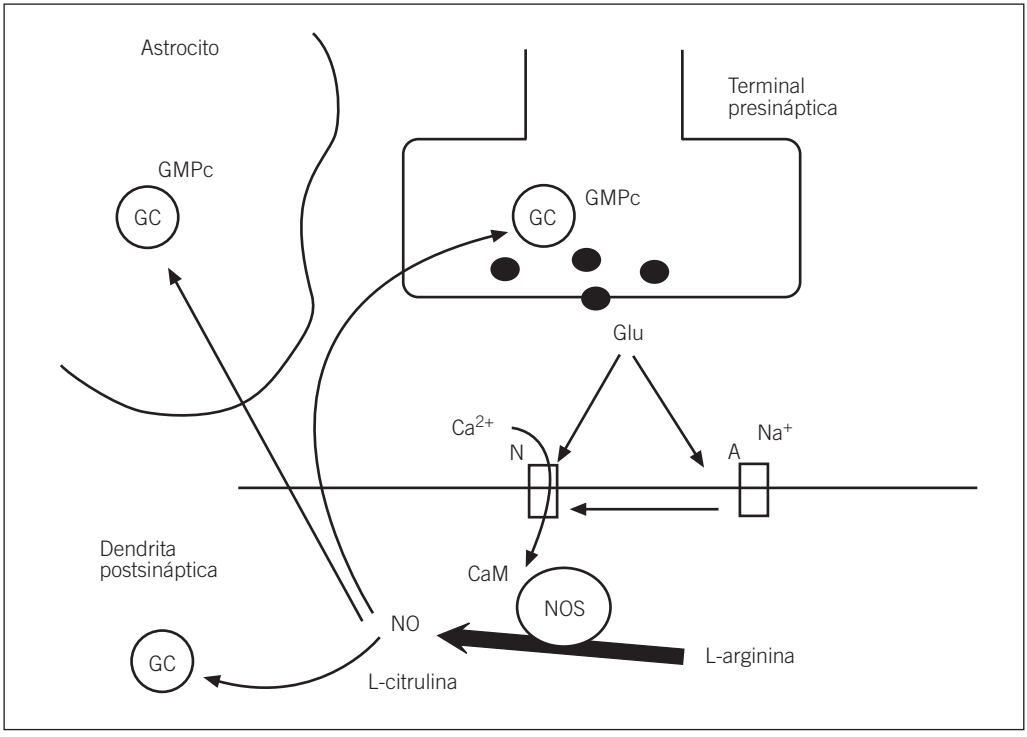


Fig. 1. El glutamato (glu) liberado de la terminal presináptica actúa sobre receptores NMDA (N) y no NMDA (A), lo que produce un aumento de la entrada de Ca^{2+}. La calmodulina (CaM) activa la NOS, que forma NO. El NO se difunde hacia otras células. El principal mecanismo de transducción neuronal es la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (GC), lo que aumentaría las concentraciones de GMPc. (Modificada de Garthwaite[37].)

palmente en neuronas, nNOS y endotelial, eNOS), y la inducible (independiente del calcio, iNOS, descrita inicialmente en macrófagos, hepatocitos y células gliales).

En los últimos años numerosas evidencias han sugerido el papel del NO en el sistema nervioso central en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos[40-42]. Alguno de los papeles *fisiológicos* propuestos para el NO en el sistema nervioso central son: desarrollo cerebral, plasticidad neuronal, formación de memoria (potenciación perdurable *LTP* en el hipocampo), regulación de la circulación cerebral, hiperalgesia o estrés[43-47]. Por otra parte, concentraciones excesivas de AAE (glutamato) y un incremento de la síntesis de NO también se ha demostrado en procesos *patológicos* como epilepsia, lesión hipóxico-isquémica[48-51] y un amplio espectro de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson o la corea de Huntington[52-55]. En la actualidad, todavía no se conoce con exactitud si el NO u otras sustancias relacionadas son causa o consecuencia de estos procesos.

La formación de NO en varias áreas cerebrales ha sido investigada directa o indirectamente por varios métodos: *a)* la formación de citrulina marcada con ^{3}H o ^{14}C a partir de L-arginina marcada es quizás el método más ampliamente utilizado[36,56]; *b)* mediciones cuantitativas de la generación de NO midiendo la oxidación de la hemoglobina o la formación de $NO_2^- + NO_3^-$, NO^-_x; *c)* cuantificación del GMPc, el producto de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble por NO[57], y *d)* técnicas histoquímicas, con anticuerpos específicos mono o policlonales contra las isoformas neuronal, endotelial e inducible[58]. Estos estudios revelaron la presencia de NO en muchas áreas del cerebro. Los primeros estudios, en 1990, demostraron claramente que la actividad sintetizadora de NO está presente en todo el cerebro en la rata y otras especies, con áreas de alta (cerebelo y bulbo olfatorio), media (hipotálamo y mesencéfalo),

baja (estriado, corteza e hipocampo) y muy baja actividad (médula oblongada)[59,60].

Óxido nítrico y dependencia física a opiáceos

La formación de NO está elevada en la dependencia y la abstinencia

Curiosamente, los primeros datos sobre una posible implicación del NO en la abstinencia opiácea se obtuvieron al observar que la administración de inhibidores de la NOS conseguía disminuir la abstinencia. No fue hasta 1994 cuando se observó que, durante la dependencia de la morfina, se producía un aumento de las concentraciones cerebrales de los metabolitos estables del NO (NO^-_2 y NO^-_3). Posteriormente, nuestro grupo[61] consiguió demostrar que durante el tratamiento crónico con morfina se producía una elevación de la actividad de la NOS dependiente del calcio en el sistema nervioso central (fig. 2). Además, estudios no publicados de nuestro laboratorio indican que existe un aumento de la expresión de la nNOS observado por técnicas inmunohistoquímicas en varias áreas cerebrales (bulbo olfatorio, *locus coeruleus*, nervios del tracto solitario, nervio prepósito hipogloso y cerebelo). Este aumento de la NOS es paralelo al incremento del GMPc durante la dependencia opiácea[62].

En cuanto a los cambios que ocurren en la abstinencia, investigaciones previas demostraron que los valores de GMPc estaban elevados en cerebelo en ratas con abstinencia a la morfina[63]. Posteriormente, se presentaron varias evidencias que indicaban un estado de hiperproducción de NO durante la abstinencia: tanto la concentración de NO^-_x en el tejido cerebral[64] como la actividad NOS[65] estaban aumentadas durante la abstinencia. Por último, nuestro grupo demostró, además, que este aumento de la actividad NOS dependiente del calcio durante la abstinencia se correlacionaba directamente con la gravedad de ésta[66] (fig. 3).

El significado de este aumento de la expresión de la NO sintasa *constitutiva* no inducible no es conocido en este momento, aunque se han identificado varias situaciones en las que puede ocurrir[67].

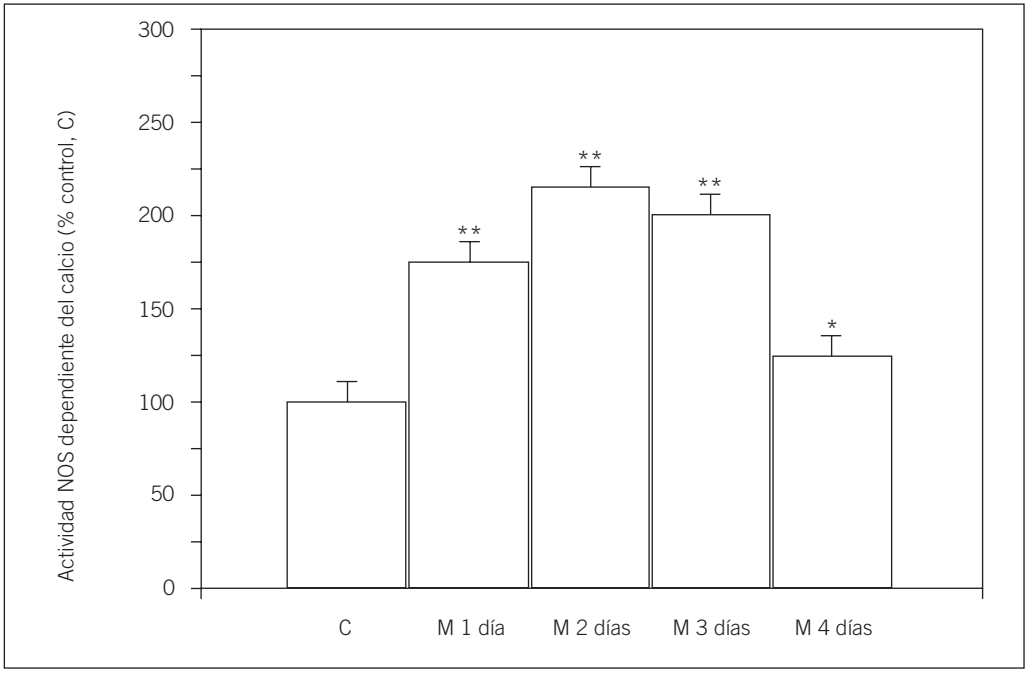


*Fig. 2. Aumento de la actividad de la NOS en la dependencia de morfina por implantación s.c. de un pellet de 75 mg de morfina (M). Control: pellet placebo. (Para más detalles, véase Leza et al[61]); *p < 0,05 y **p < 0,01 respecto al grupo control.*

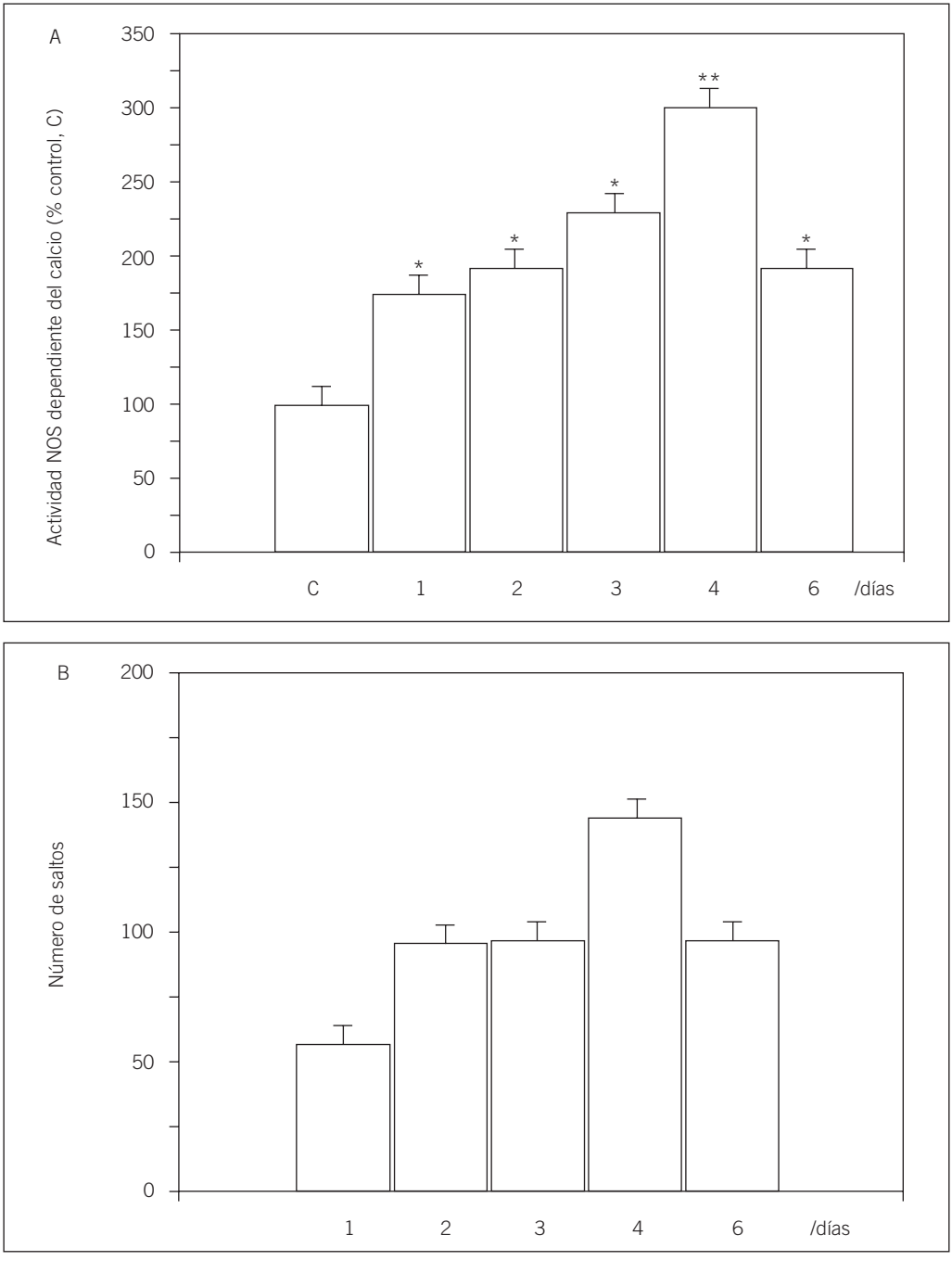


*Fig. 3. Correlación directa entre el aumento de la actividad de la NOS (A) y la gravedad (número de saltos) (B) del síndrome de abstinencia inducido por naloxona tras 1-6 días de adicción en ratones. (Para más detalles, véase Leza et al[66]); *p < 0,05 y **p < 0,01 respecto al grupo control.*

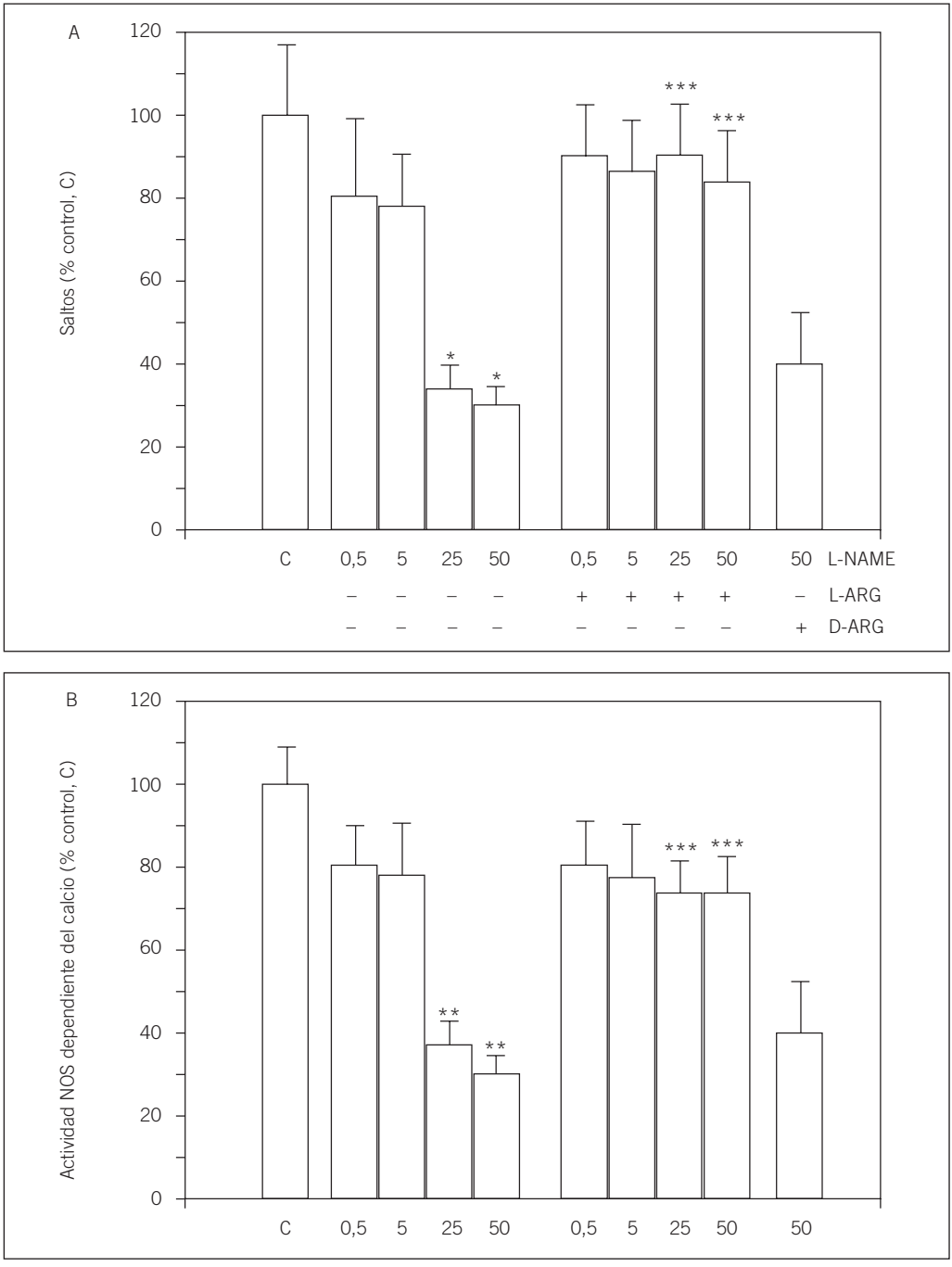


*Fig. 4. L-NAME previene los síntomas de abstinencia (número de saltos) (A) y la hiperactividad de la NOS (B) en ratones con abstinencia por administración de naloxona el cuarto día de adicción. Reversión por L-arginina (L-ARG), pero no por D-arginina (D-ARG). (Para más detalles, véase Leza et al[66]); *p < 0,01 y **p < 0,001 respecto al grupo control; ***p < 0,05 respecto al grupo tratado con L-NAME.*

TABLA II
EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA Y CRÓNICA* DE INHIBIDORES DE NO SINTASA EN LA

Referencia bibliográfica	68			76		103	69		
	NAME	NO_2Arg	NMMA	NAME	NAME*	NO_2Arg	NO_2Arg	NO_2Arg*	NAME
	7,5-400 mg/kg i.p.	3,5-100 mg/kg i.p.	3,5-100 mg/kg i.p.	100 mg/kg s.c.	12 mg 7 días microbomba	1-8 mg/kg 10 días i.p.	7,5-10 mg/kg i.p.	1-7,5 mg/kg b.i.d. 4 días	7,5-60 mg/kg i.p.
Saltos	U	U	O			Dism.			
Sacudidas				Dism.	Dism.		Dism.	Dism.	Dism.
Diarrea	Dism.	Dism.	O	Dism.	Dism.				
Pérdida de peso				Dism.	Dism.		Dism.	Dism.	Dism.
Castañeteo de dientes				Dism.	Dism.			Aum.	
Movimientos estereotipados									

Dism.: disminuye; Aum.: aumenta; Dism./Aum.: dosis bajas aumentan, dosis altas disminuyen; O: no cambia; U: no dependiente de la dosis (sólo disminuye a dosis intermedias).

Métodos (animal/dependencia/abstinencia): ratón/pellet 25 mg/naloxona 4 mg/kg[68]; rata/pellet 75 mg/naloxona 0,5 mg/kg[76]; ratón/inyecciones/naloxona 1 mg/kg[103]; rata/pellet 75 mg/naloxona 0,5 mg/kg[69]; rata/pellet 75 mg/naloxona 0,5 mg/kg[104]; ratón/inyecciones/naloxona 2 mg/kg[105]; ratón/pellet 75 mg/naltrexona 50 µg/kg[72]; rata/pellet 75 mg/naltrexona 5 mg/kg[106]; rata/pellet 25 mg/naloxona 4 mg/kg[76]; ratón/pellet 75 mg/naloxona 1 mg/kg[66].

Los inhibidores de la NOS previenen la abstinencia

Los primeros estudios demostraron que lon inhibidores de la NOS como el L-NAME (N^{Ω}-nitro-L-arginina metil éster) y NO_2Arg inhibían el salto estereotipado y la diarrea cuando se inyectan antes de la administración de naloxona en ratones con dependencia a la morfina[68] (fig. 4). A lo largo de los últimos años se han encontrado resultados similares (tabla II) utilizando otros inhibidores de la NOS.

Uno de los primeros estudios que demostró que la inhibición de la NOS por NO_2Arg atenuaba varios de los signos de la abstinencia en ratas demostró también que estos efectos están claramente afectados por el régimen de dosis[69]. La reducción de las sacudidas y pérdida de peso tras la administración de NO_2Arg y L-NAME es dependiente de la dosis cuando se administran 1 h antes de la naloxona, pero no si se administran durante el período de adicción (4 días). Estos datos podrían indicar que la inhibición de la NOS afecta a la expresión de la abstinencia, más que al desarrollo de la dependencia en ratas. Un estudio más reciente afirma que tanto L-NAME como L-NMMA no tienen efectos sobre la abstinencia si se administran durante la inducción de la dependencia física a la morfina, pero pueden disminuir la abstinencia cuando se admininistran durante la fase de expresión del síndrome[70].

Otra cuestión de interés es el hecho de que la inhibición de la abstinencia a la morfina por varios inhibidores de la NOS está limitada a un cierto rango de dosis y presenta una curva acampanada: el efecto antiabstinencia del L-NAME es evidente entre 7,5 y 100 mg/kg, pero dosis de 200-400 mg/kg no tienen este efecto[66,68]. La NO_2Arg también describe este tipo de curva. Este perfil es similar al que se observa con MK-801 y otros bloqueadores de los receptores NMDA y no NMDA[71,72]. La razón de este hecho es desconocida, pero deben considerarse otros mecanismos activados por las altas concentraciones[73]: por ejemplo, la

ABSTINENCIA MORFÍNICA

104				105		72	106	73		66
7-NI	NIO	NAME	NO_2Arg	NAME	NO_2Arg	NMMA	NMMA	7-NI	NO_2Arg	NAME
1,8-100 mg/kg s.c.	1-300 mg/kg s.c.	1 a 56 mg/kg s.c.	1 a 30 mg/kg s.c.	5 a 20 mg/kg i.p.	5 a 20 mg/kg i.p.	0,02-4 mg/kg i.p.	2 a 8 mg/kg s.c.	6,25-50 mg/kg s.c.	7,5-100 mg/kg s.c.	0,5-400 mg/kg s.c.
Aum. (?)	Aum. (?)	O	O	Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	O	O	U
Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	O	O			Dism.	Dism.	Dism.
Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	O	Dism./ Aum.		U		Dism.
Dism.	O	Dism.	Dism.	Dism.	O	Dism.			U	
Dism.	O	O	O				O	Dism.	Dism.	
Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	Dism.	Dism.		O	U		Dism.

Otros síntomas evaluados: salivación: β por NAME i.p.[76] y 7NI s.c.[104]; lagrimeo: β por NAME s.c.[76]; ptosis: β por NAME s.c.[76]; rinorrea: β por NAME s.c.[76]; temblor: β por NAME s.c.[66]; priapismo: β por 7NI y NO2ARG[73].

NAME: N^{ω}-nitro L-arginina metil éster; NO2Arg: N^{ω}-nitro L-arginina; NMMA: L-N^{ω}-monometil arginina; 7NI: 7-nitroindazol; NIO: N(5)-(1-iminoetil)-L-ornitina.

conversión de NO_2Arg a L-arginina[74] pudiera ser una de las explicaciones. Este tipo de curvas se observan también con algunos de los efectos antiabstinencia del 7-NI (7-nitro indazol), un inhibidor selectivo de la isoforma neuronal de la NOS[73,75].

Se han sugerido múltiples explicaciones de la disminución del síndrome de abstinencia a opiáceos tras la inhibición de la NOS[68,69,76]. La principal explicación se refiere al efecto del NO sobre la liberación presináptica de neurotransmisor. La disminución de la liberación del neurotransmisor tras la administración de un inhibidor de la NOS podría atenuar los síntomas de abstinencia. La noradrenalina podría ser uno de estos neurotransmisores. Esta conexión catecolaminérgica viene apoyada por el hecho de que el GMPc incrementa la tirosina hidroxilasa[77] y potencia la liberación presináptica de catecolaminas[78]. También se ha sugerido que la hipoactividad dopaminérgica podría ser un factor que contribuya a los efectos conductuales de la inhibición del síndrome de abstinencia por inhibidores de la NOS[79], ya que la administración exógena de NO estimula la liberación de dopamina en rebanadas de cerebro[80]. También es posible una conexión colinérgica: durante la abstinencia precipitada por antagonista se produce un incremento de la transmisión colinérgica[81,82], y se sabe que se requiere el GMPc para la liberación de acetilcolina (ACh)[83]. Algunos estudios indican que el mecanismo antiabstinencia de los antagonistas de glutamato[84] y de inhibidores de la NOS[85] es la inhibición de la liberación de ACh. También se ha implicado una conexión de adenosina: los agonistas de receptores de adenosina poseen un potente efecto antiabstinencia[86] y la inhibición de la NOS estimula la liberación de adenosina[87]. Otros neurotransmisores han sido implicados en los mecanismos que inducen el salto compulsivo durante la abstinencia a morfina precipitada por naloxona, como serotonina, ácido gamma aminobutírico, histamina y otros. Sin embargo, la relación precisa entre el NO y estos neurotransmisores no se conoce.

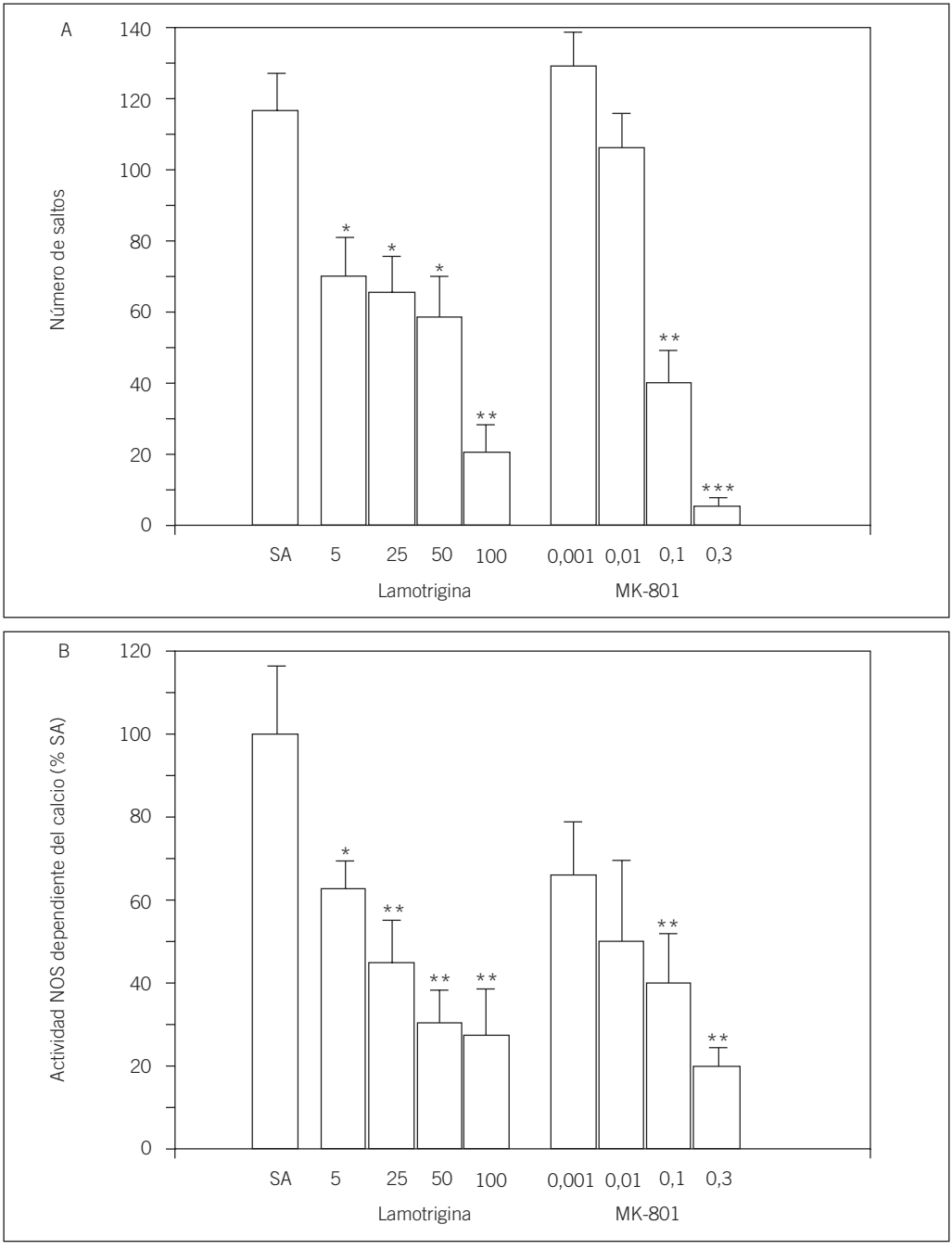


*Fig. 5. Lamotrigina y MK-801 previenen los síntomas de abstinencia (número de saltos) (A) y la hiperactividad de la NOS (B) en ratones con síndrome de abstinencia (SA) por administración de naloxona el cuarto día de adicción. (Para más detalles, véase Lizasoain[99]); *p < 0,05; **p < 0,01 y ***p < 0,001 respecto al grupo con síndrome de abstinencia.*

Otra cuestión importante es la posibilidad de que los efectos antiabstinencia de los inhibidores de la NO sintasa estén relacionados con sus propiedades ansiolíticas. De hecho, la abstinencia a la morfina ha sido utilizada como modelo de estrés[88], y el NO ha sido implicado como una "hormona de estrés"[45,47]. De esta forma, los efectos ansiolíticos de los inhibidores de la NOS[89] podrían tomar parte en el efecto antiabstinencia de estos compuestos.

La conexión aminoacidérgica

Los primeros intentos de disminuir el incremento de la transmisión aminoacidérgica en el *locus coeruleus* durante la abstinencia opiácea[27] se basaron en el uso de antagonistas de receptores de AAE. Estos agentes atenuaban los cambios conductuales y también las alteraciones eléctricas o bioquímicas en la abstinencia en varias especies animales[23,84,90-93].

Aunque el antagonista no competitivo NMDA dizocilpina (MK-801) es el más ampliamente utilizado, compuestos con diferentes características, como agentes competitivos no NMDA (DNQX: 6,7-dinitro-quinoxalina 2,3-diona) o antagonistas del lugar de unión a estricnina del receptor NMDA (5,7 DCKA: ácido 5,7-diclorokinurénico), atenúan el salto estereotipado inducido por naloxona en ratones dependientes de morfina. En un intento de explicar este mecanismo de acción común, Cappendijk et al[71] propusieron que los antagonistas NMDA podrían disminuir la liberación de noradrenalina o bien su actividad[94,95]. Por otra parte, los antagonistas NMDA tienen actividad ansiolítica[96,97], lo que podría inhibir el salto, ya que la ansiedad es un síntoma generalizado en el síndrome de abstinencia en animales y en humanos[98]. En la búsqueda de una explicación bioquímica a estos hallazgos, Cappendijk et al[68] sugirieron por vez primera la posibilidad de que el efecto antiabstinencia de los antagonistas de receptores de AAE podría deberse a la disminución de la producción de NO.

En concordancia con esta última hipótesis, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la inhibición de la síntesis de NO puede ser el mecanismo por el cual agentes bloqueadores de receptores de AAE como MK-801 y agentes inhibidores de la liberación de AAE como lamotrigina (3,5-diamino-6-[2,3-diclorofenil]-1,2,4-triazina) atenúan la abstinencia opiácea en ratones[99] (fig. 5).

Conclusión y perspectivas

El NO es un modulador de los procesos que llevan al desarrollo de la dependencia opiácea y a la expresión de la abstinencia, y la vía AAE:L-arginina:NO:GMPc podría ser un eje en los cambios neuronales durante el tratamiento con opiáceos previo a la abstinencia. La comprensión de los mecanismos de esta interacción y la dilucidación de los neurotransmisores, receptores y segundos mensajeros implicados servirá para diseñar estrategias alternativas en el tratamiento de la dependencia y abstinencia opiácea.

¿Cuáles podrían ser las futuras direcciones de investigación en esta área para comprobar las posibilidades reales de estos tratamientos en humanos? En primer lugar, sería interesante estudiar los efectos de los antagonistas de receptores de AAE o de inhibidores de la NOS en modelos de abstinencia por deprivación, no en modelos de abstinencia inducida por antagonistas. Por otra parte, sería interesante evaluar cómo los antagonistas NMDA o los inhibidores de la NOS podrían inhibir la abstinencia una vez que se ha expresado ésta. De hecho, los pacientes heroinómanos piden intervención médica cuando ya están sufriendo las consecuencias de la abstinencia.

Según una de las últimas reuniones sobre el papel de los sistemas glutamatérgicos en el desarrollo de la abstinencia opiácea, auspiciado por el National Institute on Drug Abuse[100], la significación clínica de los antagonistas de AAE o inhibidores de la NOS radica en tres posibles usos principales: el primero es su uso en la prevención de las recaídas (sobre la base de que la recaída es un proceso de memoria y con estos agentes puede evitarse el estímulo de la "perdurabilidad" que ejerce el NO en los modelos de LTP). El segundo es el tratamiento de los síntomas de abstinencia a opiáceos, y el tercero es la posibilidad de que estos agentes puedan ser coadministrados con otros agentes ya en uso como metadona, levo-alfa acetil metadol, clonidina o guanfacina, para acortar la transición a un programa de naltrexona.

Otro punto de investigación es el papel de la vía AAE:NO en la recompensa opiácea y en los efectos reforzadores de las drogas de abuso, principalmente en la transmisión dopaminérgica entre al área tegmental ventral y el *nucleus accumbens*. Otra cuestión importante es determinar los cambios en la vía AAE:NO tras la administración crónica de los antagonistas opiáceos, principalmente en la hipersensibilidad

tras los tratamientos de deshabituación con naltrexona.

Por último, tras los estudios iniciales en roedores, deben comenzarse con los estudios en primates. Los estudios preliminares indican que el MK-801 produce toxicidad que puede ser grave. Este fármaco, como otros antagonistas NMDA no competitivos, produce reacciones tipo fenciclidina (PCP) en animales como hiperactividad locomotora, caídas, ataxia y catalepsia[101,102]. Otros antagonistas NMDA competitivos sobre el receptor del glutamato no presentan esta toxicidad. El LY-274614, por ejemplo, no produce comportamientos tipo PCP, aunque produce una sedación importante[91]. Estos antagonistas sin toxicidad PCP podrían ser preferibles a otros receptores no competitivos del receptor NMDA, pero la relevancia clínica de este tipo de fármacos debe ser clarificada. En el caso de los inhibidores de la NOS, los efectos en la presión arterial son un importante factor limitante. El NO produce hipotensión a través de la activación de la NOS endotelial y, por tanto, la mayoría de los inhibidores de la NOS inducen hipertensión, con excepción de 7-NI (7-nitroindazol), que inhibe específicamente la NOS neuronal. Los estudios en humanos deben comenzarse con 7-NI u otros inhibidores más selectivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. Trends Neurosci 1989; 12: 459-62.
2. Jaffe JH. Drug addcition and drug abuse. En: Goodman LS, Gilman A, editores. The pharmacological basis of therapeutics. Nueva York: McMillan Co., 1970; 276-313.
3. Nestler EJ, Breitner-Johnson D. Common biochemical mechanisms underlying opiate and cocaine addiction. DN&P 1992; 5: 214-222.
4. Koob GF. Neural mechanisms of drug reinforcement. Ann NY Acad Sci 1992; 654: 171-191.
5. Bhargava HN. Diversity of agents that modify opioid tolerance, physical dependence, abstinence syndrome, and self-administrative behavior. Pharmacol Rev 1994; 46: 293-324.
6. Emmett-Oglesby MW, Mathis DA, Moon RTY, Lal H. Animal models of drug withdrawal symptoms. Psychopharmacology 1990; 101: 292-309.
7. Redmond DE, Krystal JH. Multiple mechanisms of withdrawal from opioid drugs. Ann Rev Neurosci 1984; 7: 443-478.
8. Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF. Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. J Pharmacol Exp Ther 1992; 261: 669-677.
9. Laschka E, Herz A, Bläsig J. Sites of action of morphine involved in the development of physical dependence in rats I. Comparison of precipitated morphine withdrawal after intraperitoneal and intraventricular injection of morphine antagonists. Psychopharmacologia 1976; 46: 133-139.
10. Bell J, Adler MW. Comparison of peripheral and central administration of naloxone in precipitating abstinence in morphine-dependent rats. Drug Alch Depend 1988; 21: 189-194.
11. Marshall DC, Buccafusco JJ. Supraspinal and spinal mediation of naloxone-induced morphine withdrawal in rats. Brain Res 1985; 329: 131-142.
12. Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. Acta Physiol Scand 1965; 232 (Supl): 1-55.
13. Pert CB, Kuhar MJ, Snyder SH. Autoradiographic localization of the opiate receptor in rat brain. Life Sci 1975; 16: 1.849-1.853.
14. Loughlin SE, Fallon JH. Locus coeruleus. En: Paxinos G, editor. Tre rat nervous system. Vol 2. North Ryde, Australia: Academic Press, 1985; 79-93.
15. Copper JR, Bloom FE, Roth RH. Norepinephrine and epinephrine. En: Copper JR, Bloom FE, Roth RH, editores. The biochemical basis of neuropharmacology. Nueva York: Oxford University Press, 1991; 220-284.
16. Aghajanian GK. Tolerance of nucleus coeruleus neurons to morphine and expression of withdrawal response by clonidine. Nature 1978; 276: 186-188.
17. Crawley JN, Laverty R, Roth R. Clonidine reversal of increased norepinephrine metabolite levels during morphine withdrawal. Eur J Pharmacol 1979; 57: 247.
18. Laverty R, Roth RH. Clonidine reverses the increased norepinephrine turnover during morphine withdrawal in rats. Brain Res 1980; 182: 482-485.
19. Swan AC, Elsworth JD, Charney DS, Jablons DM, Roth RH, Redmond Jr DE et al. Brain catecholamine metabolites and behavior in morphine withdrawal. Eur J Pharmacol 1983; 86: 167-175.
20. Distefano PS, Brown OM. Biochemical correlates of morphine withdrawal. 1. Characterization in the adrenal medulla and locus coeruleus. J Pharmacol Exp Ther 1985; 233: 333-339.
21. Buccafusco JJ, Marshall DC, Turner RM. A comparison of the inhibitory effects of clonidine and guanfacine on the behavioral and autonomic components of morphine withdrawal. Life Sci 1984; 35: 1.401-1.408.

22. Ennis M, Aston-Jones G. Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocelularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. J Neurosci 1988; 8: 3.644-3.657.
23. Tung CS, Grenhoff J, Svensson TH. Morphine withdrawal responses of rat locus coeruleus neurons are blocked by an excitatory amino-acid antagonist. Acta Physiol Scand 1990; 138: 581-582.
24. Tsuda K, Tsuda S, Nishio I, Masuyama Y, Goldstein M. Glutamatergic regulation of [3H]-noradrenaline release in the medulla oblongata of normotensive and spontaneously hypertensive rats. J Hypertension 1994; 12: 517-522.
25. Navarro CE, Cabrera RJ, Donoso AO. Release of 3H-noradrenaline by excitatory amino acids from rat mediobasal hypothalamus and the influence of aging. Brain Res Bull 1994; 33: 677-682.
26. Malva JO, Carvalho AP, Carvalho CM. Modulation of dopamine and noradrenaline release and of intracellular Ca^{2+} concentration by presynaptic glutamate receptors in hippocampus. Br J Pharmacol 1994; 113: 1.439-1.447.
27. Aghajanian GK, Kogan JH, Moghaddam B. Opiate withdrawal increases glutamate and aspartate efflux in the locus coeruleus: an in vivo microdialysis study. Brain Res 1994; 636: 126-130.
28. Akaoka H, Aston-Jones G. Indirect serotonergic agonists attenuate neuronal opiate withdrawal. Neurosci 1993; 54: 561-565.
29. Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT. The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad afferent network. Science 1986; 234: 734-737.
30. Hong M, Milne B, Jhamandas K. Evidence for the involvement of excitatory amino acid pathways in the development of precipitated withdrawal from acute and chronic morphine: an in vivo voltammetric study in the rat locus coeruleus. Brain Res 1993; 623: 131-141.
31. McMahon SB, Wall PD. Electrophysiological mapping of brainstem projections of spinal cord lamina I cells in the rat brain. Brain Res 1985; 333: 19-26.
32. Fung SJ, Reddy VK, Liu RH, Wang Z, Barnes CD. Existence of glutamate in noradrenergic locus coeruleus neurons of rodents. Brain Res Bull 1994; 35: 505-512.
33. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature 1988; 336: 385-388.
34. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. Biochem Pharmacol 1989; 38: 1.709-1.715.
35. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 5.159-5.162.
36. Bredt DS, Snyder SH Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 682-685.
37. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. Trends Neurosci 1991; 14: 60-67.
38. Palmer RMJ, Ferridge AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987; 327: 524-526.
39. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthetize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988; 333: 664-666.
40. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, patophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43: 109-142.
41. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 9.030-9.033.
42. Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RMJ, Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in the rat brain slices. Eur J Pharmacol 1989; 172: 413-416.
43. Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. Eur J Pharmacol 1991; 199: 379-381.
44. Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. Nature 1991; 349: 326-328.
45. Calzà L, Giardino L, Ceccatelli S. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. NeuroReport 1993; 4: 627-630.
46. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. Nature 1993; 361: 31-39.
47. Leza JC, Salas E, Sawicki G, Russell JC, Radomski MW. The effect of stress on homeostasis in JCR:LA-cp rats: the role of nitric oxide. J Pharmacol Exp Ther 1998; 286: 1.397-1.403.
48. Mollace V, Bagetta G, Nistico G. Evidence that L-arginine posesses proconvulsant effects mediated through nitric oxide. NeuroReport 1991; 2: 269-272.
49. De Sarro G, Di Paola ED, De Sarro A, Vidal MJ. L-arginine potentiates excitatory amino acid-induced seizures elicited in the deep prepiriform cortex. Eur J Pharmacol 1993; 230: 151-158.
50. Sancesario G, Iannone M, Morello M, Nistico G, Bernardi G. Nitric oxide inhibition aggravates ischemic damage of hippocampal but not of NADPH neurons in gerbils. Stroke 1994; 25: 436-444.
51. Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Bentura ML et al. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat fore-

brain slices. Eur J Neurosci 1998; 10: 445-456.
52. Koh JY, Choi DW. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. J Neurosci 1988; 8: 2.153-2.163.
53. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron 1988; 1: 623-634.
54. Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acids neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol Sci 1990; 11: 379-387.
55. Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. Trends Neurosci 1993; 16: 439-444.
56. Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+}-dependent and Ca^{2+}-independent nitric oxide synthases. FEBS Lett 1991; 291: 145-149.
57. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide sinthases in mammals. Biochem J 1994; 298: 249-258.
58. Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Viveros-Moreno V et al. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. Phil Trans R Soc Lond 1994; 345: 175-221.
59. Föstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. Biochem Biophys Res Commun 1990; 168: 727-732.
60. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicationg a neural role for nitric oxide. Nature 1990; 347: 768-770.
61. Leza JC, Lizasoain I, San Martín Clark O, Lorenzo P. Morphine-induced changes on cerebral and cerebellar nitric oxide synthase activity. Eur J Pharmacol 1995; 235: 95-98.
62. Bhargava HN, Cao YJ. Effects of chronic administration of morphine, U-50, 488H and [DPen2,DPen5]enkephalin on the concentration of cGMP in brain regions and spinal cord of the mouse. Peptides 1997; 18: 1.629-1.634.
63. Volicer L, Puri SK, Choma P. Cyclic GMP and GABA levels in rat striatum and cerebellum during morphine withdrawal: effects of apomorphine. Neuropharmacology 1977; 16: 791-794.
64. Cappendijk SLT, Garrelds IM, Dzoljic MR. Nitric oxide in brain tissue, cerebrospinal fluid and plasma of naive and morphine-abstinent rats [resumen 1.18]. Montreal, Canadá: Nitric oxide in the nervous system. Laurentians Mountains, julio de 1994.
65. Barjavel MJ, Bhargava HN. Effects of morphine tolerance and abstinence on nitric oxide synthase activity in brain regions and spinal cord of the mouse. Soc Neurosci Abstr 1994a; 20: 1.234.
66. Leza JC, Lizasoain I, Cuéllar B, Moro MA, Lorenzo P. Correlation between brain nitric oxide synthase and opiate withdrawal. Naunyn Schmiedeberg´s Arch Pharmacol 1996; 353: 349-354.
67. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 5.212-5.216.
68. Cappendijk SLT, De Vries R, Dzoljic MR. Inhibitory effect of nitric oxide (NO) synthase inhibitors on naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. Neurosci Lett 1993; 162: 97-100.
69. Kimes AS, Vaupel DB, London ED. Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase. Psychopharmacology 1993; 112: 521-524.
70. Dambisya YM, Lee TL. Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. Br J Pharmacol 1996; 117: 914-918.
71. Cappendijk SLT, De Vries R, Dzoljic MR. Excitatory amino acid receptor antagonists and naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. Eur J Neuropsychopharmacol 1993; 3: 111-116.
72. Thorat SN, Barjavel MJ, Matwyshyn GA, Bhargava HN. Comparative effects of NG- monomethyl-L-arginine and MK-801 on the abstinence syndrome in morphine dependent mice. Brain Res 1994; 642: 153-159.
73. Cappendijk SLT, Duval S, De Vries R, Dzoljic MR. Comparative study of normotensive and hypertensive nitric oxide synthase inhibitors on morphine withdrawal syndrome in rats. Neurosci Lett 1995; 163: 67-70.
74. Hecker M, Mitchell JA, Harris HJ, Katsura M, Thiemermann C, Vane JR. Endothelial cells metabolize NG-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. Biochem Biophys Res Commun 1990; 167: 1.037-1.043.
75. Kimes AS, Vaupel DB, London ED. Comparison of the attenuation of opioid withdrawal by nitric oxide synthase inhibitors [resumen 5.11]. Montreal, Canadá: Nitric oxide in the nervous system. Laurentians Mountains, julio de 1994.
76. Adams ML, Kalicki JM, Meyer ER, Cicero TJ. Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by a nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine methyl ester. Life Sci 1993; 52: 245-149.
77. Roskoski R, Roskoski LM. Activation of tyrosine hydroxylase in PC12 cells by the cyclic GMP and cyclic AMP second messenger system. J Neurochem 1987; 48: 236-242.
78. O´Sullivan AJ, Burgoyne RD. Cyclic GMP regulates nicotine-induced secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells: effects of 8-bromo-cyclic GMP, atrial natriuretic peptide, and nitroprusside (Nitric oxide). J Neurochem 1990; 54: 1.805-1.808.

79. Starr MS, Starr BS. Do NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? Eur J Pharmacol 1995; 272: 211-217.
80. Hanbauer Y, Wink D, Osawa Y, Edelman GM, Gally JA. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. NeuroReport 1992; 3: 409-413.
81. Bhargava HN, Way EL. Brain acethylcholine and choline following acute and chronic morphine treatment and during withdrawal. J Pharmacol Exp Ther 1974; 194: 65-73.
82. Guno Tjon Tien Ril HK, De Vries TJ, Wardeh G, Hogenboom F, Mulder AH, Schoffelmeer ANM. Long-lasting reciprocal changes in striatal dopamine and acethylcholine release upon morphine withdrawal. Eur J Pharmacol 1993; 235: 321-322.
83. Sandberg K, Berry CJ, Eugster E, Rogers TB. A role for cGMP during tetanus toxin blockade of acetylcholine release in the rat pheochromocytoma (PC12) cell line. J Neurosci 1989; 9: 3.946-3.954.
84. Tanganelli S, Antonelli T, Morari M, Bianchi C, Beani L. Glutamate antagonists prevent morphine withdrawal in mice and guinea pigs. Neurosci Lett 1991; 122: 270-272.
85. Prast H, Philippu A. Nitric oxide releases acethylcholine in the basal forebrain. Eur J Pharmacol 1992; 216: 139-140.
86. Dionyssopoulos T, Hope W, Coupar IM. Effect of adenosine analogues on the expression of opioid withdrawal in rats. Pharmacol Biochem Behav 1992; 42: 201-206.
87. Kostic MM, Schrader J. Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. Circ Res 1992; 70: 208-212.
88. Lightman SL, Young WS III. Changes in hypothalamic proproenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal. Nature 1987; 328: 643-645.
89. Guimaraes FS, De Aguiar JC, Del Bel EA, Ballejo G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. NeuroReport 1994; 5: 1.929-1.932.
90. Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. Science 1991; 251: 85-87.
91. Rasmussen K, Fuller RW, Stockton ME, Perry KW, Swinford RM, Ornstein PL. NMDA receptor antagonists supress behaviors but not norepinephrine turnover on locus coeruleus unit activity induced by opiate withdrawal. Eur J Pharmacol 1991; 197: 9-16.
92. Rasmussen K, Krystal JH, Aghajanian GK. Excitatory amino acids and morphine withdrawal: differential effects of central and peripheral kynurenic acid administration. Psychopharmacology 1991; 105: 508-512.
93. Koyuncuoglu H, Dizdar Y, Aricioglu F, Sayin U. Effects of MK-801 on morphine physical dependence: attenuation and intensification. Pharmacol Biochem Behav 1992; 43: 487-490.
94. Jones SM, Snell LD, Johnson KM. Phencyclidine selectively inhibits N-methyl-D-aspartate induced hippocampal [3H] norepinephrine release. J Pharmacol Exp Ther 1987; 240: 492-497.
95. Burgard EC, Decker G, Sarvey JM. NMDA receptor antagonists block norepinephrine-induced long-lasting potentiation and long-term potentiation in rat dentate gyrus. Brain Res 1989; 482: 351-355.
96. Trullas R, Jackson B, Skolnick P. Anxyolitic properties of 1-aminocyclopropane-carboxylic acid, a ligand at strichnine-insensitive glycine receptors. Pharmacol Biochem Behav 1989; 34: 313-316.
97. Kehne JH, McCloskey TC, Baron MB, Chi EM, Harrison BL, Whitten JP et al. NMDA receptor complex antagonists have potential anxyolitic effects as measured with separation-induced ultrasonic vocalizations. Eur J Pharmacol 1991; 193: 283-292.
98. Lal H, Emmett-Oglesby MW. Behavioural analogues of anxiety, animal models. Neuropharmacology 1983; 22: 1.423-1.441.
99. Lizasoain I, Leza JC, Cuéllar B, Moro MA, Lorenzo P. Inhibition of morphine withdrawal by lamotrigine: implication of nitric oxide. Eur J Pharmacol 1996; 299: 41-45.
100. Herman BH, Vocci F, Bridge P. The effects of NMDA receptor antagonists and nitric oxide synthase inhibitors on opioid tolerance and withdrawal. Medication development issues for opiate addiction. Neuropsychopharmacol 1995; 13: 269-293.
101. Koek W, Woods JH, Winger GD. MK-801, a proposed noncompetitive antagonist of excitatory amino acid neurotransmission, produces phencyclidine-like behavioral effects in pigeons, rats and rhesus monkeys. J Pharmacol Exp Ther 1988; 245: 969-974.
102. Willetts J, Balster RL, Leander SD. The behavioral pharmacology of NMDA receptor antagonists. Trends Pharmacol Sci 1990; 11: 423-428.
103. Kolesnikov YA, Pick CG, Ciszewska G, Pasternak GW. Blockade of tolerance to morphine but not to k opioids by a nitric oxide synthase inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5.162-5.166.
104. London ED, Vaupel DB, Kimes AS. Inhibitors of nitric oxide synthase as potential treatments for opioid withdrawal. Regulatory Peptides 1994; 54: 165-166.
105. Majeed NH, Przewlocka B, Machelska H, Przewlocki R. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. Neuropharmacology 1994; 33: 189-192.
106. Bhargava HN. Attenuation of tolerance to, and physical dependence on, morphine in the rat by inhibition of nitric oxyde synthase. Gen Pharmac 1995; 26: 1.049-1.053.

DISCUSIÓN

A. García Sánchez: Entiendo que el glutamato está actuando en el *locus coeruleus*, donde observáis un aumento de expresión que, supongo, es de nNOS. El óxido nítrico podría actuar de diferentes formas, ya sea inhibiendo la liberación de la adrenalina o a través de otros mecanismos. ¿Cómo explicáis que también se observe una inducción de la nNOS en cerebelo y en células de Purkinje, que normalmente no expresan?

J.C. Leza: Parece que en ratas no se expresa nNOS, pero sí en ratón. Nosotros también nos planteamos la pregunta de por qué se expresaba nNOS en el cerebelo y por qué no en otras áreas. Una posible explicación sería que del *locus coeruleus* parten aferencias al cerebelo al igual que del estriado, otro de los núcleos que está muy implicado en la abstinencia opiácea. Estas conexiones noradrenérgicas que van al cerebelo están reguladas por interneuronas glutamatérgicas, lo que podría explicar la presencia de inducción de la nNOS. Realmente, a través de estudios de inmunohistoquímica se puede ver que esto ocurre también en otras áreas como en *locus coeruleus* o en el núcleo paragigantocelular.

A. García Sánchez: Por otro lado, el glutamato estimula puntualmente la NOS, porque aumenta la concentración de calcio. Pero, que yo sepa, no hay datos de inducción y vosotros estáis hablando de una inducción, por tanto de un aumento de la cantidad de proteína que detectáis por inmunocitoquímica. Me resulta difícil entender todo este proceso, desde el glutamato en el *locus coeruleus* afectando la liberación de noradrenalina y el efecto de esas vías noradrenérgicas sobre el cerebelo. ¿Cómo se explica que esta disminución en la liberación de noradrenalina vaya a afectar a las concentraciones de proteína enzimática?

J.C. Leza: No tengo suficientes elementos de juicio como para interpretar estos datos desde la óptica de la biología molecular, pero puedo añadir que en el ensayo de citrulina trabajamos con tubos control, unos que tienen un quelante de calcio y otros tubos que no tienen ese quelante de calcio y que contienen un inhibidor de la NOS. Restando la actividad de los terceros de la de los segundos, deducimos si la inducción es dependiente o independiente del calcio. La actividad que hemos presentado anteriormente es dependiente del calcio. Sobre la posibilidad de que el glutamato induzca la expresión de la NOS, sea constitutiva o inducible, puedo añadir que por datos de nuestro grupo, todavía no publicados, parece ser que sí. Esto lo hemos demostrado en el modelo de isquemia-reperfusión donde el glutamato es aplicado en el líquido de perfusión que baña la rebanada de tejido y donde se ha visto que por sí mismo es capaz de inducir la NOS.

A. García Sánchez: Me parece interesante el dato, pero no queda claro, puesto que un trabajo realizado con anticuerpos frente a la NO neuronal reflejó aumentos de expresión en el cerebelo. Si esto se produce a los 5 o 7 días quiere decir que es relativamente rápido, teniendo en cuenta que debe ser un efecto bastante indirecto. ¿Existen datos acerca de si existe algún tipo de inducción en los factores de crecimiento, en citocinas o en otras sustancias en estos modelos?

J.C. Leza: No que yo conozca.

R. Maldonado: Comentas el tema de la importancia de la tormenta noradrenérgica en la expresión de la abstinencia. Los últimos resultados al respecto, basados en inducir con 6-OH-dopamina una lesión de todas las proyecciones del *locus coeruleus* con la consiguiente depleción de noradrenalina en todo el cerebro, refieren que en estos animales no existe ninguna modificación en la expresión comportamental de la abstinencia y que tampoco existe ninguna modificación en los efectos inducidos por la clonidina sobre la abstinenia. ¿Cuál es tu opinión sobre estos hallazgos?

J.C. Leza: Una posible explicación es que se produjeran otros fenómenos como, por ejemplo, una sobreactivación durante el período de tolerancia del propio NO. Éste podría estar estimulando la liberación de otros neurotransmisores, que serían los responsables del efecto observado sin la participación de las catecolaminas. Quizás hemos focalizado las cosas demasiado en el *locus coeruleus* y, a pesar de tratarse de un centro muy importante, evidentemente no es el único. De hecho, también se observó que la clonidina no abolía absolutamente el síndrome de abstinencia, lo que permite sugerir la posible participación de otros neurotransmisores como los aminoácidos excitadores.

R. Maldonado: Está demostrado que los cambios en el NO se producen sobre todo en el cerebelo. Nosotros hemos obtenido resultados similares para el caso de la abstinencia

por cannabinoides, donde las modificaciones se localizaron específicamente en el cerebelo y no en otras estructuras. ¿Habéis realizado experimentos de administración directa en el cerebelo para intentar modificar la expresión de la abstinencia?

J.C. Leza: No hemos realizado este tipo de estudios, pero creo que, efectivamente, en el cerebelo se observan cambios que proceden de otras estructuras como el estriado, *locus coeruleus* o el núcleo paragigantocelular.

O. Bulbena: No conozco tanto la nNOS como la iNOS y cuando has mencionado que la actividad era dependiente del calcio he pensado en la iNOS. ¿Se dispone de estudios sobre si esta actividad iNOS viene precedida de la expresión del NF-κB? Sobre todo en dos sentidos: en un sentido cinético de saber en qué momento se expresa el NF-κB para inducir este aumento, y posteriormente, si cabe pensar que el tratamiento con inhibidores del NF-κB también pudiera revertir la sintomatología que ha producido el L-NAME.

J.C. Leza: Efectivamente, el NF-κB parece ser un factor esencial en la expresión de la iNOS. En nuestro modelo de isquemia y reperfusión cerebral in vitro, en rebanadas de cerebro anterior, hemos observado que la activación del NF-κB precede al aumento que nosotros vemos en la actividad de la iNOS. Con PDTC, por ejemplo, se puede evitar la actividad de la iNOS, que es dependiente del calcio, pero que también depende de NFκ-B.

V. Felipo: Parece que cuando se disminuyen los valores de NO descienden los síntomas de la abstinencia. ¿Cuál sería el mecanismo molecular que conectaría el NO con los síntomas y que se integraría de algún modo en el mecanismo que ha presentado anteriormente Maldonado?

J.C. Leza: No sabría responder cómo se podrían interrelacionar, pero la fosforilación de proteínas que ocurre en el momento de la tolerancia también podría producirse con algunas de las NOS.

A.M. Planas: Me gustaría hacer un comentario que creo habría que tener en cuenta respecto a que según en qué células se puede constatar o no la presencia de NOS neuronal. Nosotros hemos trabajado con anticuerpos y nos encontramos que, en función de la fijación que se hace del tejido, puede verse o no verse la presencia de NOS. Por tanto, siempre se debe tener en cuenta en qué condiciones se ha trabajado y que también dependerá de los valores de NOS que hubiera. Quisiera, así mismo, hacer una reflexión acerca de estos cambios que observáis en las células de Purkinje. Se trata de células inhibidoras y cuando están muy activadas pueden producir ataxia en el animal. ¿Qué relación podría tener una activación de NOS con un impedimento físico como, por ejemplo, la limitación a que el animal salte? Quiero decir, que estamos centrando la atención en unos cambios motores dentro de un amplio conjunto de síntomas de la abstinencia que, tal vez y hasta cierto punto, podrían ser completamente secundarios.

J.C. Leza: Es realmente complicado interpretar cuándo nos encontramos con neuronas que pueden ser inhibitorias y que están aparentemente sobreestimuladas en un cuadro que es fundamentalmente excitador. Pero, realmente no sabría responder específicamente a tu pregunta.

R. Maldonado: Nosotros hemos realizado un estudio similar sobre la dependencia a cannabinoides y encontramos unas modificaciones muy importantes y selectivas de la ciclasa en el cerebelo, que no observamos, al menos con tanta intensidad, en el caso de la dependencia opiácea. Sobre la expresión comportamental de estas dos formas de abstinencia, en la abstinencia a cannabinoides el principal signo que observamos fue precisamente una ataxia y, sin embargo, en la abstinencia a opioides no apareció esta ataxia.

El óxido nítrico en la erección: del laboratorio a la aplicación clínica

Iñigo Sáenz de Tejada y Gorman

Fundación para la Investigación y el Desarrollo en Andrología (FI + DA). Madrid.

Introducción

La relajación del músculo liso del pene (de las arterias y del tejido trabecular) inicia y mantiene la erección. La liberación local de óxido nítrico (NO), desde nervios dilatadores autonómicos y el endotelio vascular, es fundamental en la iniciación y mantenimiento de este proceso. Las siguientes observaciones apoyan el papel del NO en la erección.

Estudios in vitro

La relajación neurogénica y la dependiente del endotelio, tanto del músculo arterial como trabecular del cuerpo cavernoso, es inhibida o bloqueada por los siguientes tratamientos: inhibidores de la sintetasa del óxido nítrico (NOS) (p. ej., N^G-nitro-L-arginina o N^G-metil-L-arginina), inhibidores de la guanilato ciclasa soluble/generadores de superóxido (p. ej., azul de metileno) y captadores del NO (p. ej., oxihemoglobina)[1]. El contacto de tiras de cuerpo cavernoso con acetilcolina o la estimulación eléctrica transmural de los nervios dilatadores da como resultado la acumulación de GMPc en este tejido[2,3] (fig. 1). La estimulación eléctrica transmural de tiras de cuerpo cavernoso estimula la formación de nitrito, un producto de oxidación del NO[3]. Finalmente, el NO y los donadores de NO son potentes dilatadores del músculo liso de las arterias y del tejido trabecular del cuerpo cavernoso[1].

Estudios inmunohistoquímicos en tejidos del cuerpo cavernoso han demostrado una inmunorreactividad NOS-*like* presente en los nervios autonómicos y el endotelio[4].

Homogenados del tejido del cuerpo cavernoso presentan una actividad considerable de NOS, como se ha demostrado mediante ensayos con citrulina[2] (fig. 2).

Estudios in vivo

En animales experimentales (perro, conejo y rata), la estimulación eléctrica de los nervios pélvicos/plexos o raíces sacras (en las ratas) produce erección peneana[4]. Estas respuestas son inhibidas o bloqueadas por la administración local intracavernosa o sistémica de inhibidores de los NOS[4]. Además, la aplicación intracavernosa de donadores de NO produce erección.

La presión de oxígeno modula la relajación del músculo liso del cuerpo cavernoso mediada por el óxido nítrico

La concentración de oxígeno a la que se exponen las tiras de cuerpo cavernoso modula la magnitud de la relajación neurogénica y la mediada por el endotelio del músculo liso del cuerpo cavernoso[2]. El oxígeno ejerce este control mediante la modulación de la síntesis del NO, debido a la dependencia de la NOS, una oxigenasa, del oxígeno molecular como sustrato. Esta observación es muy relevante a la fisiología y fisiopatología de la función eréctil. Las presiones de oxígeno fisiológicamente bajas presentes en el pene flácido pueden desempeñar un papel en el mantenimiento del estado flácido al inhibir la producción de NO, mientras que los incrementos insuficientes de las presiones de oxígeno (por enfermedad vascular) en el inicio de la erección puede impedir una respuesta eréctil completa. El umbral de la pO_2 para una síntesis completa del NO y, por tanto, para una relajación dependiente del endotelio y neurogénica máxima, es de aproximadamente 50 mmHg en el tejido del cuerpo cavernoso[2]. Las presiones de oxígeno inferiores a este valor crítico inhiben progresivamente la relajación de la formación y liberación de NO.

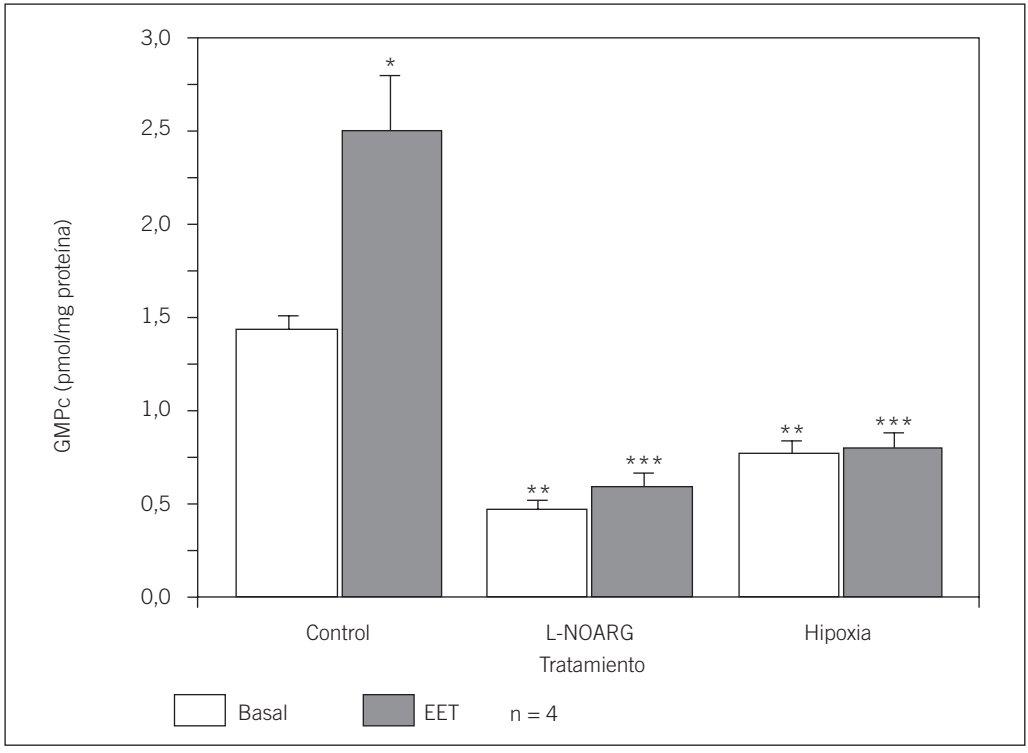


*Fig. 1. Acumulación de GMP cíclico en el cuerpo cavernoso de conejo. Las tiras de cuerpo cavernoso se incubaron en solución salina fisiológica oxigenada (control, pO_2 = 145 mmHg) a 37 ºC en presencia de indometacina (3 µM), bretilio (10 µM), atropina (0,1 µM), zaprinast (100 µM) y fenilefrina (1 µM). Algunos tejidos también se incubaron con N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG; 50 µM) o bajo condiciones de hipoxia. Todas las tiras de tejido fueron entonces sometidas a estimulación eléctrica transmural (EET) a 5 Hz durante 20 s, y rápidamente congeladas en nitrógeno líquido. Los tejidos se homogeneizaron en ácido perclórico y se determinó el contenido de GMPc por radioinmunoanálisis (RIA). Los datos se expresan como la media ± EE; *p < 0,025 respecto al valor basal; **p < 0,0005 respecto al valor basal en condiciones control; ***p < 0,0005 respecto al control estimulado eléctricamente.*

Modelos de enfermedad que interfieren con la relajación del músculo liso del pene mediada por el óxido nítrico

Hipercolesterolemia

Conejos blancos de Nueva Zelanda que reciben una dieta alta en colesterol (un 0,5% de colesterol y un 4% de aceite de cacahuete) durante un período de 8-10 semanas desarrollan hipercolesterolemia grave. Las concentraciones plasmáticas de colesterol de estos animales son de 1.628 ± 149 mg/dl a las 10 semanas en comparación con 53 ± 10 y 33 ± 3 mg/dl en los animales de control[5]. Los tejidos del cuerpo cavernoso de animales alimentados con colesterol presentan una deficiente relajación, dependiente del endotelio, a la acetilcolina. En estos animales, las respuestas a los donadores del NO, como el nitroprusiato, son comparables a las registradas en los animales de control[5], lo que indica que la hipercolesterolemia induce una alteración en la síntesis o en la disponibilidad de NO, preservándose la capacidad del músculo liso del pene de relajarse en respuesta a esta molécula.

Diabetes

La diabetes está fuertemente asociada a la probabilidad de desarrollar impotencia. Estudios in vitro han demostrado en tejido trabecular de pacientes diabéticos que la relajación mediada por el NO, tanto dependiente del en-

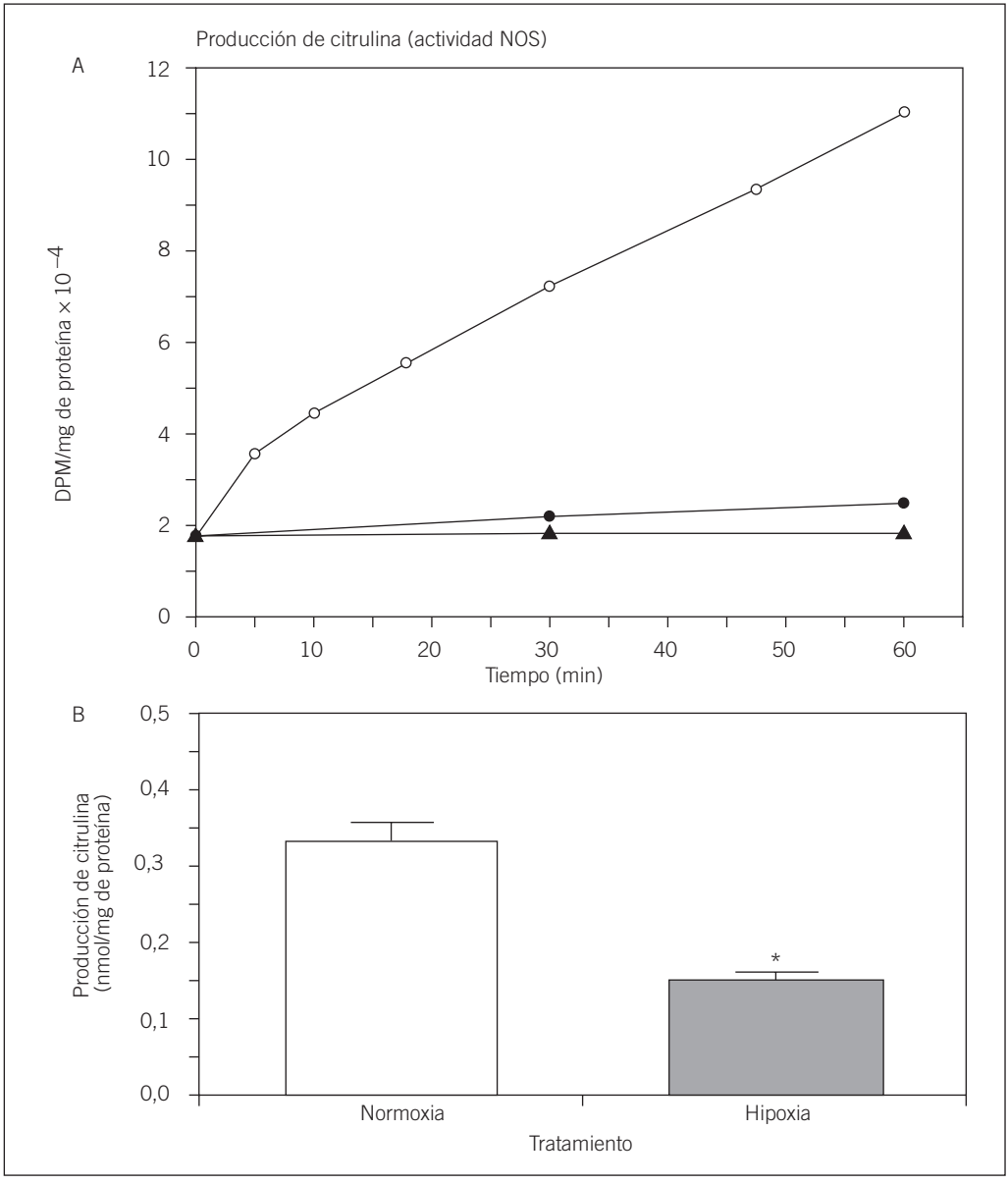


*Fig. 2. Actividad de la NOS en tejido cavernoso de conejo. A: en función del tiempo. Las preparaciones citosólicas de cuerpo cavernoso de conejo se incubaron a 37 ºC con L-[2,3-3H]-arginina durante períodos variables de tiempo (círculos blancos). Se realizaron incubaciones paralelas a 2 ºC (círculos negros) y también a 37 ºC en presencia de N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG; 30 µM) (triángulos blancos). En los tiempos indicados, la incubación se finalizó mediante la adición de 2 ml de tampón frío y se cuantificó la radiactividad empleando un contador de centelleo. Cada punto representa la media de los duplicados; B: efecto de la hipoxia. La fracción citosólica del cuerpo cavernoso de conejo se incubó a 37 ºC con arginina tritiada bajo condiciones de normoxia (pO_2 = 130-150 mmHg) o de hipoxia (pO_2 = 15-25 mmHg). Se llevaron a cabo incubaciones paralelas a 2 ºC para determinar la actividad inespecífica. La concentración de citrulina tritiada fue calculada restando la actividad inespecífica de la actividad total. Los valores se expresan como media ± EE (n = 6); *p < 0,0005.*

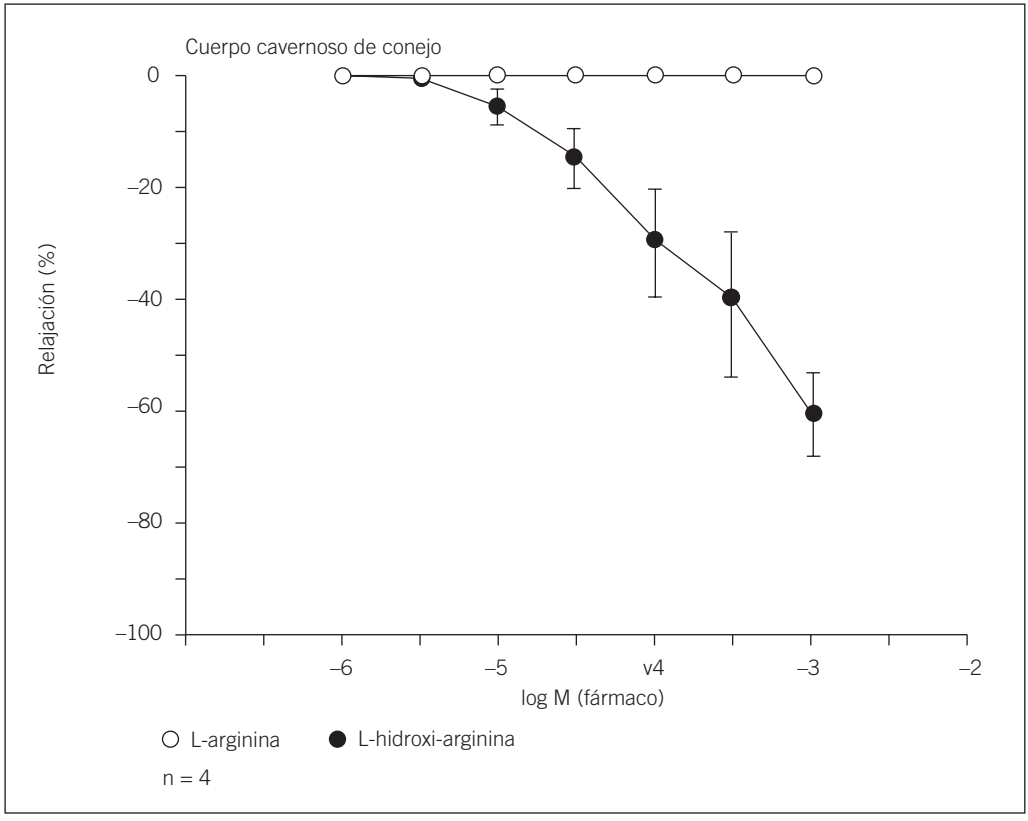


Fig. 3. Relajaciones inducidas por la adición de concentraciones crecientes (0,1 μM a 1 mM) de L-arginina y L-hidroxi-arginina en tiras de cuerpo cavernoso de conejo previamente contraídas con fenilefrina (1 μM). Los datos se expresan como la media ± EE del porcentaje de la relajación total obtenida con 0,1 mM de papaverina. n indica el número de tejidos empleados, cada uno de un animal diferente.

dotelio como neurogénica, se encuentra disminuida comparada con la respuesta en tejidos de pacientes no diabéticos[6]. Estas observaciones en tejidos humanos se han corroborado en animales de experimentación.

En tejidos trabeculares del cuerpo cavernoso de conejos tratados con aloxano para inducir diabetes se ha demostrado, a las 6 semanas, una relajación dependiente del endotelio y neurogénica deficiente del músculo liso trabecular cuando se compara con los tejidos de animales control[7]. Las respuestas al donador de NO nitroprusiato son, sin embargo, comparables en tejidos de animales diabéticos y controles. De nuevo, y como ocurre con la hipercolesterolemia, la diabetes altera las respuestas relajantes que dependen de la generación del NO. Queda sin determinar si esto se debe a

TABLA I

DIANAS FARMACOLÓGICAS PARA POTENCIAR LA VÍA DEL NO/GMPc EN EL TRATAMIENTO DE LA IMPOTENCIA

Sustratos
L-arginina
L-hidroxi-arginina
Donadores del NO
Nitratos
Moléculas nitrosiladas (p. ej., antagonistas de los receptores alfaadrenérgicos nitrosilados)
Inhibidores de las PDE
Sildenafilo (inhibidor selectivo de la PDE5)

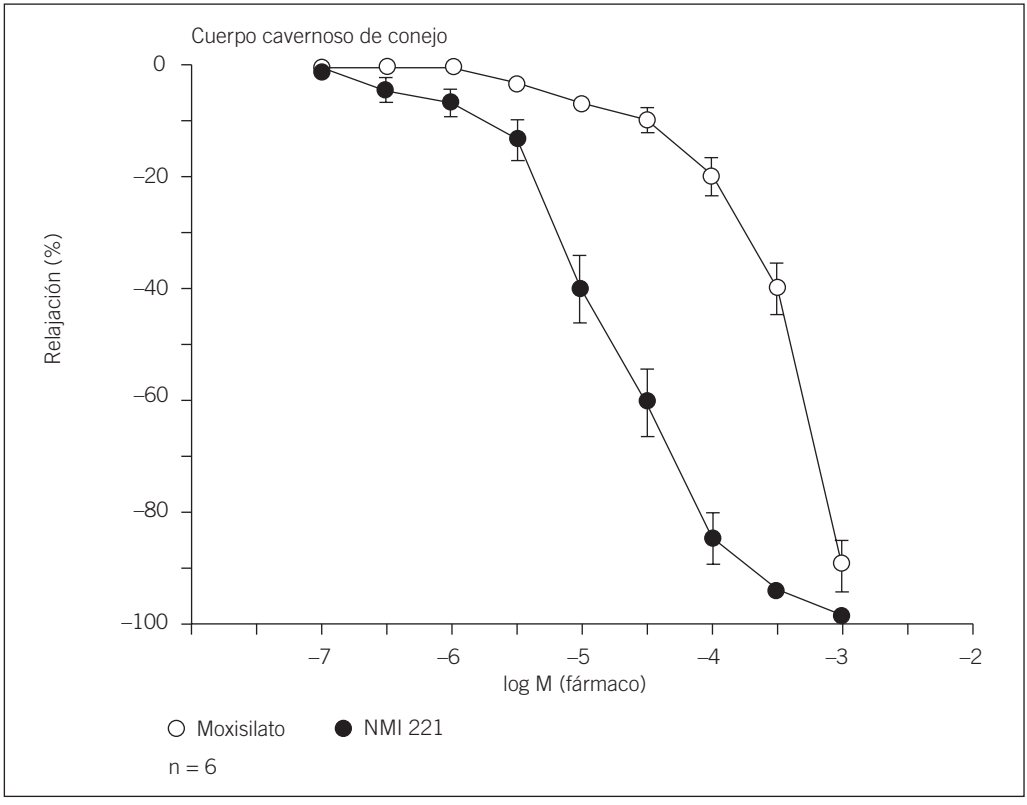


Fig. 4. Relajaciones inducidas por la adición de concentraciones crecientes (0,1 μM a 1 mM) de moxisilato y NMI 221 en tiras de cuerpo cavernoso de conejo previamente contraídas con endotelina (10 nM). Los datos se expresan como la media ± EE del porcentaje de la relajación total obtenida con 0,1 mM de papaverina; n indica el número de tejidos empleados, cada uno de un animal diferente. Las respuestas inducidas por NMI 221 fueron más potentes que las producidas por moxisilato, obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa al comparar las curvas mediante un análisis de la variancia (ANOVA; $p < 0,005$).

una alteración en la síntesis o en la disponibilidad de esta molécula.

Aplicación clínica

La evidencia del papel fundamental de la vía del NO/GMPc en la iniciación y el mantenimiento de la erección y de su alteración en condiciones patológicas hace de ésta una diana farmacológica para el tratamiento de la impotencia. En la tabla I se enumeran las distintas formas en las que es posible potenciar la vía del NO/GMPc.

La administración de L-arginina a los pacientes ha demostrado una escasa efectividad en cuanto a la mejoría de la capacidad de erección. Este resultado concuerda con la falta de efecto relajante que tiene la L-arginina sobre el músculo liso del cuerpo cavernoso (fig. 3). No obstante, la L-hidroxi-arginina, producto intermedio en la síntesis del NO, sí tiene un efecto relajante dependiente de la generación de NO. Por tanto, es posible que en un futuro la administración de sustratos y/o intermediarios en la síntesis de NO represente una vía terapéutica para la impotencia asociada a una deficiente producción de NO.

La administración local, intracavernosa, de nitratos donadores del NO, específicamente el nitroprusiato, se ha evaluado experimentalmente en algunos pacientes. Aunque hubo respuesta en muchos de ellos, los efectos secundarios, especialmente la hipotensión arterial, fueron importantes en muchos casos. En

este sentido, se está considerando la utilización de nitrosotioles, cuya transferencia del NO es casi inmediata para conseguir un efecto local con escaso efecto sistémico. Esto ha llevado a proponer la nitrosilación de moléculas que por sí mismas presentan un efecto proerectogénico, convirtiéndolas de esta manera en moléculas con una doble funcionalidad: donadores del NO y, por ejemplo, antagonistas de los receptores alfaadrenérgicos. Estas moléculas han demostrado poseer potentes efectos relajantes del músculo liso del pene in vitro (fig. 4) y la capacidad de inducir erección in vivo, en animales de experimentación, con escasos efectos sistémicos.

La inhibición de la actividad fosfodiesterasa en el cuerpo cavernoso es la diana terapéutica que ha alcanzado el uso clínico[8]. El NO ejerce su acción en el músculo trabecular y arterial mediante la activación de la forma soluble de la guanilato ciclasa con el consecuente aumento de la concentración intracelular de GMPc. En la regulación de segundos mensajeros, las fosfodiesterasas son enzimas clave. Se han identificado nueve familias distintas de fosfodiesterasas (PDE), con un patrón de distribución específico en distintos órganos. Se ha descrito la existencia de cuatro familias de PDE en el tejido del cuerpo cavernoso humano: PDE2, PDE3, PDE4 y PDE5. Dos de estas enzimas, la PDE2 y la PDE5, son capaces de hidrolizar el GMPc, siendo esta última selectiva para este nucleótido cíclico con una Km baja. El sildenafilo es un inhibidor potente y selectivo de la actividad PDE5[9]. In vitro, el sildenafilo aumenta la acumulación de GMPc en el tejido del cuerpo cavernoso humano, lo que potencia la relajación inducida por el NO endógeno y exógeno[9]. En animales de experimentación el sildenafilo potencia la capacidad de erección tras la estimulación del nervio pélvico[10]. En humanos, el sildenafilo ha demostrado un alto grado de efectividad en el tratamiento de la impotencia de gravedad moderada e incluso en algunos casos graves[8]. Este fármaco se administra por vía oral una hora antes de tener relaciones sexuales y su ventana terapeútica es de 4 h. Dada la facilidad de la vía de administración oral y su alta efectividad, el sildenafilo se ha convertido en la primera línea de tratamiento farmacológico de la impotencia. Su efectividad es menor (40%) en pacientes en los que la impotencia es secundaria a la cirugía pélvica debido a la lesión que se produce en los nervios liberadores de NO. Así mismo, la efectividad es limitada (55%) en pacientes diabéticos, mientras que en el resto de los pacientes la efectividad oscila entre el 60 y el 80% dependiendo de la etiología[8].

Actualmente se están desarrollando segundas generaciones de inhibidores de la PDE5 con mayor selectividad por esta enzima y diferente farmacocinética.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kim N, Azadzoi KM, Goldstein I, Sáenz de Tejada I. A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. J Clin Invest 1991; 88: 112-118.
2. Kim N, Vardi Y, Padma-Nathan H, Goldstein I, Sáenz de Tejada I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway: physiological role in penile erection. J Clin Invest 1993; 91: 437-443.
3. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. Biochem Biophys Res Commun 1990; 170: 843-850.
4. Burrett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. Science 1992; 257: 401-403.
5. Azadzoi KM, Sáenz de Tejada I. Hypercholesterolemia impairs endothelium dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. J Urol 1991; 146: 238-240.
6. Sáenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzoi KM, Krane RJ, Cohen RA. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. N Engl J Med 1989; 320: 1.025-1.030.
7. Azadzoi KM, Sáenz de Tejada I. Diabetes mellitus impairs neurogenic and endothelium dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. J Urol 1992; 148: 1.587-1.591.
8. Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. N Engl J Med 1998; 33: 1.397-1.404.
9. Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Turner LA, Price ME, Naylor AM. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. J Urol 1998; 159: 2.164-2.171.
10. Carter AJ, Ballard SA, Naylor AM. Effect of selective phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectile function in the anesthetized dog. J Urol 1998; 160: 242-246.

DISCUSIÓN

A. García Sánchez: ¿Es, en general, la isoforma 5 de la fosfodiesterasa predominante en tejido muscular de los vasos?

I. Sáenz de Tejada: En el músculo liso de los vasos predominan las isoformas 2 y 5.

A. García Sánchez: ¿Cómo se explicaría que sildenafilo no tenga más efectos indeseables como, por ejemplo, producción de hipotensión?

I. Sáenz de Tejada: Sorprende porque no son excesivamente potentes, pero sildenafilo sí que presenta efectos vasodilatadores a otros niveles. Entre otros, disminuye la presión arterial sistólica una media 8 mmHg, en un 16% de pacientes produce cefaleas (posiblemente por vasodilatación), causa sensación y enrojecimiento facial, así como sensación de congestión nasal por efecto sobre el tejido eréctil de la nariz.

A. García Sánchez: Puesto que hay datos de subsensibilización o *down-regulation* de guanilato-ciclasa mediada por GMPc en determinadas situaciones experimentales, ¿existen estudios realizados a largo plazo en animales de experimentación con sildenafilo para comprobar si también se produce dicha subsensibilización de la guanilato-ciclasa?

I. Sáenz de Tejada: No existen evidencias de ello, como tampoco las hay de la estimulación de la expresión de las fosfodiesterasas por parte de este fármaco. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la administración de este fármaco es a demanda, que tiene una semivida biológica de 4 h aproximadamente, y que su efecto es transitorio. Por tanto, los aumentos de GMPc no son mantenidos.

A. García Sánchez: Estaba pensando en situaciones de abuso del fármaco. Por otro lado, has mencionado que en uno de los experimentos la hidroxi-arginina era eficaz, mientras que la arginina no lo era. ¿Se ha descrito tal vez algún tipo de hipofunción de la NOS en algún paciente que pudiese explicar que el intermediario sea eficaz y no el sustrato?

I. Sáenz de Tejada: La verdad es que no lo sabemos. Nos interesamos en la hidroxi-arginina fundamentalmente por el tema de la hipoxia, pensando que en situaciones de hipoxia, la hidroxi-arginina, como ya contenía oxígeno molecular incorporado, iba a requerir la mitad de concentración de oxígeno para poder reinstituir la síntesis de NO. Y fue en estos experimentos in vitro donde constatamos que no había respuesta a la arginina y sí a la hidroxi-arginina. Esto también se ha observado en arterias, en las que para observar una respuesta vasodilatadora había que deplecionar la arginina primeramente. Esto puede inducir a pensar que tal vez exista una reserva para L-arginina que no existe para hidroxi-arginina y que, por tanto, no sea un factor que influya en su efecto vasodilatador.

A. García Sánchez: ¿Se dispone de algún estudio sobre la funcionalidad de la NOS que sugiera la existencia de correlación entre impotencia e hipofunción o disminución de NOS?

I. Sáenz de Tejada: Se ha demostrado disminución en la respuesta funcional en la diabetes, en la hipercolesterolemia y en la isquemia. En este último caso, hemos visto que se producía una disminución de la actividad NO sintetasa. Cabría destacar también el papel regulador de la actividad en el cuerpo cavernoso humano de los andrógenos. Son importantes reguladores de la actividad de la sintetasa del NO, de manera que si disminuyen se reduce la actividad y, lo que es más discutido, la expresión de la NOS. Otro mecanismo regulador son las bajas concentraciones fisiológicas de oxígeno, que en el pene en estado de flacidez son atribuibles al aporte sanguíneo de tipo venoso.

Identificación de vías intracelulares implicadas en la diferenciación muscular

Perla Kaliman, Judith Canicio y Antonio Zorzano

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

Introducción

El proceso de desarrollo del músculo esquelético comprende numerosos acontecimientos: predeterminación de células mesodérmicas pluripotentes para diferenciarse en mioblastos, salida de los mioblastos del ciclo celular, formación de miotubos multinucleados por fusión de mioblastos y, finalmente, crecimiento y maduración de las fibras de músculo esquelético[1]. Molecularmente, la expresión de genes específicos de músculo esquelético implica a la familia de factores de transcripción relacionados con MyoD. Esta familia de proteínas básicas con estructura de hélice-giro-hélice (bHLH) incluye MyoD, miogenina, myf-5 y MRF4[2]. La actividad transcripcional de estos factores está regulada de manera compleja y requiere la formación de heterodímeros con los productos del gen E2A para formar complejos activos[3]. La actividad de dichos factores se atenúa cuando E2A es secuestrado por Id, proteína cuya expresión se reprime en el momento de la diferenciación celular. Actualmente se conocen varios factores capaces de regular negativamente la diferenciación del músculo esquelético. Entre los más caracterizados se encuentran el factor básico de crecimiento de fibroblastos de tipo 2 (bFGF-2), el factor de transformación del crecimiento β1 (TGF b1) y oncogenes como c-*myc*, c-*jun*, c-*fos*, H-*ras* y E1a[4].

Existen pocos factores descritos capaces de inducir la diferenciación morfológica del mioblasto y la expresión y activación de la familia de proteínas MyoD. Entre ellos, los factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I e IGF-II) son estimuladores potentes de la diferenciación muscular y se consideran candidatos potenciales para la regulación de la función de las células satélite durante la regeneración ante la lesión muscular[5]. La expresión de IGF aumenta durante la diferenciación de los mioblastos[6-9]. La cantidad de IGF-II secretado se correlaciona con la velocidad de diferenciación espontánea y se ha descrito que la presencia de oligonucleótidos antisentido complementarios al ARNm de IGF-II inhibe la diferenciación en ausencia pero no en presencia de IGF-II exógeno[10]. La expresión de IGF-I en el músculo esquelético provoca la hipertrofia de las miofibras[11] y su sobreexpresión en el corazón de ratones transgénicos provoca cardiomegalia mediada por un aumento del número de células[12].

En cuanto a su potencial clínico, IGF-I está siendo administrado a personas afectadas de esclerosis lateral amiotrófica (ELA)[13]. IGF-I ha sido administrado con efectos beneficiosos a varios modelos de degeneración motoneuronal en el ratón. El modelo de ratón mutado (ratón "wobbler") posee un gen autosómico recesivo (wr) y ha sido caracterizado como modelo experimental de alteraciones de las motoneuronas bajas asociadas con atrofia muscular, denervación y reinervación. Se ha demostrado que el tratamiento de estos ratones durante 6 semanas con IGF-I provoca un aumento del 40% en la fuerza[14]. El diámetro promedio de la fibra muscular, que es menor en los ratones "wobbler" que en los normales, aumenta en los animales mutantes tratados con IGF-I[14]. Estos datos revelan que la administración de IGF-I provoca un efecto beneficioso significativo en los parámetros histoquímicos y funcionales del músculo. Un inconveniente claro en el diseño de terapias de regeneración muscular a base de administración de IGF es que estos péptidos son factores de crecimiento pleiotrópicos capaces de inducir hipertrofias generalizadas. Por esta razón, la identificación de los elementos celulares implicados en la cascada de señalización miogénica inducida por los IGF constituirá una base esencial en futuras estrategias terapéuticas de regeneración muscular.

Fosfatidilinositol 3-cinasa y miogénesis

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K) es una enzima capaz de fosforilar en posición D-3 el

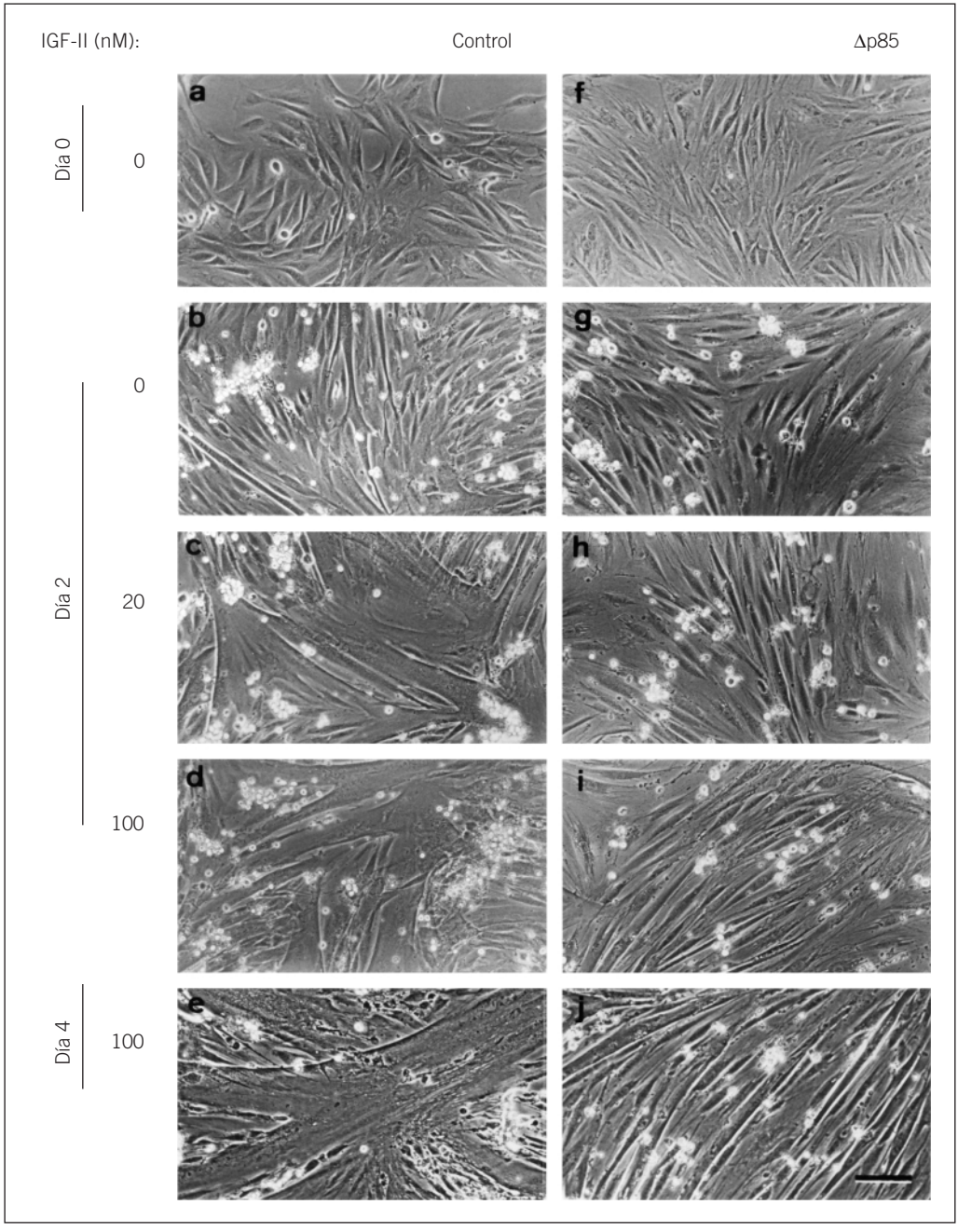


Fig. 1. Inhibición de la fusión inducida por IGF-II en células L6E9-Δp85. Células L6E9-Δp85 (f-j) y células control expresando la forma salvaje de p85Δ (a-e) crecieron hasta su confluencia en un medio rico en suero (a y f) y luego se diferenciaron en medio DMEM (b y g) o en medio DMEM que contenía 20 nM de IGF-II (c y h) o 100 nM (d, e, i y j). Las células se fotografiaron a los 2 días (b, c, g, h, i) o a los 4 días de diferenciación (e y j). Escala, 30 mm. Reproducida con permiso de Kaliman et al, 1998[23].

anillo inositol del fosfatidilinositol (PI) generando como productos PI 3-P, PI 3,4-P_2 y/o PI 3,4,5-P_3. La PI 3-K ha sido implicada en una gran variedad de procesos celulares como tráfico celular de proteínas, movilidad celular, diferenciación, regulación de la estructura del citosqueleto y apoptosis[15]. Según su estructura, función y mecanismo de activación, se pueden distinguir distintos subgrupos de PI 3-K. La PI 3-K mejor caracterizada hasta el momento está formada por una subunidad regulatoria de 85 kD (p85) y una subunidad catalítica de 110 kD (p110). La subunidad p85 es capaz de activar a la p110 al unirse a través de sus dominios SH2 a residuos de fosfotirosina de otras proteínas[16]. La PI 3-K de tipo γ no se une a p85 sino que se activa por unión a las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G[17]. Un tercer grupo de PI 3-K está formado por la Vps34p (*vacuolar protein sorting*) de *Saccharomyces cerevisiae* y su proteína homóloga humana[18,19]. Estas isoformas tienen un papel fundamental en el tráfico intracelular de proteínas y se activan al asociarse a una proteína con actividad de tipo proteína serina/treonina cinasa.

Durante los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento del papel de los IGF en la miogénesis[20]. Sin embargo, los procesos intracelulares miogénicos dependientes de IGF son muy poco conocidos. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la enzima PI 3-K es un segundo mensajero esencial para los efectos miogénicos de los IGF[21-23]. En efecto, nuestros estudios han demostrado que la vía miogénica inducida por IGF se bloquea totalmente en células musculares tratadas con inhibidores específicos de la actividad PI 3-K y en células musculares que expresan de manera estable una forma mutada dominante negativa de la subunidad reguladora de la PI 3-K, p85 (L6E9 Δp85)[22].

p85-p110 PI 3-K es esencial para la miogénesis inducida por IGF en mioblastos de rata L6E9, mioblastos humanos y células 10 T1/2 transfectadas con MyoD

En nuestro laboratorio hemos demostrado que dos inhibidores específicos y estructuralmente no relacionados de las PI 3-K (la wortmanina[24] y el LY294002[25]) bloquean la capacidad de formar miotubos multinucleados a partir de mioblastos de la línea celular de músculo esquelético de rata L6E9 y de mioblastos humanos provenientes de biopsias de músculo esquelético. La inhibición de la PI 3-K no sólo afecta al proceso morfológico de diferenciación de músculo esquelético sino que también bloquea la expresión de marcadores bioquímicos de diferenciación como son la miogenina y el transportador de glucosa GLUT4. Así mismo, la inhibición de la PI 3-K impide la salida de los mioblastos del ciclo celular (paso esencial en el proceso de diferenciación terminal) evidenciado por la inhibición de la inducción de la proteína p21, un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas. Por contra, los inhibidores de la PI 3-K no afectan a la proliferación de los mioblastos ni los primeros episodios morfológicos de la diferenciación que son el alineamiento y la elongación de los mioblastos[21].

La sobreexpresión de MyoD o de otros miembros de esta familia de factores de transcripción es suficiente para inducir la formación de miotubos multinucleados y la expresión de genes específicos de músculo en células que no provienen de un origen muscular[26]. De esta forma, los fibroblastos 10T1/2 transfectados con MyoD son capaces de formar miotubos multinucleados y de expresar marcadores bioquímicos de músculo. Sin embargo, hemos demostrado que la inhibición de la PI 3-K bloquea la capacidad de MyoD para inducir la diferenciación. El tratamiento de células 10T1/2-MyoD con wortmanina o LY294002 impide la formación de miotubos, la expresión de miogenina, la salida del ciclo celular y también la represión de la proteína Id que es un regulador negativo de la miogénesis[21].

Resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran que la forma de PI 3-K implicada en la miogénesis inducida por IGF es la p85-p110: mioblastos L6E9 que sobreexpresan de manera estable una forma mutante dominante negativa de p85α (Δp85) (incapaz de unir y activar la p110) no se diferencian morfológica ni bioquímicamente en presencia de IGF[23]. En la figura 1 se observa que las células L6E9-Δp85 no forman miotubos multinucleados en presencia de IGF-II mientras que los controles (células L6E9-Wp85 que sobreexpresan la forma salvaje de p85α) poseen un alto grado de fusión en las mismas condiciones.

Identificación de elementos celulares de la cascada de señalización miogénica dependiente de IGF/PI 3-K

Actualmente, se conoce poco sobre los elementos celulares activados directamente por la PI 3-K y/o por sus productos. Entre ellos, la

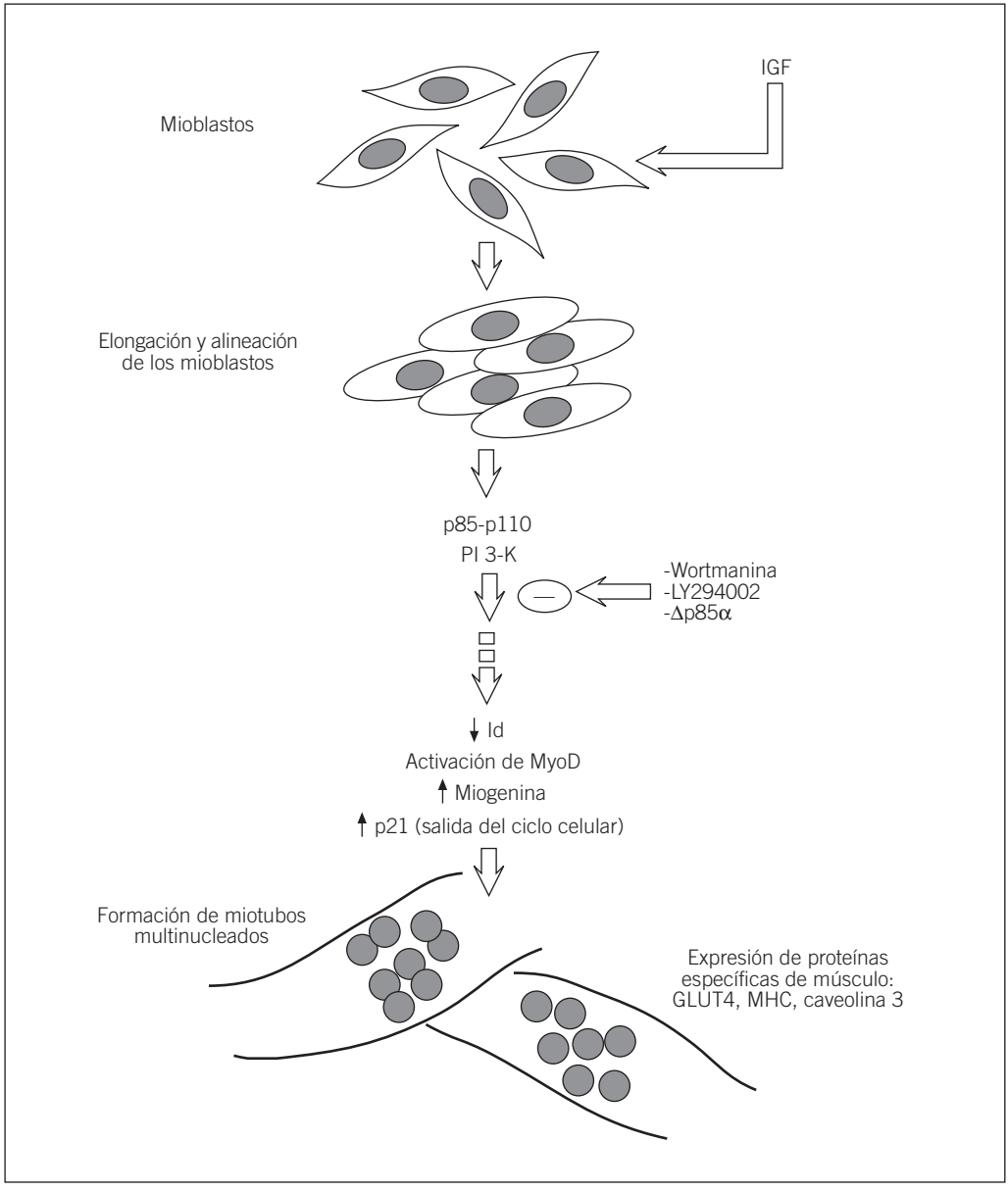


Fig. 2. Modelo de señalización miogénica inducida por IGF. En presencia de IGF-II, los mioblastos inician el programa de diferenciación. Morfológicamente, al principio se alinean y se elongan; 24 h después las células comienzan a fusionarse y forman miotubos multinucleados. En presencia de inhibidores químicos de PI 3-K (wortmanina o LY294002) o en células que expresan una p85 dominante negativa (Δp85), IGF-II es incapaz de inducir el programa de diferenciación: a) los valores de Id no decaen y se sabe que altos valores de Id inhiben MyoD; b) MyoD permanece inactivo; c) no se induce miogenina, un factor de transcripción esencial para la miogénesis, y d) los mioblastos no salen del ciclo celular, otro requisito esencial para la diferenciación, porque el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21 no se induce. Estos acontecimientos finalmente provocan la ausencia de fusión celular y de expresión de proteínas específicas de músculo como son GLUT4, la cadena pesada de la miosina (MHC) y la caveolina 3.

proteína p70 S6 cinasa (S6K), una serina/treonina cinasa, está implicada en la transmisión de señales dependientes de la actividad PI 3-K en varios procesos celulares. La p70 S6K es activada por la insulina y por IGF en mioblastos L6E9 y Sol8, y su actividad es potentemente bloqueada por un inhibidor bien caracterizado, la rapamicina. Recientemente, hemos demostrado en mioblastos de rata, ratón y humanos, que la p70 S6K no está implicada en la vía miogénica iniciada por IGF/PI 3-K[27].

Otros posibles efectores de esta vía podrían ser la proteincinasa B (también conocida como Akt o RAC) y/o algunas isoformas de la proteincinasa C (-ε, -δ, -ζ o -η) que son activadas por productos de la PI 3-K en diversas líneas celulares[28-31]. Por otra parte, se ha descrito que la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) es un elemento esencial para la diferenciación de células musculares de embrión de pollo[32]. Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que el efecto miogénico de los IGF depende de la actividad NOS celular y, que a su vez, la actividad miogénica de la NOS es totalmente dependiente de la PI 3-K (Kaliman et al, resultados no publicados).

Sobre la base de estos resultados, hemos propuesto un modelo que representa de forma esquemática los eventos morfológicos y bioquímicos que conducen a la diferenciación del músculo esquelético (fig. 2).

BIBLIOGRAFÍA

1. Olson EN. Interplay between proliferation and differentiation whithin the myogenic lineage. Dev Biol 1992; 154: 261-272.
2. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. Cell 1993; 75: 1.241-1.244.
3. Chakraborty T, Brennan TJ, Li L, Edmondson D, Olson EN. Inefficient homooligomerization contributes to the dependence of myogenin on E2A products for efficient DNA binding. Mol Cell Biol 1991; 11: 3.633-3.641.
4. Alema S, Tato F. Oncogenes and muscle differentiation: multiple mechanisms of interference. Cancer Biol 1994; 5: 147-156.
5. Edwall D, Schalling M, Jennische E, Norstedt G. Induction of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. Endocrinology 1989; 124: 820-825.
6. Tollefsen S, Lajara R, McCusker RH, Clemmons DR, Rotwein P. Insulin-like growth factors in muscle development. J Biol Chem 1989; 264: 13.810-13.817.
7. Tollefsen S, Levis Sadow J, Rotwein P. Coordinate expression of insulin-like growth factor-II and its receptor during muscle differentiation. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 1.543-1.547.
8. Rosen KM, Wentworth BM, Rosenthal N, Villa-Komaroff L. Specific, temporally regulated expression of the insulin-like growth factor-II gene during muscle cell differentiation. Endocrinology 1993; 133: 474-481.
9. Kou Kou, Rotwein PS. Transcriptional activation of the insulin-like growth factor-II gene during myoblast differentiation. Mol Endo 1993; 7: 291-302.
10. Florini JR Magri KA, Ewton DZ, James PL, Grindstaff K, Rotwein PS. "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. J Biol Chem 1991; 266: 15.917-15.923.
11. Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lec HM, Geske R, Montgomery C et al. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. J Biol Chem 1995; 270: 12.109-12.116.
12. Reiss K, Cheng W, Ferber A, Kajstura J, Li P, Li B et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 8.630-8.635.
13. Felstoff BW, Yang SX, Vaught JL, Bryan C, Ma JY. The IGF signaling system and ALS neurotrophic factor treatment strategies. J Neurol Sci 1995; 129: 114-121.
14. Hantai D, Akaaboune M, Lagord C, Murawsky M, Houenou LJ, Felstoff BW et al. Beneficial effects of IGF-I on wobbler mouse motoneuron disease. J Neurol Sci 1995; 129: 122-126.
15. Vanhaesebroeck B, Stein RC, Waterfield MD. The study of the phosphoinositide 3-kinase function. Cancer Surv 1996; 27: 249-270.
16. Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Panayotou G, Das P et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. Cell 1992; 70: 419-429.
17. Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Muhlhofer H et al. Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. Science 1995; 269: 690-693.
18. Stack JH, Dewald DB, Takegawa K, Emr SD. Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. J Cell Biol 1995; 129: 321-334.
19. Volinia S, Dhand R, Vanhaesebroeck B, MacDougall LK, Stein R, Zvelebil MJ et al. A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. EMBO J 1995; 14: 3.339-3.348.
20. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. Growth hormone and the insulin-like growth gactor system

in myogenesis. Endocrine Rev 1996; 17: 481-517.
21. Kaliman P, Viñals F, Testar X, Palacín M, Zorzano A. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block differentiation of skeletal muscle cells. J Biol Chem 1996; 271: 19.146-19.151.
22. Kaliman P, Zorzano A. Phosphatidylinositol 3-kinase in myogenesis. Trends Cardiovasc Med 1997; 7: 7-11.
23. Kaliman P, Canicio J, Shepherd PR, Beeton CA, Testar X, Palacín M et al. Insulin-like growth factors require phosphatidylinositol 3-kinase to signal myogenesis: dominant-negative p85 expression blocks differentiation of L6E9 muscle cells. Mol Endo 1998; 12: 66-77.
24. Ui M, Okada T, Hazeki K, Hazeki O. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. Trends Biochem Sci 1995; 20: 303-307.
25. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem 1994; 269: 5.241-5.248.
26. Edmondson DG, Olson EN. Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription J Biol Chem 1993; 268: 755-758.
27. Canicio J, Gallard E, Illa I, Testar X, Palacín M, Zorzano A et al. p70 S6kinase is not required for insulin-like growth factor-induced differentiation of rat, mouse, or human skeletal muscle cells. Endocrinology 1998. En prensa.
28. Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 1995; 378: 785-789.
29. Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S et al. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. J Biol Chem 1994; 269: 32.358-32.367.
30. Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. J Biol Chem 1993; 268: 13-16.
31. Ettinger SL, Lauener RW, Duronio V. Protein kinase δ specifically associates with phosphatidylinositol 3-kinase following cytokine stimulation. J Biol Chem 1996; 271: 14.514-14.518.
32. Lee KH, Baek MY, Moon KY, Song WK, Chung CH, Ha DB et al. Nitric oxid as a messenger molecule for myoblast fusion. J Biol Chem 1994; 269: 14.371-14.374.

DISCUSIÓN

J. Moscat: Demuestras que la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K) es necesaria para la activación del factor nuclear *kappa* B (NFκ-B). ¿Tienes algún resultado que pueda demostrar que también es suficiente, o prevés que va a ser únicamente necesaria?

P. Kaliman: No hemos realizado estos experimentos. La PI 3-K es esencial para la miogenesis, ya que cuando se bloquea no hay ningún tipo de diferenciación ni bioquímica ni morfológica. Lo mismo ocurre al bloquear NFκ-B, puesto que también es un paso esencial para la miogénesis. Como intermediarios entre PI 3 cinasa y NFκ-B tiene que estar el grupo de serincinasas que fosforilen I-κ B. No sé si una mutante permanente activa de PI 3-K puede por sí sola aumentar los niveles de actividad de NFκ-B de la célula.

J. Moscat: Me refería a que la sobreexpresión de mutantes permanente activa de PI 3-K se ha visto que activa, por ejemplo, *jun* o *Rac*.

P. Kaliman: No disponemos de los datos, aunque imagino que sí que es esencial para la completa activación de NFκ-B.

G. Pons: En relación con la activación de NFκ-B lo único que sorprende es el tiempo que tarda en descender I κ, que me pareció ser de 16 o 24 h. ¿No es mucho tiempo en comparación con la rapidez con que se activa normalmente el sistema en respuesta a otros factores? Y, en segundo lugar, ¿habéis probado el dominante negativo de I κ?

P. Kaliman: Aunque no te sabría decir por qué, el descenso más brusco se observa sobre todo entre las 16 y las 24 h. El proceso de diferenciación tiene unos tiempos que tampoco se pueden comparar a los sistemas donde se induce una cascada con factores de crecimiento en 5 min. Son procesos que duran 4 días en cultivo, como mínimo. Dado que son resultados muy recientes que no están publicados todavía, aún no hemos podido probar el dominante negativo de I κ.

A. Muñoz: Puesto que se ha descrito que la hormona tiroidea regula la expresión de genes clave en la diferenciación muscular, como miogenina, MyoD y miosinas, y que por otra parte también regula la expresión de *insulin growth factor I* (IGF-I) y el propio receptor en células de riñón, por ejemplo, ¿habéis estudiado qué hace la hormona tiroidea en vuestro sistema?

P. Kaliman: No hemos analizado el efecto de la hormona tiroidea en nuestro modelo. Las célu-

las musculares secretan de manera autocrina IGF para promover su diferenciación, y nosotros estamos adicionando el IGF de manera exógena para iniciar directamente la miogénesis.

R. Bartrons: ¿Funciona exactamente igual con las dos IGF?

P. Kaliman: No, porque el IGF-II es el que la célula muscular secreta de manera autocrina, pero su efecto está mediado a través del receptor de IGF-I.

A. Celada: ¿Cualquier sustancia que induce iNOS, como por ejemplo interferón γ o cualquier otro producto, induce diferenciación? Y, en segundo lugar, ¿en qué parte del ciclo celular se detiene la célula con el IGF?

P. Kaliman: No se han realizado estudios con interferón en cuanto a inducción de diferenciación muscular. Se sabe que la interleucina 15 sí que afecta a la diferenciación muscular. En alguno de los experimentos se provó el interferón γ, pero no observamos ningún efecto claro. Respecto a tu segunda pregunta, desconozco en qué momento del ciclo se detiene la célula.

A. García de Herreros: ¿Habéis estudiado algún otro efector de PI 3-K como Akt o algún otro posterior?

P. Kaliman: Probamos p70 S6 cinasa (p70 S6K) y vimos que la vía no pasa por ahí. En estos momentos lo estamos analizando en Akt y pensando también, evidentemente, en isoformas de PKC.

A. García de Herreros: Fibroblastos muy semejantes a éstos pueden diferenciarse hacia adipocitos si son tratados de otra manera, con un estímulo en el que interviene el IGF-I. ¿Habéis estudiado si esta ruta está involucrada tanto en la diferenciación hacia la célula muscular como hacia el adipocito?

P. Kaliman: La verdad es que no es exactamente comparable la vía de diferenciación adipogénica. Se ha descrito que la p70 S6K es importante para la vía adipogénica, pero no para la miogénica. También hay que pensar que en la diferenciación de adipocitos se induce con insulina, por ejemplo. Hay algunos puntos en común, como el caso de la PI 3-K, que sí que se ha visto implicada en la adipogénesis.

A. García de Herreros: ¿Hay algún elemento que puedas caracterizar que esté involucrado también en la diferenciación de fibroblastos hacia adipocitos?

P. Kaliman: Por el momento centramos nuestro estudio en la miogénesis.

F. Mayor: Es realmente sorprendente que la vía PI 3-K sea la única responsable de todo el programa de diferenciación cuando realmente estos receptores son capaces de poner en marcha simultáneamente varios procesos. En relación con esto, ¿habéis observado si algún otro receptor en estos tipos celulares que también estimule PI 3-K produce el mismo efecto de diferenciación?

P. Kaliman: La verdad es que no hemos estimulado estas células con ningún otro agente diferenciador, porque estamos analizando el mecanismo desde una óptica más fisiológica, que es a través del receptor IGF-I. Pero lo que está claro es que la PI 3-I es esencial para este proceso, puesto que si se bloquea no se obtiene ningún tipo de diferenciación muscular. Lo que puede ser es que la PI 3-K no esté actuando sólo en la vía de IGF sino también por la vía de integrinas. Se sabe que la vía de integrinas es esencial para la miogénesis y que los complejos macromoleculares que se encuentran asociados a integrinas unen también PI 3-K. Puede que haya también distintas isoformas de PI 3-K implicadas.

A. García Sánchez: Me ha sorprendido que la arginina mimetizase totalmente el efecto del IGF. Para empezar, me pregunto qué isoforma se está expresando constitutivamente: ¿es la nNOS, que es abundante en músculo esquelético, o es la iNOS, de la que actualmente empiezan a existir evidencias de que también se expresa constitutivamente?

P. Kaliman: Sí, a nosotros también nos sorprendió. En el músculo esquelético se expresan las tres isoformas constitutivas de NOS. Nosotros observamos que con L-arginina se induce la producción de NO y la fusión. Aunque puede que no sea sólo a través de iNOS, sino de las otras NOS.

A. García Sánchez: Aunque sea un experimento algo sucio y poco popular, ¿habéis probado el empleo de donadores?

P. Kaliman: No podemos usarlos porque tienen una vida media muy corta y este proceso dura 4 o 5 días. Con donadores tipo nonoatos, que tienen una vida media más larga, no observamos ningún efecto claro.

Señalización del receptor de pancreastatina: *cross-talk* con el receptor de insulina

Víctor Sánchez Margalet, José Santos Álvarez y Carmen González Yanes

Departamento de Bioquímica Clínica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

Introducción

La pancreastatina (PST) es un péptido de 49 aminoácidos con una glicina-amida en el extremo carboxilo terminal, que fue aislado a partir de páncreas porcino a finales de 1986[1]. La PST deriva de la proteólisis de un precursor prohormonal, la cromogranina A (CGA), una glucoproteína muy abundante en el gránulo de secreción cromafín, pero que también está presente en la mayoría de los gránulos de secreción de células neuroendocrinas[2,3]. En los islotes de Langerhans, la PST se localiza tanto en las células β, productoras de insulina, como en las células δ, productoras de somatostatina[4], y en las células α, productoras de glucagón[5,6]. Además, la CGA puede sufrir su procesamiento proteolítico fuera de la célula, en el espacio extracelular, tras su secreción, así como en la circulación periférica[7,8]. Puesto que la mayoría de la CGA circulante se origina en tejido cromafín, este origen debe ser la principal fuente indirecta de PST, mientras que el páncreas endocrino, el antro gástrico y las células neuroendocrinas del duodeno son la fuente mayoritaria de secreción de PST procesada[9,10]. El ADNc de CGA de rata reveló la presencia de una secuencia PST-*like*, homóloga a la PST porcina[11-14].

La PST fue denominada así por su acción inhibidora sobre el primer pico de secreción de la insulina estimulada por glucosa; sin embargo, se han descrito muchos más efectos biológicos en diferentes tejidos. De hecho, su papel como péptido regulador enteropancreático se ha establecido tras conocerse una serie de efectos biológicos cuya actividad radica en el extremo carboxilo terminal de la molécula[15]. Estos efectos se ejercen sobre la secreción pancreática endocrina y exocrina[16-22], la secreción gástrica[23,24], la liberación de parathormona[25], las concentraciones de catecolaminas[26] y la retención de memoria[27]. La PST sintética de rata también ha demostrado tener actividad biológica en diferentes tejidos[28-30]. En el hígado de rata hemos encontrado que la PST posee un efecto glucogenolítico comparable al ejercido por el glucagón[31,32]. Este efecto fue confirmado en hepatocitos aislados de rata, donde resultó ser dependiente de la presencia de calcio en el medio de incubación, e independiente de la producción de AMPc[33]. Además, encontramos que la PST incrementa la concentración de calcio libre citosólico, aumentando tanto la salida de los depósitos intracelulares como la entrada de calcio extracelular[34]. Por otra parte, comprobamos que la PST inhibe la síntesis de glucógeno estimulada por insulina en hepatocitos aislados de rata[35].

Recientemente hemos encontrado otro efecto contrarregulador de PST, esta vez sobre la acción de la insulina sobre otra célula diana, el adipocito de rata[36]. La PST inhibe la captación de glucosa y la liberación de lactato estimulada por insulina. La lipogénesis también se ve inhibida por la PST aunque con menor eficacia. La PST tiene un efecto lipolítico sobre el adipocito aislado que es inhibido totalmente por la insulina[36]. Por contra, la PST estimula la síntesis proteica, tanto basal como estimulada por insulina en los adipocitos aislados de rata[36]. En definitiva, hemos encontrado una nueva acción endocrina de PST con un posible papel fisiológico en la regulación del metabolismo del tejido graso y con posibles implicaciones en procesos fisiopatológicos como la obesidad y otros síndromes con resistencia a la insulina.

La acción inhibitoria de PST sobre la secreción endocrina y exocrina en general condujo a la idea de que la PST podría desempeñar un papel en la regulación fina de la secreción tanto autocrina como paracrina y endocrina. Sin embargo, la estrecha relación de la PST con el tejido cromafín, y los efectos observados en el hígado y en el tejido adiposo, sugieren un papel como péptido contrarregulador de la insulina. Así, la PST actuaría en conjunción con las catecolaminas en la regulación del metabolis-

mo de la glucosa[37,38] y los lípidos[36], inhibiendo tanto la secreción de insulina como su acción sobre el hepatocito y el adipocito. Este efecto sinérgico con el de las catecolaminas podría ser útil en condiciones fisiológicas, como la respuesta al estrés (p. ej., producido por la hipoglucemia) (fig. 1). Por otro lado, los efectos de PST inhibiendo la secreción y la acción de la insulina han llevado a la hipótesis reciente que atribuiría un papel a la PST en la resistencia a la insulina[37,38]. Así, la diabetes tipo 2 se caracteriza por una secreción inapropiada de insulina y resistencia a la misma[39]. De hecho, se han encontrado valores elevados de PST circulante en la diabetes tipo 2, en la hipertensión y en la diabetes gestacional, donde parece correlacionarse con las catecolaminas[40-43]. Si bien la resistencia a la insulina parece preceder al incremento en los valores de PST o de catecolaminas en la hipertensión esencial[44], estas hormonas contrarreguladoras podrían empeorar el síndrome de resistencia a la insulina.

A pesar de todas las acciones descritas aún no se conocen los mecanismos precisos por los que la PST ejerce tantos efectos biológicos. Durante los últimos años nos hemos interesado en el estudio del sistema de señalización de PST en el hepatocito. Por tanto, vamos a centrarnos en revisar nuestro trabajo sobre la señalización de PST en el hígado[45].

Receptores de pancreastatina en las membranas hepáticas

Aunque se han descrito múltiples efectos biológicos de la PST inhibiendo la secreción

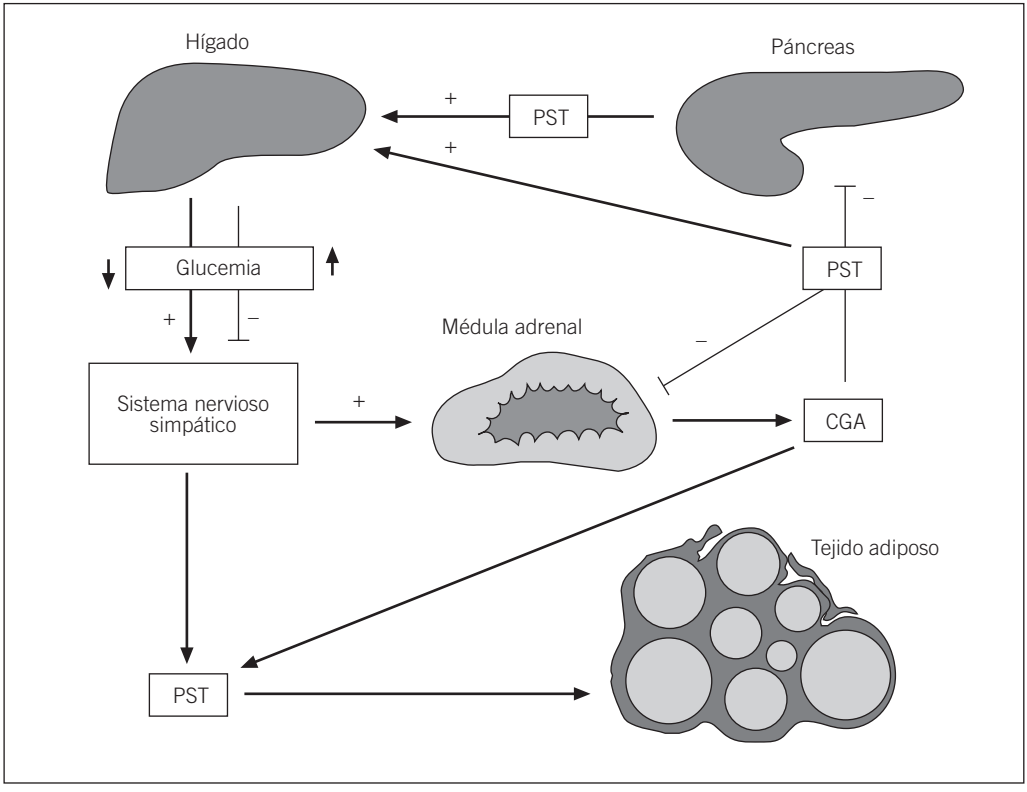


Fig. 1. Modelo del papel fisiológico de la pancreastatina (PST). Una señal de estrés (hipoglucemia) aumenta la actividad simpática, secretándose catecolaminas junto a la cromogranina A (CGA). La PST derivada de CGA inhibe la secreción y acción de la insulina en el hígado y en el tejido adiposo, estimula la glucogenólisis hepática e inhibe la captación de glucosa en el adipocito, lo que llevaría la glucemia a valores de normalidad, a la vez que la actividad simpática se inhibe, autolimitándose. Por otro lado, la PST producida en el páncreas o en el sistema gastrointestinal puede contrarregular la acción de la insulina; +: estimulación; –: inhibición.

exo y endocrina, la presencia de receptores en tejidos secretores no ha sido aún descrita. De hecho, una de las pruebas para demostrar el carácter endocrino de un péptido es la presencia de receptores específicos en la membrana plasmática de la célula diana.

En este sentido, hemos encontrado receptores específicos para PST de alta afinidad en membranas de hígado de rata[46]. Empleamos PST marcada con ^{125}I para estudiar la caracterización funcional de los receptores de PST. Este estudio sugirió que el hígado de rata presentaba receptores específicos y de alta afinidad para PST. Así, la unión del ligando era muy dependiente de la estructura de la PST. Por tanto, PST de otras especies con poca homología estructural (porcina o humana) presentaron muy baja afinidad en los estudios de desplazamiento del radioligando. El receptor de PST parecía ser una glucoproteína monomérica funcionalmente acoplada a algún sistema de proteínas G, ya que la unión era muy sensible a nucleótidos de guanina, y podía adsorberse con diferentes lectinas[46]. Estos resultados hacen pensar en un receptor de 7 dominios transmembrana acoplado a las proteínas G. El análisis de la unión en condiciones de equilibrio indicaba la presencia de una única clase de sitios de unión, con una B_{max} de 15 fmol/mg de proteína y una K_D de 0,2 nM. Estos valores se corresponden bastante bien con la ED_{50} observada para los efectos de PST en los hepatocitos[33,34], y son comparables a los de la mayoría de receptores de péptidos, y lo que es más importante, los valores eran compatibles con las concentraciones circulantes de PST[47], lo que refuerza la idea de un papel fisiológico de PST como un regulador del metabolismo de la glucosa.

Recientemente, hemos conseguido solubilizar receptores de PST a partir de membranas hepáticas en un estado funcional y acoplados a proteínas G, como comprobamos al realizar la caracterización funcional de los receptores solubles[48]. Así, obtuvimos resultados comparables a los observados previamente en membranas particuladas, con una B_{max} de 14 fmol/mg de proteína, una K_D de 0,3 nM y una sensibilidad similar a los nucleótidos de guanina. La caracterización molecular del receptor soluble de PST por medio de filtración en gel Sephacryl S-300 y *cross-linking* con radioligando reveló dos componentes: un pico de 80 K_D correspondiente al receptor y otro de 170 K_D compuesto de la asociación del receptor con una proteína G. Esta proteína G debe pertenecer a la familia de $G\alpha_q$ ya que fue reconocida con anticuerpos específicos en el immunoblot de las fracciones cromatográficas correspondientes al componente de 170 K_D[48].

También hemos conseguido, gracias a su naturaleza glucoproteica, purificar parcialente el complejo receptor-proteínas G por medio de cromatografía de adsorción a lectinas (lectina del germen de trigo)[48]. Éste es un primer paso importante hacia la purificación definitiva que llevará a la secuenciación y clonación del receptor.

Señalización del receptor de la pancreastatina

Una vez que habíamos encontrado el efecto biológico de la PST sobre el hígado nos interesó estudiar su señalización en el hepatocito[45].

Pronto observamos que el efecto glucogenolítico de la PST era independiente de AMPc pero muy dependiente del calcio[33]. Más aún, observamos que la PST incrementaba el calcio libre citosólico ($[Ca^{2+}]_i$), por medio de algún mecanismo tanto sensible como insensible al tratamiento con toxina pertúsica[34]. Estos resultados sugerían que la acción de PST estaría mediada por un sistema efector que incluiría la activación de PLC. De hecho, comprobamos que la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ está mediada por el incremento de IP3, a través de un mecanismo insensible a toxina pertúsica, mientras que la estimulación de la entrada de calcio extracelular parece utilizar un mecanismo sensible a toxina pertúsica[34]. Así, la PST incrementa la producción de IP3 y DAG en la membrana del hepatocito por medio de la activación de PLC[49,50]. La estimulación de PLC por un mecanismo insensible a toxina pertúsica sugería la intervención de una proteína G de la familia $G\alpha_q$. Hay que destacar que la producción de DAG estimulada por PST no es equimolar, sino mayor que la producción de IP3. Estos resultados se explican por la actuación de fosfolipasa C sobre otros sustratos como la fosfatidil colina (resultados no publicados).

Si el IP3 producido era responsable del incremento en $[Ca^{2+}]_i$, el DAG producía una estimulación de la actividad proteincinasa C, como comprobamos en hepatocitos aislados[50]. La función celular de ambas vertientes de la señalización derivadas del fosfatidil inositol bifosfato es sinérgica y parece ser responsable de la acción de PST en el hepatocito.

La PST también estimula la producción de GMPc, por medio de un mecanismo sensible a

toxina pertúsica. El papel del GMPc en la fisiología del hepatocito no se conoce. Sin embargo, hemos encontrado que la producción de GMPc inhibe la activación de PLC por PST, lo que sugiere una función de retroalimentación negativa sobre la señalización del receptor. El mecanismo íntimo de esta regulación está siendo investigado en la actualidad.

Proteínas G acopladas al receptor de PST en las membranas hepáticas

Los estudios del receptor de PST y su acción en el hepatocito sugerían el acoplamiento de proteínas G en la membrana plasmática. Así, teníamos datos indirectos de que PST estimula una proteína G: por la sensibilidad de la unión del radioligando a nucleótidos de guanina[46,48] y por la estimulación por PST de la actividad GTPasa de alta afinidad en membranas hepáticas[49]. Estos resultados fueron ratificados con estudios de unión de GTP-γ-^{35}S en membranas solubilizadas (resultados no publicados). El tratamiento con toxina pertúsica de las membranas hepáticas sólo inhibía parcialmente (15%) tanto la unión de GTP como la actividad GTPasa estimulada por PST. Esto sugería que el sistema principal de transducción del receptor de PST pertenecería a la familia de proteínas $G\alpha_q$, la cual es uno de los principales activadores de PLC de membrana (PLC-b). Por otra parte, el sistema de señalización sensible a toxina pertúsica parece pertenecer a la familia $G\alpha_{i1,2}$ (resultados no publicados), y sería el responsable del acoplamiento con la activación de guanilato ciclasa, aunque el mecanismo preciso de esta activación es objeto de estudio en la actualidad.

El siguiente paso fue, por tanto, investigar la naturaleza de esta interacción receptor-proteína G por medio de anticuerpos específicos, utilizando diferentes abordajes. El efecto de PST incrementando la unión de GTP y la actividad GTPasa fue bloqueado de forma específica por anticuerpos contra $G\alpha_{q/11}$, y en menor medida por anticuerpos anti-$G\alpha_{i1,2}$, lo que demuestra el acoplamiento funcional del receptor de PST con un doble sistema de proteínas G, pertenecientes a las familias $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{i1,2}$[51]. Estos resultados coincidían con los obtenidos por immunoblot en la cromatografía de exclusión en gel[46], en los que se observaba la coelución del receptor con la proteína $G\alpha_{q/11}$ formando un complejo de 170 kD. Esta asociación física selectiva fue comprobada por la presencia de $G\alpha_{q/11}$ en semipurificado de receptor de PST por cromatografía de adsorción a lectina de germen de trigo. Por otro lado, la inmunoprecipitación de $G\alpha_{q/11}$ coprecipitó al receptor de PST, como se dedujo de la actividad de unión de PST al inmunoprecipitado[51]. Estos resultados demostraban definitivamente el acoplamiento físico entre el receptor y la proteína $G\alpha_{q/11}$.

Finalmente, el acoplamiento del receptor de PST con el sistema efector PLC fue bloqueado por el anticuerpo contra $G\alpha_{q/11}$, lo que sugiere que una proteína G de la familia de $G\alpha_{q/11}$ es efectivamente el mediador de la señal desde el receptor de PST a la activación de PKC en las membranas de hígado de rata.

Para discernir qué subunidad $G\alpha$ específica mediaba la activación de PLC por PST empleamos anticuerpos específicos contra $G\alpha_q$ y $G\alpha_{11}$ (cedidos generosamente por el Prof. John H. Exton, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN), ya que ambas subunidades están presentes en las membranas hepáticas. Este estudio reveló que es selectivamente $G\alpha_{11}$ la proteína que media la activación de PLC por PST, y no la homóloga $G\alpha_q$[52].

El receptor de PST activa la isoenzima fosfolipasa C-β3

Puesto que PST estimula la actividad PLC en membranas hepáticas, era de suponer que la isoenzima efectora de esta acción sería PLC-β (PLC-γ es citosólica y sólo se asocia a proteínas tirosín fosforiladas de la membrana en respuesta a la señalización por tirosincinasas).

Sin embargo, hay cuatro isoformas de PLC-β descritas hasta el momento, y tres de ellas están presentes en las membranas de hígado de rata (β1, β2 y β3). Sólo PLC-β4 (específica de tejido nervioso) está ausente en las membranas hepáticas. Por tanto, utilizamos anticuerpos específicos contra las 3 isoenzimas de PLC-β presentes en el hígado de rata. Encontramos que sólo anti-PLC-β3 fue capaz de bloquear la acción de PST[52]. Por tanto, estos datos sugieren que PLC-β3 media la respuesta del receptor de PST en el hepatocito.

La pancreastatina inhibe la señalización del receptor de la insulina

Muy recientemente hemos estudiado el efecto de la PST sobre la señalización del receptor de insulina en las células derivadas de hepatoma de rata HTC[53]. La PST inhibe de forma dependiente de la dosis la autofosforilación del

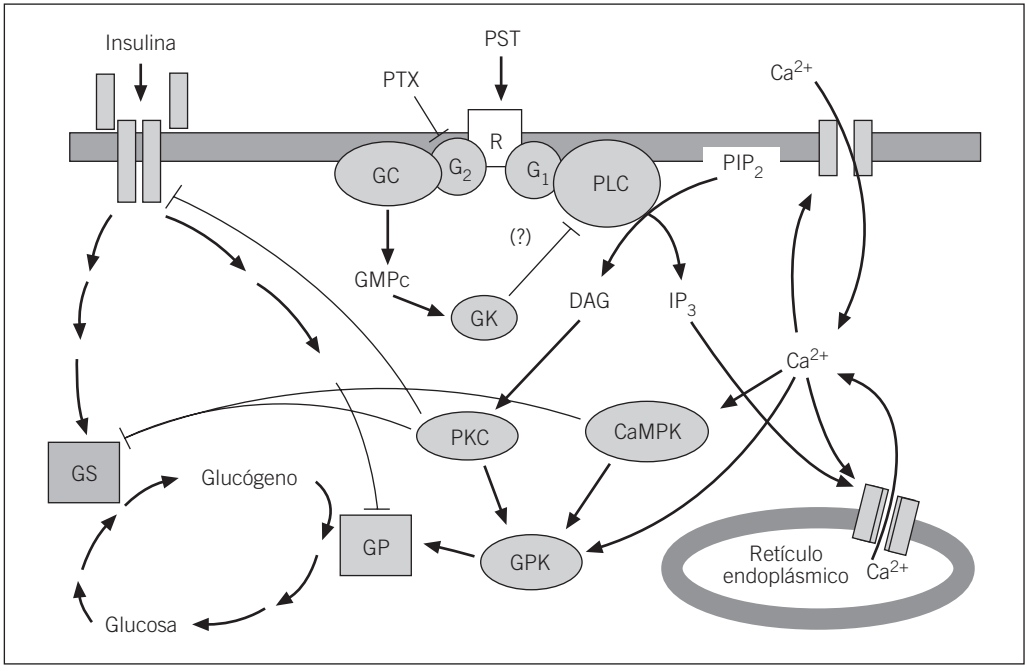


Fig. 2. Modelo del mecanismo de acción de la pancreastatina (PST). La PST se une a su receptor en la membrana del hepatocito y activa los sistemas de transducción de proteínas G. Una proteína G ($G\alpha_{11}$) insensible a toxina pertúsica (PT) activa la PLC-β3 produciendo IP3 y DAG, que activan PKC y proteincinasas dependientes de calcio, que median el efecto metabólico. La PKC puede fosforilar el receptor de insulina e inhibir su actividad. Otra proteína G sensible a toxina pertúsica ($G\alpha_{i1,2}$) media la producción de GMPc, que sirve para inhibir la señal de PLC autolimitándose la acción de PST.

receptor de la insulina. Además, PST también inhibe la tirosín-fosforilación de los sustratos del receptor de insulina en células HTC, IRS-1 y p62[54-57], así como su asociación con p85, la subunidad reguladora de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). La PST incluso bloqueó la activación de la cinasa de S6, una enzima de la parte final de la cascada de señalización del receptor de la insulina[58]. Finalmente, todos estos efectos inhibitorios de PST sobre la señalización de la insulina se previnieron con inhibición farmacológica de PKC (con estaurosporina). Esto sugería que el efecto contrarregulador de PST estaría mediado por fosforilación del receptor de insulina por la PKC activada, lo que fue demostrado por immunoblot con anticuerpos antiserina y antitreonina de immunoprecipitado antirreceptor de la insulina[53]. De nuevo, este efecto de fosforilación del receptor de la insulina pudo ser bloqueado por estaurosporina. En definitiva, estos resultados sugieren que la PST ejerce su efecto antiinsulina interrumpiendo la señalización temprana del receptor de insulina como consecuencia de la activación de PKC. La subunidad específica de PKC que es activada por la estimulación con PST y que sería responsable del *cross-talk* es objeto de investigación en la actualidad.

Conclusiones

En la figura 2 se resumen nuestros conocimientos acerca del mecanismo de acción de la PST en el hepatocito. Sabemos que existe un receptor específico en la membrana plasmática (probablemente de 7 dominios transmembrana), cuya estructura se dilucidará tras su purificación y clonación. Hemos observado que el receptor de PST es una glucoproteína de 80 K_D acoplada a dos sistemas de transducción: uno bien conocido, insensible a toxina pertúsica, probablemente la proteína $G\alpha_{11}$, que acopla el receptor con la PLC de membrana (PLC-β), y más específicamente con la PLC-

β3. La activación de PLC produce IP3 responsable del incremento en $[Ca^{2+}]_i$, y DAG que es responsable de la activación de proteincinasa C. Estas dos vías son probablemente responsables de la acción de PST sobre el metabolismo de la glucosa en el hepatocito. Además, la actividad PKC interviene en el mecanismo molecular de contrarregulación de la insulina, fosforilando su receptor en restos de serina y treonina y, por ello, inhibiendo la actividad tirosincinasa del receptor de insulina. Por otro lado, existe un sistema de proteínas G sensible a toxina pertúsica ($G\alpha_{i1,2}$), responsable del incremento en las concentraciones de GMPc. Sin embargo, el mecanismo por el cual el receptor de PST activa una guanilato ciclasa y cómo este sistema contrarregula la actividad PLC es motivo de trabajo en la actualidad, y de sus resultados podremos obtener nuevas conclusiones respecto a estos sistemas de transducción de membrana.

Agradecimiento

El trabajo revisado en este artículo ha sido subvencionado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 96/1.411). Agradecemos el apoyo constante del Prof. R. Goberna, Jefe del Departamento de Bioquímica Clínica, y del Servicio Andaluz de Salud (SAS), del que depende el Hospital Universitario Virgen Macarena.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JC. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. Nature 1986; 324: 476-478.
2. Iancangelo AL, Affolter HU, Eiden LE, Herbert E, Grimes M. Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. Nature 1986; 323: 82-86.
3. Iancangelo AL, Fischer-Colbrie R, Koller KJ, Brownstein MJ, Eiden LE. The sequence of porcine chromogranin A messenger RNA demonstrates chromogranin A can serve as the precursor for the biologically active hormone, pancreastatin. Endocrinology 1988; 155: 2.339-2.341.
4. Ravazzola M, Efendic S, Östenson CG, Tatemoto K, Hutton JC, Orci L. Localization of pancreastatin immunoreactivity in porcine endocrine cells. Endocrinology 1988; 123: 227-229.
5. Lamberts R, Schmidt WE, Creutzfeldt W. Light and electron microscopical immunocytochemical localization of pancreastatin-like immunoreactivity in porcine tissues. Histochemistry 1990; 93: 369-380.
6. Curry WJ, Johnston CF, Shaw C, Buchanan KD. Distribution and partial characterization of immunoreactivity to the putative C-terminus of rat pancreastatin. Regul Peptides 1991; 30: 207-219.
7. Simon JP, Bader MF, Aunis D. Proteolytic processing of CGA in cultured chromaffin cells. Biochem Biophys Acta 1989; 1.051: 123-130.
8. Watkinson A, O'Sullivan A, Burgoyne R, Dockray G. Differential accumulation of catecholamines, proenkephalin- and CGA-derived peptides in the medium after chronic nicotine stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. Peptides 1990; 11: 435-441.
9. Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranin-A and chromogranin-B - the first 25 years and future perspectives. Neuroscience 1992; 49: 497-528.
10. Watkinson A, Johnson AC, Davison M, Young J, Lee CM, Moore S et al. Heterogeneity of chromogranin A-derived peptides in bovine gut, pancreas and adrenal medulla. Biochem J 1991; 276: 471-479.
11. Hutton JC, Nielsen E, Kastern W. The molecular cloning of the chromogranin A-like precursor of β-granin and pancreastatin from the endocrine pancreas. FEBS Lett 1988; 236: 269-274.
12. Abood ME, Eberwine JH. Characterization and regulation of a cDNA clone for rat pancreastatin. Biochem Biophys Res Commun 1990; 167: 1.079-1.085.
13. Iancangelo AL, Okayama H, Eiden LE. Primary structure of rat chromogranin A and distribution of its mRNA. FEBS Lett 1988; 227: 115-121.
14. Parmer RJ, Koop AH, Handa MT, O'Connor DT. Molecular cloning of chromogranin A from rat pheochromocytoma cells. Hypertension 1989; 14: 435-444.
15. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin: further evidence for its consideration as a regulatory peptide. J Mol Endocrinol 1996; 16: 1-8.
16. Efendic S, Tatemoto K, Mutt V, Quan C, Chang D, Östenson C-G. Pancreastatin and islet hormone release. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 7.257-7.260.
17. Silvestre RA, Peiró E, Miralles P, Villanueva ML, Marco J. Effects of pancreastatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion by the perfused rat pancreas. Life Sci 1988; 42: 1.361-1.367.
18. Funakoshi A, Miyasaka K, Kitani K, Tatemoto K. Effect of pancreastatin on pancreatic endocrine function in the conscious rat. Regul Peptides 1989; 24: 225-231.
19. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin increases cytosolic Ca^{2+} in insulin secreting RIN m5F cells. Mol Cell Endocrinol 1992; 88: 129-133.
20. Sánchez-Margalet V, Calvo JR, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin and its 33-49 C-terminal fragment inhibit glucagon-stimulated insulin in vivo. Gen Pharmacol 1992; 23: 637-638.

21. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin (33-49) enhances the priming effect of glucose in the rat pancreas. Experientia 1993; 49: 551-552.
22. Miyasaka K, Funakoshi A, Nakamura R, Kitani K, Shimizu F, Tatemoto K. Effects of porcine pancreastatin on postprandial pancreatic exocrine and endocrine functions in the conscious dog. Digestion 1989; 43: 204-211.
23. Lewis JJ, Zdon MJ, Adrian TE, Modlin IM. Pancreastatin: a novel peptide inhibitor of parietal cell secretion. Surgery 1988; 104: 1.031-1.036.
24. Lewis JJ, Goldenring JR, Asher VA, Modlin IM. Pancreastatin: a novel peptide inhibitor of parietal cell signal transduction. Biochem Biophys Res Commun 1989; 163: 667-673.
25. Fasciotto BH, Gorr SU, DeFranco DJ, Levine MA, Cohn DV. Pancreastatin, a presumed product of chromogranin A (secretory protein I) processing, inhibits secretion from porcine parathyroid cells in culture. Endocrinology 1989; 125: 1.617-1.622.
26. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancrestatin decreases plasma epinephrine levels in surgical stress in the rat. Peptides 1993; 14: 797-799.
27. Flood JF, Morley JE. Effects of systemic pancreastatin on memory retention. Peptides 1988; 9: 1.077-1.080.
28. Funakoshi A, Miyasaka K, Kitani K, Tamamura H, Funakoshi S, Yajima H. Bioactivity of synthetic C-terminal fragment of rat pancreastatin on endocrine pancreas. Biochem Biophys Res Commun 1989; 158: 844-849.
29. Miyasaka K, Funakoshi A, Kitani K, Tamamura H, Fujii N, Funakoshi S. The importance of the C-terminal amide structure of rat pancreastatin to inhibit pancreatic exocrine secretion. FEBS Lett 1990; 263: 279-280.
30. Peiró E, Dégano P, Miralles P, Silvestre RA, Marco J. Homologous pancreastatin inhibits insulin secretion without affecting glucagon and somatostatin release in the perfused rat pancreas. Regul Peptides 1991; 34: 159-167.
31. Sánchez V, Calvo JR, Goberna R. Glycogenolytic effect of pancreastatin in the rat. Biosci Rep 1990; 10: 87-91.
32. Sánchez-Margalet V, Calvo JR, Goberna R. Glycogenolytic and hyperglycemic effect of 33-49 C-terminal fragment of pancreastatin in the rat in vivo. Horm Metabolism Res 1992; 34: 455-457.
33. Sánchez V, Lucas M, Calvo JR, Goberna R. Glycogenolytic effect of pancreastatin in isolated rat hepatocytes is mediated by a cyclic-AMP-independent Ca^{2+}-dependent mechanism. Biochem J 1992; 284: 659-662.
34. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin increases free cytosolic Ca^{2+} in rat hepatocytes involving both pertussis-toxin-sensitive and insensitive mechanisms. Biochem J 1993; 294: 439-442.
35. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin inhibits insulin-stimulated glycogen synthesis but not glycolysis in rat hepatocytes. Regul Peptides 1994; 51: 215-220.
36. Sánchez-Margalet V, González-Yanes C. Pancreastatin inhibits insulin action in rat adipocytes. Am J Physiology 1998; 275E: 1.055-1.060.
37. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin, a new peptide associated with essential hypertension and hyperinsulinemia. En: Galteau MM, Henny J, Siest G, editores. Biologie prospective. París: John Libbey Eurotext, 1993; 575-580.
38. Sánchez-Margalet V, Santos-Álvarez J, Goberna R. Pancreastatin signaling in the liver. En: Teelken A, Korf J, editores. Neurochemistry: cellular, molecular and clinical aspects. Nueva York: Plenum, 1997; 589-593.
39. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferranini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. Diabetes Care 1992; 15: 318-368.
40. Funakoshi A, Tateishi K, Shinozaki H, Matsumoto M, Wakasugi H. Elevated plasma levels of pancreastatin (PST) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). Regul Peptides 1990; 30: 159-164.
41. Sánchez-Margalet V, Valle M, Lobón JA, Maldonado A, Escobar F, Oliván J et al. Increased plasma pancreastatin-like immunoreactivity levels in non-obese patients with essential hypertension. J Hypertension 1995; 13: 251-258.
42. Sánchez-Margalet V, Valle M, Lobón JA, Escobar-Jiménez F, Pérez-Cano R, Goberna R. Plasma pancreastatin-like immunoreactivity correlates with plasma norepinephrine levels in essential hypertension. Neuropeptides 1995; 29: 97-101.
43. Sánchez-Margalet V, Lobón JA, González A, Escobar-Jiménez F, Goberna R. Increased basal and postglucose plasma pancreastatin levels in gestational diabetic subjects. Correlation with plasma norepinephrine levels. Diabetes Care 1998; 21: 1.951-1.954.
44. Sánchez-Margalet V, Ramos E, Mateo J, Oliván J, Pérez-Cano R, Goberna R. Normal pancreastatin-like levels in young offspring of non-obese essential hypertensive patients. J Endocrinology 1997; 153: 313-318.
45. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin action in the liver: dual coupling to different G proteins. Cell Signal 1996; 8: 9-12.
46. Sánchez-Margalet V, Valle M, Goberna R. Receptors for pancreastatin in rat liver membranes: molecular identification and characterization by covalent cross-linking. Mol Pharmacol 1994; 46: 24-29.
47. Bretherton-Watt D, Valentino KL, Tatemoto K, Roth K, Polak JM, Bloom SR. Pancreastatin distribution and plasma levels in the pig. Peptides 1988; 9: 1.005-1.014.
48. Sánchez-Margalet V, Santos-Álvarez J. Solubilization and molecular characterization of pancreastatin receptors from rat liver membranes. Endocrinology 1997; 138: 1.712-1.718.
49. Sánchez-Margalet V, Goberna R. Pancreastatin activates pertusis toxin-sensitive guanylate cyclase and pertusis toxin-insensitive phospholipase C in rat liver membranes. J Cell Biochem 1994; 55: 173-181.

50. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Goberna R. Pancreastatin activates protein kinase C by stimulating the formation of 1,2-diacylglycerol in rat hepatocytes. Biochem J 1994; 303: 51-54.
51. Santos-Álvarez J, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Pancreastatin receptor is coupled to a guanosine triphosphate-binding protein of the $G_{q/11}\alpha$ family in rat liver membranes. Hepatology 1998; 27: 608-614.
52. Santos-Álvarez J, Sánchez-Margalet V. Pancreastatin activates beta 3 isoform of phospholipase C via $G\alpha_{11}$ protein stimulation in rat liver membranes. Mol Cell Endocrinol 1998; 143: 101-106.
53. Sanchez-Margalet V. Modulation of insulin receptor signaling by pancreastatin. Diabetologia 1999. En prensa.
54. Sung CK, Sánchez-Margalet V, Goldfine ID. Role of p85 subunits of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor, p62 and GTPase-activating protein. J Biol Chem 1994; 269: 12.503-12.507.
55. Sánchez-Margalet V, Goldfine ID, Truitt K, Imboden J, Sung CK. Role of p85 subunit of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor to insulin receptor substrate 1. Mol Endocrinol 1995; 9: 435-442.
56. Sánchez-Margalet V, Zoratti R, Sung CK. Insulin-like growth factor-1 stimulation of cells induces formation of complexes containing phosphatidylinositol-3-kinase, guanosine triphosphatase-activating protein (GAP), and p62 GAP-associated protein. Endocrinology 1995; 136: 316-321.
57. Sung CK, Choi W, Sánchez-Margalet V. Guanosine triphosphate-activating protein-associated protein, but not src-associated protein p68 in mitosis, is a part of insulin signaling complexes. Endocrinology 1998; 139: 2.392-2.398.
58. Sánchez-Margalet V, Goldfine ID, Vlahos CJ, Sung CK. Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor LY294002. Biochem Biophys Res Commun 1994; 204: 446-452.

DISCUSIÓN

A. Zorzano: ¿Cómo se regulan las concentraciones circulantes de pancreastatina (PST), y se correlacionan con el estado de sensibilidad insulínica in vivo? En segundo lugar, los efectos de la insulina en las células adiposas no son muy evidentes, ¿depende tal vez de que habéis estado trabajando con animales de una determinada edad? Por último, la incubación en presencia de PST disminuye la captación basal de 2-deoxiglucosa; ¿habéis estudiado la abundancia de GLUT-1 en estas condiciones?

V. Sánchez Margalet: Empezando por el final, no lo hemos estudiado, aunque parece que efectivamente puede inhibir tanto el transporte de 2-desoxiglucosa como la presencia de GLUT-4 en la membrana. Por otro lado, y como tú comentas, la señal de insulina no es tan buena como sería deseable, puesto que las ratas en cuanto pesan más de 180 g no responden prácticamente a la insulina y las muy pequeñas no responden a PST. Nosotros trabajamos con animales entre 5 y 6 semanas de vida, que pesan unos 150-180 g. Respecto a las concentraciones circulantes de PST, normalmente se correlacionan muy bien con las concentraciones de catecolaminas. La misma célula β secreta PST, pero proporcionalmente es muy superior la secreción de insulina. Cuantitativamente, las concentraciones circulantes dependen mucho de la regulación por el sistema simpático, de modo que la cromogramina A que se secreta madura por el sistema nervioso simpático se puede degradar a PST, constituyendo la fuente fundamental de PST. Aunque no está demostrado, nuestra hipótesis es que las concentraciones de PST pueden aumentar en situaciones de estrés y cuando se incrementa la actividad simpática. Creemos que el papel fisiopatológico de este aumento podría estar de alguna manera relacionado con la resistencia a la insulina, puesto que hemos hallado aumentos del péptido en síndromes de resistencia a la insulina en pacientes hipertensos y en diabéticas gestacionales. Aunque postulamos una participación del péptido, está claro que el síndrome de resistencia a insulina es aparte del efecto que pueda tener este péptido sobre la resistencia a insulina. En este sentido, seleccionamos una serie de hipertensos resistentes a la insulina en quienes detectamos un aumento en las concentraciones de PST. Posteriormente observamos que la mayoría de los hijos (con una media de edad de 20 años) de estos individuos y que no presentaban hipertensión arterial, eran ya resistentes a la insulina, pero sin embargo tanto sus concentraciones de catecolaminas como de PST eran completamente normales. Por tanto, probablemente la PST tenga un papel potenciandor de la acción de las catecolaminas, y éstas tengan, a su vez, un efecto inhibidor sobre la acción de la insulina.

A. García de Herreros: El hecho de que el receptor de insulina se inactive es una evidencia

bastante circunstancial de que la PKC cinasa esté siendo activada, ya que otras cinasas también pueden hacerlo. ¿Disponéis de más evidencias sobre la activación de la PKC cinasa? En segundo lugar, observáis que la insulina potencia la síntesis de proteínas en lugar de bloquearla. Generalmente se considera que estos incrementos de síntesis son mediados por la vía de la activación de S6 cinasa. ¿No te resulta curioso que se observe inhibición o potenciación en función de la célula?

V. Sánchez Margalet: Por requerimiento de unos *referees,* en este momento estamos estudiando otras evidencias de activación de la PKC en esta línea, ya que únicamente disponíamos de datos en hepatocito aislado de rata. Por los trabajos publicados, suponemos que las subunidades específicas que median esta fosforilación de receptores de insulina probablemente serán α o β_2. Con referencia a tu pregunta del efecto sobre síntesis de proteínas, existen antecedentes de hormonas lipolíticas que aumentan la síntesis de proteínas posiblemente mediado por calcio. Es el caso de la angiotensina II y otras hormonas dependientes de calcio que son capaces de aumentar la síntesis de proteínas, aunque no puedo asegurarte si lo hacen sobre tejido adiposo blanco o marrón.

F. Mayor: Creo que has comentado que este acoplamiento era preferentemente por vía de $\alpha 11$, que también observasteis cierta capacidad de acoplamiento a proteínas tipo G_i o al menos sensible a toxina pertúsica y que estimulaba actividad guanilatociclasa. ¿Sabéis si se trata de una activación por vía NO? Y, por otra parte, este bloqueo por toxina pertúsica ¿es total o parcial?

V. Sánchez Margalet: Nosotros hemos observado un incremento de las concentraciones de GMPc, pero no sabemos si está o no mediado por NO, aunque es un tema que nos interesa y tenemos planificado estudiar. En cuanto al bloqueo por toxina pertúsica, se trata de un bloqueo total.

J.M. Baeyens: ¿Se han identificado receptores de PST en el sistema nervioso central, o se cree al menos que puedan existir?

V. Sánchez Margalet: No se han identificado receptores hasta el momento. Aunque iniciamos algunos estudios al respecto, los resultados fueron negativos. En la actualidad, sin embargo, no hemos podido seguir esta línea de investigación.

A. García Sánchez: A propósito de la formación de GMPc, ¿sabéis si el aumento de calcio intracelular es sensible a toxina pertúsica?

V. Sánchez Margalet: Fundamentalmente no lo eran, ya que la señal era más baja pero había un aumento del calcio.

A. García Sánchez: Un posible mecanismo podría explicarse por esta vía. La NO sintetasa dependiente del calcio se puede activar por entrada de calcio o por movilización, y pueden ser sensibles a toxina pertúsica si en la entrada de calcio o en la movilización está involucrada una proteína G sensible a la toxina pertúsica.

Antiinflamatorios no esteroides en la prevención del cáncer de colon

Ramon Bartrons

Unitat de Bioquímica. Departament de Ciències Fisiològiques. Campus de Bellvitge.
Universitat de Barcelona. L´Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

Introducción

La mayoría de cánceres son consecuencia de factores genéticos y ambientales. Los factores genéticos pueden explicar alrededor de un 5% de casos y el resto puede atribuirse a factores externos que actúan conjuntamente con factores genéticos. Entre los factores externos podemos encontrar diferentes sustancias que pueden actuar como carcinógenos: constituyentes de la dieta, contaminantes, tabaco, drogas, radiaciones y agentes infecciosos[1].

El cáncer de colon y recto tiene una incidencia de aproximadamente un 10% del total y se ha asociado al nivel de desarrollo económico y social de la población, con una distribución más elevada en los países occidentales. Diferentes observaciones epidemiológicas y experimentales han relacionado el riesgo de padecer cáncer de colon con la dieta, la ingestión calórica aumentada, la actividad sedentaria y el exceso de peso.

Los antiinflamatorios no esteroides (AINE) son uno de los grupos de fármacos más ampliamente utilizados. En la Grecia hipocrática, la escuela médica de Cos ya utilizaba infusiones de corteza de sauce (*Salix Alba*) para el tratamiento de la fiebre y el dolor. El aislamiento de la salicilina (Buchner, 1828), la síntesis del salicilato sódico (Kolbe, 1859) y del acetilsalicílico (Hoffmann, 1897) lograron avances significativos en el uso terapéutico de estos compuestos. La identificación de las prostaglandinas (Von Euler, 1934) y de la enzima ciclooxigenasa (Bergstrom, 1962) permitió el hallazgo del mecanismo de acción de la aspirina (Vane, 1971). Posteriormente, el descubrimiento de nuevos AINE, prostaglandinas sintetasas y las isoenzimas de la ciclooxigenasa han aumentado las aplicaciones terapéuticas de los AINE.

Evidencia de los AINE como agentes antineoplásicos

Durante los últimos años se han encontrado propiedades antineoplásicas de los AINE, particularmente en el tracto gastrointestinal[2,3]. Los datos actualmente disponibles se apoyan en tres líneas de investigación: estudios epidemiológicos, estudios en animales y observaciones clínicas.

El primer estudio epidemiológico que relacionaba el consumo de aspirina con la reducción de la incidencia de cáncer colorrectal se realizó en Australia (Melbourne Colorectal Cancer Study), y demostró que el uso regular de aspirina disminuía un 47% la incidencia en el cáncer colorrectal[2]. Posteriormente, otros estudios epidemiológicos obtuvieron resultados parecidos, refiriendo que el uso de aspirina tenía un efecto protector frente al cáncer colorrectal[4,5]. Otros trabajos han correlacionado el uso de aspirina y la prevención de diferentes tipos de cánceres como de mama, próstata, pulmón, vejiga o riñón, no encontrando resultados significativos[3,6]. El estudio más completo[4] analizó el consumo de aspirina y la incidencia de cáncer colorrectal en 600.000 personas. La dosis ingerida no era del todo precisa, pero se estimó que el riesgo relativo de cáncer de colon para los que ingerían aspirina, 16 o más veces al mes, era de 0,60 para los varones y de 0,58 para las mujeres. Por contra, el uso de paracetamol no variaba la incidencia. El seguimiento de esta población demostró también una disminución de los cánceres de esófago, estómago y recto, además del de colon. La reducción del riesgo de cáncer era dependiente de la dosis y aumentaba en aquellas personas con más años de tratamiento.

Diferentes AINE como aspirina, indometacina, sulindaco o piroxicam han demostrado ser

inhibidores del crecimiento de tumores de colon inducidos por carcinogénesis química[7-9], y se han utilizado también en el tratamiento de adenomas de colon y recto en humanos[10-12]. Aunque conocemos que estos fármacos inhiben la enzima ciclooxigenasa, se desconoce cuál es el mecanismo molecular de este efecto beneficioso sobre el cáncer colorrectal.

Mecanismos

El desarrollo de nuevas estrategias para prevenir y tratar el cáncer resulta muy importante. Los AINE aparecen como fármacos de posible utilidad terapéutica para la prevención y el tratamiento antineoplásico, aunque sus efectos adversos requieren el desarrollo de pautas farmacológicas seguras. Para ello es necesario conocer los mecanismos moleculares a través los cuales los AINE ejercen su acción. Los estudios realizados se han centrado en tres áreas distintas: *a)* activación de carcinógenos a través de la enzima ciclooxigenasa; *b)* inhibición de la proliferación celular, y *c)* inducción de apoptosis.

Activación de carcinógenos

Numerosos trabajos han relacionado la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) con la iniciación de la carcinogénesis a través de diferentes mecanismos. Uno de ellos es activar carcinógenos contaminantes, tóxicos o ingeridos con los alimentos.

Los productos que se obtienen del metabolismo del ácido araquidónico (20 carbonos) como las prostaglandinas, tromboxanos y ácidos 15-hidroxieicosatetranoicos (HETE), se denominan eicosanoides, derivado del griego εικοσι que significa 20. Estos productos participan en procesos como la inflamación, la ovulación, la modulación de la respuesta inmune o la mitogénesis. El control de la síntesis de estos metabolitos es muy importante

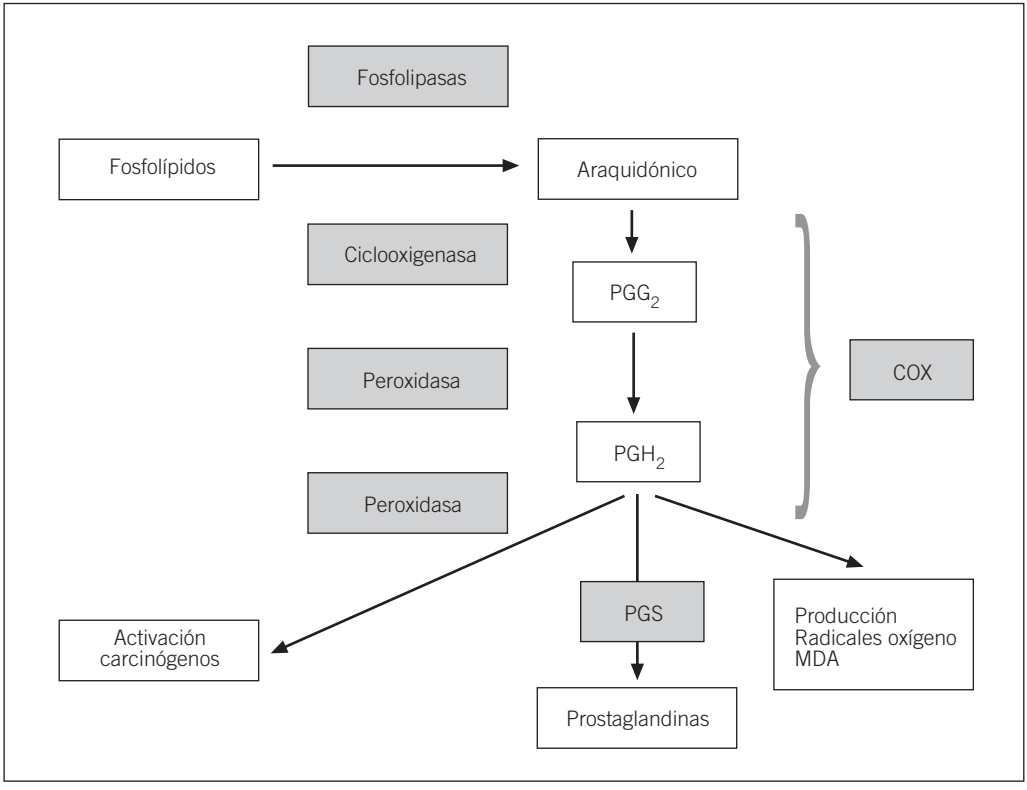


Fig. 1. Reacciones de la ciclooxigenasa.

en la regulación de todos estos procesos, y existen diferentes y posibles enzimas reguladoras. El primer punto de control se produce en la liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y es catalizado por la fosfolipasa A_2. Esta enzima puede inducirse por acción de diferentes estímulos (factores de crecimiento, citocinas, leucotrienos, histamina, trombina, etc.) y sintetizar señales que pueden modular diferentes procesos celulares.

Una vez el ácido araquidónico se libera de los fosfolípidos de las membranas, puede ser metabolizado: *a)* por la COX, dando prostaglandinas y tromboxanos[13]; *b)* por las lipooxigenasas que forman HETE, con la posterior síntesis de leucotrienos y lipoxinas[14], o *c)* por la citocromo P450 monooxigenasa, que genera ácidos epoxieicosatrienoicos[15]. Cada una de estas vías da lugar a diferentes productos. La ciclooxigenasa tiene dos actividades catalíticas diferentes. Una es la ciclooxigenasa, que cicla y oxigena el ácido araquidónico formando PGG_2, y otra la peroxidasa que reduce PGG_2 para formar PGH_2. La actividad peroxidasa posee una menor especificidad y puede también reducir otros sustratos, como fenoles, aminas aromáticas o pesticidas (fig. 1). Se han descrito numerosos ejemplos de carcinógenos activados por la enzima COX y que pueden unirse y modificar el ADN[16]. Además, esta actividad puede generar malondialdehido (mutágeno y carcinógeno) y radicales peróxido que pueden estar implicados en la iniciación de la carcinogénesis. Ambas actividades pueden estar implicadas independientemente en otras reacciones y ser inhibidas por diferentes sustancias. Finalmente, a partir de PGH_2, diferentes sintetasas catalizan la formación de prostaglandinas.

La enzima COX existe en dos formas isoenzimáticas: COX-1 y COX-2, que difieren entre sí en la regulación de su expresión, su distribución tisular y su localización celular[17,18]. La isoenzima COX-1 se expresa constitutivamente y algunos estudios indican que puede ser responsable de la producción de prostaglandinas en el retículo endoplasmático, que posteriormente saldrán de la célula para actuar sobre receptores de la membrana celular. En cambio, la expresión de COX-2, caracterizada el año 1989 por Simmons et al[19], es inducible y regulada por estímulos específicos[17,18,20,21]. Los factores de crecimiento y promotores tumorales inducen la expresión de COX-2 en fibroblastos, lo que apoya la hipótesis de que la isoenzima COX-2 está implicada en la mitogénesis[22]. COX-2 sería responsable de la síntesis aumentada de prostaglandinas en respuesta a diferentes citocinas, factores de crecimiento y mitógenos, teniendo un papel clave en los procesos inflamatorios (fig. 2).

Las citocinas IL-4 y IL-10, y los glucocorticoides bloquean su expresión, acción que permite explicar explicar parte de los efectos antiinflamatorios de estas sustancias. Su localización en la membrana nuclear ha sugerido un papel importante en la proliferación inducida por diferentes factores de crecimiento a través de la síntesis de prostaglandinas dirigidas al núcleo de la célula con funciones moduladoras de la diferenciación, replicación o muerte celular[18,21]. Se han sugerido posibles efectos de los productos de COX-2 nucleares puesto que diferentes prostaglandinas pueden funcionar como ligandos para los receptores activados del proliferador peroxisomal nuclear (PPAR)[23,24].

Inhibición de la proliferación celular

Otro mecanismo a través del cual los AINE pueden afectar a la génesis de tumores puede ser a través del metabolismo del ácido araquidónico, los productos del cual se encuentran implicados en la carcinogénesis[25]. Los tumores de colon humanos[26], así como los obtenidos en modelos animales[27], producen cantidades aumentadas de prostaglandina E_2 (PGE_2). Este aumento de PGE_2 en las células intestinales estimula su proliferación y sería consecuencia de un incremento de la actividad ciclooxigenasa. Esto plantea la cuestión de cuál de las isoenzimas de la COX (COX-1, isoenzima constitutiva o COX-2, isoenzima inducible) es responsable de este aumento. Resultados de estos últimos años nos indican que la expresión de COX-2 está aumentada en los cánceres colorrectales, sin que se encuentren variaciones significativas de COX-1[28]. La concentración de PGE_2 está aumentada en los adenomas de colon humanos[28], en el colon de ratas expuestas a carcinógenos[8,27] y en los ratones Min que poseen una mutación dominante en el gen supresor tumoral APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), que también está mutado en la poliposis adenomatosa familiar humana (FAP), que produce adenomas gastrointestinales a los 3 meses de edad[29,30]. Este aumento de PGE_2 en las células intestinales sería consecuencia de un incremento en la actividad ciclooxigenasa. También en las células epiteliales neoplásicas

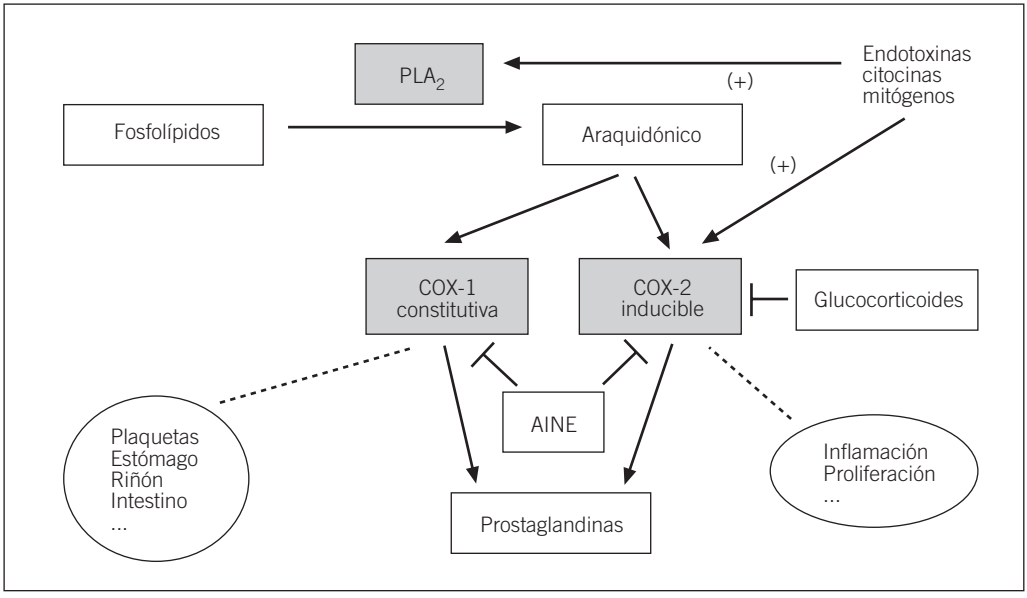


Fig. 2. Isoenzimas de la ciclooxigenasa.

del intestino de los ratones Min se han detectado concentraciones aumentadas de proteína y ARNm de COX-2. En cambio, no se encuentran variaciones significativas de COX-1 en todos estos modelos. Además, se han publicado resultados en los que se refiere que la incubación de células derivadas de cáncer de colon con inhibidores selectivos de COX-2 inhibe su crecimiento[27,31]. Estos resultados sugieren que algún factor favorece la sobreexpresión de COX-2 en estas células, siendo su papel esencial en la producción aumentada de PGE_2.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar el efecto antitumoral de aspirina y otros AINE es la modulación de la proliferación celular. Para estudiar este efecto hemos utilizado el cultivo de fibroblastos Swiss 3T3 de ratón, ya que es un modelo muy útil para identificar los factores extracelulares que regulan el crecimiento y conocer las señales y fenómenos moleculares que conducen a la mitogénesis. Estas células pueden mantenerse quiescentes en la fase G_0-G_1 del ciclo celular en un medio libre de factores de crecimiento exógenos. La adición de suero fresco o de determinados factores mitogénicos induce la síntesis de ADN y su división. Éste es uno de los sistemas celulares en que mejor se han estudiado los mecanismos a través de los cuales los factores de crecimiento, generando señales intracelulares, inducen la división celular.

La adición de aspirina o indometacina a los cultivos de fibroblastos Swiss 3T3 inhibe significativamente la síntesis de ADN inducida por los factores de crecimiento bombesina y PDGF (*platelet-derived growth factor*)[32]. La aspirina, a dosis inferiores a 1 mM, sólo inhibe la acción mitogénica de factores de crecimiento que liberan ácido araquidónico, el sustrato de COX, y el efecto antiproliferativo de aspirina se puede revertir con PGE_2 exógena, el derivado mayoritario de la vía de COX en estas células. Estos resultados indican que la acción antiproliferativa de la aspirina, a dosis bajas, es a través la inhibición de COX. La explicación más simple para comprender estos resultados es que PGE_2 y/o otros eicosanoides derivados de la PGH_2 participan en las vías de transducción de señales estimuladas por PDGF y bombesina, potenciando alguna de las vías conocidas o bien activando nuevas vías no identificadas implicadas en la síntesis del ADN. También es posible que las señales inducidas por PGE_2 actúen manteniendo más tiempo las señales inducidas por PDGF y bombesina (fig. 3).

Concentraciones de aspirina más altas (5 mM) inhiben totalmente la acción mitogénica de concentraciones de PDGF saturantes.

Existen tres argumentos que indican que este efecto a dosis altas de aspirina no es mediado por inhibición de COX: *a)* 5 mM de aspirina inhiben también el efecto mitogénico de EGF y insulina, los cuales no inducen liberación de ácido araquidónico; *b)* el efecto inhibidor de aspirina (5 mM) en la mitogénesis estimulada por PDGF no es contrarrestado por PGE_2 exógena, y *c)* la curva dosis-respuesta de aspirina para inhibir la síntesis de ADN es bifásica, lo que sugiere dos mecanismos diferentes. El mecanismo de inhibición de la proliferación celular independiente de COX, a concentraciones de aspirina superiores a 2 mM, se desconoce.

Apoptosis

Las células epiteliales intestinales están programadas para dividirse y diferenciarse en el proceso que las conduce desde las criptas a la superficie del intestino. El número de células depende de la capacidad de proliferación, diferenciación y de la velocidad de muerte inducida por la apoptosis. Cualquier alteración en este proceso puede dar lugar a su acumulación y a la formación de pólipos y tumores. El mecanismo de muerte celular programada es el característico de las células epiteliales intestinales y es progresivamente inhibido durante el desarrollo del cáncer colorrectal. La inducción de apoptosis podría ser uno de los mecanismos de acción de los AINE. Se ha demostrado que sulindaco, sulindaco sulfuro, aspirina, indometacina, naproxeno, piroxicam y salicilatos inducen apoptosis en células derivadas de cáncer de colon.

Elder et al[33] demostraron que los salicilatos producían una parada del ciclo celular en la fase G_0-G_1 y también inducían apoptosis en diferentes líneas celulares. En los ultimos años se ha comprobado que la sobreexpresión de COX-2 en las células intestinales puede inducir características que aumenten el potencial tumorigénico[34,35], incluyendo disminución del proceso de apoptosis y de expresión de ciertos receptores de factores de crecimiento y moléculas de adhesión. La apoptosis es un mecanismo básico para mantener un rápido recambio del epitelio intestinal y una disminución de la actividad apoptótica puede resultar en una supervivencia aumentada de las células anormales. Éste es uno de los mecanismos que explicarían

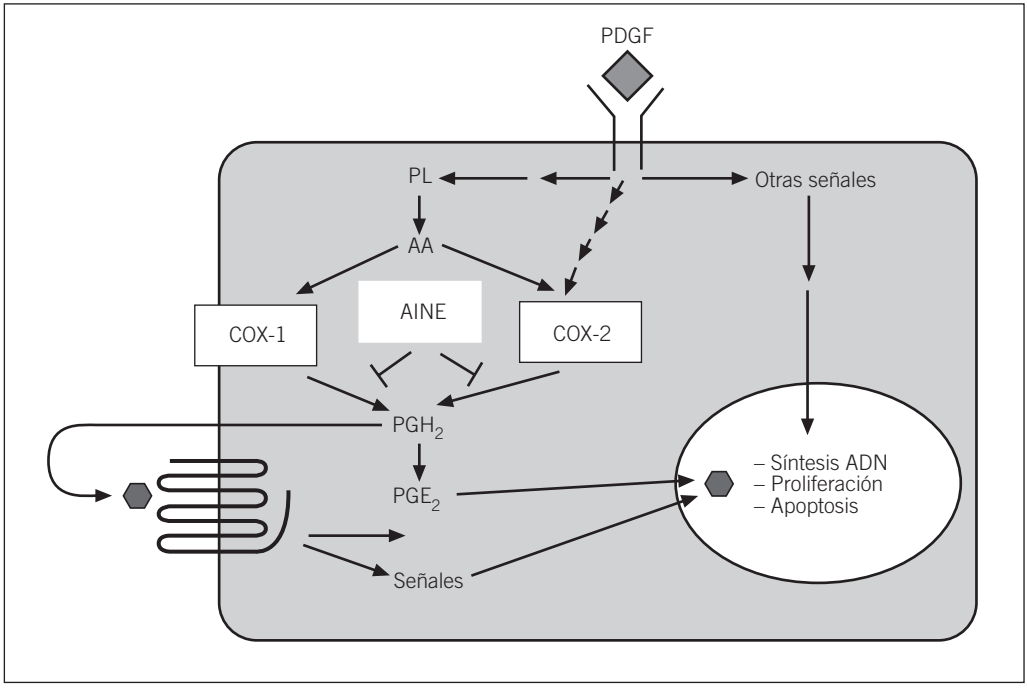


Fig. 3. Mecanismo de inhibición de la proliferación celular.

la acumulación de células del epitelio y la formación de pólipos y tumores. Shiff et al[36] han demostrado que diferentes AINE reducen la proliferación, aumentan el número de células en fase G_0-G_1 e incrementan también el proceso de apoptosis. En este sentido, se han publicado resultados en los que se ha comunicado que sulindaco sulfuro, sulindaco sulfona y aspirina inducen apoptosis en células de carcinoma de colon humano HT-29[36,37]. El mecanismo responsable de este efecto apoptósico de los AINE no está claro, aunque se ha descrito que la sobreexpresión de COX-2 en células epiteliales intestinales de rata inhibe la apoptosis y que ésta se puede restablecer administrando inhibidores de COX-2[34].

El ratón Min es un modelo animal de tumorogénesis intestinal que se parece a la forma de FAP. Los individuos con FAP tienen una mutación en un alelo del gen APC que les produce adenomas intestinales múltiples después de una mutación somática o de la pérdida del segundo alelo. Se ha observado que las células intestinales alteradas de los ratones Min, con el gen APC mutado, tienen una apoptosis disminuida, pero si se les administran AINE (sulindaco) recuperan la capacidad de inducir muerte celular programada, al mismo tiempo que disminuye el contenido de COX-2 y PGE_2 de estas células, lo que sugiere que el efecto sobre la apoptosis podría deberse a la inhibición de COX-2 y a la disminución de la formación de PGE_2[30]. Por otro lado, Reddy et al[27] han demostrado que los inhibidores específicos de COX-2 inhiben la formación de pólipos en modelos animales de carcinogénesis, sugiriendo que el isoenzima COX-2 desempeña un papel importante en este proceso. Además, se ha demostrado también que la anulación del gen de COX-2 o bien el tratamiento con inhibidores selectivos de COX-2 suprimen la formación de tumores en otro modelo de poliposis inducida por la supresión del gen APC, lo que pone en evidencia la relación entre expresión de COX-2 y la formación de pólipos[38]. En este modelo, los adenomas han perdido ambas copias del gen APC y sobreexpresan COX-2. La cuestión básica es si estos dos procesos están relacionados. Se ha comprobado que en el tejido normal, próximo al adenoma, no se produce un aumento de COX-2, lo que sugiere que la inducción de esta isoenzima se produce después de la pérdida del segundo alelo del gen APC. A favor de esta hipótesis tenemos que la proteína COX-2 no se detecta en pólipos más pequeños de 2 mm, lo que indicaría que el tumor se ha iniciado antes de expresarse COX-2[38]. No obstante, otros investigadores han demostrado en ratones Min que el epitelio próximo al tumor tiene la isoenzima COX-2 aumentado. El mecanismo a través del cual COX-2 facilitaría el crecimiento se desconoce, aunque se ha visto que disminuye la respuesta apoptósica. Los datos obtenidos de COX-2 en el cáncer de colon plantean la cuestión de si la presencia de esta isoenzima es indispensable. La respuesta parece ser negativa. En el trabajo de Oshima et al[38] se demuestra que en los ratones deficientes en COX-2 el número de pólipos se reduce el 86%, pero no llega al 100%. Esto significa que hay otras vías que favorecen la formación de tumores, independientemente de COX-2. En este sentido, se ha descrito que la anulación del gen COX-1 en ratones Min también disminuye el número de adenomas espontáneos.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado que concentraciones de aspirina superiores a 1,5 mM inducen apoptosis en células de leucemia linfática crónica humana a través de un mecanismo independiente de COX y que conlleva la activación de caspasas[39].

Conclusiones

Quedan aún muchas preguntas por resolver sobre los posibles mecanismos de los AINE en el control de la proliferación celular y apoptosis, y también en la iniciación, promoción y progresión de la transformación neoplásica. En los próximos años habrá que clarificar el papel de los AINE en la inhibición de las isoenzimas de la COX y las moléculas relacionadas con sus efectos, estudiando si el efecto se produce por disminución de los productos de las reacciones catalizadas por estas isoenzimas (prostaglandinas PGE_2 o PGJ_2, entre otras), por el aumento de la concentración de sustrato (araquidónico y ceramida) o bien por la disminución de la activación de carcinógenos y producción de radicales.

Un gran número de trabajos apoyan la hipótesis que la modulación de la isoenzima COX-1 puede tener una gran importancia en la prevención del cáncer colorrectal. Desconocemos a través de qué mecanismos se produce este efecto, aunque sabemos que facilita la proliferación e inhibe la apoptosis en diferentes tipos celulares (fig. 4). En relación a la isoenzima COX-2, los datos más recientes refieren que su expresión es un hecho temprano e importante en el cáncer de colon, lo que sugiere que los fármacos que inhiben COX-2 deberían ser efec-

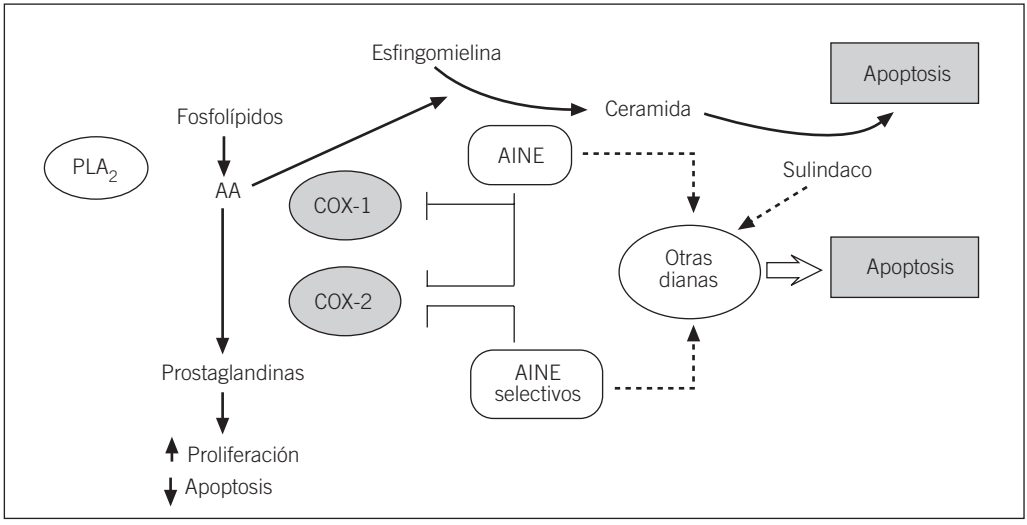


Fig. 4. Mecanismos moleculares de acción de los AINE.

tivos en la quimioprevención de este tipo de cáncer. En el futuro deberemos poder explicar cómo se regula la expresión de COX-2, qué mecanismos la activan en el proceso de carcinogénesis, cuáles son los productos relacionados con sus efectos y a través de qué mecanismos y, sin duda, conocer la eficacia de inhibidores selectivos y las dosis necesarias para obtener efectos benéficos. También debe destacarse la posible utilización terapéutica de algunos AINE en el tratamiento de diferentes enfermedades relacionadas con la inhibición de la apoptosis.

De acuerdo con la bibliografía actual, algunas acciones de los AINE son independientes de la vía COX y el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales actúan deberá favorecer el diseño de nuevas dianas farmacológicas y nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? Science 1997; 278: 1.068-1.073.
2. Kune G, Kune S, Watson L. Colorectal cancer risk, chronic illness, operations, and medications: case control results from the Melbourne colorectal cancer study. Cancer Res 1988; 48: 4.399-4.404.
3. Rosenberg L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer. Prev Med 1995; 24: 107-109.
4. Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro SA. A hipothesis: nonsteriodal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. J Natl Cancer Inst 1991; 83: 355-358.
5. Giovanucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. Ann Intern Med 1994; 121: 241-246.
6. Egan KM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Rosner BA, Colditz GA. Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 988-993.
7. Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, Kelloff G. Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Carcinogenesis 1993; 14: 1.493-1.497.
8. Rao CV, Simi B, Wynn TT, Garr K, Reddy BS. Modulating effect of amount and types of dietary fat on colonic mucosal phospholipase A2, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities, and cyclooxygenase metabolite formation during different stages of colon tumor promotion in male F344 rats. Cancer Res 1996; 56: 532-537.
9. Levy GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal antiinflammatory drugs, and colon cancer. FASEB J 1997; 11: 234-247.
10. Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. J Surg Oncol 1983; 24: 83-87.
11. Rigau J, Piqué J, Rubio E, Planas R, Tarrech J, Bordas J. Effects of long-term sulindac therapy on colonic polyposis. Ann Intern Med 1991; 115: 952-954.
12. Giardello F, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi S, Hylind LM, Celano P et al. Treatment of colonic and rectal ademomas with sulindac in familiar adenomatous polyposis. N Engl J Med 1993; 328: 1.313-1.316.

13. Vane JR, Botting R. A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cycloxygenase (COX-1 and COX-2). Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res 1995; 23: 41-48.
14. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. Science 1987; 237: 1.171-1.176.
15. Capdevila JH, Falck JR, Estabrook RW. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade FASEB J 1992; 6: 731-736.
16. Eling TE, Thompson DC, Foureman GL, Curtis JF, Hughes MF. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1990; 30: 1-45.
17. Herschman HR. Regulation of prostaglandin sinthase-1 and prostaglandin synthase-2. Cancer Metastasis Rev 1994; 13: 241-256.
18. Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? Am J Physiol 1996; 270: G393-G400.
19. Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 841-848.
20. Vane JR. Towards a better aspirin. Nature 1994; 367: 315-316.
21. Smith WL, Garavito RM, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and 2. J Biol Chem 1996; 271: 33.157-33.160.
22. Kujubu DA, Reddy ST, Fletcher BS, Heschman HR. Expression of the protein product of the prostaglandin synthase-2/TIS10 gene in mitogen-stimulated Swiss 3T3 cells. J Biol Chem 1993; 268: 5.425-5.430.
23. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature 1998; 391: 82-86.
24. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-γ is a negative regulator of macrophage activation. Nature 1998; 391: 79-82.
25. Lupulescu A. Enhancement of carcinogenesis by prostaglandins. Nature 1978; 272: 634-636.
26. Rigas B, Goldman IS, Levine L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. J Lab Clin Med 1993; 122: 518-523.
27. Reddy BS, Rao CV, Seibert K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. Cancer Res 1996; 56: 4.566-4.569.
28. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclo-oxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology 1994; 107: 1.183-1.188.
29. Jacoby RF, Marshall DJ, Newton MA, Novakovic K, Tutsch K, Cole CE et al. Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the APC Min mouse model by the nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam. Cancer Res 1996; 56: 710-714.
30. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburg A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT et al. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. Cancer Res 1996; 56: 2.556-2.560.
31. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RC, Morrow J et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. Cancer Res 1997; 99: 2.254-2.259.
32. Castaño E, Dalmau M, Marti M, Berrocal F, Bartrons R, Gil J. Inhibition of DNA synthesis by aspirin in swiss 3T3 fibroblasts. J Pharmacol Exp Ther 1997; 280: 366-372.
33. Elder DJE, Hague A, Hicks DJ, Paraskeva C. Differential growth inhibition by the aspirin metabolite salicylate in human colorectal tumor cell lines. Cancer Res 1996; 56: 2.273-2.276.
34. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. Cell 1995; 83: 493-501.
35. DuBois RN, Shao J, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD. G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. Cancer Res 1996; 56: 733-737.
36. Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. J Clin Invest 1995; 96: 491-503.
37. Piazza GA, Klulchak AL, Krutzsch M, Sperl G, Paranka NS, Gross PH et al. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. Cancer Res 1995; 55: 3.110-3.116.
38. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E et al. Suppression of intestinal polyposis in APC knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2. Cell 1996; 87: 803-809.
39. Bellosillo B, Piqué M, Barragán M, Castaño E, Villamor N, Colomer D et al. Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood 1998; 92: 1.406-1.414.

DISCUSIÓN

M. Palacín: ¿Es posible alcanzar concentraciones de 5 mM de ácido acetilsalicílico en tratamiento crónico con este fármaco?

R. Bartrons: Nosotros calculamos que las concentraciones máximas alcanzadas son de 1,5-2 mM, tras el empleo en tratamiento del

ácido acetilsalicílico. Se ha observado que células leucémicas humanas entran en apoptosis con concentraciones de 2,5 mM de ácido acetilsalicílico. Es principalmente relevante haber podido demostrar en células humanas, en este caso por primera vez, que los AINE puedan ser, si no directamente, al menos utilizados como coadyuvantes en el tratamiento de la leucemia linfática.

A. García de Herreros: Con relación a estos datos de muerte celular inducida por inhibidores en células HT-29, ¿habéis estudiado la causa de las muertes, por ejemplo, bloqueando la apoptosis? ¿Observáis inhibición de crecimiento a dosis bajas?

R. Bartrons: Actualmente estamos trabajando en este tema. Puede inducirse apoptosis, demostrada por fragmentación de ADN y aparición de un pico diploide en citometría, incubando las células con concentraciones de ácido acetilsalicílico superiores a 2,5 mM. Otros autores han demostrado que a concentraciones bajas no se observa inducción de apoptosis. La respuesta a la segunda pregunta es que puede observarse inhibición de crecimiento de las células incubadas en presencia de concentraciones bajas de AINE.

S. Erill: Este efecto de la aspirina que no se observa con otros AINE, ¿se produce también con salicilato sódico añadido directamente?

R. Bartrons: Sí que se produce. En una de las gráficas que he presentado se incluían los resultados con salicilato sódico.

A. Celada: ¿La apoptosis se produce también en células normales? Y, ¿a través de qué vía ocurre?

R. Bartrons: No he presentado los datos de estudios realizados con monocitos, en los que observamos que se produce apoptosis y por un mecanismo, por ahora desconocido, mucho menos sensible tanto a salicilato como a aspirina.

J.M. Baeyens: Aunque ya ha sido previamente comentado, me preguntaba si podían existir diferencias entre aspirina y otros AINE que pudieran ser consecuencia de la capacidad acetiladora de COX-2 y, por tanto, de la inhibición irreversible.

R. Bartrons: En mi opinión deben coexistir mecanismos de acción muy distintos. En los estudios epidemiológicos de prevención cardiovascular con el empleo de bajas dosis de aspirina, la concentración de fármaco que llega al intestino es mínima y no puede, por tanto, explicar los efectos que se observan mediante estudios in vitro. En este caso, a bajas concentraciones, sugerimos que se produce inhibición de COX (1 o 2), mientras que en otras situaciones, a concentraciones superiores a 2 mM, se verían afectadas otras vías de señalización que conducirían a la apoptosis.

O. Bulbena: El intestino es de los pocos órganos en donde se ha descrito que el NFκ-B está incluso expresado en condiciones basales y que existe iNOS constitutiva. Tal vez un posible mecanismo de acción de la aspirina pudiera estar relacionado con su efecto inhibitorio sobre el NFκ-B.

R. Bartrons: Desconocemos si 80-125 mg de aspirina pueden modificar el NFκ-B intestinal. En los trabajos que se han publicado sobre el efecto de los salicilatos sobre NFκ-B se empleaban concentraciones muy altas, del orden de 10-20 mM. Para alcanzar estas concentraciones en el intestino, deberían administrarse más de 12 g de aspirina, lo que ningún farmacólogo se atrevería a probar.

P. Kaliman: Recientemente se ha publicado un trabajo que relaciona p38 MAP-cinasa con al apoptosis inducida por salicilatos. ¿Han estudiado si con el inhibidor se modifica la apoptosis?

R. Bartrons: Nuestro grupo ha estudiado p38 en dos modelos distintos y no se modifica la apoptosis, ni la MAP-cinasa tampoco. Es probable que Iκ-B esté modificada, aunque es difícil de estudiar a través de nuestros modelos experimentales.

Potencial farmacológico de inhibidores de la *Jun N-Terminal Kinase* (JNK)

Alberto Muñoz[a] y Carme Caelles[a,b]

[a]Instituto de Investigaciones Biomédicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.
[b]Unitat de Bioquímica. Facultat de Farmacia. Universidad de Barcelona.

Introducción

Las células están constantemente adaptándose y respondiendo a los cambios que sufre su entorno, así como, en organismos pluricelulares, a mensajes procedentes de otras células. La transducción de señales es el proceso por el cual el estímulo, una vez ha sido percibido por la célula, es convertido en una señal intracelular y enviada a todos aquellos efectores cuya actividad es necesaria para que se produzca la respuesta celular apropiada. El avance en el conocimiento de las rutas de transducción de señales implicadas en procesos de proliferación y/o activación celular en los últimos años hace prever un aumento en el número de frentes sobre los cuales se puedan ejercer acciones dirigidas a controlar en este tipo de procesos. Fenómenos de proliferación celular anómala e inflamación acompañan, en ocasiones simultáneamente, a enfermedades muy diversas, algunas de ellas con una alta repercusión social como neoplasias, artritis reumatoide y diversas enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, etc. Por esta razón, establecer estos potenciales frentes de acción, así como disponer de moléculas capaces de interferirlos específica y controladamente, tiene un claro interés farmacológico.

La *Jun N-Terminal Kinase* (JNK), también conocida como *Stress-Activated Protein Kinase* (SAPK), pertenece a la familia de *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) y constituye el eslabón final de una ruta de transducción de señales inicialmente implicada en la respuesta a citocinas y condiciones de estrés celular y, en consecuencia, potencial candidata a participar en la respuesta inflamatoria. La vía de la JNK también ha sido involucrada en la regulación de otros procesos como la proliferación, la muerte celular programada (apoptosis) y la morfogénesis. Este repertorio funcional de la vía de transducción de señales de la JNK, conjuntamente con otros datos que se van a discutir en este artículo, la hacen especialmente indicada para la búsqueda de agentes de potencial interés terapéutico.

Investigación financiada por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Plan Nacional de Salud (SAF95-0738 y SAF98-0060). Los resultados que aparecen en este artículo han sido en parte publicados en la revista *Genes & Development* 1997; 11: 3.351-3.364.

La vía de transducción de señales de la JNK

Bajo la denominación de JNK se engloba un grupo de proteínas quinasas codificadas por tres genes: *jnk1*, *jnk2* y *jnk3*, a partir de los cuales, mediante procesamiento alternativo de los correspondientes transcritos, se generan un total de 10 isoformas, 4 de JNK1, 4 de JNK2 y 2 de JNK3, respectivamente[1,2]. Por una parte, este procesamiento alternativo produce las isoformas correspondientes a Mr 46.000 y 55.000, que hasta el momento no han presentado diferencias funcionales entre sí. Por otra parte, un segundo procesamiento alternativo produce dos tipos de isoformas, denominadas α y β, de los transcritos de los genes *jnk1* y *jnk2*, las cuales in vitro difieren en la especificidad de sustrato[2].

Como rasgos comunes con el resto de MAPK, la JNK se activa por fosforilación dual en los residuos de tirosina y treonina de la secuencia Thr-Pro-Tyr localizada en el subdominio VIII, y constituye el último paso de una cascada de transducción de señales en la que los eslabones inmediatamente anteriores están constituidos por otras proteincinasas denominadas, de forma genérica, cinasa de la MAPK (MAPKK) y cinasa de la MAPKK (MAPKKK), respectivamente[1,3]. Una vez activada, la JNK se transloca al núcleo, donde se hallan algunos de sus sustratos (como se verá posteriormente).

Hasta el momento, se han caracterizado dos MAPKK responsables de la activación de la JNK por fosforilación dual, la SEK1/MKK4/JNKK1 y

la MKK7/JNKK2[3,4]. De ellas cabe resaltar que, mientras MKK7 es específica de JNK, MKK4 también puede activar a otro miembro de la familia de MAPK, la proteincinasa p38[4]. Además, en células deficientes en MKK4, la activación de JNK permanece refractaria únicamente frente a determinados estímulos, lo que indica que existe una especificidad de respuesta entre MKK4 y MKK7, y corrobora que JNK puede ser activada por ambas enzimas[4,5]. Se han descrito varias MAPKKK responsables de la activación de MKK4 y MKK7 o, incluso, capaces de activar la ruta de JNK de forma independiente a éstas[6]. Finalmente, el repertorio de moléculas implicadas en transducir la señal desde el estímulo extracelular a la cascada de fosforilación de la JNK es realmente amplio. En la actualidad se está dedicando un considerable esfuerzo a definir las moléculas que intervienen en la ruta de la JNK en condiciones fisiológicas[4].

Se han descrito distintos mecanismos de inhibición de la actividad JNK. En primer lugar, y al igual que sucede con las otras MAPK, la JNK activada por fosforilación dual en Tyr y Thr puede inactivarse por acción de fosfatasas de especificidad dual, recogidas bajo la denominación de Ser/Thr/Tyr *MAP Kinase Phosphatases* (MKP), cuya preferencia hacia las distintas MAPK depende de cada isoforma en particular[7]. La actividad JNK puede inhibirse, a diferencia de otras MAPK, por su interacción directa con otras proteínas como la *JNK Interacting Protein* (JIP)-1, que evita su translocación nuclear[8], o el producto del gen *waf1/cip1*, la proteína p21, más conocida por su acción inhibidora de los complejos ciclina/*cyclin-dependent kinase* (CDK) del ciclo celular[9].

Regulación de la transcripción por la vía de la JNK

Está ampliamente aceptado que la vía de la JNK regula la expresión génica mediante la modulación de la actividad de distintos factores de transcripción que figuran entre los sustratos de la JNK[10]. Así, la JNK es capaz de regular la actividad de algunos miembros de las familias de activadores transcripcionales Jun, ATF y Ets (c-Jun, ATF2 y Elk-1, respectivamente) mediante la fosforilación de sus respectivos dominios de transactivación[10]. Esta fosforilación es un requisito para la interacción de estos activadores transcripcionales con otras moléculas coactivadoras, como la *CREB-binding protein* (CBP) o la p300, necesarias para activar la transcripción génica[11]. Estos coactivadores son capaces de modificar la estructura de la cromatina in situ mediante la acetilación de las histonas, y/o de reclutar moléculas con dicha actividad histona-acetil-transferasa como P/CAF[12]. Alternativamente, la fosforilación por JNK puede modular la actividad de los factores de transcripción a través de otros mecanismos como la regulación de la estabilidad de la proteína[13] o del transporte al núcleo[14]. Finalmente, la ruta de la JNK puede regular la expresión génica también postranscripcionalmente, como es el el caso de la traducción del ARN del factor necrosante de tumores de tipo alfa o *Tumor-Necrosis Factor* (TNF)-α[15].

Regulación de la actividad del complejo AP-1 por la ruta de la JNK

Sin duda, c-Jun es el activador transcripcional cuya regulación mediante fosforilación por JNK ha sido mejor estudiada. c-Jun es el principal componente del factor de transcripción AP-1, un complejo dimérico formado por homo o heterodímeros entre las proteínas codificadas por los distintos miembros del la familia del protooncogén c-*jun* (c-Jun, JunB y JunD) o por heterodímeros entre éstas y los productos de los miembros de la familia del protooncogén c-*fos* (c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2)[16]. AP-1 es frecuentemente activado por estímulos que inducen la proliferación y/o activación celular como mitógenos, oncoproteínas, citocinas y condiciones de estrés[16].

La actividad del complejo AP-1 puede inducirse mediante mecanismos tanto independientes como dependientes de la expresión génica. En ambos casos la actividad JNK desempeña un papel clave[17]. La inducción de la actividad AP-1 de manera independiente de transcripción transcurre a través de la modificación postransduccional de los componentes del complejo. En este sentido, uno de los mecanismos más relevantes es la fosforilación del dominio aminoterminal (N-terminal) de c-Jun, concretamente en los residuos de serina 63 y 73[17,18]. La proteincinasa responsable de esta fosforilación es la JNK. De hecho, esta fosforilación se produce en respuesta a algunos de los estímulos que inducen AP-1, como la irradiación con luz ultravioleta (UV) o TNF-α, los cuales, a su vez, son inductores de la ruta de JNK[17,18].

El mecanismo de activación de AP-1 dependiente de transcripción generalmente implica un incremento neto de los componentes del complejo[17]. La participación de la ruta de JNK también en este mecanismo queda patente por

el hecho de que la activación transcripcional de los genes c-*jun* y c-*fos* depende, en gran medida, de la actividad de los factores de transcripción ATF2 y Elk-1, respectivamente[17]. Como ya se ha comentado en anteriormente, tanto ATF2 como Elk-1 son sustratos de la JNK[10].

Actualmente existen evidencias directas de que la ruta de la JNK regula in vivo la actividad transcripcional del complejo AP-1. En células deficientes en MKK4, tanto JNK como AP-1 permanecen refractarios a la estimulación por agentes de estrés celular[19]. Por otra parte, ratones en los que se ha inactivado el gen *jnk3* carecen de actividad JNK en las neuronas del hipocampo y, a su vez, en estas células no se produce el incremento en la actividad AP-1 que sigue a su estimulación con agentes excitotóxicos[20].

La vía de JNK en procesos fisiológicos y patológicos

En la medida en que la vía de la JNK va siendo caracterizada y estudiada se amplía el abanico de procesos, tanto fisiológicos como patológicos, en los que es implicada. Por razones de espacio, comentaremos a continuación sólo algunos de ellos[4].

La activación del complejo AP-1 es un acontecimiento que frecuentemente se ha vinculado a la transformación oncogénica[16]. En este contexto, la implicación de la JNK en dicha activación sugirió, desde un principio, que esta ruta podría estar asociada a transformación celular[21]. Aunque la actividad JNK es inducida por algunos oncogenes, actualmente este aspecto es tema de debate, en parte debido a su reciente implicación también en la inducción de apoptosis en determinados modelos celulares[4,20].

Desde un principio, la activación de la ruta de la JNK por citocinas proinflamatorias como TNF-α y condiciones de estrés celular sugirió su participación durante la respuesta inflamatoria[22]. De hecho, la actividad JNK se induce en la activación por coestimulación de células T[23] y contribuye a la producción y secreción de IL-2[23,24] y a la proliferación de timocitos[24]. Por otra parte, también participa en la secreción de la citocina proinflamatoria TNF-α, como ya se ha comentado[15], y en la activación del gen de la E-selectina en respuesta a TNF-α en células endoteliales[25].

La ruta de la JNK ha sido, así mismo, implicada en la regulación de procesos de supervivencia y muerte celular. La supervivencia durante el desarrollo y la activación de células T necesita de la transducción de señales a través de MKK4[5]. En contraposición, tanto la actividad JNK como la de AP-1 participan en la apoptosis de la neuronas del hipocampo en respuesta a agentes que causan excitotoxicidad[20].

Antagonismo entre los receptores hormonales nucleares y el factor transcripcional AP-1

Los esteroides, retinoides y otras hormonas de naturaleza lipofílica ejercen la mayoría, si no todas, sus acciones a través de su interacción con sus receptores celulares, que constituyen la denominada superfamilia de los receptores hormonales nucleares (HR). Los HR actúan como factores de transcripción cuya actividad está modulada por la interacción con su ligando, y pueden regular la transcripción de forma positiva o negativa[26]. La activación de la expresión génica implica la unión de los receptores a secuencias específicas de nucleótidos, denominados elementos de respuesta hormonal, presentes en las regiones reguladoras (promotores) o en el interior (intrones o exones) de los genes diana. Curiosamente, el mecanismo de represión transcripcional en general no requiere la interacción del HR con secuencias de ADN específicas, sino que parece tener lugar a través de la interferencia con la actividad de otros factores de transcripción, por lo que recibe el nombre de transrepresión. Entre estos factores antagonizados por los HR se encuentra AP-1[27].

El estudio del mecanismo por el que tiene lugar el fenómeno de transrepresión entre HR y AP-1 tiene un especial interés, ya que para el caso de glucocorticoides y retinoides esta propiedad se ha correlacionado con algunas de las acciones farmacológicas de estas hormonas, como son las antineoplásicas, inmunosupresoras y/o antiinflamatorias[27,28]. Por ejemplo, en relación a la actividad antiproliferativa, determinados tipos de retinoides capaces de activar selectivamente la función de transrepresión del receptor del ácido retinoico inhiben la proliferación de aquellas líneas celulares con actividad AP-1 endógena (p. ej., las células HeLa), pero no así la de aquellas que carecen de esta actividad (como las células F9)[29]. Por otra parte, el efecto positivo de los glucocorticoides en el tratamiento de determinadas leucemias, linfomas y algunas enfermedades de naturaleza

autoinmune puede correlacionarse con la propiedad de estas hormonas de inducir apoptosis de células T, propiedad que requiere únicamente de la función de transrepresión del receptor hormonal activado, y que es independiente de la de transactivación[30]. Finalmente, y en relación con su actividad antiinflamatoria y antienvejecimiento de la piel, los retinoides son capaces de inhibir la inducción de AP-1 que sigue a la exposición prolongada al componente de ultravioleta de la luz solar, bloqueando con ello la indución de metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular como colagenasas, estromalisina 1 y gelatinasas[31].

El fenómeno de la transrepresión de los HR y AP-1 fue descrito a principios de esta década y, desde entonces, distintos mecanismos han sido propuestos para explicarlo a nivel molecular[27,28]. Recientemente se ha observado que los HR, al igual que el factor AP-1, requieren del coactivador transcripcional CBP para activar la transcripción génica. Este hecho ha llevado a proponer la competencia entre los HR y AP-1 por cantidades limitantes de CBP como mecanismo para explicar la transrepresión[32]. Es importante hacer notar que la interacción con CBP, tanto por parte de AP-1 como de los HR, requiere de un paso previo de activación, que es la fosforilación del dominio N-teminal de c-Jun y la unión del correspondiente ligando, respectivamente[11,32]. Recientemente, resultados de nuestro laboratorio han demostrado que la activación de distintos HR como los de glucocorticoides, retinoides, hormona tiroidea y vitamina D inhiben la inducción de la ruta de la JNK en respuesta a distintos estímulos[33]. De acuerdo con el papel de la JNK en la activación de AP-1, la interferencia con esta ruta se correlaciona con la propiedad de estos HR de bloquear la fosforilación del dominio N-terminal de c-Jun y, en consecuencia, de inhibir la activación transcripcional dependiente de AP-1. Además, la inhibición por parte de los HR de la ruta de la JNK afecta también a la activación de otros factores de transcripción activados por JNK, como ATF2 y Elk-1. Es decir, mediante la inhibición de la ruta de la JNK, los HR inhiben la activación de AP-1 mediada tanto por mecanismos independientes de transcripción (fosforilación del dominio N-terminal de c-Jun) como dependientes de transcripción (expresión de los genes c-*jun* y c-*fos* mediada por ATF2 y Elk-1). En resumen, la interferencia con la ruta de la JNK representa un nuevo mecanismo a través del cual HR antagonizan a AP-1 y, en definitiva, un mecanismo alternativo por el que hormonas como los glucocorticoides y retinoides pueden ejercer sus acciones farmacológicas[33]. De hecho, la inhibición de la JNK y /o ERK (otro miembro de la familia de MAPK frecuentemente implicado en proliferación celular) por parte de distintas hormonas lipofílicas como el glucocorticoide sintético dexametasona, ácido retinoico, estradiol y progestrona ha sido implicada en el mecanismo por el que estas hormonas son capaces de inhibir respectivamente la producción de TNF-α[15], la expresión del gen c-*fos*[34] o de la endotelina 1 en respuesta a la angiotensina II[35].

La ruta de la JNK participa en la transducción de señales implicadas tanto en procesos fisiológicos normales como en aquellos que se producen en respuesta a condiciones de estrés, como es la respuesta inflamatoria, por lo que es previsible que moléculas capaces de interferir con esta ruta sean candidatas a controlar estos procesos. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que moléculas que normalmente están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis celular como las hormonas esteroides, tiroideas y las vitaminas A y D y sus metabolitos actuando a través de sus receptores intracelulares son capaces de inhibir la activación de la ruta de la JNK, y esta propiedad se correlaciona con su habilidad de antagonizar la actividad del complejo AP-1. Al menos en el caso de glucocorticoides y retinoides, esta capacidad de transrepresión está íntimamente ligada a sus acciones antiproliferativas, inmunosupresoras y/o antiinflamatorias. Es, por tanto, razonable pensar que inhibidores de la vía de señalización de la JNK puedan tener utilidad farmacológica. Un posible mecanismo de acción de dichos inhibidores es la activación de los HR, pero aún más conveniente serían aquellos inhibidores que actúen independientemente de aquéllos, ya que esto evitaría los efectos secundarios de los tratamientos con glucocorticoides y retinoides, que son en gran medida consecuencia de la activación génica por estas hormonas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Davis JD. MAPKs: new JNK expands the group. TIBS 1994; 19: 470-473.
2. Gupta S, Barret T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoform with transcription factors. EMBO J 1996; 15: 2.760-2.770.

3. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 180-186.
4. Ip YT, Davis, RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. Curr Opin Cell Biol 1998; 10: 205-219.
5. Nishina H, Fischer KD, Radvanyi L, Shahinian A, Hakem R, Rubie EA et al. Stress-signalling kinase SEK1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3. Nature 1997; 385: 350-353.
6. Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, and Tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? Curr Opin Genet Dev 1997; 7: 67-74.
7. Neel BG, Toks NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 193-204.
8. Dickens M, Rogers JS, Cavanagh J, Raitano A, Xia Z, Halpern JR et al. A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. Science 1997; 277: 693-696.
9. Shim J, Lee H, Park J, Kim H, Choi EJ. A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. Nature 1996; 381: 804-807.
10. Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. Curr Biol 1995; 5: 747-757.
11. Nordheim A. CREB takes CBP to tango. Nature 1994; 370: 177-178.
12. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. Nature 1997; 389: 349-352.
13. Musti AM, Treier M, Bohmann D. Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. Science 1997; 275: 400-402.
14. Chow CW, Rincón M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. Nuclear accumulation of NFAT-4 opposed by the JNK signal transduction pathway. Science 1997; 278: 1.638-1.641.
15. Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alfa (TNF-α) translation: glucocorticoids inhibit TNF-α translation by blocking JNK/SAPK. Mol Cell Biol 1997; 17: 6.274-6.282.
16. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos, and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. Biochem Biophys Acta 1991; 1.072: 129-157.
17. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 1995; 270: 16.483-16.486.
18. Karin M, Liu ZG, Zandi E. AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 240-246.
19. Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu TH, Xu J, Davis RJ et al. Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation and defects in AP-1 transcriptional activity. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 3.004-3.009.
20. Yang D, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincón M, Zheng TS, Davis RJ et al. Absence of excitotoxicity induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. Nature 1997; 389: 865-870.
21. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. Genes & Dev 1993; 7: 2.135-2.148.
22. Kyriakis JM, Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. BioEssays 1996; 18: 567-577.
23. Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. Cell 1994; 77: 727-736.
24. Nishina H, Bachmann M, Oliviera-dos-Santos AJ, Kozieradzki I, Fisher KD, Odermatt B et al. Impaired CD28-mediated interleukin 2 production and proliferation in stress kinase SAPK/ERK1 kinase (SEK1)/mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)-deficient T lymphocytes. J Exp Med 1997; 186: 941-953.
25. Read MA, Whitely MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis DJ et al. TNF-α induced E-selectin expression is activated by the NF-κB and JNK/P38 MAP kinase pathways. J Biol Chem 1997; 272: 2.753-2.761.
26. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schultz G, Umesono K et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 1995; 83: 835-839.
27. Saatcioglu F, Claret FX, Karin M. Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. Semin Cancer Biol 1994; 5: 347-359.
28. Cato ACB, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. BioEssays 1996; 18: 371-378.
29. Fanjul A, Dawson MI, Hoobs PD, Jong L, Cameron JF, Harlev E et al. A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. Nature 1994; 372: 107-110.
30. Helmberg A, Auphan N, Caelles C, Karin M. Glucocorticoid induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. EMBO J 1995; 14: 452-460.
31. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S et al. Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. Nature 1996; 379: 335-339.
32. Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B et al. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. Cell 1996; 85: 403-414.

33. Caelles C, González-Sancho JM, Muñoz A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. Genes & Dev 1997; 11: 3.351-3.364.
34. Lee H-Y, Walsh GL, Dawson MI, Hong WK, Kurie JM. All-*trans*-retinoic acid inhibits Jun N-terminal kinase-dependent signaling pathways. J Biol Chem 1998; 12; 7.066-7.071.
35. Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER. Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. Biochem J 1998; 330: 1.097-1.105.

DISCUSIÓN

R. Borges: Mi primera pregunta está relacionada con el esquema que presentaste donde la hormona tiroidea y el ácido transretinoico se incorporaban en distintas dianas, pero me pareció entender que actuaban exactamente en el mismo sitio, cuando los efectos de estas sustancias son muy distintos. En segundo lugar, y dado que existe una diferencia en la potencia de los glucocorticoides que se utilizan en clínica, tal vez una forma correcta de iniciar el cribado podría ser probando otros glucocorticoides, no solamente dexametasona, a fin de comprobar si esta acción dual que has descrito se centra más en un lado que en otro, y podría explicar la distinta potencia de un glucocorticoide frente a otro.

A. Muñoz: Respondiendo a tu primera pregunta, en realidad no es como tú lo has descrito. El receptor de la hormona tiroidea o el de alguna vitamina D, forma un heterodímero con el receptor que se denomina RXR, que lo es del ácido 9-cis-retinoico. El receptor del *all*-trans-retinoico, que es el RAR también forma un heterodímero con la proteína RXR, de manera que el receptor de la hormona tiroidea y el receptor de *all*-transretinoico no se pegan a los mismos sitios ni regulan los mismos genes obviamente, pero comparten la proteína con la que dimerizan, de manera que si se sobreexpresa uno, se inhibe por competencia con RXR la función de la otra hormona. Evidentemente, la vitamina A y la hormona tiroidea no hacen lo mismo. Respecto a tu segunda pregunta, próximamente pondremos a punto un sistema que pretendemos sea fácil, económico y cuantitativamente posible, para analizar sustancias que se fijen e inhiban JNK. De hecho, no estamos buscando más glucocorticoides con menos efectos secundarios ni moléculas que se unan a los receptores para evitar en lo posible los efectos secundarios, si no que buscamos inhibidores específicos de JNK, para posteriormente y con ayuda de alguna compañía farmacéutica, poder seleccionar los que no sean tóxicos.

F. Ventura: ¿Los efectos de represión los habéis observado sólo con AP-1 o también con otros sistemas que utilizan CBP, como por ejemplo, con factores miogénicos?

A. Muñoz: Se sabe y está publicado, que existe también con NFκ-B, aunque nosotros sólo lo hemos hecho con AP-1.

G. Pons: ¿Habéis estudiado si este efecto de inhibición de la JNK se produce sin necesidad de que el receptor penetre en el núcleo? Si así fuera, quedaría claro que no hay ningún efecto sobre transcripción.

A. Muñoz: En el caso de los glucocorticoides no hemos hecho experimentos de translocación al núcleo. Anteriormente publicamos los resultados de la cinética de inhibición donde apreciamos que prácticamente en 10 min la JNK está ya inhibida al 50%. Aunque no lo hayamos analizado directamente, esto permite predecir una buena correlación entre la cinética de paso al núcleo y la cinética de inhibición. Desde luego, necesariamente tiene que estar presente la hormona, con lo cual creemos que evidentemente es el complejo dentro del núcleo lo que inhibe. Sobre el último comentario, podemos afirmar que no se necesita transcripción. Lo hemos estudiado con un mutante de GR, el LS-7, que es defectivo en actividad transcripcional, y lo hemos hecho también con inhibidores, de manera que es un efecto independiente de la activación génica, requiere el receptor muy posiblemente dentro del núcleo, ligado a su hormona respectiva, y es dependiente de la concentración de receptor.

M. Palacín: En relación con el efecto de transrepresión, ¿habéis visto si existe una interacción física directa entre el receptor ocupado y JNK, o alguna de las cinasas que le preceden?

A. Muñoz: Es exactamente lo que estamos estudiando actualmente, además de si existe interacción directa. A continuación pretendemos esclarecer si es posible que lo que estén haciendo estos receptores hormonales es, en lugar de inhibir per se la actividad cinásica de la JNK, sencillamente activar su desfosforilación. El problema es que hay muchas fosfatasas, y son mal conocidas. Recientemente

se han publicado dos artículos en *Science* sobre la regulación de la ERK y la calcio-calmodulin-cinasa-4 dentro del núcleo por una fosfatasa que está unida a ella. De manera que la desensibilización natural fisiológica de todas estas cinasas será porque ellas mismas activan a la fosfatasa que está unida y que las inhiben. Podría ser que la acción se produjese por activar antes de tiempo esta fosfatasa, que al parecer, está siempre unida a la cinasa.

A. Celada: Me parece muy interesante el mecanismo de las JNK, particularmente cuando se recuerdan los artículos que se publicaron en *Cell* en el año 1991, de los cuales incluso se derivaron algunos hechos éticamente cuestionables. Fui uno de los que demostró la interacción entre el MHC de clase II con los corticoides y también intenté rehacer lo que los otros autores habían realizado para demostrar que las dos proteínas se unían. Pero el sistema me pareció tan sumamente artificial que nunca creí en él. Es posible que haya otro mecanismo, y quizás el único problema de vuestra teoría es que no entiendo cómo, por ejemplo, las moléculas de clase II del MHC son fosforiladas por la JNK. Es muy posible que además haya otro mecanismo mucho más sencillo, que es el mecanismo de captura y de interacción proteína-proteína. Entiendo el mundo de los factores de transcripción como una balanza entre activadores e inhibidores, y entre ellos pueden establecerse interacciones proteína-proteína y puede ser que inhiban la unión a los promotores. Esto lo hemos demostrado en otros sistemas y quizá también sea el caso de los glucocorticoides.

A. Muñoz: Creo que estás proponiendo una unión de receptores hormonales activados por su hormona, con algunos de los factores transcripcionales que se inhiben. Sabes mejor que yo la gran cantidad de bibliografía publicada al respecto, aunque hay un artículo en el que la adición de glucocorticoides no afectaba el *foot-printing* in vivo de AP-1. Siempre hay que tener cuidado entre lo que uno observa en una co-inmunoprecipitación o en un *gel-shift* in vitro, y lo que ocurre de verdad in vivo. La única excepción se produciría con promotores como la proliferina, en que los sitios están solapantes. Hay también promotores en los que, sin inhibir la unión a ADN de AP-1, sin embargo la transcripción está inhibida por el receptor. Proponemos que sea porque está inhibiendo la fosforilación de c-Jun por la JNK.

A. Celada: Todo esto es muy sencillo. Si a una proteína que está unida al ADN le pegas otra proteína, la ARN polimerasa no puede actuar y no se produce transcripción. Creo que esto no es ningún problema. En este caso, el promotor puede estar ocupado in vivo por los factores de transcripción. Es posible que vuestra teoría, que es muy atractiva, sea cierta pero creo que también deben considerarse otras opciones.

A. Muñoz: El problema es que muchas veces no se dispone de suficientes herramientas para avanzar como, por ejemplo, para poder detectar qué factor de transcripción ocupa el promotor. Por tanto, no siempre resulta tan fácil como pudiera parecer. Evidentemente, se trata de una teoría con la que pretendemos seguir trabajando.

Nuevas dianas terapéuticas en la transducción de señales por proteincinasas C

Jorge Moscat y María T. Díaz Meco

Laboratorio GlaxoWellcome-CSIC de Biología Molecular y Celular. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción

Los mecanismos de señalización celular acoplan los receptores de factores de crecimiento o citocinas inflamatorias con respuestas celulares como proliferación, quimiotaxis, diferenciación o apoptosis. Estos procesos de señalización constituyen un intrincado sistema de redes bioquímicas que permiten el flujo de la información desde el entorno extracelular hasta el núcleo de la célula. En la actualidad, la identificación de los distintos componentes que participan en estas rutas y de sus alteraciones en situaciones fisiopatológicas son objeto de un intenso estudio en búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. En estas rutas desempeña un papel destacado la génesis de segundos mensajeros lipídicos que conducen a la activación de cascadas de cinasas activables por lípidos. Entre éstas, la familia de las proteincinasas C (PKC) es una de las mejor caracterizadas[1]. Son ya más de 12 los isotipos de PKC que han sido identificados y que se agrupan en tres subfamilias, según sus características estructurales y sus propiedades bioquímicas[1]. La subfamilia de las PKC clásicas (cPKC), cuyo prototipo es αPKC, es sensible a Ca^{2+} y a diacilglicerol (DAG), mensajeros producidos por la activación de fosfolipasa C de fosfoinosítidos[1], mientras que las nuevas (nPKC) son activables por DAG y no responden a Ca^{2+}, pudiendo ser dianas de fosfolipasa C de fosfatidilcolina[2]. La clonación del isotipo ζ[3], que constituye junto a λ y ι la subfamilia atípica[3-5], abrió nuevas perspectivas en el estudio de la señalización celular por estas cinasas.

Características de las PKC atípicas

ζPKC a diferencia de las clásicas, y al igual que las nuevas, no es regulable[3] por Ca^{2+}. Otra característica que distingue a esta nueva isoforma de las otras de su familia es su único *zinc finger* (lugar hipotético de unión a fosfolípidos) que es doble en las clásicas y nuevas, y que en otras PKC parece ser responsable de la activación por diacilglicerol y ésteres de forbol[1]. Es interesante destacar que las PKC atípicas (aPKC) son insensibles a ésteres de forbol y DAG[3-5]. Sin embargo, son activables por importantes segundos mensajeros lipídicos tales como fosfatidilinositol 3,4,5-P_3 (PI 3,4,5-P_3) y ceramida[6-9] que se generan tras la activación celular por citocinas inflamatorias y factores de crecimiento[10-12]. De acuerdo con esto, se ha descrito la implicación de esta subfamilia atípica de PKC en importantes funciones celulares. Así, la microinyección de un péptido inhibidor con la secuencia del seudosustrato de las aPKC, pero no de α o εPKC inhibe completamente la maduración y la activación de NF-κB en oocitos de *Xenopus laevis,* así como la reiniciación de la síntesis de ADN en fibroblastos quiescentes de ratón[13,14]. Además, la depleción de λ/ιPKC con oligonucleótidos antisentido o su inhibición por transfección de mutantes que carecen de actividad cinasa y son dominante negativos inhibe la capacidad proliferativa celular, así como la activación de MAPK[15,16], la actividad de promotores dependientes de elementos κB[14,17-20], la liberación de PGE_2 en respuesta a IL-1β[21], la expresión del gen de α_2 integrina inducida por PDGF[22] y la diferenciación de células PC12 en respuesta a NGF[23]. Así mismo, se ha demostrado recientemente in vivo que λPKC, y muy probablemente también ζPKC, es una etapa clave en la transmisión de la cascada mitogénica activada por PI-3 cinasa[24,25].

Mecanismos de regulación y PKC atípicas

Las PKC atípicas no son sólo regulables por lípidos, sino que también lo son por reguladores proteicos. Así, ζPKC interacciona con Ras in vitro e in vivo[26-28], lo que podría explicar el requerimiento de este oncogén en la activación de las aPKC por PDGF[26] y el hecho de que

ζPKC medie, al menos en parte, las señales mitogénicas de Ras[13,29,30]. Sin embargo, tanto Ras como los mediadores lipídicos descritos como cofactores para las PKC atípicas no son selectivos para éstas. Así, el PIP_3 no sólo activa a ζPKC o λPKC sino que, además, es importante en la activación de otras cinasas como εPKC, δPKC, c-AKT o PRK1[24]. Las ceramidas, no sólo activan a ζPKC sino que también regulan a la CAP cinasa o a la CAP fosfatasa[11].

Por tanto, la identificación y caracterización de moduladores proteicos específicos para cada isotipo de PKC es importante en el establecimiento de estrategias específicas para el bloqueo selectivo de cada isoforma. Es de destacar, en este sentido, la identificación utilizando el sistema de doble híbrido en levadura, de dos nuevos moduladores proteicos que controlan la actividad de las aPKC: LIP y el producto del gen par-4[18,31]. LIP es un activador selectivo de λ/ιPKC a través de su interacción con el dominio "dedo de cinc" de la cinasa[18]. Por otro lado, el producto del gen par-4, que se induce durante la parada del crecimiento celular y la apoptosis[32], también interacciona específicamente con el "dedo de cinc" de ζPKC y λ/ιPKC, lo que conduce a la inhibición de su actividad enzimática. La interacción de las aPKC con Par-4 ha permitido desvelar el papel fundamental de estas cinasas en la supervivencia celular[31].

Uno de los posibles efectores directos de estas PKC en el control de la supervivencia y la proliferación celular es la cascada de MAPK[31,33,34]. Al contrario que Raf-1[35], MAPK parece estar implicada de modo decisivo en los mecanismos de acción de las aPKC en supervivencia. El hecho de que estas PKC regulen la activación de promotores dependientes de AP1 en respuesta a estímulos mitogénicos[24,36] y Ras[29], junto con la evidencia de que ζPKC es un efector clave de Ras[26,28], ya sugería que estas isoformas podrían estar implicadas en la activación de MAPK. En este sentido, se ha demostrado recientemente que la sobreexpresión de un mutante permanentemente activo de ζPKC o λ/ιPKC es suficiente para activar MAPK sin efecto alguno sobre SAPK o p70s6K[16]. Además, mutantes dominantes negativos de PKC atípicas inhiben significativamente la activación de la cascada de MAPK[16]. Es interesante destacar que la activación de MAPK por los isotipos clásicos y nuevos de PKC implica la activación de Raf, mientras que las acciones de aPKC son independientes de Raf pero mediadas por MEK[16,37]. Todas estas evidencias en su conjunto indican que las aPKC constituyen una ruta paralela a Raf para activar MAPK sin afectar la cascada de SAPK[16,27,30,37,38]. Esto puede ser de especial relevancia ya que el balance de la actividad de MAPK frente a SAPK y p38 puede ser crítico en la inducción de apoptosis[39,40]. De hecho, el bloqueo de las aPKC por Par-4 o la irradiación ultravioleta conlleva la inhibición de MAPK y una activación concomitante de p38[33]. Resultados recientes demuestran, además, que la simple inhibición de la actividad basal de MAPK es suficiente para desencadenar la activación de p38 de manera dependiente de caspasas[34]. Este efecto se bloquea en presencia de suero a través de la cascada de PI-3 cinasa-Akt[34]. El hecho de que las aPKC sean activadas por productos de PI-3 cinasa[6,7,25] indica que estas PKC están sujetas a un doble mecanismo de control en respuesta a señales de estrés: la interacción con Par-4 y la inactivación de PI-3 cinasa.

Sin embargo, la regulación de las cascadas de MAPK no es la única vía por la que las PKC controlan la supervivencia celular. Existen sólidas evidencias que implican a las aPKC en la regulación de NF-κB[8,9,13,16,17,19,20,29]. Este importante factor de transcripción es esencial para la inducción de la supervivencia celular y el bloqueo de la apoptosis, por lo que un campo de investigación importante en la actualidad lo constituye el estudio del mecanismo por el que estas PKC controlan NF-κB. Resultados recientes sugieren que la acción de las PKC en esta ruta está mediada por las cinasas responsables de la fosforilación de IκB, las IKK[41].

Un mejor conocimiento y caracterización de los mecanismos que regulan estas cinasas puede suponer un avance significativo para el diseño de posibles nuevas dianas terapéuticas más eficaces y selectivas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nishizuka Y. Intracellular signalling by hidrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 1992; 258: 607-614.
2. Exton JH. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. Biochim Biophys Acta 1994; 1.212: 26-42.
3. Ohno Y, Fuji T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. Protein kinase C ζ subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3.099-3.103.
4. Selbie LA, Schmitz-Peiffer C, Sheng Y, Biden TJ. Molecular cloning and charcterization of PKCι,

and atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. J Biol Chem 1993; 268: 24.296-24.302.
5. Akimoto K, Mizuno K, Osada S, Hirai S, Tanuma S, Suzuki K et al. A new member of the third class in the protein kinase C family, PKCλ, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. J Biol Chem 1994; 269: 12.677-12.683.
6. Nakanishi H, Exton JH. Purification and characterization of the zeta isoform of protein kinase C from bovine kidney. J Biol Chem 1992; 267: 16.347-16.354.
7. Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH. Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem 1993; 268: 13-16.
8. Lozano J, Berra E, Municio MM, Díaz-Meco MT, Domínguez I, Sanz L et al. Protein kinase C ζ isoform is critical for κB-dependent promoter activation by sphingomyelinase. J Biol Chem 1994; 269: 19.200-19.202.
9. Müller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K. PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNFα, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. EMBO J 1995; 14: 1.961-1.969.
10. Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. J Biol Chem 1994; 269: 3.125-3.128.
11. Kolesnick R, Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. Cell 1994; 77: 325-328.
12. Liscovitch M, Cantley LC. Lipid second messengers. Cell 1994; 77: 329-334.
13. Domínguez I, Díaz-Meco MT, Municio MM, Berra E, García de Herreros A, Cornet ME et al. Evidence for a role of protein kinase C ζ subspecies in maturation of *Xenopus laevis* oocytes. Mol Cell Biol 1992; 12: 3.776-3.783.
14. Domínguez I, Sanz L, Arenzana-Seisdedos F, Díaz-Meco MT, Virelizier JL, Moscat J. Inhibition of protein kinase ζ subspecies blocks the activation of a NF-κB-like activity in *Xenopus laevis* oocytes. Mol Cell Biol 1993; 13: 1.290-1.295.
15. Berra E, Díaz-Meco MT, Domínguez I, Municio MM, Sanz L, Lozano J et al. Protein kinase C ζ isoform is critical for mitogenic signal transduction. Cell 1993; 74: 555-563.
16. Berra E, Díaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sánchez P et al. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C ζ. EMBO J 1995; 14: 6.157-6.163.
17. Díaz-Meco MT, Berra E, Municio MM, Sanz L, Lozano J, Domínguez I et al. A dominant negative protein kinase C ζ subspecies blocks NF-κB activation. Mol Cell Biol 1993; 13: 4.770-4.775.
18. Díaz-Meco MT, Municio MM, Sánchez P, Lozano J, Moscat J. Lambda-interacting protein, a novel protein that specifically interacts with the zinc finger domain of the atypical protein kinase C isotype λ/ι and stimulates its kinase activity in vitro and in vivo. Mol Cell Biol 1996; 16: 105-114.
19. Folgueira L, McElhinny JA, Bren GD, MacMorran WS, Díaz-Meco MT, Moscat J et al. Protein kinase C-ζ mediates NF-κB activation in human immunodeficiency virus-infected monocytes. J Virol 1996; 70: 223-231.
20. Sontag E, Sontag JM, Garcia A. Protein phosphatase 2A is a critical regulator of protein kinase C ζ signaling targeted by SV40 small t to promote cell growth and NF-κB activation. EMBO J 1997; 16: 5.662-5.671.
21. Rzymkiewicz DM, Tetsuka T, Daphna-Iken D, Srivastava S, Morrison AR. Interleukin-1β activates protein kinase C ζ in renal mesangial cells. J Biol Chem 1996; 271: 17.241-17.246.
22. Xu J, Zutter MM, Santoro SA, Clark R. PDGF-induction of α2 integrin gene expression is mediated by protein kinase C ζ. J Cell Biol 1996; 134: 1.301-1.311.
23. Wooten MW, Zhou G, Seibenhener ML, Coleman ES. A role for ζ protein kinase C in nerve growth factor induced differentiation of PC12 cells. Cell Growth and Diff 1994; 5: 395-403.
24. Akimoto K, Takahashi R, Moriya S, Nishioka N, Takayanagi J, Kimura K et al. EGF or PDGF receptors activate atypical PKCζ through phosphatidylinositol 3-kinase. EMBO J 1996; 15: 788-798.
25. Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. Protein Kinase C-ζ as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. J Biol Chem 1997; 272: 30.075-30.082.
26. Díaz-Meco MT, Lozano J, Municio MM, Berra E, Frutos S, Sanz L et al. Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C ζ. J Biol Chem 1994; 269: 31.706-31.710.
27. Liao D-F, Monia B, Dean N, Berk BC. Protein kinase C-ζ mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1997; 272: 6.146-6.150.
28. Wooten MW, Seibenhener ML, Matthews LH, Zhou G, Coleman ES. Modulation of ζ-protein kinase C by cyclic AMP in PC12 cells occurs through phosphorylation by protein kinase A. J Neurochem 1996; 67: 1.023-1.031.
29. Bjorkoy G, Overvatn A, Díaz-Meco MT, Moscat J, Johansen T. Evidence for a bifurcation of the mitogenic signaling pathway activated by ras and phosphatidylcholine-hydrolyzing. J Biol Chem 1995; 270: 21.299-21.306.
30. Bjorkoy G, Perander M, Overvatn A, Johansen T. Reversion of Ras- and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C-mediated transformation of NIH 3T3 cells by a dominant interfering mutant of protein kinase C λ is accompanied by the loss of constitutive nuclear mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. J Biol Chem 1997; 272: 11.557-11.565.

31. Díaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sánchez P, Lozano J, Sanz L et al. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. Cell 1996; 86: 777-786.
32. Sells SF, Wood DP, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA et al. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cell. Cell Growth & Diff 1994; 5: 457-466.
33. Berra E, Municio MM, Sanz L, Frutos S, Díaz-Meco MT, Moscat J. Positioning the atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. Mol Cell Biol 1997; 17: 4.346-4.354.
34. Berra E, Díaz-Meco MT, Moscat J. The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. J Biol Chem 1998; 273: 10.792-10.797.
35. Wang H-G, Rapp UR, Reed JC. BCl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. Cell 1996; 87: 629-638.
36. Huang C, Ma W, Bowden T, Dong Z. Ultraviolet B-induced activated protein-1 activation does not require epidermal growth factor receptor but is blocked by a dominant negative PKCλ/ι. J Biol Chem 1996; 271: 31.262-31.268.
37. Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. Mol Cell Biol 1998; 18: 790-798.
38. Van Dijk MCM, Muriana FJG, Van der Hoeven PCJ, Widt J, Schaap D, Moolenar WH et al. Diacylglycerol generated by exogenous phospholipase C activates the mitogen-activated protein kinase pathway independent of Ras and phorbol ester-sensitive protein kinase C: dependence on protein kinase C-ζ. Biochem J 1997; 323: 693-699.
39. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature 1996; 380: 75-79.
40. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995; 270: 1.326-1.332.
41. Lallena MJ, Díaz-Meco MT, Moscat J. Critical role of the atypical PKC isoforms in the regulation of IκB kinase β by TNFα. 1999. En prensa.

DISCUSIÓN

A. Zorzano: En relación con el papel propuesto de la ζPKC en proliferación y supervivencia, ¿cómo lo cuadras con los resultados de tu colaboración con Bob Farese de los cuales se evidencia que ζPKC participa en los efectos típicos de una célula diferenciada, como es la respuesta a la insulina estimulando el transporte de glucosa?

J. Moscat: Aunque no participé directamente en estos trabajos de Farese, no es tan sorprendente lo que comentas porque, por ejemplo, está ampliamente aceptado que PI-3 cinasa está implicada en supervivencia celular y, sin embargo, parece ser que también lo está en el control de GLUT-4. Esto es muy interesante, porque se relaciona con la localización geográfica de las cinasas. EGF y PDGF inducen PI-3 cinasa y, sin embargo, no inducen GLUT-4. Pero la diferencia es que al estimular PI-3 cinasa por insulina, se localiza cerca del IRS-1 y cuando se estimula por el factor de crecimiento está en otro lugar. Por esta razón, la proteinasa que hemos clonado en p62 puede ser muy interesante porque está ubicando ζPKC en una región en la que pueda haber un complejo de señalización distinto según cada tipo celular.

A.M. Planas: Vosotros habéis estudiado este control de la supervivencia en diversos tipos celulares. Sin embargo, in vivo existen muchos más tipos celulares diferentes, sobre todo pensando en el cerebro que es el órgano con el cual trabajo. ¿Hasta qué punto pensáis que vuestros hallazgos podrían ser dependientes del tipo celular con el que se está trabajando? Me refiero a que, tal vez, una serie de cinasas podrían estar activadas en un sistema y no en otros.

J. Moscat: Desde mi perspectiva de biólogo molecular y celular sólo puedo decirte que, en nuestro grupo, trabajamos en sistemas modelo que intentamos que reproduzcan al máximo lo que realmente ocurre en situaciones fisiológicas. Por ejemplo, el modelo de PI-3 cinasa en supervivencia se definió en células PC-12, que son realmente unas células de muy mala calidad, pero que los hallazgos derivados de su estudio han sido posteriormente confirmados con experimentos realizados con células reales de hipocampo y de otras regiones cerebrales. Los resultados que he presentado indican que existen muchísimos balances relacionados con las proteínas cinasas C y deben interpretarse de forma que en algunas células el balance puede estar favore-

cido algunas de estas rutas, pero que en otras células tal vez participan rutas que todavía desconocemos. La ventaja de utilizar sistemas modelo es que son sistemas bastante limpios, en los que uno puede diseccionar estas rutas, aunque la significación que esto luego pueda tener en la fisiología o la clínica dependerá de que podamos disponer de inhibidores farmacológicos para administrar al animal y estudiar sus efectos. La otra alternativa es utilizar animales *knock-out*, aunque en este caso se incurre en el riesgo de que se desarrollen mecanismos compensatorios que pueden complicar la interpretación de los resultados.

P. Kaliman: En vuestro sistema ¿la activación de IKK por ζPKC depende de PI-3 cinasa? Y, en segundo lugar, cuando precipita el complejo de IKK, ¿precipita también algún otro tipo de PKC?

J. Moscat: La influencia de PI-3 cinasa la estamos explorando en la actualidad. Creo que en determinados tipos de factores de supervivencia la PI-3 cinasa va a ser necesaria, aunque posiblemente no sea suficiente. Si sobreexpresamos PI-3 cinasa no se aprecia ζPKC más activa, sin embargo, si bloqueamos PI-3 cinasa sí que se inhibe ζPKC. Si realmente es tan importante ζPKC como pensamos para la estimulación de NFκ-B y de NFκ-B cinasa, deberíamos tener una respuesta similar.

P. Kaliman: Esto estaría relacionado con mi comentario anterior sobre la limitación endógena del sistema. Por ejemplo, cuando nosotros sobreexpresamos la p85 salvaje y estimulamos las células para diferenciarlas, no vemos que se diferencien más que las células controles.

J. Moscat: En vuestro experimento añadisteis p85 δ que es dominante negativo, mientras que p85 de tipo salvaje no hace nada, por lo que sugerí añadir p110 permanentemente activo. Nosotros disponemos del mutante p110 permanentemente activo que es perfectamente activo, puesto que estimula RAC y JNK. Fisiológicamente tampoco estamos seguros de lo que significa, pero por lo menos sabemos que está funcionando. En estas condiciones no es suficiente para estimular ζPKC, lo cual no quiere decir que sea una limitación del sistema, sino que ζPKC puede utilizar una actividad basal de PI-3 cinasa aunque no sea estimulable. De esto hay ejemplos, como AKT que se fosforila por PDK-1 y PDK-1 únicamente es capaz de estimular a AKT porque está unido a un PIP 3-4 basal. No hace falta más PIP-3 para estimular PDK-1, aunque sí para estimular AKT. Es decir, hay un papel de la PI-3 cinasa basal que puede ser necesario, aunque su estimulación puede no ser suficiente.

P. Kaliman: Esto también se recoge en un artículo que publicamos hace unos años, donde el tráfico de GLUT-1 basal en mioblastos depende de una actividad basal de PI-3 cinasa. Por más insulina que se añada no vemos más efectos.

J. Moscat: Sobre tu pregunta de si podíamos precipitar otras PKC, estudiamos αPKC y εPKC, esta última no está presente pero la sobreexpresamos. Cuando se sobreexpresa de forma ectópica αPKC con IKK podemos ver una asociación. Sin embargo, cuando se analiza la interacción de las proteínas endógenas no se observa interacción, lo que quiere decir que si forzamos el sistema podemos llegar a ver una interacción que es inespecífica. Precisamente esto es todo lo contrario de lo que pasa con la ζPKC, puesto que tras la expresión ectópica de IKK observábamos que TNFα inducía a la asociación de la endógena, lo que no ocurre si se hace lo mismo para αPKC, ni incluso estimulando con PMA, por lo que pensamos que las otras PKC no están implicadas en la regulación fisiológica de IKK. Además, esto concuerda con que inhibidores más o menos selectivos para αPKC o la βPKC y sin efecto sobre las ζ son incapaces de bloquear el efecto TNFα.

F. Ventura: En tu presentación has comentado que la ζPKC activaba tanto p38 como IKK. ¿Habéis estudiado la implicacion de Met cinasa en estos efectos?

J. Moscat: En realidad es la inhibición de ζPKC la que estimula p38. Cuando se induce PAR-4 se inhibe ζPKC y es esta inhibición la que promueve la estimulación de p38 a través de su sistema de caspasas. Respecto a tu pregunta, hemos realizado varios experimentos y no hemos podido constatar ningún tipo de interacción entre ζPKC y Met cinasa.

A. García de Herreros: ¿Podrías comentar algo más sobre la p62 y su papel de localización de la ζPKC en la membrana? Me refiero, por ejemplo, a si está involucrada en la activación de ζPKC.

J. Moscat: p62 no es capaz de estimular ζPKC porque interacciona por un dominio que nada tiene que ver con el dominio de interacción. En resultados preliminares de laboratorio, hemos observado que p62 permite que SARK fosforile a la ζPKC en una re-

gión que la activa. De confirmarse, esto sería bastante novedoso porque constituiría una evidencia de que las ζPKC son activables por fosforilación en tiroxina. El hecho de que nadie haya objetivado que ζPKC in vitro se fosforile por SARK o por miembros de esta familia, se debe simplemente a la falta de p62. Si no hay p62 que las una e induzca un cambio conformacional, no puede haber fosforilación. Pensamos, por tanto, que realmente va a ser importante la estimulación por tirosincinasas.

R. Trullás: ¿El tratamiento con suero altera de alguna manera la reducción de ERK? Mi segunda pregunta sería si el efecto del suero se revierte completamente con wortmanina.

J. Moscat: He presentado los resultados basales de ERK. El valor de ERK no varía tengan o no tengan suero, porque su valor basal no varía ni en células en quiescencia, detenidas en G_0-G_1, ni en células que estén proliferando activamente. La única diferencia es que en células que están en quiescencia, al añadir suero, se produce un pico que es más o menos sostenido por las respuestas del valor basal. Nosotros hemos observado que en células que proliferan activamente y sin la presencia de suero, a pesar de que el suero no modifique en absoluto ERK, si se bloquea ζPKC por inducción de par-4 se induce apoptosis. Sobre tu segunda pregunta, la wortmanina revierte totalmente el efecto del suero.

Monografías Dr. Antonio Esteve publicadas

1. El hospital de día y su repercusión en terapéutica (1985).
2. Problemas que se plantean en el tratamiento de infecciones graves por *S. aureus* (1986).
3. Contribución del biólogo a la farmacología en España (1987).
4. Un glosario para farmacólogos (1987).
5. Aspectos biológicos de los síndromes depresivos (1988).
6. Bases del tratamiento de las intoxicaciones agudas (1988).
7. Investigación básica y medicina clínica (1988).
8. Tratamiento de datos en farmacología (1989).
9. Perspectivas terapéuticas en la esclerosis múltiple (1989).
10. Biotecnología de aplicación farmacéutica (1991).
11. Metodología del ensayo clínico (1991).
12. Periodismo científico. Un simposio internacional (1991).
13. El ensayo clínico como tarea cooperativa (1992).
14. Terapéutica y calidad de vida (1993).
15. Investigación sobre cáncer en España: de la biología molecular a la clínica (1994).
16. El tratamiento del dolor: del laboratorio a la clínica (1994).
17. Farmacología de los canales iónicos (1995).
18. Bases de datos en farmacología y terapéutica (1996).
19. Fármacos y conducción de vehículos (1996).
20. Traducción y lenguaje en medicina (1997).
21. Medicina y medios de comunicación. Traducción al español de una serie publicada en la revista *The Lancet* (1997).
22. Problemas y controversias en torno al ensayo clínico (1998).
23. Glosario de investigación clínica y epidemiológica (1998).
24. Transducción de señales como diana farmacológica (1999).
25. Investigación médico-farmacéutica en atención primaria. Una visión a través de las publicaciones de la REAP (1999).