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

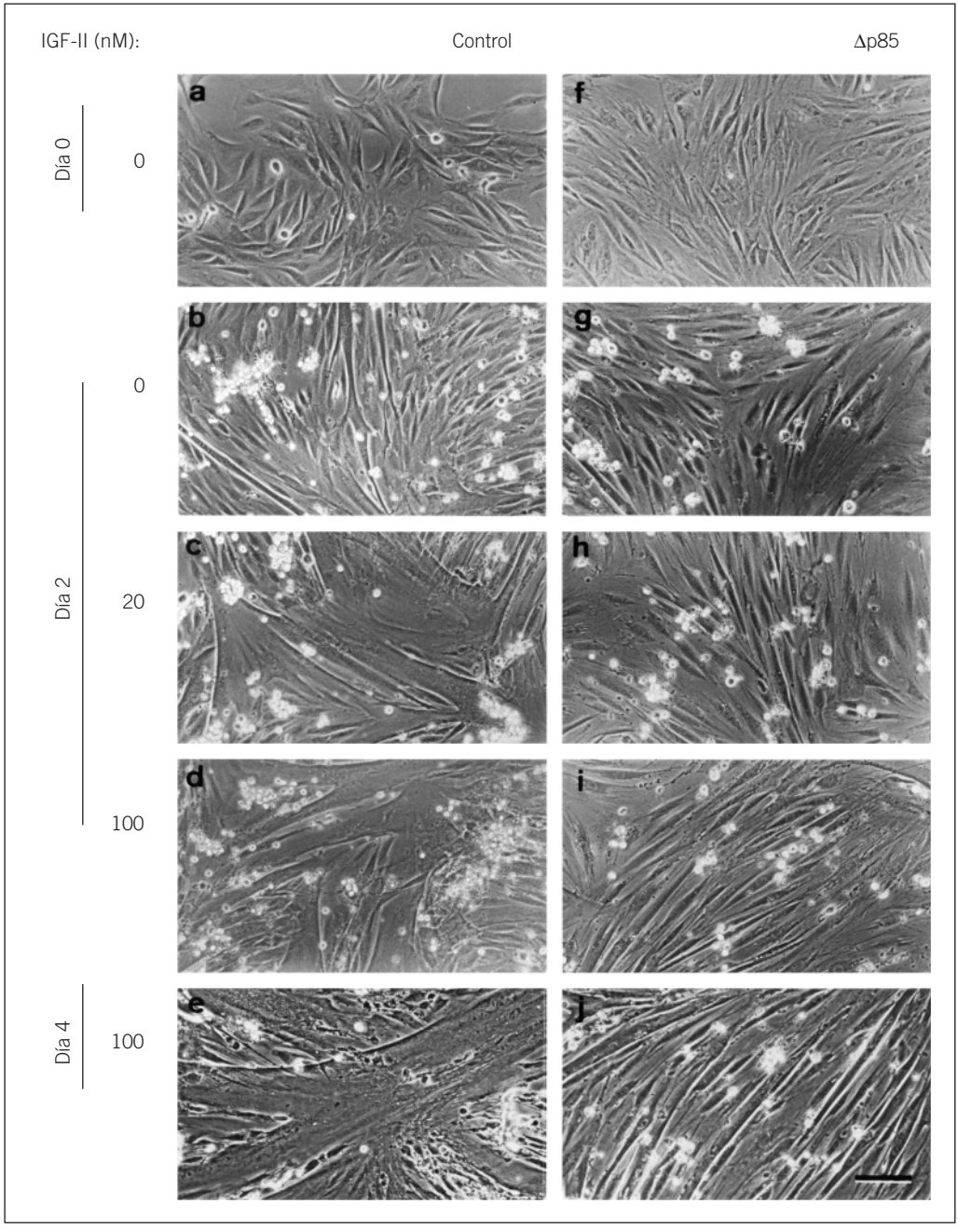

Fig. 1. Inhibición de la fusión inducida por IGF-II en células L6E9-Δp85. Células L6E9-Δp85 (f-j) y células control expresando la forma salvaje de p85Δ (a-e) crecieron hasta su confluencia en un medio rico en suero (a y f) y luego se diferenciaron en medio DMEM (b y g) o en medio DMEM que contenía 20 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

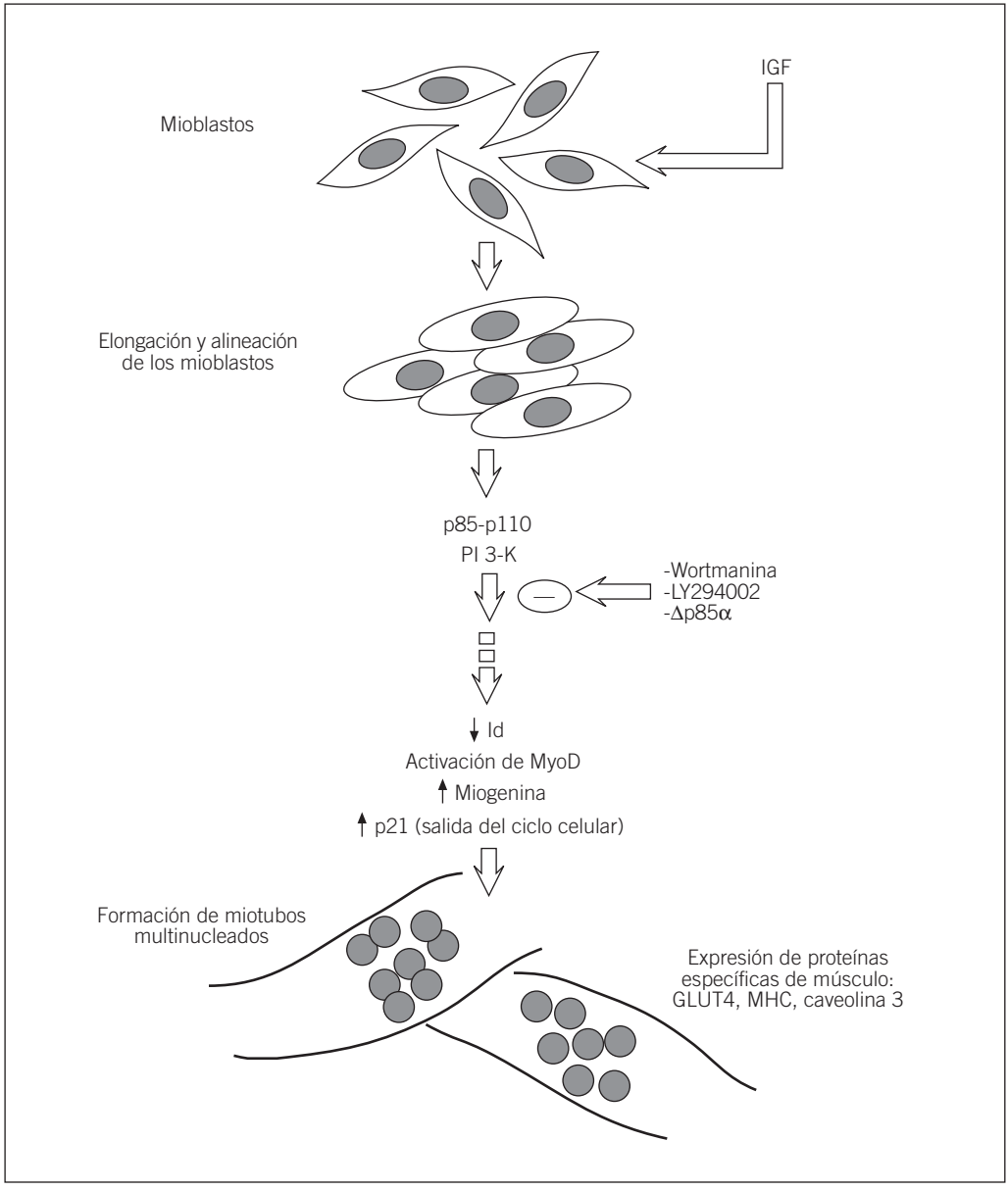

Fig. 2. Modelo de señalización miogénica inducida por IGF. En presencia de IGF-II, los mioblastos inician el programa de diferenciación. Morfológicamente, al principio se alinean y se elongan; 24 h después las células comienzan a fusionarse y forman miotubos multinucleados. En presencia de inhibidores 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.