



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología,
Pediatría y Radiología

TESIS DOCTORAL

NUEVOS FÁRMACOS EN HEMOPATÍA AGUDA MALIGNA: ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NK-1 EN LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA

Águeda Molinos Quintana

SEVILLA 2015

Dirigido por

Dr. Miguel Muñoz Sáez

Dr. José Antonio Pérez-Simón

A mis hijas

AGRADECIMIENTOS

Hay momentos en la vida en los que decidir marcar nuevos retos personales y profesionales pueden hacer de ti una persona nueva, más valiente, un constructor de la vida con capacidad para potenciar las virtudes y corregir los defectos. La curiosidad científica y la pasión por la medicina y en particular por la salud de los más pequeños suponen esa parte de mí que aún tiene que crecer y madurar. Dicen que los momentos de dificultad e incertidumbre pueden hacernos más fuertes y permitirnos consolidar y contemplar la belleza singular de cada gesto, de cada palabra y de cada nuevo objetivo alcanzado con perseverancia.

Cuando escribo estas palabras sólo puedo pensar y llenarme de gratitud al recordar a todas las personas que están en mi vida, ayudándome cuando caigo y acompañándome en el camino. Sin la ayuda desinteresada de familiares, amigos y compañeros, este trabajo no habría podido ver la luz. Un esfuerzo recompensado con la conquista de un objetivo personal que me había marcado en la vida. Tal vez no ha sido el mejor momento, pero al final ha servido para demostrarme a mi misma que a pesar de las adversidades, la vida es una lucha con recompensas y pequeños sueños cumplidos.

Es imposible resumir en unas pocas líneas lo que siento por cada una de las principales personas que me han ayudado en el proceso de elaboración de este trabajo. Intentaré buscar las palabras adecuadas que simbolicen el agradecimiento y admiración que siento por las personas que más quiero, y dedicar unas palabras llenas de cariño para mis amigos y mentores profesionales. Mis disculpas a todos los que deberían estar aquí citados y que tengo presentes cada día.

En primer lugar tengo que agradecer el apoyo recibido por mis directores de tesis. Paciencia, ilusión, entusiasmo y pasión son las mejores cualidades que definen al Dr. Miguel Muñoz. Científico incansable, de los que nacen y se hacen. Transmite ilusión por el conocimiento de lo desconocido y amor y respeto por la ciencia y la investigación. Persona sensible con el sufrimiento ajeno, médico a pie de cama, científico de vocación y el artífice y alma de este proyecto de investigación.

Un especial agradecimiento al Dr. Pérez Simón por su empuje y ánimo para la

consecución de este proyecto. Una admirable capacidad de trabajo y un ejemplo constante del médico investigador. Su experiencia ha sido fundamental para sintetizar y exponer con rigor todos los conocimientos aprendidos y aplicados en este proyecto de tesis. Gracias por el tiempo dedicado que ha sido pilar fundamental para poder finalizar esta tesis.

La Dra. Catalina Márquez, tutora de esta tesis, es un ejemplo de perseverancia, generosidad y entusiasmo. Estoy muy agradecida por el apoyo recibido, siempre dispuesta a colaborar y aconsejar. Una labor médica digna de mención y un orgullo trabajar a su lado. Capacidad para escuchar y estimular este proyecto desde sus inicios.

Es imposible no mencionar con mucho cariño a mis compañeros y amigos el Dr. Pérez Hurtado y la Dra. Pérez de Soto. Es un privilegio trabajar en el día a día rodeada de amigos. Han sido y son mis mentores en Hematología. Todo un orgullo aprender de los mejores con su humildad y trabajo duro. Grandes amigos que han ofrecido los mejores consejos y han velado por mí desde el principio. Una sonrisa por la mañana para lo bueno y para lo malo. La palabra compañerismo nació con ellos. Parte de esta tesis está dedicada sólo a vosotros, por escucharme y apoyarme cada día. Sois excepcionales.

Por supuesto una mención muy especial a Pablo Trujillo, compañero biólogo cuyo trabajo en el laboratorio ha sido esencial y parte fundamental de esta tesis. Gracias por la paciencia que has demostrado; mi inexperiencia nunca resultó un problema para ti. El laboratorio suponía un gran reto y gracias a ti he podido superar todos los obstáculos. Muchas gracias de corazón.

A José Ignacio Piruat por potenciar mi capacidad de trabajo en el laboratorio de experimentación y por dejarme aprender, siempre disponible y dando facilidades. Ha sido todo un placer descubrir la metodología de trabajo en modelo animal y la importancia de estructurar adecuadamente un experimento. De corazón muchas gracias por facilitarme el camino y por escuchar y comprender en los momentos de dificultad. Gracias a María José Durán Galván por su inestimable ayuda en el animalario y por mostrarme cada día el manejo y respeto en la investigación con animales con fines científicos. Siempre una cara amable en el laboratorio. Gracias a Francisco de la Cerda que con su experiencia previa como doctorando me dió el primer empujón cuando no sabía por dónde empezar. A mi gran amiga Laura Marcos, porque nadie como tú entiende el esfuerzo que conlleva esta tesis. Gracias por estar siempre cerca.

El Dr. Obando ha tenido una gran importancia en mi vida profesional. Su influencia como pediatra durante la residencia fue decisiva para mí. Estuvo en mis inicios como un maestro y gracias a él comenzó mi interés por la investigación. La primera persona que se sentó a mi lado y me guió paso a paso para elaborar mi primer trabajo científico y la primera persona que desde el primer año de residencia guió mi formación para ser una buena pediatra. Un maestro, docente por excelencia y gran persona, generoso en su tiempo y fuente inagotable de conocimientos.

La tesis es el producto de un trabajo lento y cuidadoso. Una flor que necesita cuidados para crecer. Es imposible expresar con palabras el amor que siento por los míos, por mi familia, por las personas que le dan sentido a mi vida.

Papá y mamá, todo esto es fruto de vuestro ejemplo, trabajo hecho con pasión. Desde pequeña aprendí de vuestro ejemplo la importancia del trabajo bien hecho. Son sentimientos labrados por vosotros, por la educación recibida siempre con amor. La responsabilidad y el trabajo fueron cualidades que me inculcasteis desde pequeña. Gracias por ser los mejores padres, gracias por seguir allanando el camino y por vuestro amor incondicional; siempre cerca.

A mi hermano Paco, excepcional persona, buena y generosa. Paciente y detallista. Esta tesis tiene una parte de ti y una gran parte dedicada a nuestra infancia. Aunque estés lejos, aún me sigo preguntando qué haría mi hermano en mi lugar. Desde pequeños he sentido tu apoyo absoluto, porque a tus ojos, siempre hago bien las cosas, porque somos hermanos, porque somos cómplices y velamos por la felicidad del otro. Te quiero hermanito.

Para el final guardo el sentido de mi vida, mi familia. La que siempre deseé. La felicidad en los ojos de mis dos niñas, de mis tesoros. Una voz inocente, un mundo por descubrir. Me encanta pensar que un poco de este trabajo puede contribuir a ofreceros un mundo mejor, un futuro más cálido y acogedor. Este trabajo es sólo para vosotras, porque sois lo mejor que me ha pasado en la vida. Gracias Josemi por compartir la vida conmigo. Contigo descubrí el sentido de la palabra amor, y el verdadero valor de las cosas. Eres mi mayor aliciente para ser cada día un poco mejor, sólo para ti, sólo para nosotros.

“Deberíamos vivir tantas veces como los árboles, que pasado un año malo echan nuevas hojas y vuelven a empezar”

“El tiempo es invencible porque él mismo se destruye a cada instante”

José Luis Sampedro

“Siempre que te pregunten si puedes hacer un trabajo, contesta que sí y ponte enseguida a aprender como se hace”

Franklin D. Roosevelt

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
CFU	Unidades formadoras de colonias hematopoyéticas
CFU-GM	CFU Granulocítico-macrofágico
CFU-G	CFU Granulocítico
CFU-E	CFU Eritroide
CFU-Meg	CFU Megacariocítico
CFU-GEMM	CFU Mixto
CFU-L	CFU Linfoide
CMH	Células madre hematopoyéticas
CMM	Células madre mesenquimales
DAG	Diacilglicerol
DO	Densidad óptica
EKA (B, C y D)	Endokinina A (B, C y D)
ERK1/2	Kinasas reguladoras de la señal extracelular 1 y 2
HGFIN	Hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type
HK-1	Hemokinina 1
IP ₃	Inositol trifosfato
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMA	Leucemia mieloblástica aguda
MAPK	Protein-kinasa activadas por mitógenos
MO	Médula ósea
NF κ B	Factor de activación nuclear kappa β
NKA	Neurokinina A
NKB	Neurokinina B
NK1R	Receptor NK1 (neurokinin 1)
NK2R	Receptor NK2
NK3R	Receptor NK3
NP	Neuropéptido

NPK	Neuropéptido K
NP γ	Neuropéptido- γ
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PKA, PKB, PKC	Proteína-kinasa A, B y C
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PRGC	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
RAPG	Receptor acoplado a proteína G
SCF	Stem cell factor (Factor de célula madre)
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SNC	Sistema nervioso central
SMD	Síndrome mielodisplásico
SMP	Síndrome mieloproliferativo
SP	Sustancia P
SSF	Suero salino fisiológico
Tc	Linfocito T citotóxico
Th	Linfocito T helper
TK	Taquicinina
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....

Páginas 1-70

1. FISIOPATOLOGÍA DE LA HEMATOPOYESIS

2. LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA

2.1 GENERALIDADES

2.2 CLASIFICACIÓN LMA

2.3 EPIDEMIOLOGÍA LMA

2.4 ALTERACIONES CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES. FACTORES PRONÓSTICOS LMA

2.5 TRATAMIENTO DE LA LMA

2.6 PRONÓSTICO LMA

3. SUSTANCIA P Y RECEPTOR NK-1

3.1 NEURONAS Y NEUROTRANSMISORES

3.2 NEUROPEPTIDOS

3.2.1 Síntesis, almacenamiento y características de los NP

3.2.2 Clasificación de los neuropéptidos

3.2.3 Mecanismo de acción

3.3 TAQUICININAS

3.3.1 Estructura peptídica y genética

3.3.2 Receptores taquicinérgicos

3.4 SUSTANCIA P (SP)

3.5 RECEPTOR NK1

3.6 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA UNIÓN SP-NK1R

3.7 ANTAGONISTAS NK1R

3.8 PRINCIPALES ACCIONES FISIOLÓGICAS SP-NK1R

3.9 PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON SP-NK1R

4. SISTEMA INMUNE Y TAQUICININAS

4.1 CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE Y TAQUICININAS

4.2 HEMATOPOYESIS Y TAQUICININAS

4.2.1 TK y hematopoyesis fisiológica

4.2.2 TK y hematopoyesis patológica. Leucemia y mielofibrosis

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... Páginas 71-73

III. MATERIAL Y MÉTODO..... Páginas 74-88

IV. RESULTADOS..... Páginas 89-113

1. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NK1R EN LAS CÉLULAS DE LMA

1.1 Western Blot

1.2 Real Time PCR

2. EFECTO PROLIFERATIVO DE LA SP SOBRE LAS LÍNEAS CELULARES DE LMA

3. EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NK1R SOBRE LA PROLIFERACIÓN

4. LOS ANTAGONISTAS DE NK1R BLOQUEAN PARCIALMENTE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR LA SP EXÓGENA

5. EFECTO DEL ANTAGONISTA NK1R APREPITANT SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR SP SOBRE LINFOCITOS DE DONANTE SANO

6. DETECCIÓN CÉLULAS LMA EN APOPTOSIS

7. MODELO ANIMAL

V. DISCUSIÓN..... Páginas 114-145

VI. CONCLUSIONES..... Páginas 146-147

VII. BIBLIOGRAFÍA..... Páginas 148-187

FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Diferenciación hematopoyética

Figura 2. Anatomía de la médula ósea

Figura 3. Examen citológico de LMA

Figura 4. Incidencia de LMA por edad

Figura 5. Incidencia y muertes por LMA

Figura 6. Supervivencia global desde el diagnóstico de adultos < 60 años con LMA

Figura 7. Supervivencia global de LMA inversamente relacionada con la edad

Figura 8. Supervivencia global de LMA

Figura 9. Supervivencia global de LMA después de una primera recaída

Figura 10. Neurona

Figura 11. Representación esquemática de una sinapsis química

Figura 12. Receptor acoplado a proteína G

Figura 13. Mecanismos efectores de la proteína G

Figura 14. Estructura de los genes TAC y sus variantes de empalme

Figura 15. Representación esquemática de la organización de los genes que codifican los receptores taquicinérgicos humanos

Figura 16. Secuencia de aminoácidos de SP y SP (6-11)

Figura 17. Estructura del receptor NK1R en su forma completa

Figura 18. Representación esquemática del sitio de unión de SP y antagonistas NK1R

Figura 19. Sitio de unión de SP y los antagonistas NK1R

Figura 20. Organización de los exones del gen TAC1R en su forma completa y truncada

Figura 21. Selectividad de las TK endógenas y algunos fragmentos C-terminales de SP

Figura 22. Representación esquemática de las vías de señalización intracelular tras la activación del NK1R por la SP

Figura 23. Mecanismos de activación del receptor NK1R

Figura 24. Esquema del efecto proliferativo y anti-apoptótico de la SP a través de β -arrestina en la membrana endosomal

Figura 25. Internalización del NK1R

Figura 26. Ruta endocelular. Mecanismo de desensibilización y resensibilización del NK1R

Figura 27. Esquema del receptor NK1R truncado

Figura 28. Implicaciones del sistema SP/NK1R en patología humana

Figura 29. Regulación de la hematopoyesis por la SP

Figura 30. Resumen de las acciones de la SP y NKA sobre la hematopoyesis

Figura 31. Implicación de los receptores taquicinérgicos en la regulación de la hematopoyesis y el resultado de la comunicación entre NK1R y NK2R

Figura 32. Efectos de SP, NKA y SP(1-4) sobre las células hematopoyéticas

Figura 33. Interacción de la SP con distintos receptores y su efecto sobre la hematopoyesis

Figura 34. Control del SNC sobre la hematopoyesis

Figura 35. Modelo propuesto de interacción entre el sistema nervioso, endocrino, inmune y las células tumorales

Figura 36. Modelo de ratón NSG (NOD/SCID/ Il2rg).

Figura 37. Cámara Neubauer

Figura 38. Niveles de proteína de NK1R por Western blot

Figura 39. Análisis de los niveles de expresión del mRNA del gen TAC1R mediante RT-PCR

Figura 40. Niveles de expresión del mRNA del gen TAC1R full-length y truncado

Figura 41. Ensayos de proliferación con SP en LMA

Figura 42. Ensayos de proliferación con SP en linfocitos

Figura 43. Gráficos de citotoxicidad de células de LMA

Figura 44. Gráficos de inhibición: Efecto citotóxico de los antagonistas NK1R sobre las líneas celulares de LMA

Figura 45. Gráfico de citotoxicidad de linfocitos con aprepitant

Figura 46. Gráfico de inhibición competitiva LMA KG-1

Figura 47. Gráfico de inhibición competitiva LMA HL-60

Figura 48. Gráfico de inhibición competitiva en la línea celular de LMA KG-1 con aprepitant en ausencia o presencia de SP

Figura 49. Gráfico de inhibición competitiva en la línea celular de LMA HL-60 con aprepitant en ausencia o presencia de SP

Figura 50. Ensayos de inhibición competitiva en linfocitos sanos con aprepitant

Figura 51. Cultivos de LMA tratados con aprepitant teñidos con DAPI

Figura 52. Curva de peso de los ratones NSG en el experimento piloto

Figura 53. Diagrama de proceso del modelo animal

Figura 54. Estudio de citometría de muestras de MO

Figura 55. Diagrama de caja con los niveles de infiltración de MO

Figura 56. Curva de peso de los ratones según grupo de tratamiento

Figura 57. Curva de supervivencia según grupo de tratamiento

Figura 58. Fuentes de liberación de SP

Figura 59. Posibles fuentes de liberación de SP sobre la célula de LMA

Figura 60. Composición química de distintos antagonistas NK1R no peptídicos

Figura 61. Vías alternativas para la SP en la MO cuando el NK1R está bloqueado

TABLAS

Tabla 1. Clasificación LMA según la OMS 2008

Tabla 2. Resultados protocolo SHOP LANL 2001 comparados con otros protocolos internacionales

Tabla 3. Clasificación de los principales NP en mamíferos

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de los neuropéptidos que integran la familia de las TK de mamíferos

Tabla 5. Comparación de la afinidad de las TK por cada tipo de receptor taquicinérgico

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de las TK

Tabla 7. Tabla comparativa de las distintas isoformas del NK1R

Tabla 8. Resultados IC₅₀-IC₁₀₀ sobre las líneas KG-1, HL-60 y linfocitos con los distintos antagonistas de NK1R

Tabla 9. Cultivos teñidos con DAPI

Tabla 10. Tabla descriptiva de los ratones xenoinjertados

Tabla 11. Presencia de SP y NK1R en muestras de distintos tumores humanos

Tabla 12. Tabla comparativa del efecto citotóxico de tres antagonistas NK1R sobre distintas líneas tumorales

I. INTRODUCCIÓN

1. FISIOPATOLOGÍA DE LA HEMATOPOYESIS

Definimos hematopoyesis como el mecanismo responsable del crecimiento y diferenciación de las células hematológicas. Su funcionamiento correcto asegura la producción de las células sanguíneas responsables del transporte de oxígeno, la coagulación sanguínea y la inmunidad.

El sistema hematopoyético está compuesto por diferentes tipos celulares organizados jerárquicamente (Figura 1). Se reconocen diversos tipos celulares que podemos agrupar en: células madre hematopoyética (CMH), células progenitoras comprometidas y por último las células maduras. El inicio del proceso de diferenciación hematopoyética se encuentra en el compartimento de CMH o stem cells que se localizan cerca del endostio medular, una cavidad donde los niveles de oxígeno son bajos (Figura 2). Este grupo de células con la máxima capacidad de autorrenovación y diferenciación (células pluripotentes) es el responsable de la generación continua y de por vida de todas las demás células hemáticas. Los estadios intermedios de desarrollo celular entre las células madre y las células hematopoyéticas maduras están constituidos por células que han sufrido restricciones en la capacidad de diferenciación, pero todavía no han adquirido los cambios morfológicos típicos de las células maduras; son los progenitores comprometidos o unidades formadoras de colonias hematopoyéticas (CFU) (colony forming units) que identifican a progenitores hematopoyéticos comprometidos hacia algún linaje mieloide o linfoide. Así, se identifican progenitores granulocítico-macrofágicos (CFU-GM), granulocíticos (CFU-G), eritroides CFU-E, megacariocíticos (CFU-Meg), mixtos (CFUGEMM) y linfoides (CFU-L). En el caso de los precursores eritroides y megacariocíticos, un estadio previo a las CFU es la BFU (Burst Forming Unit) con una capacidad de crecimiento “explosiva” que dan lugar a grandes colonias (Luc, Buza-Vidas, & Jacobsen, 2008). Además de las CMH, en la médula ósea (MO) también residen las células madre mesenquimales (CMM) situadas alrededor de los vasos sanguíneos de la médula (Figura 2). Estas CMM dan lugar a las células del estroma medular y tienen una función esencial en el sostén y mantenimiento de la homeostasis medular necesaria para que las CMH puedan funcionar correctamente. Las CMM son células pluripotentes y adultas con plasticidad hacia diversos linajes celulares como

fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, adipocitos y mioblastos entre otros.

Esta organización jerárquica no se puede visualizar in vivo directamente. Por este motivo, todas las células hematopoyéticas inmaduras se clasifican morfológicamente de manera indiscriminada como células blásticas: células de tamaño medio, redondas, con núcleo grande y citoplasma escaso.

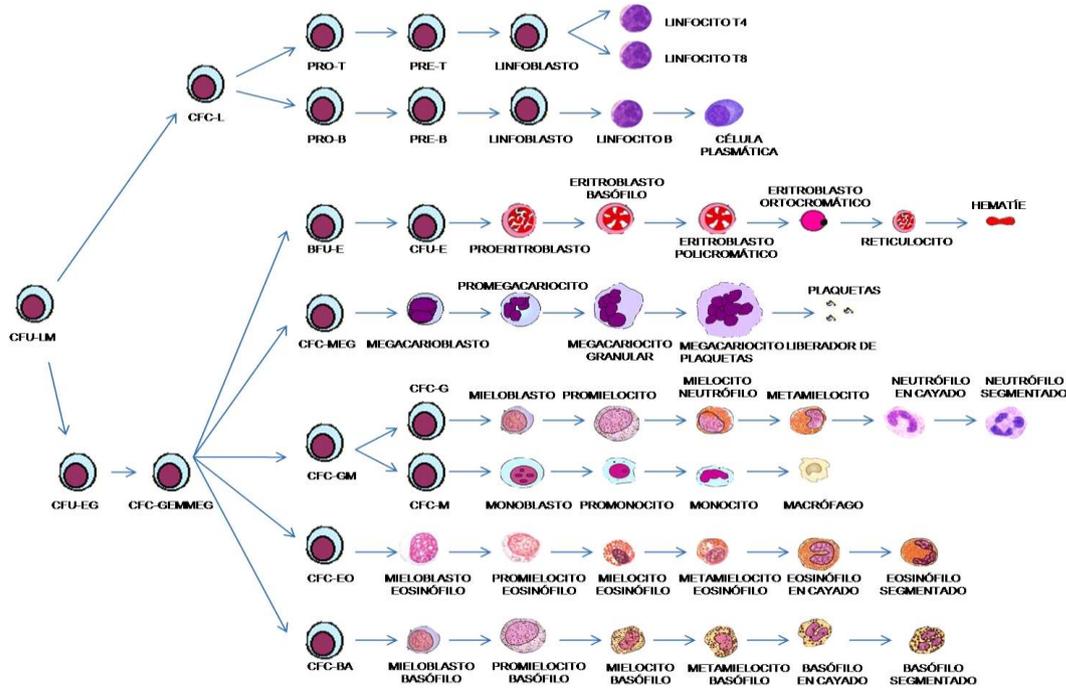


Figura 1. Diferenciación hematopoyética. Ernest B., Marshal A.L., Barry S.C., Thomas J.K., Uri S. (2007) Williams Hematología (6ª edición). Editorial Marbán

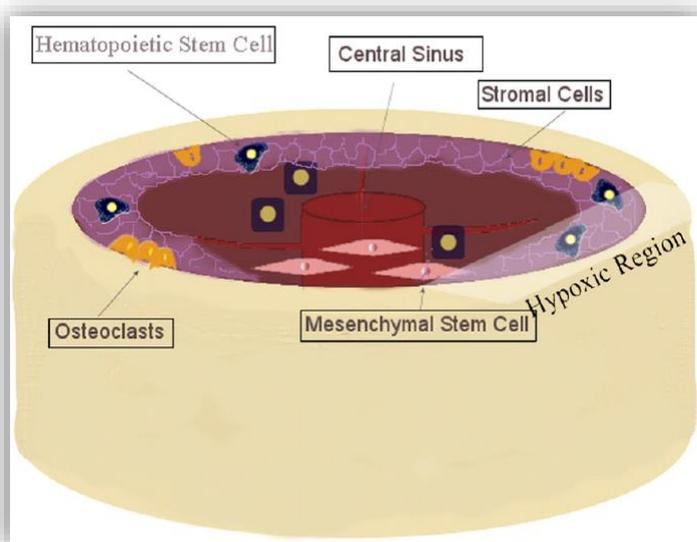


Figura 2. Anatomía de la médula ósea. La CMH (Hematopoietic stem cell) se sitúa en regiones hipóxicas de la médula ósea cercana al endostio. Las CMM (Mesenchymal stem cell) se localizan en zonas que rodean la vasculatura medular. Imagen tomada de Liu et al. 2007. Pag 31.

2. LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA

2.1 GENERALIDADES

La leucemia se define como la proliferación incontrolada de una población anómala de células inmaduras del tejido hematopoyético (blastos) que infiltran la médula ósea (MO) impidiendo la producción de las restantes células normales, e invaden la sangre y otros órganos. Existen dos grandes subgrupos dentro de las leucemias agudas: la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia mieloblástica aguda (LMA) según deriven de una célula de origen linfoide o mieloides respectivamente. Existe un tercer subgrupo menos frecuentes (<5% de casos) donde el clon proliferante expresa tanto antígenos mieloides como linfoides y se denomina leucemia mixta o de linaje ambiguo. Además, se distinguen dos tipos de leucemias agudas:

- Leucemia aguda primaria o de novo: surge sin ningún antecedente previo
- Leucemia aguda secundaria: aparece como evolución de otras hemopatías, por ejemplo síndromes mielodisplásicos (SMD), síndromes mieloproliferativos (SMP), o bien es consecuencia de la acción de conocidos carcinógenos como quimioterapia, radioterapia, accidentes nucleares o exposición a agentes químicos etc.

La leucemia mieloides o mieloblástica aguda (LMA) es una enfermedad heterogénea en la que se produce una proliferación clonal de progenitores mieloides de la MO que conduce finalmente al fallo medular y la muerte por infecciones y/o hemorragias.

Su diagnóstico se realiza mediante el examen de sangre periférica y de MO (Figura 3). La etiopatogenia de las LMA es desconocida, aunque se han descrito ciertas cromosomopatías, radiaciones ionizantes, fármacos mielotóxicos (fenilbutazona, cloranfenicol y citostáticos), sustancias químicas (benceno), virus (HTLV-1, Virus Epstein Barr, VIH), factores constitucionales (inmunodeficiencias, síndrome de Down, síndrome de Fanconi, factores raciales) y ciertos factores genéticos (inactivación de genes

supresores, activación de oncogenes) como factores implicados en la expansión del clon leucémico.

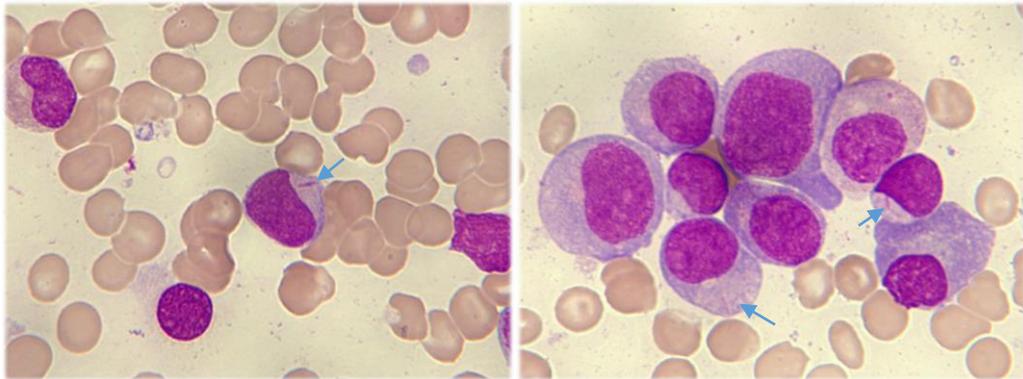


Figura 3. Examen citológico LMA. Extensiones de médula ósea con blastos mieloides con núcleos con cromatina finamente punteada. Se observan bastones de Auer (flecha). Imágenes cedidas por la sección de Citología del departamento de Hematología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

La incidencia media en la población general se sitúa entre 1 y 3 casos por cada 100.000 habitantes y año (San Miguel, Izquierdo, & Sánchez-Guijo, 2009) si bien varía enormemente en función de la edad (Juliusson et al., 2012).

La clínica general comprende síntomas constitucionales (pérdida de peso, astenia, debilidad), síntomas derivados de la infiltración de la MO (anemia, infecciones y diátesis hemorrágica) y síntomas específicos por infiltración leucémica de algún órgano o tejido: hepatoesplenomegalia, hipertrofia gingival, infiltración de la piel o sistema nervioso central (SNC).

2.2 CLASIFICACIÓN LMA

En 2001 la OMS publicó y posteriormente actualizó en 2008 un sistema de clasificación que incorpora e interrelaciona morfología, citogenética, genética molecular y marcadores inmunológicos (Döhner et al., 2010) (Tabla 1).

- LMA con anomalías genéticas características:
 - LMA con t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
 - LMA con inv(16)(p13;1q22) o t(16;16)(p13,1q22); CBFβ-MYH11
 - Leucemia promiilocítica aguda con t(15;17)(q22;q12); PML-RARα y variantes
 - LMA con anomalías 11q23. t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
 - LMA con t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
 - LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3)(q21;q26.2);RPN1-EV11
 - LMA megacarioblástica con t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
 - Entidad provisional: LMA con mutación NPM1
 - Entidad provisional LMA con mutación CEBPA
- LMA con cambios relacionados con mielodisplasia.
- Neoplasia mieloide relacionada con tratamiento
- LMA sin otra especificación
 - Leucemia mieloblástica aguda, mínimamente diferenciada (FAB M0)
 - Leucemia mieloblástica aguda sin maduración (FAB M1)
 - Leucemia mieloblástica aguda con maduración (FAB M2)
 - Leucemia mielomonocítica aguda (FAB M4)
 - Leucemia monoblástica aguda y leucemia monocítica aguda (FAB M5a y M5b)
 - Leucemias eritroides agudas (Leucemia pura eritroide y eritroleucemia (eritro/mieloide) (FAB M6a y M6b)
 - Leucemia megacarioblástica aguda (FAB M7)
 - Leucemia basofílica aguda
 - Panmielosis aguda con mielofibrosis
- Sarcoma mieloide
- Leucemias agudas de linaje ambiguo
- Neoplasias de células dendríticas con diferenciación blástica plasmocitoide
- Proliferaciones mieloides relacionadas con Síndrome de Down
 - Mielopoyesis anormal transitoria
 - Leucemia mieloide asociada a Síndrome de Down

Tabla 1. Clasificación LMA según la OMS (Organización mundial de la salud) 2008. LMA y neoplasias relacionadas.

2.3 EPIDEMIOLOGÍA

En Estados Unidos cada año se diagnostican 18.000 casos nuevos de leucemia aguda de las que más de 12.000 son definidas como LMA. Más de 10.000 mueren a causa de esta enfermedad lo cual representa el 2% de las muertes por cáncer (Siegel, Miller, & Jemal, 2015). La LMA es mucho más común entre la gente de mayor edad pasando de <2 casos por 100.000 habitantes/año en menores de 40 años a 5 casos por 100.000 habitantes/año a partir de los 60 años de edad. Existe un rápido incremento a partir de los 50 años y un pico de incidencia a los 80 años de edad de acuerdo con el registro estadounidense de Supervivencia, epidemiología y resultados finales (SEER) (Figura 4). En Estados Unidos se estiman alrededor de 20.000 casos nuevos de LMA y en torno a 10.000 defunciones por LMA en 2015 según registro SEER (Figura 5)

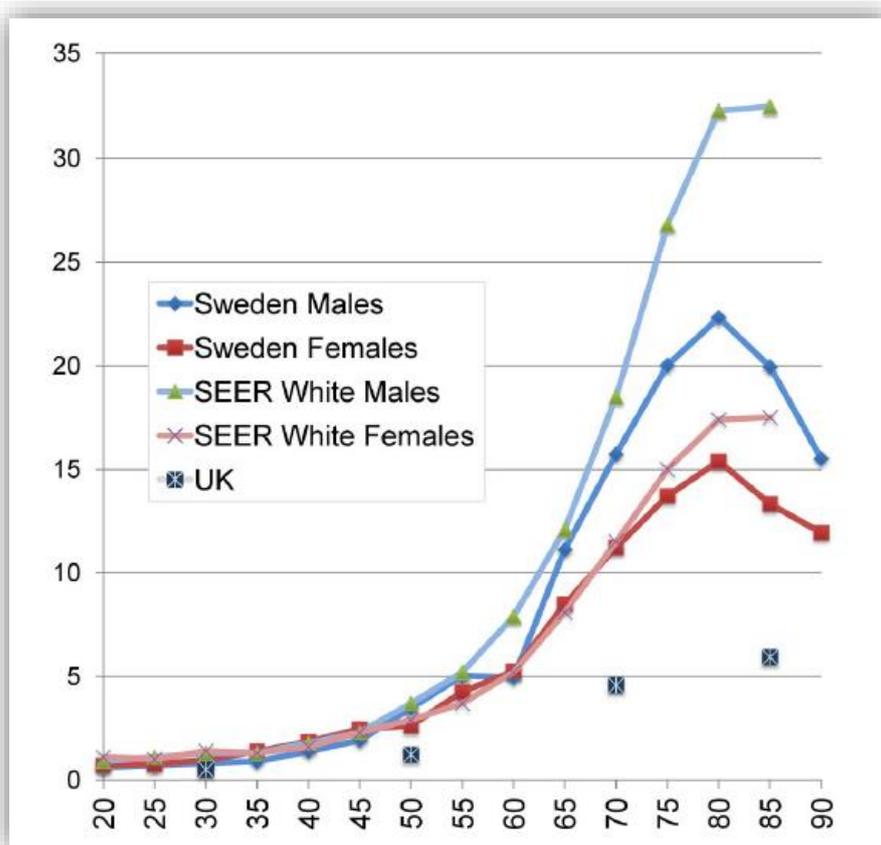


Figura 4: Incidencia LMA por edad: Incidencia anual de LMA por 100.000 habitantes (eje y) según edad (eje x) y sexo en Suecia entre 1997 y 2006, en el registro SEER entre 2004-2008 y en el Reino Unido. Imagen tomada de Juliusson et al. 2012 (Juliusson et al., 2012)

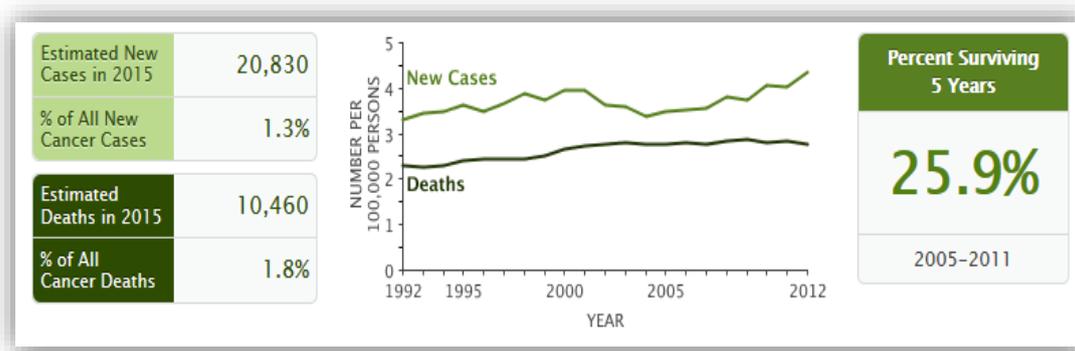


Figura 5: Incidencia y muertes por LMA. Registro SEER. El número de nuevos casos de LMA fue de 4 por 100.000 habitantes/año. El número de muertes fue de 2.8 por 100.000 habitantes/año. Estos datos están ajustados por edad y basados en registros desde 2008 hasta 2012

La leucemia es el cáncer pediátrico más frecuente siendo responsable del 30% de todos los cánceres infantiles. La LMA pediátrica es poco frecuente, se estima que afecta a 7 de cada millón de menores de 15 años y supone un 25% de las leucemias infantiles (Ursula Creutzig et al., 2012; Rubnitz & Inaba, 2012). La mayor incidencia ocurre en el primer año de vida con 1.6 casos por cada 100.000 niños al año, desciende a 0.2/100.000 durante la primera década de la vida y en la adolescencia se estima en torno a 0.4/100.000 (Schuback, Arceci, & Meshinchi, 2013). La incidencia global en el mundo varía entre 2 a 14.4 casos por millón (Puumala, Ross, Aplenc, & Spector, 2013). Es responsable de más de la mitad de las muertes por leucemia en estos pacientes (Manola, 2009).

Por otro lado, existe un número de enfermedades de diagnóstico en edad infantil que se asocian con una mayor incidencia de LMA: Anemia de Fanconi (mutación en genes reparadores del ADN), disqueratosis congénita, síndrome de Schwachman-Diamond's, agranulocitosis congénita, la neurofibromatosis tipo I y el síndrome de Noonan, este último asociado al desarrollo de leucemia mielomonocítica juvenil y menos frecuentemente a LMA.

La LMA se caracteriza por una gran heterogeneidad tanto clínica como biológica. En las últimas décadas, el diagnóstico y tratamiento de la LMA ha mejorado considerablemente en los últimos años alcanzando ratios de supervivencia global en torno al 70% a los 5 años (Ursula Creutzig et al., 2012). Aunque los distintos subtipos de LMA presentan pronósticos muy variables con una supervivencia esperable a los 5 años

que oscila entre 10-90%. Las tasas más altas de curación se dan en la leucemia promielocítica aguda.

2.4 ALTERACIONES CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES. FACTORES PRONÓSTICOS DE LA LMA

En la actualidad, el análisis citogenético al momento del diagnóstico de la LMA es considerado como uno de los factores pronósticos (Byrd et al., 2002; Grimwade et al., 2010). Los hallazgos citogenéticos a nivel cariotípico o su contrapartida molecular tienen un altísimo valor predictivo sobre las tasas de remisión, la supervivencia libre de enfermedad, el riesgo de recaída y la supervivencia global. El estudio citogenético es considerado en los protocolos de tratamiento para la asignación del riesgo siguiendo las recomendaciones del grupo European Leukemia Net (ELN) (Döhner et al., 2010).

Además de las alteraciones citogenéticas, la estratificación pronóstica de la LMA también se realiza en base al estudio de mutaciones. Así, en los últimos años se han identificado nuevos marcadores biológicos con impacto en el pronóstico de la LMA, como las mutaciones somáticas FLT3-ITD (dominio tirosin-kinasa 1), FLT3-D835 (dominio tirosin-kinasa 2), NPM1 (nucleofosmina) y mutaciones en el gen CEBPA que han mejorado la estratificación en cuanto riesgo de aquellos pacientes con citogenética normal (J. P. Patel et al., 2012).

Otras nuevas dianas incluyen TP53, WT1 y las implicadas en la modulación del epigenoma como TET2, ASXL1, IDH1 y 2 y DNMT3A. El gen más frecuentemente mutado es el FLT3 (FMS-like tyrosine Kinase 3) presente en el 30% de los adultos y el 15% de la población pediátrica (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013; J. P. Patel et al., 2012; Schuback et al., 2013) asociándose a peor respuesta quimioterápica y mayor incidencia de recaída.

El uso de nuevas tecnologías de secuenciación masiva como next generation sequencing (Schuback et al., 2013) es prometedor en la identificación de nuevas alteraciones.

Además de las alteraciones citogenéticas, la hiperleucocitosis al diagnóstico, el antecedente de SMD o las LMA secundarias así como la edad > 60 años y la ausencia de

remisión completa o persistencia de enfermedad mínima residual tras el tratamiento de inducción, son todos ellos considerados factores de mal pronóstico.

2.5 TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA MIELOBLÁSTICA AGUDA

A pesar de haberse alcanzado un progreso considerable en el diagnóstico y clasificación de la LMA en las últimas tres décadas, dos tercios de los adultos jóvenes y hasta el 90% de los mayores de 65 años fallecen a causa de su enfermedad. La mejora en el tratamiento de soporte, los progresos en el trasplante alogénico y un mejor conocimiento de la enfermedad y de los factores pronósticos han contribuido al aumento en la supervivencia en los últimos años. Sin embargo, los pilares del tratamiento actual de la LMA con agentes quimioterápicos, en concreto las antraciclinas y la citarabina a menudo asociado a un tercer fármaco (etopósido o tioguanina) mantienen combinaciones terapéuticas basadas en diseños de hace más de 30 años (Rowe & Tallman, 2010).

(Ursula Creutzig et al., 2004) además de las secuelas o complicaciones tardías de los trasplantes de progenitores hematopoyéticos (TPH).

Por otro lado, un elevado porcentaje de pacientes de edad mayor o igual a 65 años precisamente donde la prevalencia de la enfermedad es mayor, presentan patologías asociadas y mala tolerancia a los tratamientos, por lo que a menudo no son candidatos a recibir quimioterapia intensiva (Juliussen et al., 2009; Menzin, Lang, Earle, Kerney, & Mallick, 2002). De hecho, hasta un 30-70% de los pacientes mayores de 65 años no podrán recibir quimioterapia de inducción o no podrán continuar un tratamiento de consolidación. Todo esto, unido a las características biológicas de mal pronóstico frecuentes en la LMA del anciano (Döhner et al., 2010) hacen que la tasa de supervivencia a largo plazo sea sensiblemente inferior a la de los pacientes jóvenes.

En la edad pediátrica existe una mejoría en la supervivencia en las últimas décadas alcanzando supervivencia libre de enfermedad mayor del 50% y supervivencia global mayor del 60% en los ensayos clínicos más recientes. Sin embargo, las secuelas a largo plazo en el post-trasplante así como la enfermedad injerto contra huésped crónica o las secuelas neurológicas y endocrinológicas tienen gran relevancia en la edad

pediátrica. Además, los índices de curación de algunos subtipos de LMA son inaceptablemente bajos.

Aproximadamente el 70% de los adultos jóvenes y el 90% de los pacientes pediátricos alcanzan una primera remisión completa con el tratamiento de inducción. En la actualidad, el TPH alogénico proporciona el efecto antileucémico más potente conocido como parte del tratamiento de consolidación de la remisión porque reduce de forma significativa la tasa de recaída, por lo que se emplea habitualmente en las LMA de alto riesgo e incluso en las de riesgo intermedio a pesar de existir una mortalidad relacionada con el trasplante de hasta un 15-20% (Rowe JM, Li X, Cassileth PA, 2005).

(Forman & Rowe, 2013). Todo ello explica los resultados de supervivencia extremadamente pobres de estos pacientes. Por tanto, el desarrollo de nuevas terapias que se usen como puente hasta el trasplante o que reduzcan el riesgo de recaída es hoy día un reto terapéutico.

Con la identificación de nuevos marcadores moleculares se están diseñando nuevas drogas con dianas moleculares específicas para LMA: los fármacos anti CD45 (Pagel et al., 2009) y anti CD33 (Jurcic, 2012), la clofarabina en sustitución de la fludarabina, los agentes hipometilantes post-trasplante o los inhibidores de la histona deacetilasa, las células T específicas antileucémicas como CD33/CD3 (BiTE: bispecific T-cell engager) y los inhibidores del FLT3 son algunos de ellos. Desafortunadamente, los resultados preliminares con la mayoría de estos fármacos no están arrojando mejoras significativas en la supervivencia de estos pacientes. Por otro lado, la enorme heterogeneidad de la LMA hace que ciertas drogas experimentales sean beneficiosas para un subgrupo concreto de pacientes sin aparentes beneficios en la supervivencia global y que sea deseable una diana terapéutica común a los distintos subtipos de LMA. Además, con frecuencia no es posible administrar nuevos agentes terapéuticos en el contexto de ensayos clínicos por no estar disponibles o por limitaciones en los criterios de inclusión/exclusión en pacientes ancianos, pediátricos o con comorbilidades asociadas (Mengis, Aebi, Tobler, Dähler, & Fey, 2003). En estos casos, no existen alternativas terapéuticas adecuadas y tan solo disponemos de tratamiento de soporte con transfusiones y antibioterapia. Todo ello muestra la necesidad de encontrar nuevas dianas terapéuticas para desarrollar nuevas estrategias de tratamiento en la LMA.

2.6 PRONÓSTICO DE LA LMA

Con los protocolos adaptados al riesgo citogenético y molecular se obtienen de forma global entre un 60-80% de remisiones completas tras la inducción. Desafortunadamente casi un tercio de estos pacientes recaen.

Población pediátrica: Actualmente el 80-90% de los pacientes con LMA logran su primera remisión completa (Kaspers & Zwaan, 2007; Meshinchi & Arceci, 2007) (Rubnitz & Inaba, 2012). (Niewerth, Creutzig, Bierings, & Kaspers, 2010). Sin embargo, aproximadamente el 60% de los niños carecen de donante emparentado por lo que son necesarias otras fuentes de progenitores alternativas que asocian una mayor morbi-mortalidad (trasplante haploidéntico, trasplante de sangre de cordón o de MO de donante no HLA idéntico).

En niños, el protocolo actual de tratamiento de la LMA en España (SEHOP LMA 2007 + LPA 2005) permite alcanzar tasas de supervivencia libre de enfermedad del 46% a los 5 años (información presentada en el congreso de la Sociedad española de hematología y oncología pediátrica SEHOP 2015). Este grupo evalúa los resultados obtenidos con su protocolo previo de 2001 con una tasa de remisión completa del 90% equiparable a la de otros protocolos vigentes, datos de mortalidad precoz del 6,6% y una supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años del 47%, excluyendo la LMA promielocítica similares a los obtenidos por otros grupos (Tabla 2).

	RC (%)	S. G. (5 a.)	SLE (5 años)	Mortal. precoz	Fallo inducción
SHOP 01	90		47	6,6	3,1
MCR-AML10	93	58	49	4	3
MCR-AML12	92	66	56	4	4
CCG-2991	77	45	34	5	18
POG 8821	77,4	40	31	3,9	10,6
ANZCCSG	95	56	50	2	2,9
NOPHO91	92	66	50	2	3,8
BFM-98	88%	62	49	3,2	8,5

Tabla 2. Resultados protocolo SHOP LANL 2001 comparados con otros protocolos internacionales (Armendariz et al., 2005; U. Creutzig et al., 2005; Dluzniewska et al., 2005; Gibson et al., 2005; Kardos et al., 2005; Lie et al., 2005; Pession et al., 2005; Ravindranath et al., 2005; Ribeiro et al., 2005).

Población adulta: (Tallman, Gilliland, & Rowe, 2005). Cuatro grandes grupos oncológicos muestran datos de supervivencia global aproximada del 35% a los 5 años en pacientes < 60 años (Figura 6).

Las tasas de remisión de LMA están inversamente relacionadas con la edad (Juliussen et al., 2009, 2011) (Figura 7). Los registros y series de pacientes mayores de 60-65 años que han podido ser tratados con quimioterapia intensiva muestran tasas de supervivencia en torno al 15-20% al año y al 5-10% a los 5 años.

Tras una primera recaída, la probabilidad de lograr una segunda remisión completa es mucho menor (Forman & Rowe, 2013) y el tiempo libre de enfermedad es generalmente más corto por lo que el pronóstico de estos pacientes se ensombrece y continúa siendo un reto (Leopold & Willemze, 2002). Kurosawa y colaboradores encontraron una supervivencia global del 30% a los 3 años tras la primera recaída en 1015 pacientes adultos con LMA que habían recidivado (Figura 8) (Kurosawa et al., 2010).

Según datos de la ECOG y en concordancia con datos del grupo alemán y de M.D. Anderson Cancer Center, la supervivencia global a los 5 años de una recaída en LMA apenas alcanza el 10% (Rowe & Tallman, 2010) (Figura 9).

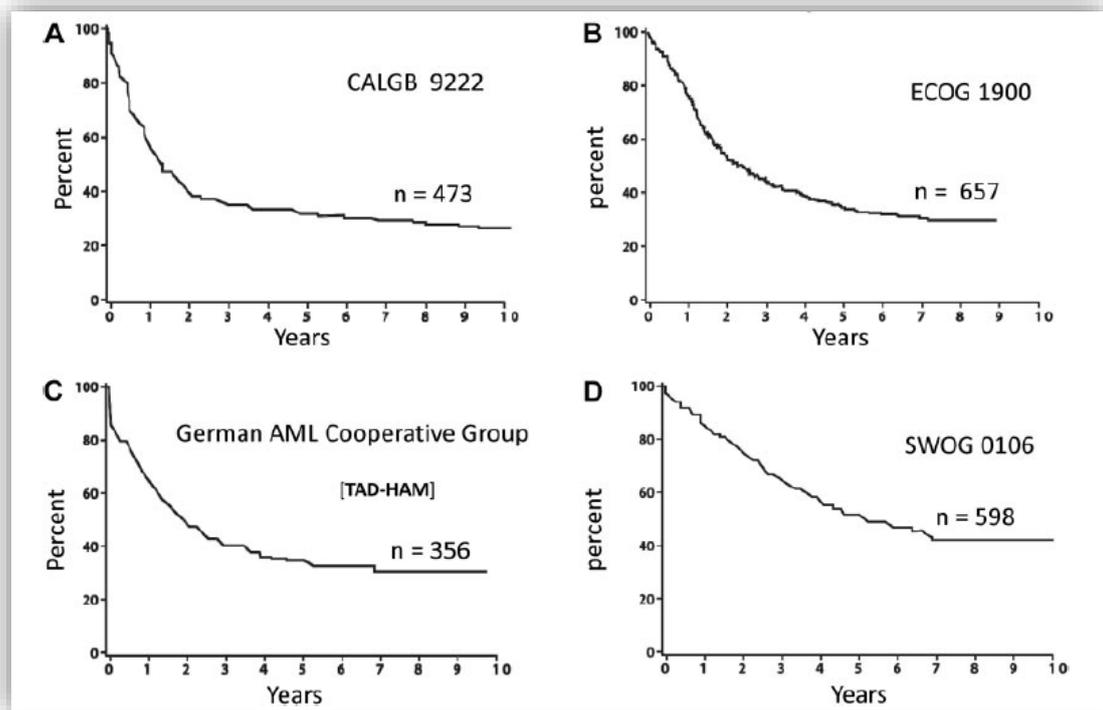


Figura 6: Supervivencia global desde el diagnóstico de adultos < 60 años con LMA. Supervivencia global aproximada del 35% a los 5 años. (n: número de pacientes reclutados). Imagen tomada de Rowe JM et al. Blood 2010. Pag 3148. Presenta los resultados de supervivencia recientemente publicados por cuatro grupos oncológicos cooperativos: (A) CALGB 9222. Tomado de Moore et al. (B) ECOG 1900. Tomado de Fernandez et al. (C) German AML Cooperative group. Tomado de Buchner et al. (D) SWOG 0106. (Büchner et al., 2009; Fernandez et al., 2009; J. O. Moore et al., 2005; Petersdorf et al., 2013)

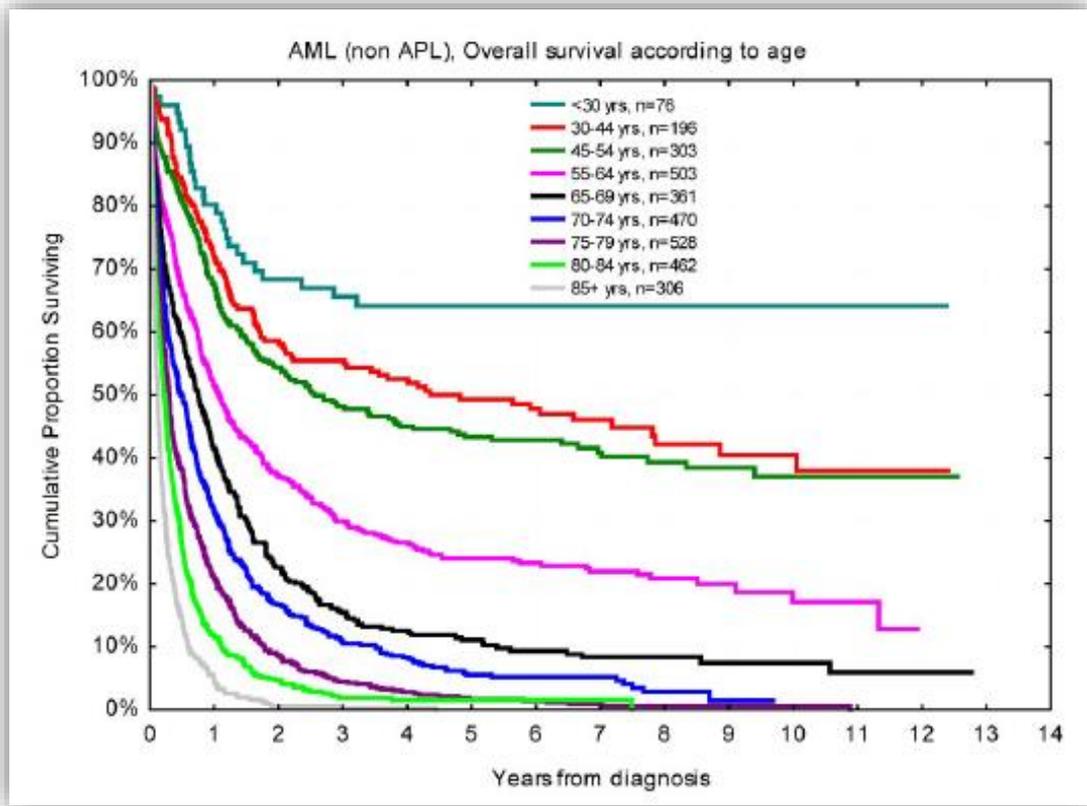


Figura 7: Supervivencia global de LMA inversamente relacionada con la edad. Supervivencia global de LMA sin incluir la leucemia promielocítica en el periodo 1997-2006 con seguimiento hasta Diciembre 2008. Imagen tomada de Juliusson et al. Blood 2012. (Juliusson et al., 2012)

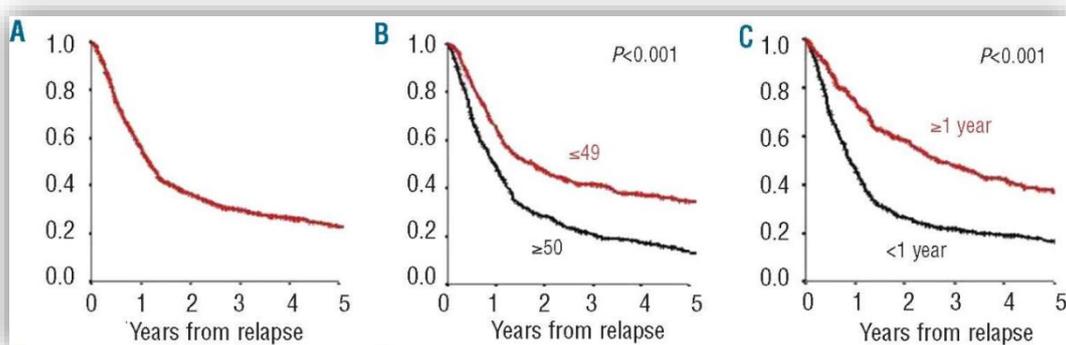


Figura 8. Supervivencia global LMA: tras primera recaída medular (A), supervivencia según edad (B) e intervalo libre hasta primera recaída (C). Gráfica tomada del trabajo de Kurosawa S. et al. (Haematologica 2010).

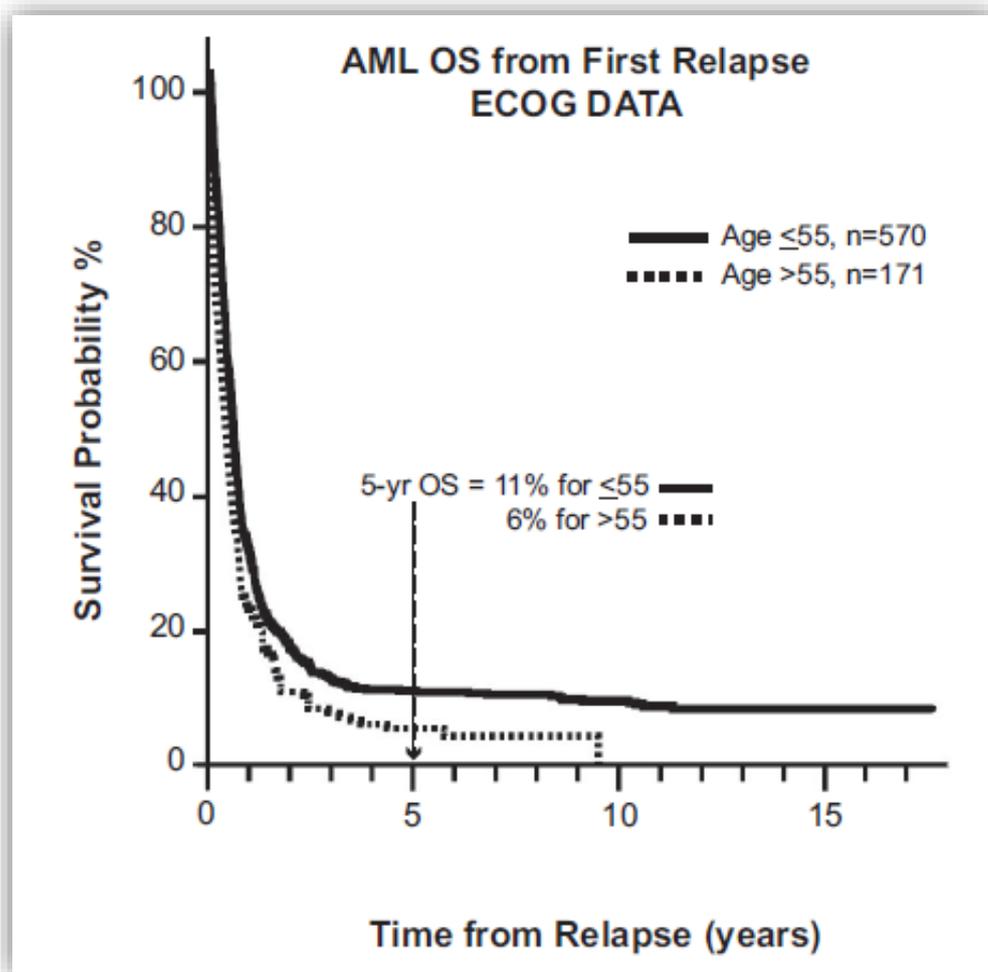


Figura 9. Supervivencia global de LMA después de una primera recaída. Datos de 8 registros de estudios de la ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group). Imagen tomada de Rowe et al. Se muestra una supervivencia a los 5 años en torno al 10% siendo inferior en los pacientes de mayor edad (línea discontinua).

En resumen, es crucial el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar la supervivencia a largo plazo de estos pacientes, especialmente para aquellos casos con enfermedad refractaria o recidivante en los que los tratamientos disponibles en la actualidad son insuficientes.

3. SUSTANCIA P Y RECEPTOR NK1

3.1 NEURONAS Y NEUROTRANSMISORES

En 1888, el premio Nobel español Don Santiago Ramón y Cajal mediante la aplicación del método de Golgi demuestra la auténtica organización estructural del sistema nervioso en unidades celulares independientes, las neuronas (Figura 10).

La comunicación neuronal se lleva a cabo mediante la liberación de pequeñas cantidades de mensajeros químicos que alteran la función de otra célula de manera breve o duradera y que se denominan neurotransmisores. Actúan en un lugar funcional y estructuralmente especializado denominado sinapsis.

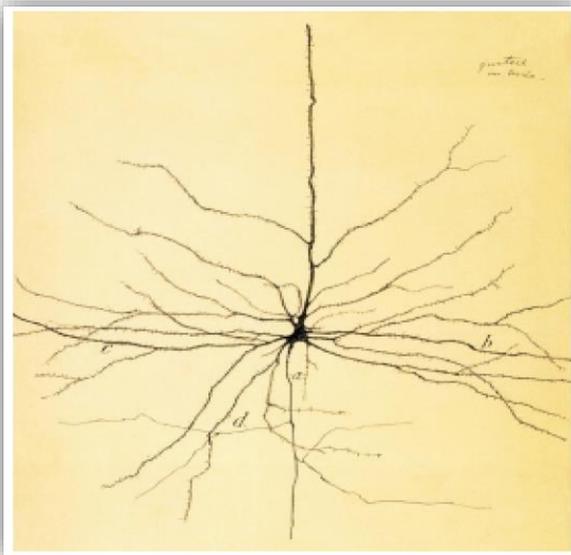


Figura 10. Neurona. Tomada del libro *Arte y neurología* (Antonio Martín-Araguz, 2005): Dibujo realizado por Ramón y Cajal para ilustrar las células piramidales impregnadas con el método de Golgi. *a*, axon; *b*, dendritas, *d*, colaterales axónicas."Esta figura fue reproducida en la *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados* (Cajal 1899b, 1904, figura 690). © Herederos de Santiago Ramón y Cajal.

Todas las sinapsis químicas están constituidas por tres elementos: un elemento pre-sináptico, un elemento post-sináptico y una hendidura sináptica (Alberts B, 2002)

(Figura 11). El elemento pre-sináptico representa la terminación nerviosa que contiene y libera el neurotransmisor, el cual se almacena en las vesículas sinápticas. La hendidura sináptica es un espacio de unos 20-30 nm de espesor que separa el elemento pre y post-sináptico. El elemento post-sináptico se compone de una membrana plasmática en la segunda neurona enfrentada a la hendidura sináptica. Cuando un impulso nervioso llega a la terminación de la neurona (axón pre-sináptico) se produce la liberación de transmisores químicos a la hendidura sináptica, los cuales se unen a receptores ubicados en la superficie de la célula post-sináptica, lo que a su vez desencadena fenómenos que abren o cierran conductos presentes en la misma membrana post-sináptica.

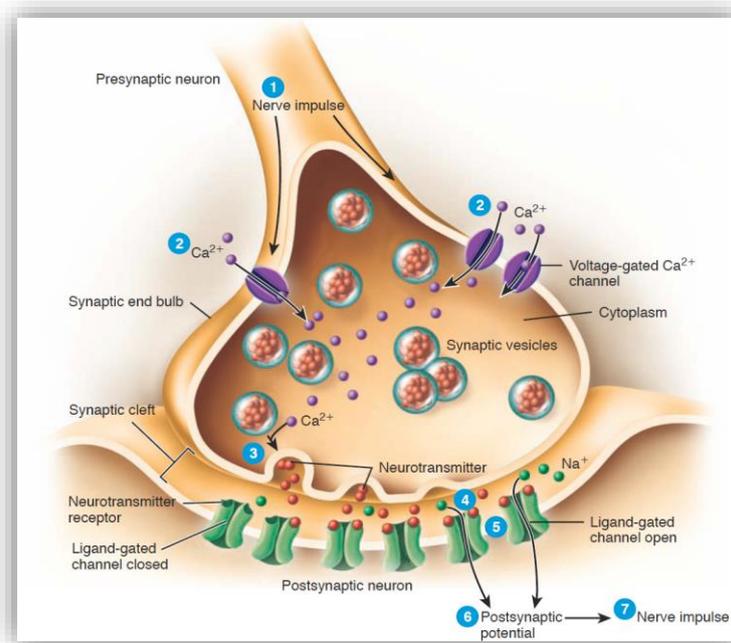


Figura 11. Representación esquemática de una (Tortora GJ & Derrickson B, 2009), capítulo 12).

En términos generales el sistema nervioso utiliza dos tipos principales de sustancias químicas para llevar a cabo la comunicación entre neuronas:

A. Transmisores de bajo peso molecular, fundamentalmente aminas y aminoácidos. Son los llamados neurotransmisores clásicos.

B. Transmisores peptídicos

3.2 NEUROPEPTIDOS

Uno de los hechos que más ha influido en la evolución del conocimiento del sistema nervioso central (SNC) ha sido el descubrimiento de la existencia de sustancias de naturaleza peptídica en la neurona diferente a los transmisores clásicos que permitían la comunicación neuronal.

En 1919 se habla por primera vez de la neurona como una célula secretora (Speidel CC, 1922). Este hecho fue confirmado por Bargmann W. (Bargmann W, 1968) utilizando la técnica de tinción de Gomori al encontrar unos gránulos en el interior de las neuronas que se desplazaban hacia los axones para producirse la liberación de los llamados neurotransmisores peptídicos o neuropéptidos (NP) (Ceballos M, 1997). Constituyen el mayor grupo de sustancias conocidas que intervienen en la comunicación célula-célula. Tienen un tamaño variable (3-40 aminoácidos) y actúan sobre tejidos neuronales y no neuronales.

3.2.1 SÍNTESIS, ALMACENAMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS NP

En el proceso de transmisión química, el NP casi siempre coexiste con uno o más neurotransmisores clásicos de manera que pueden actuar de forma complementaria modulando su acción o actuar de forma independiente (Whittaker VP, 1984). De esta manera los NP tienen la capacidad de actuar no sólo como neurotransmisores en una sinapsis, sino que poseen acciones moduladoras regulando la acción de otros neurotransmisores y acciones hormonales ya que pueden actuar sobre una población de receptores distantes tras liberarse directamente a la sangre o al líquido extracelular (acciones paracrinas) en otro (Strand FL, 1999).

Los NP cumplen los requisitos indispensables para ser considerados como neurotransmisores en sentido estricto (Ceballos M, 1997):

- ✚ Se sintetizan en la neurona.
- ✚ Están presentes en el terminal nervioso y se liberan en cantidades necesarias para ejercer su acción sobre la neurona post-sináptica o el órgano efector.

- ✚ Su administración exógena, en concentraciones apropiadas, provoca el mismo efecto que el obtenido cuando la sustancia se libera de forma endógena.
- ✚ Existe un mecanismo específico para eliminar la sustancia del espacio sináptico.

Además de estas cuatro características clásicas de los neurotransmisores, los NP se diferencian de ellos porque se fabrican en el cuerpo celular, se almacenan en vesículas alejadas de la membrana sináptica y se transportan a lo largo de los axones hasta los terminales sin que tenga lugar una recaptación ni tampoco síntesis a nivel del terminal nervioso (Hökfelt, Johansson, Ljungdahl, Lundberg, & Schultzberg, 1980). A diferencia de ellos, los neurotransmisores pequeños se sintetizan en los terminales sinápticos y se mantienen constantes por un eficiente mecanismo de reemplazo.

La potencia de acción de los NP es mayor que la de los neurotransmisores clásicos por varias razones: las concentraciones requeridas para activar a sus receptores son menores, actúan a través de vías intracelulares que pueden proporcionar una amplificación significativa de su señal y finalmente, los mecanismos de eliminación de los NP de la hendidura sináptica son más lentos por lo que permanecen accesibles a sus receptores durante períodos más largos (Fuxe et al., 1994).

3.2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS NEUROPEPTIDOS

Se han realizado diversas clasificaciones de los NP según diferentes criterios como son su localización tisular o su estructura y secuencia de aminoácidos; este hecho ha llevado a dividir a los NP en familias a veces con funciones similares o incluso solapadas. En la Tabla 3 se muestran los principales NP de mamíferos y se incluyen algunos de los recientemente descubiertos.

HIPOTALÁMICOS	HIPOFISARIOS
Hormona liberadora de la tirotrópina	Vasopresina
Somatostatina	Oxitocina y prolactina
Hormona liberadora de la corticotropina	Hormona adrenocorticotropa (ACTH)
Hormona liberadora de las gonadotropinas	Hormona estimuladora de melanocitos
Hormona liberadora de la hormona de crecimiento	Hormona de crecimiento
Orexinas A y B	Hormona estimulante folículo y luteinizante
	Hormona estimulante de tiroides
	Secretoneurina
GASTROINTESTINALES Y PANCREÁTICOS	PÉPTIDOS OPIOIDES
Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP)	Metendefalina
Colecistocinina	Leu-encefalina
Gastrina	Dinorfina
Insulina y glucagón	β-endorfina
Motilina y amilina	
Péptido relacionado con el gen de la calcitonina	
Galanina y secretina	
Neuropéptido Y	
Polipéptido pancreático	
Péptido tirosina-tirosina	
	TAQUICININAS
	<u>Sustancia P</u>
	<u>Neurokinina A</u>
	<u>Neurokinina B</u>
	<u>Neuropéptido K y Neuropéptido y</u>
OTROS	
Angiotensina II	Péptido natriurético cerebral
Bombesina	Urocortina
Bradicinina	Endomorfina 1 y 2
Neurotensina	Nociceptina/ Orfanina
Neuropéptido FF	Nocistatin
Péptido liberador de prolactina	Cortistatina
Péptido regulador de la cocaína y anfetaminas	Apelina

Tabla 3: Clasificación de los principales NP de mamíferos (resaltado el grupo de las Taquicininas) (García-López, Martínez-Martos, Mayas, Carrera, & Ramírez- Expósito, 2002).

3.2.3 MECANISMO DE ACCIÓN

En la sinapsis peptidérgica se produce una despolarización de la terminal presináptica seguida de una apertura de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes que promueven la movilización de las vesículas que contienen el NP para fusionarse con la membrana plasmática y así liberar el NP que interactúa con los receptores post-sinápticos de la superficie celular (Dobrescu, 1998). Esta interacción entre el NP y el receptor normalmente da lugar a un cambio en la estructura tridimensional del receptor, fenómeno que origina una cascada de eventos en la célula que se traducirá en una respuesta celular.

En 1987 se aisló por primera vez un receptor neuropeptídico, un clon de ADNc del receptor de la sustancia K a partir de una genoteca de ADNc bovino (Masu et al., 1987). Este primer receptor peptídico clonado pertenecía a la familia de receptores acoplados a proteína G (RAPG). Después fueron clonados los receptores de la sustancia P (Hershey & Krause, 1990) y la neurotensina (Tanaka, Masu, & Nakanishi, 1990), y se comprobó que todos ellos pertenecían a la misma familia.

En general, estos receptores RAPG contienen un lugar de reconocimiento para el ligando y un lugar de reconocimiento para una proteína G particular. Están constituidos por una cadena única de 400 a 600 residuos de aminoácidos. Estructuralmente estos receptores se caracterizan por la existencia de siete tramos de 22-28 residuos hidrófobos separados por segmentos hidrófilos. Estos segmentos transmembrana forman haces de hélices estrechamente empaquetados que atraviesan la membrana (Hadley ME, 1997).

La unión del NP a su receptor provoca la activación de una enzima, generalmente una adenilatociclasa, que cicla nucleótidos localizados en la superficie interna de la membrana y convierte ATP en AMPc el cual se combina con una protein-quinasa dependiente de adenilatociclasa (PKA). Otros NP actúan a través de la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂), que da lugar a la formación de otro grupo de segundos mensajeros como el diacilglicerol y el inositol trifosfato. (Figuras 12 y 13).

Aunque en la actualidad se ha clonado al menos un receptor para casi todos los tipos de NP conocidos, el número total de receptores se desconoce. Además se ha descrito que NP diferentes, aunque relacionados, puedan unirse al mismo receptor (Massot et al., 1996; McLatchie et al., 1998), hallazgo que abre un campo importante en

el estudio de la plasticidad de los receptores.

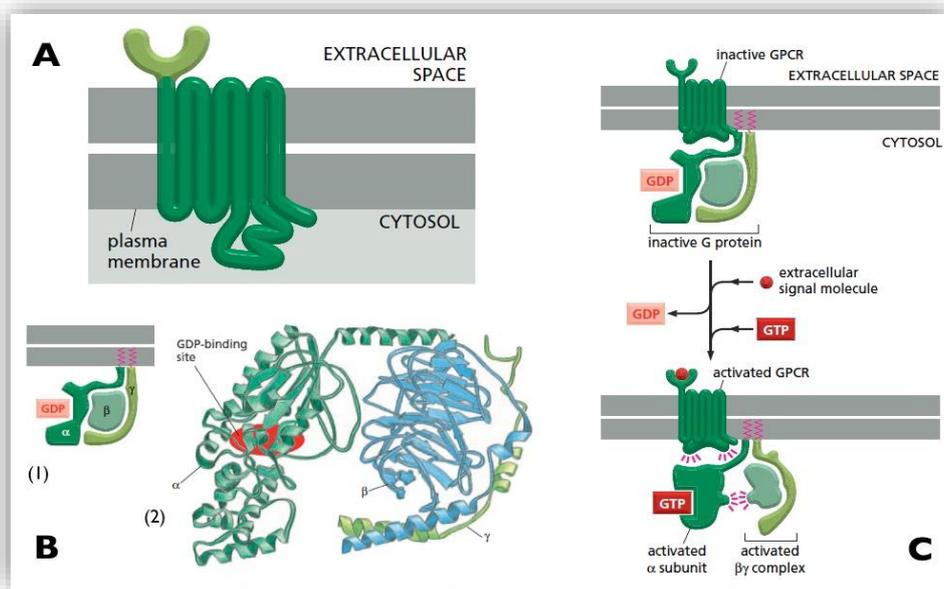


Figura 12: Receptor acoplado a proteína G. **A.** Estructura del receptor con sus siete dominios transmembrana. **B.** Estructura de una proteína G inactiva con sus subunidades α , β y γ en una representación esquemática (1) y tridimensional (2). **C.** Activación de la proteína G tras la unión del receptor transmembrana a su ligando (Alberts, 2008).

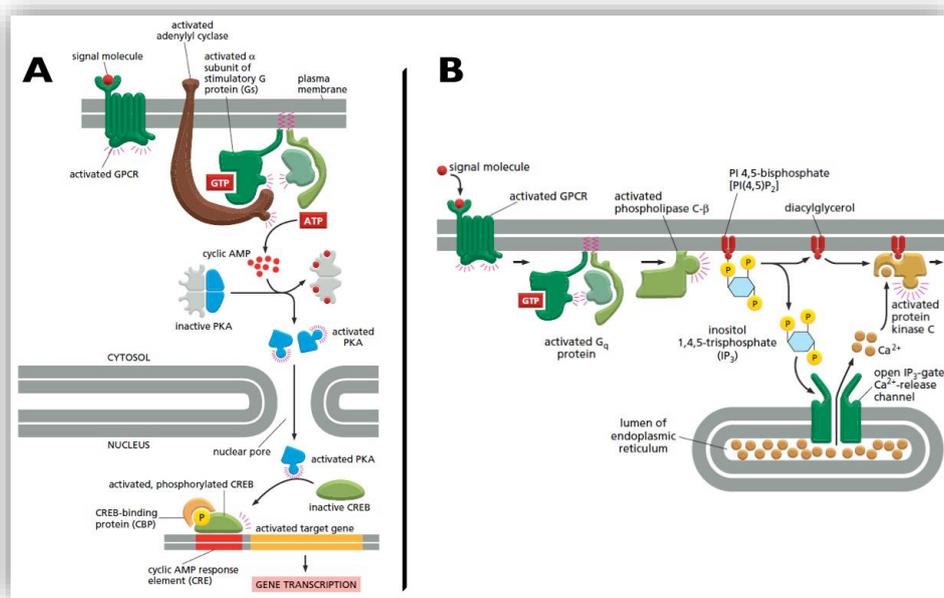


Figura 13: Mecanismos efectores de la proteína G. **A.** Vía de la adenilato ciclasa y proteincinasa A (PKA). **B.** Vía del fosfatidil inositol bifosfato (Alberts, 2008).

3.3 TAQUICININAS

3.3.1 ESTRUCTURA PEPTÍDICA Y GENÉTICA

Las taquicininas (TK) son una familia de péptidos de pequeño tamaño cuya estructura primaria se encuentra bastante conservada entre diferentes especies animales. Por definición, las TK comparten una región hidrofóbica Carboxi-terminal (C-terminal), FXGLM-NH₂, donde X es siempre un residuo hidrofóbico y la metionina final está amidada (Almeida et al., 2004). Esta región C-terminal del péptido es determinante para la activación e interacción con su receptor taquicinérgico (Maggi, 1995), mientras que en el otro extremo del péptido, las diferentes secuencias amino-terminales con características hidrofílicas les confieren mayor o menor afinidad para cada subtipo del receptor (Cascieri et al., 1992; Ingi, Kitajima, Minamitake, & Nakanishi, 1991).

Hasta hace poco sólo se habían identificado y secuenciado las tres principales TK como NP de 10-11 aminoácidos de longitud: Sustancia P (SP) en 1931 y neurokinina A (NKA) y neurokinina B (NKB) en la década de los 80'. La NKA se presenta también en sus dos formas elongadas: neuropéptido K y neuropéptido-γ (NPK y NPy). En el año 2000, se amplía esta familia con el descubrimiento de una cuarta TK en ratones la cual se denominó hemokinina 1 (HK-1) por su expresión en el tejido hematopoyético (Y. Zhang, Lu, Furlonger, Wu, & Paige, 2000; Yu Zhang & Paige, 2003) y que llevó a la creación de un nuevo grupo de TK, las endokininas. Las endokininas A y B son formas elongadas por el extremo amino-terminal de la HK-1 (Tabla 4).

Las TK están codificadas por tres genes diferentes llamados pre-protaquicininas: TAC1, TAC3 y TAC4 de acuerdo con la nomenclatura oficial de la Human Genome Organization (HUGO) (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature). Estos términos reemplazan a los que se usaban previamente: PPT-A/PPT-I para el TAC1, PPT-B o PPT-II para el TAC3 y PPT-C para el actual TAC4 (Patacchini, Lecci, Holzer, & Maggi, 2004).

TAQUICININAS	Nº aa	Gen	Secuencia de aminoácidos ^a
Sustancia P	11	TAC 1	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂
Neurokinina A	9	TAC 1	His-Lys-Thr-Asp-Ser- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂
Neuropéptido K y γ	36 y 21	TAC 1	--- His-Lys-Thr-Asp-Ser- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂
Neurokinina B	10	TAC 3	Asp-Met-His-Asp-Phe- Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂
Hemokinina 1	11	TAC 4	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂
Endokinina A y B	47 y 41	TAC 4	---Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln- Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂
Endokinina C y D ^b	14	TAC 4	---Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-THR- Phe-Gln-Gly-Leu-Leu-NH₂

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de los neuropéptidos que integran la familia de las TK de mamíferos.

a. Los aminoácidos (aa) en negrita son los que conforman la secuencia C-terminal común de las TK. Subrayado se representa el residuo aromático de la posición 4 C-terminal de cada TK (Phe: fenilalanina) o alifático (Val: valina)

b. Péptidos relacionados con las TK (*tachykinin-like*).

El gen TAC1 fue el primero que se clonó en 1983 de cerebro bovino. Inicialmente se pensó que dos genes diferentes codificaban para SP (TAC1) y NKA (TAC2). Posteriormente se demostró que la NKA se codificaba a partir de empalme o splicing alternativo del mismo gen TAC1 del que existen 4 isoformas (α -TAC1, β -TAC1, γ -TAC1 y δ -TAC1). Como se muestra en la figura 14, la sustancia P está contenida en el exón 3 y la NKA en el exón 6. De esta manera, cualquiera de los transcritos es capaz de producir SP, mientras que NKA sólo puede ser codificado por las isoformas β y γ . Por tanto, la distribución cuantitativa de SP y NKA, va a estar en función del procesamiento alternativo de los pre-ARNm de TAC1.

El gen TAC 4 mediante inclusión o exclusión de los exones 3 y 4 genera 4 posibles transcritos que dan lugar a diferentes endocinas (A, B, C y D). La HK1 propuesta por Kurtz y colaboradores está codificada por el exón 2 que está presente en todos los transcritos (Kurtz et al., 2002).

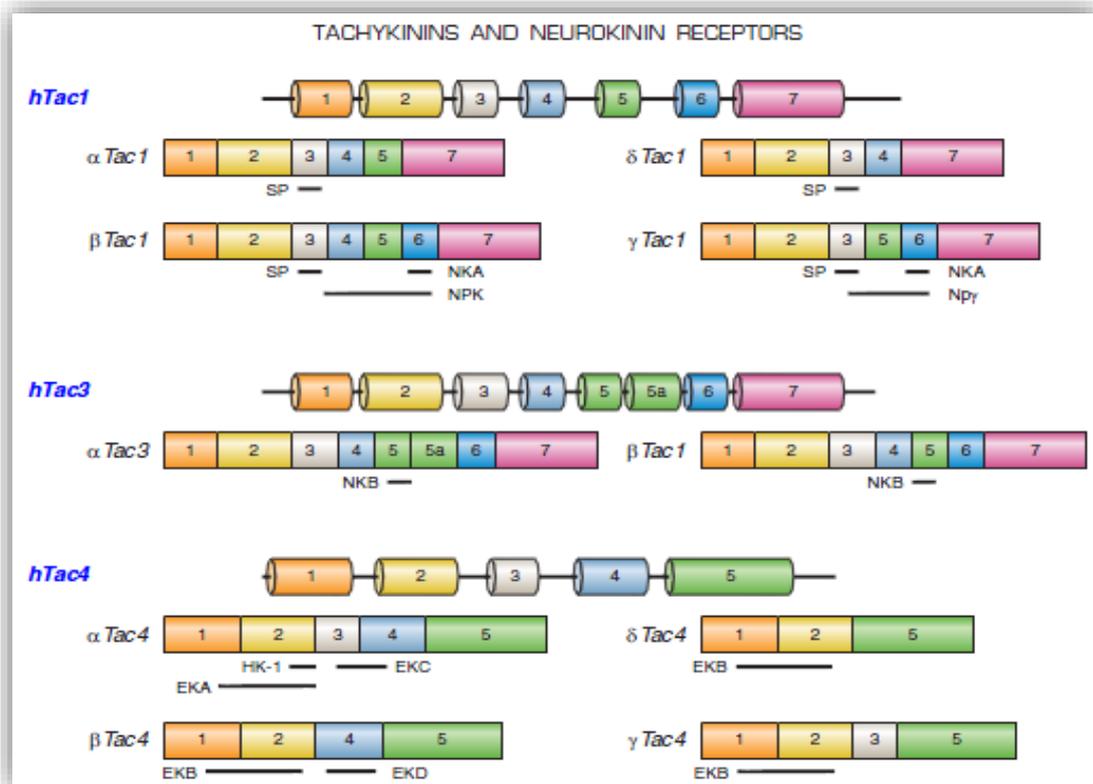


Figura 14. Estructura de los genes TAC y sus variantes de empalme. Producción de las distintas taquicininas. Imagen tomada de Steinhoff MS et al. *Physiol Rev* 2014. (Steinhoff, von Mentzer, Geppetti, Pothoulakis, & Bunnnett, 2014)

En relación a la localización de las TK, se demostró la expresión del gen TAC 1 en la práctica totalidad de tejidos humanos (Strand FL, 1999): cerebro, piel, corazón, tracto gastrointestinal y respiratorio, sistema urinario, células tirotropas de la glándula pituitaria (Brown, Roth, & Krause, 1991), células endoteliales (Linnik & Moskowitz, 1989), glándulas mamarias (Pinto et al., 2004) así como en la mayor parte de las células sanguíneas inmunes (Pernow, 1983; Weinstock, Blum, Walder, & Walder, 1988), en sangre periférica y tejido no neuronal del sistema inmune así como en células inflamatorias (Khare, Albino, & Reed, 1998). Respecto a TAC3, se demostró que NKB se expresaba incluso en tejido totalmente desprovisto de inervación como la placenta (M. Muñoz, Pavón, et al., 2010; N. M. Page et al., 2000), mientras que TAC4 presentaba una expresión principalmente en tejido periférico no inervado (Zhang et al., 2000).

3.3.2 RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS

Las TK ejercen su acción mediante la unión a diferentes subtipos del receptor taquicinérgico de la familia RAPG tipo 1 (receptores acoplados a proteína G) o *rhodopsin-like* (Nakanishi, 1991; Severini, Improta, Falconieri-Erspamer, Salvadori, & Erspamer, 2002). Existen tres receptores taquicinérgicos de la familia RAPG que han sido farmacológicamente y genéticamente tipificados: Receptor NK1 (NK1R), receptor NK2 (NK2R) y receptor NK3 (NK3R).

El NK1R es una proteína de 407 aminoácidos similar en todas las especies; en cambio, la estructura del NK2R (398 aminoácidos en humanos) y NK3R (465 aminoácidos en humanos) varía entre diferentes especies. Se ha postulado que la alta conservación entre especies de la estructura del NK1R es debida a la necesidad de éste de interactuar con más de un ligando de alta afinidad (Almeida et al., 2004; Pennefather et al., 2004).

Estos receptores pertenecen a una gran superfamilia de receptores que interaccionan con la proteína G y que ocupan aproximadamente el 1% del genoma. Los receptores NK1R, NK2R y NK3R son codificados por tres genes TACR1, TACR2 y TACR3 (Hershey, Dykema, & Krause, 1991). Estos genes contienen 5 exones con intrones que interrumpen la secuencia de codificación de la proteína en posiciones idénticas (Figura 15). Por su estructura típica también se les llama receptores de los siete dominios transmembrana.

Los tres subtipos del receptor están heterogéneamente distribuidos en cada especie (Pinto et al., 2004). En mamíferos, el receptor NK1 se expresa de forma ubicua, encontrándose en neuronas, endotelio vascular, músculo, células inmunes y médula ósea entre otros (Patacchini & Maggi, 2001). En todas estas células el NK1R está constitutivamente expresado, a diferencia de la médula ósea, donde (P. S. Bandari et al., 2002) (P. S. Bandari et al., 2002). El receptor NK2R presenta una distribución mayoritariamente en tejidos periféricos (Pennefather et al., 2004), mientras que el receptor NK3R se expresa en mayor grado en el SNC (Pinto et al., 2004) aunque también se ha visto en ciertos tejidos periféricos (Lecci & Maggi, 2003) como placenta, útero, músculo esquelético y ciertas neuronas entéricas del intestino de diferentes especies entre otros (Lecci & Maggi, 2003; N. M. Page et al., 2000). (Pennefather et al., 2004) (Pennefather et al., 2004)

Figura 15. Representación esquemática de la organización de los genes que codifican los receptores taquicinérgicos humanos. Las regiones codificantes de los genes se dividen en cinco exones (I-V) separados por cuatro intrones (líneas discontinuas). Se identifican los segmentos transmembrana (TM) codificados por cada exón. Imagen tomada de (Pennefather et al., 2004).

En términos generales podemos decir que NK1R tiene mayor afinidad por la SP, el receptor NK2R por la NKA y el receptor NK3R por la NKB (Tabla 5 y 6). Sin embargo, a fecha de hoy, está demostrado que cualquier TK puede actuar como agonista de cualquier subtipo de receptor aunque con afinidades considerablemente diferentes. (Maggi, Patacchini, Rovero, & Giachetti, 1993; Regoli, Boudon, & Fauchère, 1994).

Tipo receptor taquicinérgico	Proteína. Nº aminoácidos	Gen	Orden de afinidad para las taquicininas
NK1R	407	TACR1	SP* y HK1** > NKA > NKB
NK2R	398	TACR2	NKA > NKB > SP
NK3R	465	TACR3	NKB > NKA > SP

Tabla 5: Comparación de la afinidad de las TK por cada tipo de receptor taquicinérgico.

* La SP es el ligando endógeno principal del NK1R

** Se sugiere que HK-1 sería ligando de NK1R en tejido periférico no innervado

El NPK y NPy como formas elongadas de la NKA que son, se unen con mayor preferencia a NK2R, aunque también poseen alta afinidad por NK1R (Burcher, Alouan, Johnson, & Black, 1991). Tanto la HK-1 como la EKA y EKB presentan alta afinidad por el receptor NK1 con una potencia de activación similar a la SP, lo que se traduce en la producción de efectos casi idénticos a la SP a nivel periférico y por ello nos referimos en ocasiones a la HK-1 y endokininas como SP-like HK (Kurtz et al., 2002; Nigel M. Page et al., 2003; Y. Zhang et al., 2000). Así mismo se sugiere que estas SP-like HK pudieran ser el ligando endógeno principal del NK1R en el tejido periférico en especial en los tejidos no innervados (Nigel M. Page et al., 2003).

TAQUICININAS	Afinidad receptor	Secuencia de aminoácidos ^a
Sustancia P	NK1R	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Hemokinina 1	NK1R	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neurokinina A	NK2R	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂
Neurokinina B	NK3R	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂

Tabla 6: Secuencia de aminoácidos de las TK. Relación entre la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal y la afinidad por un subtipo de receptor taquicinérgico.

En negrita región pentapeptídica carboxi-terminal común a las TK

Subrayado: Aminoácido en posición 4 C-Terminal. El residuo aromático fenilalanina (Phe) determina una selectividad incrementada hacia NK1-R. Los aminoácidos que ocupan la posición 7 del extremo C-terminal (en rojo) si son residuos básicos o neutrales como Gln: Glutamina y Ser: Serina, tienen preferencia por NK1R. Asp: Acido aspártico (aminoácido ácido).

3.4 SUSTANCIA P

En 1931 Ulf von Euler, un joven farmacéutico sueco, describió por primera vez la presencia en el cerebro e intestino de caballo de un factor resistente a la atropina con una potente capacidad para estimular la contracción muscular y disminuir la presión sanguínea (V Euler & Gaddum, 1931). Comprobó que este compuesto mantenía su actividad cuando, tras evaporarse, se convertía en un polvo seco, motivo por el que lo llamó "P" (de powder, polvo en inglés) (Hökfelt, Pernow, & Wahren, 2001)). A comienzos de la década de los 70, Susan Leeman y colaboradores fueron los primeros en identificar la SP como un undecapéptido (M. M. Chang, Leeman, & Niall, 1971) con la siguiente estructura de aminoácidos: **Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂**. Se consiguió sintetizar el compuesto (Tregear, Niall, Potts, Leeman, & Chang, 1971) y poner a punto las técnicas de radioinmunoensayo (Powell, Leeman, Tregear, Niall, & Potts, 1973). De esta manera se pudieron estudiar los modelos fisiológicos de la SP mediante anticuerpos y estudios inmunohistoquímicos que permitieron demostrar la liberación de

SP en diferentes tejidos con anticuerpos selectivos frente a SP (Severini et al., 2002).

En el SNC la SP se localiza en la corteza cerebral en las áreas somatomotora, somatosensorial, visual y olfatoria. Sin embargo, es a nivel subcortical donde se hallan los mayores niveles de este péptido en los núcleos caudado y putamen presentando una densidad muy elevada de somas celulares que expresan SP con proyecciones de fibras axonales hacia la sustancia negra. De esta forma el área nigro-estriada supone una de las áreas de mayor concentración del péptido. También hallamos SP en los núcleos amigdalares del hipocampo (área asociada con el comportamiento emocional), cápsula interna y séptum. Recientemente se ha descrito la existencia de SP en las células gliales del hipocampo (Blanco Martínez B, 2012). En el tronco encéfalo se localiza entre los principales núcleos neuronales (destacando el trigémino), y en la médula espinal sobre todo a nivel de las astas posteriores. A nivel del sistema nervioso periférico, la SP se localiza principalmente en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios espinales, cadena cervical simpática y en los ganglios yugular, nodoso y trigeminal (J.-C. Beaujouan, Torrens, Saffroy, Kemel, & Glowinski, 2004).

En el resto del organismo, la SP está ampliamente distribuida localizándose alrededor de los vasos sanguíneos o terminaciones nerviosas en la mayoría de órganos y tejidos: piel, folículos pilosos, glándulas sudoríparas, aparato respiratorio, genitourinario y cardiovascular, en los plexos mientérico y submucoso del sistema digestivo e incluso en la pulpa dentaria (Pernow, 1983; Severini et al., 2002; Shimizu, Matsuyama, Shiina, Takewaki, & Furness, 2008). También se ha descrito la presencia de SP en la placenta, órgano carente de inervación (Marzoni et al., 2005; M. Muñoz, Pavón, et al., 2010) y en las células del sistema inmune.

El hexapéptido SP(6-11) representa el fragmento mínimo con capacidad para activar el NK1R (Almeida et al., 2004) (Figura 16). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que fragmentos N-terminales como SP(1-4) y SP(1-7) son activos metabólicamente (Joshi et al., 2001; Q. Zhou & Nyberg, 2002), en ocasiones con efectos opuestos a la SP completa (Hallberg & Nyberg, 2003).

Secuencia de aminoácidos

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----

Sustancia P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂ extremo C-terminal
Septide (6-11)	pGlu-Phe-Phe-Pro-Leu-Met-NH ₂

Figura 16. Secuencia de aminoácidos de SP (undecapéptido) y [pGlu⁶,Pro⁹]SP(6-11) o “Septide”

La SP como el resto de TK realiza su acción como neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona. Su actividad neurotransmisora fue propuesta ya en la década de los 50 (Lembeck, 1953). Tras ser liberada del terminal presináptico en respuesta al estímulo despolarizante, la SP se inactiva fundamentalmente a través de la degradación por peptidasas (tripsina y pepsina). En cambio resiste la acción de las carboxipeptidasas (Pernow, 1983) y tampoco participan en su inactivación mecanismos de recaptación. Benuck y colaboradores aislaron en 1975 una enzima parcialmente purificada a partir de cerebro de rata que presentaba actividad proteolítica sobre la SP (Benuck & Marks, 1975). Era una metaloproteasa denominada endopeptidasa neutra (EPN) también conocida como encefalinasa. Curiosamente, la EPN es idéntica al antígeno común de la leucemia aguda linfoblástica común CALLA positiva, un marcador proteico de la leucemia aguda linfocítica (Eberlin, Mück, & Michel, 2012; Offermanns & Rosenthal, 2008; Painter et al., 1988).

3.5 RECEPTOR NK1

El NK1R pertenece a la familia de receptores tipo RAPG. Su estructura consiste en siete hélices transmembrana conectadas entre sí a través de tres bucles intracelulares y otros tres extracelulares, con un extremo N-terminal extracelular y otro C-terminal intracelular (Figura 17) El núcleo lo conforma el haz de siete α -hélices transmembrana contraídas y estabilizadas como resultado de sus mutuas interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y una red de enlaces en este entorno lipofílico. Los bucles extracelulares se organizan en cuatro filamentos de hoja plegada- β , mientras que los intracelulares carecen de estructura determinada (Okada & Palczewski, 2001; Stenkamp, Teller, &

Palczewski, 2002). Mediante el modelo de la rodopsina conocemos que, tras la unión al ligando, la traducción de la señal en los RAPG se lleva a cabo mediante una reordenación del haz de α -hélices que induce un cambio de conformación en la superficie citoplasmática del receptor que es transmitido a la proteína G para que complete el mecanismo de señal (Ernst & Bartl, 2002).

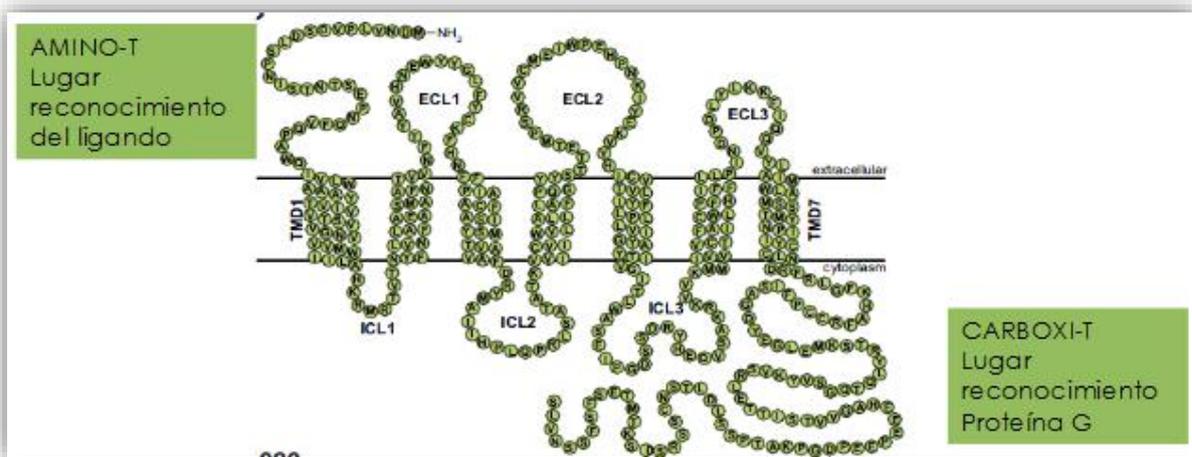


Figura 17: Estructura del receptor NK1R en su forma completa tomada de Steinhoff et al. 2014. Se muestran los tres bucles extracelulares (ECL 1, 2 y 3) y los tres bucles intracelulares (ICL1, 2 y 3). A la izquierda el extremo amino-terminal como sitio de reconocimiento de su ligando e implicado en la afinidad neuropéptido-receptor. A la derecha el extremo carboxi-terminal, sitio fundamental para la activación del receptor mediante la unión a proteína G.

Con el desarrollo del primer antagonista no peptídico del NK1R (CP-96,345), se pudo analizar el sitio de unión de la SP con el NK1R. Se demostró que la SP por su carácter hidrofílico se une al receptor en los giros extracelulares del segundo y tercer dominio transmembrana (Figura 18). Por el contrario, los antagonistas no peptídicos por su naturaleza hidrófoba tienen su lugar de unión al NK1R localizado más profundamente, entre los segmentos transmembrana III, IV y V y VI, a diferencia de la SP (Figura 20) (Gether et al., 1993; Hökfelt et al., 2001). Aunque hay escaso solapamiento entre los distintos sitios de unión de la SP y el antagonista no peptídico, se comportan como antagonistas competitivos ya que el receptor actúa como una molécula con características alostéricas.

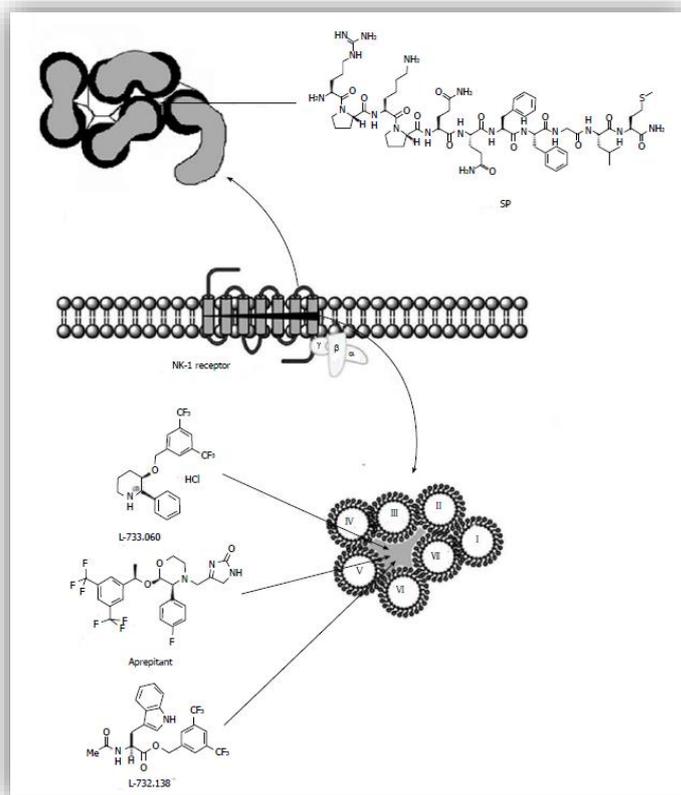


Figura 19: Sitio de unión SP y antagonistas NK1R.

L-733.060, Aprepitant y L-732.138 se unen al receptor NK1 en sitios diferentes. La SP se une en los giros extracelulares del receptor mientras que los antagonistas NK1R lo hacen más profundamente en los segmentos transmembrana. Imagen tomada de M. Muñoz et al. 2014.

En la estructura genómica de los receptores taquicinérgicos existe la posibilidad de generar variantes funcionales de empalme "splice variants". El empalme prematuro de los exones 2 ó 4 o la inclusión de un exón extendido o uno nuevo en la secuencia podrían modular la longitud del receptor. A este respecto, varios estudios han demostrado la existencia de una isoforma larga o completa (full-length) del receptor NK1R de 407 aminoácidos y una isoforma corta o truncada del receptor con 311 aminoácidos en los que s(Baker, Morris, & Gibbins, 2003; Fong, Anderson, Yu, Huang, & Strader, 1992; P. W. Mantyh et al., 1996).

Más recientemente se ha visto que la forma completa del NK1R es la más prevalente en el cerebro humano mientras que la forma truncada es la más representativa en los tejidos periféricos (Caberlotta et al., 2003). De la misma forma se ha comprobado una expresión diferente de los genes TAC1 y TAC4 en tejidos humanos, estando el gen TAC4 más representado en el tejido periférico, particularmente en el sistema inmune, MO, timo y tiroides así como en órganos reproductores. Se ha sugerido que podría existir cierta correlación entre la preferencia con la que algunos tejidos expresan la isoforma larga o corta del NK1R y cómo esos mismos tejidos expresan

predominantemente SP (gen TAC1) o endokininas y otros péptidos SP-like (gen TAC4) (Nigel M. Page et al., 2003). Por todo esto se plantea si la forma truncada del NK1R pudiera ser el receptor alternativo de las SP-like HK en tejidos y células periféricas.

Se han descrito varios subtipos de NK1R dependiendo de su afinidad por diferentes ligandos (Figuras 20 y 21). El **NK1R "clásico"** (Mussap, Geraghty, & Burcher, 1993), es aquel para el que la SP es la única TK endógena con alta afinidad. Otra modalidad de NK1R es la que presenta alta afinidad por ligandos del tipo SP(6-11) también llamado septide. Estos receptores periféricos **NK1R "septide-sensibles"** poseen alta afinidad por otras TK como la NKA, NPK, NPY y NKB, ligandos todos ellos que presentan una débil afinidad por el receptor NK1"clásico". Por el contrario, la SP y los agonistas y antagonistas selectivos de los receptores NK1"clásicos" sí poseen una alta afinidad por ambos tipos de receptores (J. C. Beaujouan, Saffroy, Torrens, Sagan, & Glowinski, 1999). La SP(6-11) sólo reconoce el sitio de unión de alta afinidad del receptor "septide sensible", lo cual resulta interesante por el hecho de ser la mínima longitud de cadena necesaria para activar el receptor, que además coincide con los últimos seis aminoácidos de la EKA y B (Figura 25) (J.-C. Beaujouan et al., 2004; N. M. Page, 2004; Severini et al., 2002). Un tercer subtipo de receptor ha sido descrito con el nombre **"nuevo NK1R sensible"**, con alta afinidad por TK de mayor longitud y no por septide o SP(6-11) (J.-C. Beaujouan et al., 2004)).

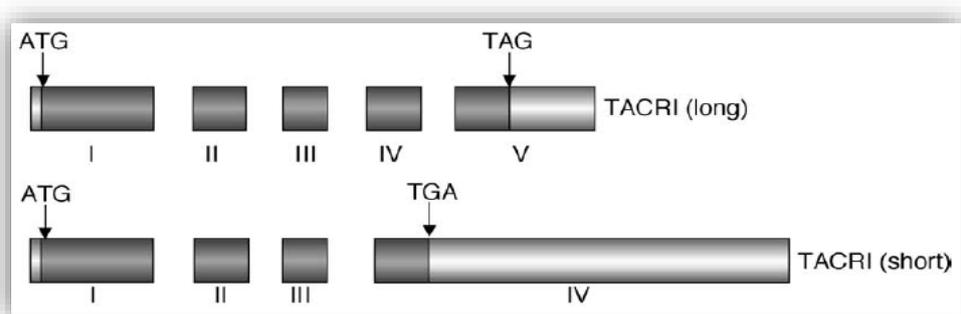


Figura 20. Organización de los exones del gen TAC1R en su forma completa y truncada. La región codificada de cada isoforma se muestra en gris oscuro. Imagen tomada de Page NM. 2005

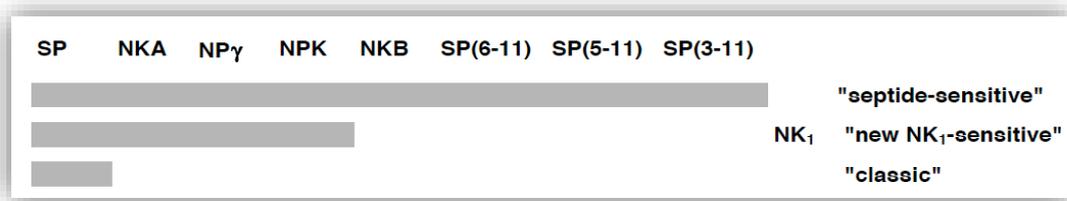


Figura 21. Selectividad de las TK endógenas y algunos fragmentos C-terminales de SP (SP 6-11, SP 5-11 y SP 3-11) frente a los diferentes subtipos de NK1R descritos (Figura modificada de Beaujouan et al., 2004).

3.6 VÍAS SEÑALIZACIÓN UNIÓN SP-NK1R

Los hallazgos de diferentes trabajos indican que el NK1R responde a un modelo de activación multimodal, en el que la unión de cada ligando induce en el receptor una conformación única, estable y específica que le permite activar una o más proteínas G de una manera ligando-específica (Lecat, Bucher, Mely, & Galzi, 2002; Palanche et al., 2001). Esta conformación adoptada por el receptor estaría condicionada tanto por el ligando (Villar et al., 1998). Aunque la mayoría de la información deriva del estudio de ligandos de alta afinidad (SP para el NK1R), otros agonistas y otras TK que actúan como ligando del receptor, pueden activar diferentes vías de señalización del mismo receptor NK1R con resultados diferentes. Finalmente, la mayoría de estudios sobre las vías de señalización se han hecho examinando el receptor completo sin modificación (full-length). Las variantes de este receptor generadas por empalmes alternativos en la transcripción (forma trunca) pueden seguir vías de señalización diferentes como analizaremos más adelante lo cual puede ser importante en situaciones patológicas en las que esta isoforma esté presente. A continuación analizaremos el inicio de las vías de señalización, el proceso de finalización de la señal y los estudios de señalización realizados con el NK1R truncado.

A) INICIO DE LA SEÑALIZACIÓN DEL NK1R

Tras la unión del agonista a su receptor en la superficie celular, se produce una

reordenación de las α -hélices transmembrana que inducen un cambio conformacional en la superficie citoplasmática del receptor que permite la interacción con la proteína G formando un complejo de alta afinidad: SP-NK1R-Proteína G que completa el mecanismo de señal e inicia la vía efectora. La forma activada de la proteína G se disocia del receptor y activa la proteína efectora modulando los niveles de segundos mensajeros intracelulares entre los que figura tanto la **Fosfolipasa C (PLC)** como la **Adenilato ciclasa (AC)** y como consecuencia de las mismas se produce una movilización del calcio intracelular a través del fosfoinositol (Guard & Watson, 1991).

La principal proteína G responsable de las vías de movilización del calcio es la $G\alpha_q$, mientras que la $G\alpha_s$ activa la adenilato ciclasa (Palanche et al., 2001)). La vía de señalización clásica de NK1R implica a la PLC como segundo mensajero sugiriendo que la subunidad $G\alpha_q$ es la predominante en la activación de NK1R (Krause et al., 1993).

La SP a través de la forma activada de la proteína G inicia distintas vías de señalización (figuras 28 y 29):

- La PLC activa segundos mensajeros como diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3) y activa la vía PKB (protein kinasa B) codificadas en los humanos por el gen Akt que proporciona el efecto antiapoptótico de la SP. A través del DAG se activa la protein kinasa C (PKC)
- La enzima AC convierte ATP en AMPc que se combina con la protein-kinasa A (PKA) para actuar sobre el ADN y producir efectos sobre metabolismo, crecimiento y diferenciación celular.
- La SP activa el principal factor de transcripción nuclear proinflamatorio o Factor de activación nuclear kappa β ($NF\ \kappa\beta$) en las células generando IL6 e IL8 y $TNF\alpha$ (Factor de necrosis tumoral α) con acción pro-inflamatoria
- Activación de la vía Rho para su efecto sobre la migración celular
- Activación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) para formar ácido araquidónico (AA) que es un precursor de mediadores lipídicos inflamatorios y generar prostaglandinas, leucotrienos y tromboxano A_2
- Las distintas protein-kinasas activan de forma secuencial la vía **MAPK/ERK** (también llamada vía **Ras-Raf-MEK-ERK**) que es una cadena de proteínas en la célula que comunica la señal entre el receptor de superficie y el AND en el núcleo de la célula. Las MAPK (protein-kinasa activadas por mitógenos) incluyendo las

quinasas reguladoras de la señal extracelular 1 y 2 (ERK1/2) fosforilan distintas proteínas y regulan distintas funciones celulares incluyendo proliferación, expresión de genes, diferenciación y supervivencia celular, o lo que es lo mismo, esta vía es la que media la actividad proliferativa y anti-apoptótica de la SP a través del NK1R (Kavelaars, Jeurissen, & Heijnen, 1994; Luo, Sharif, & Sharif, 1996; Martin, Charles, Sanderson, & Merrill, 1992) (Figuras 22 y 23).

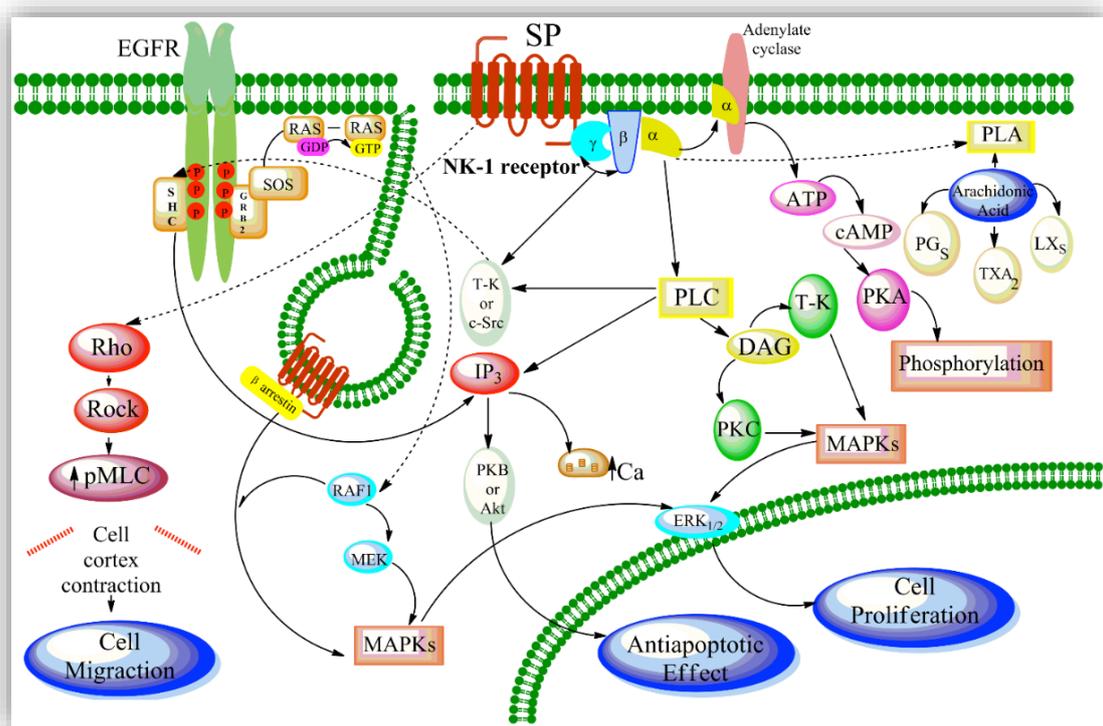


Figura 22. Representación esquemática de las vías de señalización intracelular tras la activación del NK1R por la SP (ATP: adenosín trifosfato; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; DAG: diacilglicerol; IP₃: inositol trifosfato; MAPKs: protein-kinasa activadas por mitógenos; PKA: protein kinasa A; PKB: protein kinasa B; PKC: protein kinasa C; PLA: fosfolipasa A; PLC: fosfolipasa C; pMLC: fosforilación de la cadena ligera de la miosina; T-K: tirosina kinasa; (Imagen tomada de (Rosso, Muñoz, & Berger, 2012).

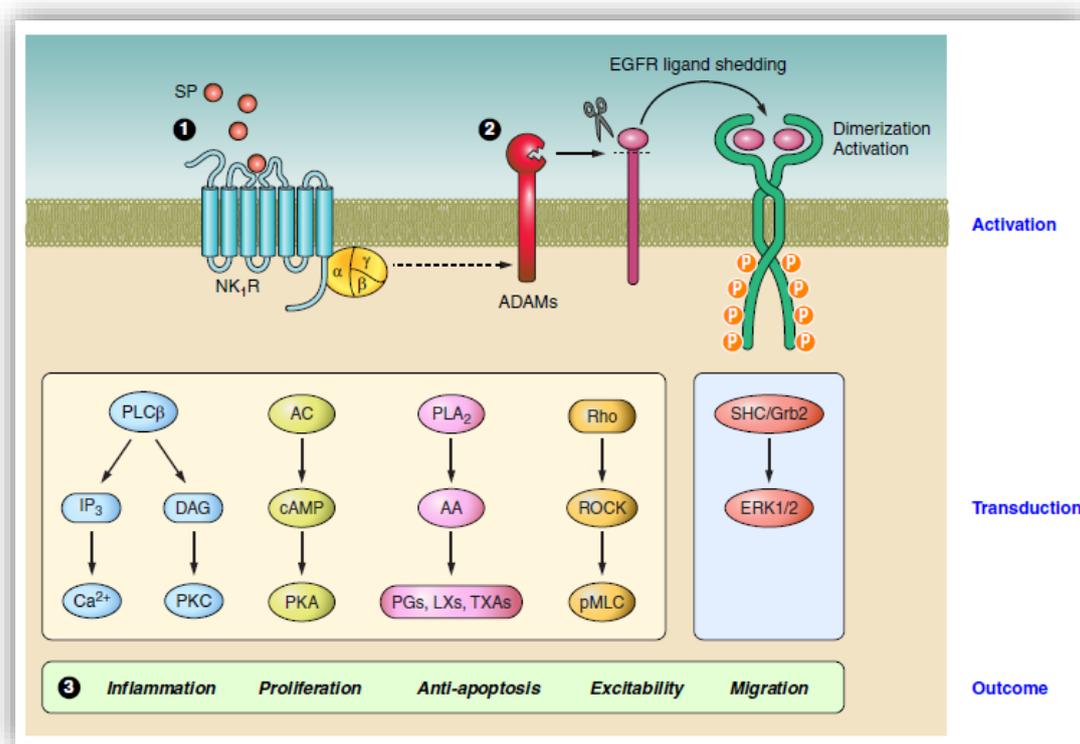


Figura 23: Mecanismos de activación del receptor NK1R. Imagen tomada de Steinhoff MS et al. 2014, pag 271: “Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease”

1. El NK1R contiene un lugar para el reconocimiento del ligando en el extremo N-terminal y un lugar de reconocimiento de la proteína G o extremo carboxi-terminal. La activación del NK1R por la sustancia P en la membrana citoplasmática inicia la vía de señalización a través de la proteína G que incluye la activación de la PLC, la formación del IP₃ y el DAG, movilización del calcio intracelular y activación de la PKC. Por otro lado activa la adenil ciclasa (AC) activando la proteinquinasa A; También activa la fosfolipasa A₂ (PLA₂) para formar ácido araquidónico (AA) y generar prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LXs) y tromboxano A₂ (TXA₂); finalmente activa la vía Rho y fosforila la MLC (myosin regulatory light chain).

2. El NK1R a través de EGFR (Epidermal growth factor receptor) activa la vía MAPK (proteínquinasa activadas por mitógenos)/ERK. La señal se transporta mediante GRB2 y Ras que a través de las distintas proteín quinasa culmina con la activación de la MAPK originalmente denominada ERK (extracellular signal-regulated kinases) que es capaz de traslocarse al núcleo para allí regular la transcripción modificando la actividad de proteínas.

3. Las diversas vías de señalización activadas tras la unión SP-NK1R implican diversos efectos y en ocasiones específicas de cada célula como son inflamación, proliferación, anti-apoptosis, excitación neuronal y migración

Las arrestinas son proteínas citosólicas que fueron inicialmente identificadas como componentes críticos en la desensibilización e internalización de los RAPG. Datos más recientes indican que las arrestinas también pueden desempeñar un papel en la propagación de señal, contribuyendo a ensamblar complejos multimoleculares en el entorno del receptor (C. A. C. Moore, Milano, & Benovic, 2007; Reiter & Lefkowitz, 2006). La β -arrestina sufre un notable cambio conformacional tras su unión al receptor activado por SP permitiendo el reclutamiento de la maquinaria de internalización, como clatrina y además provocando la modulación de cascadas de señalización intracelular a través de la formación de un complejo de señalización endosomal o signalosoma que comprende el NK1R, β -arrestina, Src, MEKK y ERK. (Murphy, Padilla, Hasdemir, Cottrell, & Bunnett, 2009). Este complejo promueve la traslocación nuclear del ERK1/2 activado necesario para el efecto antiapoptótico y proliferativo de la SP (Figura 24).

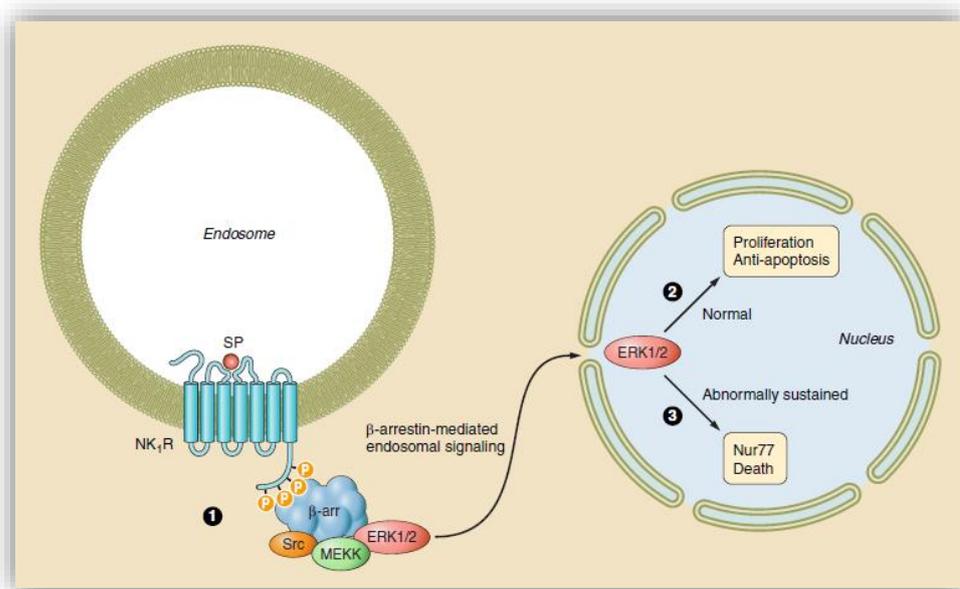


Figura 24. Esquema del efecto proliferativo y anti-apoptótico de la SP a través de β -arrestina en la membrana endosomal. Imagen tomada de Steinhoff MS et al. 2014, pag 272: 1) β -arrestina (β -arr) recluta el complejo NK1R, β -arrestina, Src, MEKK y ERK o signalosoma para mediar la fosforilación y activación de la vía ERK o MAPK y trasladarse al núcleo. 2) En circunstancias normales la vía ERK/MAPK media el efecto antiapoptótico y proliferativo de la SP. 3) Cuando la activación de la vía ERK/MAPK está anormalmente mantenida, como ocurre con las células a las que les falta la forma activa de ECE-1 (Enzima convertidora endotelial) se produce muerte celular a través de la inducción del receptor Nur77.

B) FINALIZACIÓN DE LA SEÑAL NK1R

En 1995 Mantyh y colaboradores demostraron que tras una estimulación somatosensorial, NK1R sufría una dramática internalización reversible (Figura 25). (P. W. Mantyh et al., 1995).

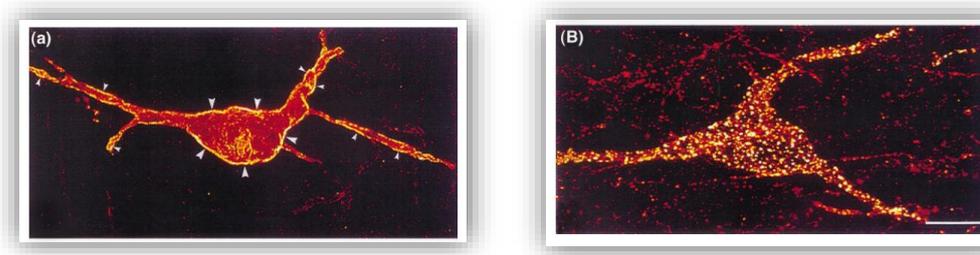


Figura 25. Internalización del NK1R. Imagen tomada de Mantyh PN et al. (1995) en la que se muestra la internalización del NK1R tras un estímulo somatosensorial. (a) Receptor en la membrana celular (flechas). (b) Receptor internalizado ocupando el citoplasma de las neuronas tras estímulo doloroso.

Grady y colaboradores determinaron que la SP y su receptor se internalizan rápidamente por la acción de la clatrina. En ausencia de SP, el NK1R se localiza en la membrana plasmática, pero cuando la célula está expuesta a este NP, el complejo ligando-receptor se internaliza. A diferencia de NK1R, la SP se degrada enzimáticamente en el interior de los endosomas. Estos mecanismos de endocitosis y reciclaje de los receptores serían responsables de los fenómenos de desensibilización y resensibilización del NK1R en presencia de SP por medio de los cuales la célula conseguiría hacerse insensible en situaciones con cantidades excesivas de SP como en los procesos inflamatorios (Grady et al., 1995).

La finalización de la señal ocurre por mecanismos que retiran el ligando del fluido extracelular (recaptación y degradación de la SP) y por mecanismos que restringen la capacidad del receptor de unirse a su maquinaria de activación a través de la proteína G (desacoplamiento y desensibilización del receptor) (Figura 26).

A continuación presentamos un esquema de la finalización de la señal:

- ✚ Degradación de la SP en el fluido extracelular a través de una metaloproteasa de la membrana celular llamada endopeptidasa neutra.
- ✚ La fosforilación del NK1R en su extremo C-terminal por las quinasas de RAPG provoca la unión y reclutamiento de la proteína citosólica β -arrestina la cual

bloquea la capacidad del receptor de interactuar con otras proteínas G, conduciendo a una rápida desensibilización (Bünemann & Hosey, 1999; Jorgensen et al., 2008). Como resultado de esta unión de β -arrestina, el receptor fosforilado es objeto de endocitosis mediado por clatrina, un proceso que finalmente re-sensibiliza y recicla los receptores a la membrana plasmática (C. A. C. Moore et al., 2007; Reiter & Lefkowitz, 2006).

- ✚ La metaloproteasa de membrana ECE-1 (enzima convertidora de endotelina 1) degrada la SP en los endosomas y desancla los componentes del complejo signalosoma atenuando la señal ERK/MAPK (Cottrell et al., 2009).
- ✚ Finalmente para el proceso completo de resensibilización, se requiere la disociación de β -arrestina y el reciclaje de NK1R en la membrana celular.

C) FORMA TRUNCADA DE NK1R

El NK1R truncado existe debido a una variante de empalme en el exón 5 perdiendo 311 residuos en su extremo C-terminal (Figura 27). El NK1R truncado es más representativo del tejido periférico y se postula que podría ser el receptor alternativo de EK y HK1. Resumimos las características conocidas de la forma truncada NK1R (Tabla 7):

- ✚ Tiene una afinidad por la SP menor que por la forma completa (Fong et al., 1992).
- ✚ Presenta limitaciones en los mecanismos de internalización o endocitosis del receptor (Böhm et al., 1997).
- ✚ Más resistente a la desensibilización del receptor en comparación con la forma full-length (H. Li et al., 1997) con una mayor capacidad de mantener una respuesta prolongada tras ser activado.
- ✚ No sigue las mismas vías de señalización (Déry, Defea, & Bunnett, 2001) que full-length NK1R.
- ✚ La acción proliferativa y anti-apoptótica a través de la vía ERK-MAPK es independiente de proteína G y es más lenta.

Todas estas diferencias pueden tener implicaciones en condiciones patológicas donde se ha observado una regulación positiva del receptor truncado aunque la actividad biológica de NK1R truncado sigue siendo controvertida.

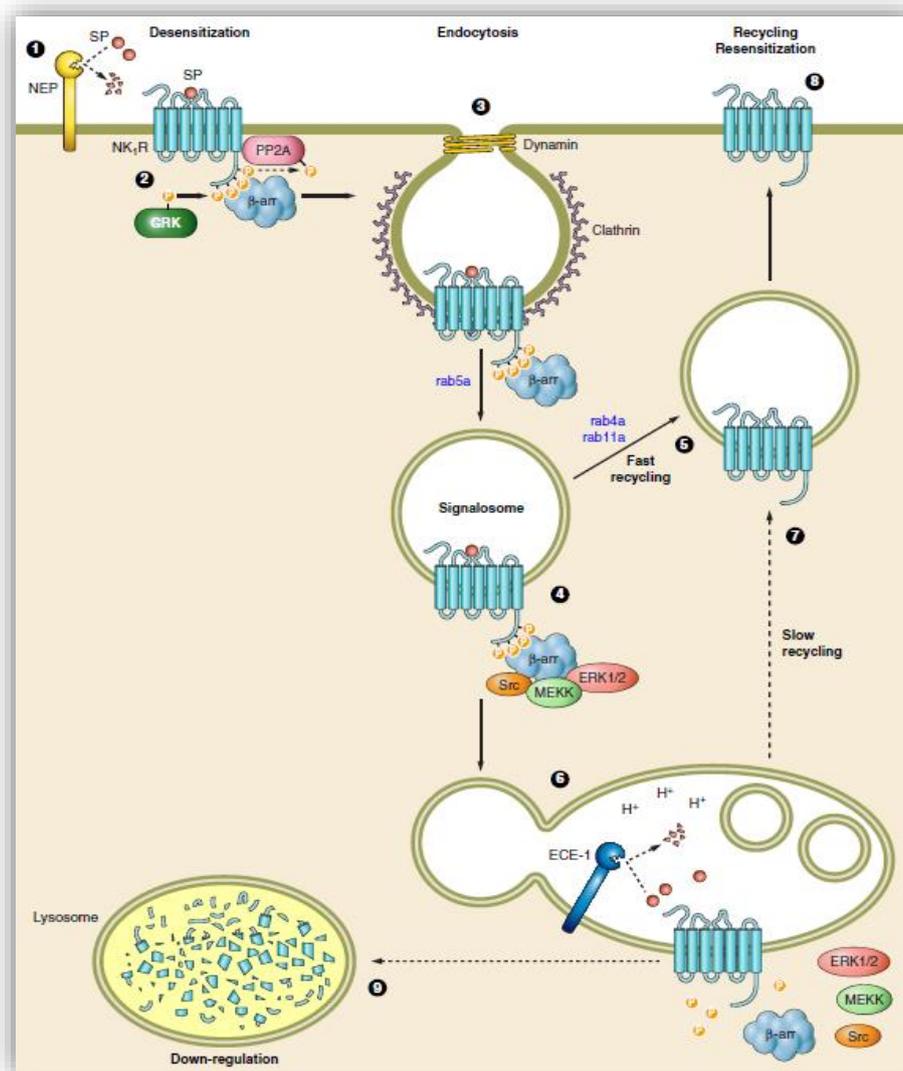


Figura 26. Ruta endocelular. Mecanismos de desensibilización y resensibilización del NK1R. Imagen tomada de Steinhoff et al. 2014, pag 274. 1: NEP: Endopeptidasa neutra degrada la SP en el medio extracelular. 2: Fosforilación en el loop 3 intracelular del NK1R en su extremo C-terminal. Esta fosforilación incrementa la afinidad de NK1R por β -arrestina mediando la desensibilización del receptor. La β -arrestina también recluta la protein fosfato 2A (PP2A) que puede defosforilar NK1R y devolverlo a la membrana celular. 3: β -arrestina a través de claritrina promueve la endocitosis de SP-NK1R. 4: Formación del signalosoma endosomal para activar las vías de señalización. Rab5a media este tráfico del endosoma temprano. 5: NK1R puede sufrir un mecanismo de reciclaje rápido dependiente de rab4a y rab11a. 6: De forma alternativa, el NK1R circula en el endosoma hacia una localización perinuclear que contiene ECE-1 y degrada SP. 7: Vía de reciclaje lenta de NK1R para finalizar en superficie resensibilizado (8). 9: Tras un estímulo prolongado de altas concentraciones de SP, el NK1R es conducido a los lisosomas para su degradación y regulación a la baja de la señalización de SP.

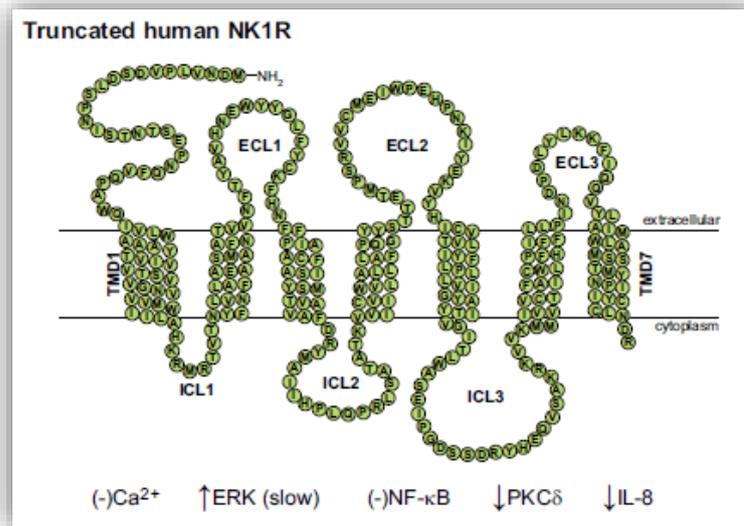


Figura 27. Esquema del receptor NK1R truncado (truncated). La forma truncada pierde los sitios de fosforilación del extremo C-terminal por lo que no interacciona con β-arrestina lo cual lleva a un defecto en la desensibilización y endocitosis del receptor. Además el NK1R truncado presenta menor movilización del calcio intracelular, menor activación de la vía NF-κB e inhibición de la expresión de IL-8 y de PKCδ. Imagen modificada de Steinhoff MS et al. 2014, pag 270.

EFEECTO	NK1R full-length	NK1R truncado
Longitud de NK1R	407 aminoácidos	311 aminoácidos
Movilización calcio intracelular a través inositol trifosfato	Sí	No
Activación ERK	Rápida (<1min) y mantenida	Lenta (pico a los 20-30 min)
PKCδ fosforilación	Aumentado	Disminuido
Activación NF-κB	Sí	No
Expresión mRNA IL-8	Aumentado	Disminuido

Tabla 7. Tabla comparativa de las distintas isoformas del NK1R. Diferencias en la longitud del extremo C-terminal median las propiedades funcionales del NK1R truncado. Tabla modificada de Lai JP et al. 2008.

3.7 ANTAGONISTAS DE NK1R

Existen dos tipos de antagonistas de NK1R: peptídicos y no peptídicos. De forma general, podemos decir que los antagonistas peptídicos (Tabla 8) presentan una afinidad por el NK1R varias veces menor que sus agonistas naturales, inestabilidad metabólica e imposibilidad para atravesar la barrera hematoencefálica, motivos que limitan su utilidad en estudios in vivo. Además, inyectados directamente en el SNC presentan baja potencia, incapacidad para discriminar entre receptores taquicinérgicos, una actividad agonista residual parcial e inducen degranulación de mastocitos y neurotoxicidad (Lee, Campbell, Williams, & Iversen, 1986).

ANTAGONISTAS NK1R	Secuencia de aminoácidos
[DPro ² ,DTrp ^{7,9}]SP	Arg- DPro -Lys-Pro-Gln-Gln- DTrp -Phe- DTrp -Leu-Met-NH ₂
Spantide I	DArg -Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- DTrp -Phe- DTrp -Leu-Met-NH ₂
Spantide II	DLys *-Pro- Pal -Pro- DPhe *- Asn - DTrp -Phe- DTrp -Leu-Met-NH ₂
[DPro ⁹ ,*Pro ¹⁰ ,Trp ¹¹]SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe- Dpro - Pro *- Trp -NH ₂
[Orn ⁶ ,AspOBz ¹¹]SP(6-11)	Orn -Phe-Phe-Gly-Leu- AspOBz
Sendide	Try - DPhe -Phe- Dhis -Leu-Met-NH ₂
[DTrp ⁷]Sendide	Try - DTrp -Phe- Dhis -Leu-Met-NH ₂
[Gln ⁶]Sendide	Gln- DPhe -Phe- Dhis -Leu-Met-NH ₂

Tabla 8. Estructura y nombre de los principales antagonistas peptídicos del receptor NK1R (Modificado de Almeida et al., 2004; tabla 4).

Las limitaciones encontradas en los antagonistas peptídicos impulsó la búsqueda y desarrollo de nuevos antagonistas no peptídicos de diferente naturaleza: esteroidea, amonios cuaternarios derivados de la quinuclidina, derivados del triptófano, análogos de la piperazina o compuestos piperidínicos. El primer antagonista no peptídico descrito con actividad selectiva frente al NK1R fue **CP-96,345**. Sobre la estructura de éste se elaboraron otros antagonistas como **CP-99,994** (Piedimonte et al., 1993), **ezlopitant**

(Reed-Hagen, Tsuchiya, Shimada, Wentland, & Obach, 1999) y **CP-122,721** entre otros. Hay que destacar **L-733,060**, un antagonista desarrollado a partir de CP-99,994 (P.-Q. Huang, Liu, Wei, & Ruan, 2003) muy bien estudiado, que presenta actividad analgésica (Parenti, Aricò, Ronsisvalle, & Scoto, 2012), antidepresiva (Guiard et al., 2004), ansiolítica y frente a trastornos del estado de ánimo (Rupniak et al., 2000), eficacia en la enfermedad inflamatoria hepática (Bang et al., 2003) y actividad antitumoral demostrada en diferentes líneas celulares tumorales humanas (M. Muñoz, Rosso, Pérez, Coveñas, Rosso, Zamarriego, & Piruat, 2005; M Muñoz, Rosso, Pérez, Coveñas, Rosso, Zamarriego, Soult, et al., 2005; M Muñoz, González-Ortega, & Coveñas, 2012; M. Muñoz, Pérez, Coveñas, Rosso, & Castro, 2004; M Muñoz, Pérez, Rosso, Zamarriego, & Rosso, 2004; Rosso, Robles-Frías, Coveñas, Salinas-Martín, & Muñoz, 2008). Entre estos antagonistas también destaca **MK-869**, conocido posteriormente como **aprepitant** que ha sido empleado para el tratamiento del dolor (Chizh et al., 2007), prurito (Santini et al., 2012), migraña, emesis (Tattersall et al., 2000), trastornos psiquiátricos como depresión (Kramer et al., 1998) y como fármaco antitumoral (Kast, 2009; M. Muñoz, González-Ortega, Rosso, et al., 2012; M. Muñoz, González-Ortega, & Coveñas, 2012; M. Muñoz & Rosso, 2010). La FDA (Food and Drug Administration) aprobó la indicación de aprepitant oral para las náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia. Una proforma de este fármaco, **fosaprepitant**, está también aprobada para su empleo intravenoso (Navari, 2007).

3.8 PRINCIPALES ACCIONES FISIOLÓGICAS SP-NK1R

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. A nivel cortical, la SP actúa como modu(Hökfelt et al., 1982). A nivel del tracto hipotálamo-hipofisario induce un aumento en la liberación de hormonas hipofisarias (Baertschi, Zingg, & Dreifuss, 1981). La presencia de SP y NK1R en áreas como la amígdala sugiere su participación en el comportamiento emocional y la respuesta neuroquímica al estrés (De Felipe et al., 1998; Kramer et al., 1998; P. W. Mantyh, Hunt, & Maggio, 1984). En la médula espinal la SP está presente fundamentalmente en las neuronas de las astas posteriores.

INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA. La SP activa el NK1R presente en las células endoteliales produciendo vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, extravasación plasmática y aumento de la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, facilitando por medio de éstas la migración transendotelial e infiltración de los neutrófilos en el foco inflamatorio (Nakagawa, Sano, & Iwamoto, 1995; Quinlan et al., 1998). También presenta actividad neuro-inmunorreguladora sobre la inmunidad celular y humoral, estimulando la proliferación de células T (Payan, Brewster, & Goetzl, 1983), diferenciación de células B, degranulación de mastocitos y diapédesis leucocitaria (Krause, Takeda, & Hershey, 1992; McGillis, Mitsuhashi, & Payan, 1990). Activa el factor de transcripción NF- κ B, con un papel muy importante en la regulación de la expresión de moléculas proinflamatorias como IL-8 (Fiebich, Schleicher, Butcher, Craig, & Lieb, 2000; Lieb, Fiebich, Berger, Bauer, & Schulze-Osthoff, 1997). La SP también induce un aumento en la expresión de IL-2 por las células T (Calvo, Chavanel, & Senik, 1992; P. Rameshwar, Gascon, & Ganea, 1993), e IL-1, IL-6 y TNF- α por astrocitos (Gitter, Regoli, Howbert, Glasebrook, & Waters, 1994) y monocitos (Lotz, Vaughan, & Carson, 1988). En modelos murinos se ha comprobado que el bloqueo de los NK1R protege al hígado del daño inflamatorio mediado por citoquinas (Bang et al., 2003) y reduce el daño por isquemia-reperfusión a nivel de la arteria mesentérica superior en ratas (Souza, Mendonça, de A Castro, Poole, & Teixeira, 2002).

EFFECTOS NEUROTRÓFICOS. En la actualidad el concepto de neurogénesis adulta se ha postulado como un mecanismo potencial por el cual el tejido neuronal dañado puede ser reemplazado mediante la activación y el desarrollo de células progenitoras neuronales. La capacidad de la SP de promover el crecimiento neuronal es un fenómeno bien conocido. Se ha demostrado que en el área cortical subventricular y en el giro dentado del hipocampo del cerebro de rata, áreas ricas en células madres neuronales, la introducción de SP induce un aumento en el número de células progenitoras neuronales (Park, Yan, Satriotomo, Vemuganti, & Dempsey, 2007).

CARDIOVASCULAR. La SP es uno de los vasodilatadores más potentes conocidos actuando a través del endotelio promoviendo la liberación a nivel endotelial de factores endógenos (prostaciclina, óxido nítrico, factor relajante derivado del endotelio) que

reducen el tono de la musculatura lisa arterial (D'Orléans-Juste, Dion, Mizrahi, & Regoli, 1985; Regoli, Drapeau, Dion, & D'Orléans-Juste, 1987). Su administración ejerce un efecto hipotensor muy potente acompañado de taquicardia, comprobado tanto en estudios en animales como humanos (Evans, Dixon, Clarke, Conradson, & Barnes, 1988; Severini et al., 2002)). También se ha encontrado SP en terminaciones nerviosas sensoriales que rodean a los vasos sanguíneos de diferentes localizaciones anatómicas, por medio de las cuales median la llamada vasodilatación neurogénica (Furness, Papka, Della, Costa, & Eskay, 1982).

DIGESTIVO. NK1R se expresa en las neuronas entéricas, células intersticiales de Cajal, células epiteliales y linfocitos y macrófagos de la lámina propia. La SP está implicada en funciones de secreción de fluidos y electrolitos, motilidad intestinal, vascularización y función inmunitaria. La inflamación intestinal se correlaciona con la activación de NK1R y la regulación positiva de este receptor. Asimismo, la SP activa a través de NK1R las vías de señalización proinflamatoria en colonocitos. Parece que la SP forma parte del arco reflejo no colinérgico intestinal que permite la conexión funcional de las neuronas sensoriales del tracto gastrointestinal con las simpáticas ganglionares (Jiang, Dun, & Karczmar, 1982). Se habla incluso de la regulación taquicinérgica intestinal y del potencial papel de los receptores taquicinérgicos como dianas terapéuticas (Holzer & Holzer-Petsche, 1997a, 1997b; Shimizu et al., 2008).

DOLOR. La SP es uno de los principales neurotransmisores implicados en la transmisión de la sensación dolorosa y su posterior elaboración en el SNC. Tras su liberación, la SP excita las neuronas nociceptivas en las astas dorsales de la médula donde activan los NK1R de las vías de transmisión del dolor hacia el SNC (Severini et al., 2002). También está involucrada en el proceso de integración del dolor a nivel central y en la generación del estrés y ansiedad que éste desencadena (DeVane, 2001).

El papel de SP-NK1R en nocicepción e hiperalgesia en modelos animales ha quedado demostrado con trabajos que muestran cómo la delección de TAC1 modera el dolor y previene la inflamación neurogénica (Cao et al., 1998) y estudios en los que si se suprime NK1R se suprime el dolor inducido por estrés (De Felipe et al., 1998). Sin embargo, el uso de antagonistas de NK1R falló como analgésico en los ensayos clínicos

(Hill, 2000). Independientemente estos resultados negativos, los trabajos preclínicos apoyan fuertemente el papel de SP y NK1R en la modulación del dolor y la hiperalgesia, aunque su papel es tal vez más sutil de lo que inicialmente se pensaba.

RESPIRATORIO. Los pulmones, paralelamente con la inervación simpática y parasimpática, presentan fibras C no mielinizadas que continenen SP y NKA (Joos, Germonpré, & Pauwels, 2000) y que abarcan tanto el epitelio bronquial, como los vasos sanguíneos, las glándulas submucosas y las capas de musculo liso bronquiales (Groneberg, Quarcoo, Frossard, & Fischer, 2004). La estimulación periférica de estas fibras sensoriales produce sensación de dolor (Neumann, Doubell, Leslie, & Woolf, 1996) y estimula la tos (Mazzone, 2004). Hoy sabemos que la SP es un broncoconstrictor muy potente que además tiene gran efecto vasodilatador sobre los vasos de la vía aérea, permite la extravasación de plasma y en definitiva, la propagación de la respuesta inmune (Groneberg et al., 2004). Induce la secreción de moco y regula el mecanismo de aclaramiento mucociliar (Chapman, Hey, McLeod, Minnicozzi, & Rizzo, 1998). Existen evidencias de la expresión de TAC1 en eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos, células dendríticas, células del epitelio bronquial y del músculo liso como fuente adicional de SP (Aliakbari, Sreedharan, Turck, & Goetzl, 1987; Ho, Lai, Zhu, Uvaydova, & Douglas, 1997; Lai, Douglas, Rappaport, Wu, & Ho, 1998; Lambrecht et al., 1999; Maghni et al., 2003). Los corticoides usados como tratamiento del asma regulan a la baja la expresión de NK1R en los miocitos de la vía área en ratones asmáticos (M. Li & Shang, 2012) y se ha visto en modelos animales de fibrosis quística que la SP contribuye a la falta de aclaramiento mucociliar propia de esta enfermedad (Choi et al., 2009).

3.9 PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA SP Y NK1R.

La SP está implicada en la regulación del sistema cardiovascular, vasodilatación, supervivencia y degeneración neuronal, en la regulación de mecanismos respiratorios, en el control del movimiento, micción, motilidad gástrica, inflamación, dolor, depresión, salivación y cáncer (Hökfelt et al., 2000; Miguel Muñoz & Coveñas, 2013).

Parece ser que la SP y otros NP se liberan preferentemente cuando el sistema

neuronal y no neuronal está fuertemente activado. Esta situación ocurre bajo circunstancias patológicas por lo que se piensa que los antagonistas de NK1R podrían hacer su efecto cuando el sistema SP-NK1R está regulado al alza y presenta una liberación incrementada de SP (Hökfelt et al., 2000) y/o una sobreexpresión de NK1R. Esto se ha descrito en procesos patológicos y enfermedades como la emesis, depresión, degeneración neuronal, enfermedad inflamatoria intestinal, prurito o en infecciones virales como el VIH así como en el cáncer (Figura 28). Describimos a continuación algunas de las principales patologías relacionadas.

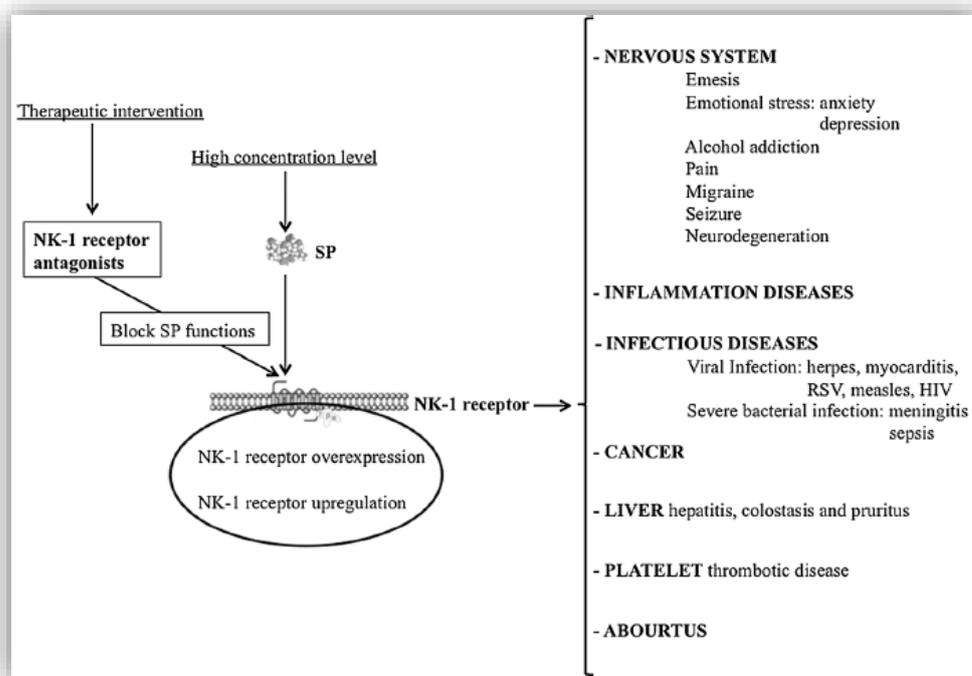


Figura 28: Implicaciones del sistema SP/NK1R en patología humana. Imagen tomada de (Miguel Muñoz & Coveñas, 2013) "Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology"

ENFERMEDADES INFLAMATORIAS. La SP actúa como mediador de la quimiotaxis de leucocitos de sangre periférica (Schratzberger et al., 1997), de monocitos (Ruff, Wahl, & Pert, 1985), eosinófilos (Dunzendorfer, Meierhofer, & Wiedermann, 1998) y estimula la migración de células natural-killer (Feistritz et al., 2003). El efecto proinflamatorio que ejerce la SP sobre las células epiteliales y del sistema inmune, se ha puesto de manifiesto en diversas enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio,

gastrointestinal y musculoesquelético (O'Connor et al., 2004). Se ha encontrado un aumento en los niveles de SP y expresión de NK1R en el recto y colon de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Shimizu et al., 2008), en la enfermedad mucocutánea inflamatoria crónica (González Moles et al., 2009) y en el líquido sinovial y suero de enfermos con artritis reumatoide (Anichini et al., 1997).

Los pacientes con asma presentan un aumento en la expresión tanto de SP como NK1R en el árbol bronquial y se ha relacionado con el desarrollo de hiperreactividad bronquial, inflamación de la vía aérea y tos (Advenier, Joos, Molimard, Lagente, & Pauwels, 1999; Ellis & Udem, 1994). La inflamación neurogénica inducida por la SP también participa en otras patologías respiratorias, como la tos no productiva, infecciones respiratorias por virus, rinitis alérgicas y sarcoidosis (O'Connor et al., 2004).

TRASTORNOS AFECTIVOS. Se ha confirmado la presencia de SP en el hipotálamo y amígdala, estructuras del sistema límbico involucradas en la regulación del comportamiento emocional (DeVane, 2001). La SP desempeña un papel fundamental en la regulación de la afectividad emocional y respuesta neuroquímica al estrés, por lo que alteraciones en este complejo SP-NK1R podrían estar involucrados en la patogenia de la depresión y ansiedad entre otros trastornos (Herpfer & Lieb, 2003; Patrick W. Mantyh, 2002) (Pantaleo et al., 2010). Se ha comprobado que los sujetos con mayor ansiedad presentan mayores niveles plasmáticos de SP (Schedlowski et al., 1995; Weiss et al., 1996) así como en pacientes con depresión aguda (Bondy et al., 2003)), sintomatología esquizofrénica (Rimón et al., 1984) y fibromialgia (Russell et al., 1994). Curiosamente, la infusión de SP durante el sueño ha demostrado asociar un peor estado de ánimo al despertar y una disminución en la calidad del sueño (Lieb et al., 2002).

EMESIS: La SP está presente en el núcleo del tracto solitario y en el área postrema, ambas localizaciones están implicadas en el control de la emesis. Ya en 1981, Armstrong y colaboradores implicaron a la SP en el reflejo nauseoso (Armstrong, Pickel, Joh, Reis, & Miller, 1981) y posteriormente numerosos trabajos preclínicos y ensayos clínicos en humanos han corroborado el uso de antagonistas de NK1R para el control de los vómitos sin reacciones adversas significativas

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS: Enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y corea de Huntington son enfermedades neurodegenerativas en las que se ha encontrado SP y NK1R en las áreas cerebrales implicadas en estos trastornos (Gillberg, Aquilonius, Eckernäs, Lundqvist, & Winblad, 1982; Kowall et al., 1993; Richfield et al., 2002; Sonomura et al., 2007). Aunque en estudios preclínicos parece que los antagonistas NK1R podrían tener efecto neuroprotector, aún no se han desarrollado ensayos clínicos en humanos que lo hayan demostrado.

INFECCIÓN POR VIH. Parece que la SP y el NK1R actúan como moduladores de la respuesta inmune en la infección por el VIH. Se han encontrado niveles de SP elevados en el plasma de pacientes con infección por el VIH (Douglas et al., 2001, 2008). Además se ha comprobado que los macrófagos y linfocitos de pacientes infectados por este virus expresan más SP, lo que llevó hace ya más de una década a plantear la hipótesis de que la SP podría tener relevancia en la inmunopatogénesis de la infección por el VIH y desarrollo del SIDA (Ho, Lai, Li, & Douglas, 2002). Posteriormente se comprobó que el bloqueo de los NK1R con aprepitant ejercía un efecto anti-VIH1 en células mononucleares de sangre periférica, además de una sinergia con algunos inhibidores de la proteasa (Manak et al., 2010). Recientemente se ha comprobado que la SP aumenta la expresión del VIH-1 en neuroesferas de origen fetal infectadas por este virus (Schwartz et al., 2013) y que la activación de NK1R por la SP contribuye al aumento de la infección por VIH en macrófagos al inducir la expresión de CD163 (Tuluc, Meshki, Spitsin, & Douglas, 2014).

CANCER: Una de las acciones de la SP que ha tenido mayores implicaciones en la investigación ha sido su capacidad mitogénica, comprobada en diferentes tipos celulares sanos: células del tejido conectivo (Nilsson, von Euler, & Dalsgaard, 1985), sinoviocitos (Lotz, Carson, & Vaughan, 1987), fibroblastos (Ziche, Morbidelli, Pacini, Dolara, & Maggi, 1990) y linfocitos (Payan et al., 1983) así como en células tumorales. De hecho, la SP puede considerarse como un mitógeno cuasi-universal. También se ha comprobado su capacidad para estimular la neovascularización a través de la inducción de proliferación endotelial (Ziche, Morbidelli, Pacini, Dolara, et al., 1990).

Ya en la década de los 80 se identificó la presencia de SP en tumores primarios del SNC de humanos (Allen et al., 1985). Una década después, Hennig y colaboradores no sólo demostraron la existencia de NK1R en células tumorales de astrocitoma, glioblastoma, carcinoma medular de tiroides, cáncer de mama y ganglioneuroblastoma, sino que además observaron que en la mayoría de estos tumores este receptor se expresaba tanto en los vasos sanguíneos intra como peritumorales. Este hallazgo planteó la hipótesis de que la SP participaba en la progresión y crecimiento de las células tumorales a través de su efecto pro-angiogénico, actuando de forma autocrina y paracrina en este contexto tumoral (Hennig, Laissue, Horisberger, & Reubi, 1995). En 1996, Luo y colaboradores comprobaron *in vitro* por primera vez que concentraciones fisiológicas de SP inducían mitogénesis a través del NK1R en una línea celular de astrocitoma humano. Demostraron que esta respuesta mitogénica estaba mediada por la estimulación de la actividad de la tirosin-kinasa y las kinasas extracelulares reguladas por señal (ERK1 y ERK2) (Luo et al., 1996). Pocos años después demostraron que el complejo SP-NK1R participaba en el desarrollo y crecimiento *in vivo* del tumor en modelo animal inyectando células tumorales de astrocitoma humano a ratones atímicos (C. Palma et al., 2000). Con estos hallazgos se abría un nuevo camino para el empleo de antagonistas de los NK1R como potencial tratamiento anticanceroso.

En la última década, numerosos trabajos han puesto de manifiesto que el receptor NK1R se expresa en diferentes tipos de células tumorales y que la SP a través de NK1R produce proliferación de células tumorales. Además se ha demostrado el efecto antitumoral derivado del bloqueo de los NK1R con diferentes antagonistas específicos de este receptor. Destacan los estudios llevados a cabo en líneas celulares de retinoblastoma (M. Muñoz et al., 2005, 2007), neuroblastoma y glioma (M. Muñoz, Rosso, Pérez, Coveñas, Rosso, Zamarrigo, & Piruat, 2005; M. Muñoz, Pérez, Coveñas, et al., 2004), leucemia aguda linfoblástica (M. Muñoz, González-Ortega, & Coveñas, 2012), melanoma (M. Muñoz et al., 2010, 2004), adenocarcinoma gástrico y de colon (Rosso et al., 2008), cáncer de mama (Bigioni, Benzo, Irrissuto, Maggi, & Goso, 2005), laríngeo (Esteban et al., 2009; M. Muñoz et al., 2008) y recientemente en cáncer de pulmón (M. Muñoz, González-Ortega, Rosso, et al., 2012), hepatoblastoma (M. Berger et al., 2014) y osteosarcoma (M Muñoz et al., 2014). También se ha estudiado el papel de la SP y su receptor en el tejido tumoral de cáncer de páncreas (Friess et al., 2003;

Miguel Muñoz & Coveñas, 2014), tumor queratoquístico odontogénico (González Moles et al., 2009) y en el carcinoma oral de células escamosas (Brener et al., 2009).

Los estudios que relacionan el sistema SP-NK1R con la progresión tumoral se basan en varios pilares demostrados con estos trabajos de investigación:

- ✚ 1. La SP está presente en las células tumorales tanto en el citoplasma como el núcleo e inducen proliferación de células tumorales.
- ✚ 2. El receptor NK1R está sobreexpresado en las células tumorales y en mayor medida en los fenotipos tumorales de mayor malignidad.
- ✚ 3. En las células tumorales la SP incrementa la fosforilación y activación de PKB o Akt suprimiendo los mecanismos de apoptosis. Además, la SP liberada por el tumor produce la rotura de glucógeno y liberación de glucosa que es usada por las células tumorales para aumentar su metabolismo (efecto Warburg) (Medrano, Gruenstein, & Dimlich, 1994).
- ✚ 4. La SP induce un cambio rápido en la forma celular produciendo evaginaciones citoplasmáticas o “blebbing” las cuales son importantes para la movilidad celular, migración celular y extensión e infiltración tumoral (Meshki et al., 2009).
- ✚ 5. La SP estimula la neoangiogénesis al estimular la proliferación de células endoteliales incrementando el flujo sanguíneo tumoral (Ziche, Morbidelli, Pacini, Geppetti, et al., 1990). En la mayoría de los tumores se ha comprobado que tanto SP como NK1R están presentes en los vasos sanguíneos intra y peritumorales y de hecho, durante la neoangiogénesis tanto la inervación tisular como NK1R están aumentados (Hennig et al., 1995).
- ✚ 6. La inflamación crónica se ha relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer como por ejemplo ocurre con el tracto gastrointestinal. El sistema SP-NK1R se encuentra sobreexpresado en el proceso inflamatorio como se ha demostrado recientemente en las células epiteliales colónicas de pacientes con cáncer asociado a colitis (Gillespie et al., 2011).

Por todo esto el bloqueo de los receptores NK1R se ha convertido en una diana terapéutica antitumoral de creciente interés en los últimos años.

4. SISTEMA INMUNE Y TAQUICININAS

4.1. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE Y TAQUICININAS

Ya en la década de los 80 y 90 se planteó la posibilidad de que las TK pudiesen ejercer su influencia en el sistema inmune (Eglezos, Andrews, Boyd, & Helme, 1991; McGillis et al., 1990). Se demostró que ciertos tipos de células inflamatorias podían ser capaces de sintetizar y liberar TK, y que los NK1R desempeñaban un papel como mediadores de la migración extravascular de los granulocitos en respuesta a diferentes estímulos en los tejidos inflamados (Maggi, 1997).

Mientras que los NP proinflamatorios como la SP favorecen una respuesta CD4+Th1 y promueven la inmunidad celular, otros como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) son potentes supresores de la inmunidad celular (Seiffert & Granstein, 2002). La concentración de SP está muy aumentada en los focos inflamatorios en enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa o el asma. Se ha demostrado que la SP a través del NK1R retrasa la apoptosis y, por tanto, aumenta la supervivencia de los neutrófilos (Böckmann, Seep, & Jonas, 2001), macrófagos (B. N. Kang et al., 2001) y precursores de linfocitos T y B (Y. Zhang et al., 2000; Yu Zhang & Paige, 2003). La SP también potencia la proliferación de los linfocitos T inducida por antígenos o mitógenos (Calvo et al., 1992). Además, los efectos de estas TK se amplifican por la pérdida de su principal enzima degradante, la EPN de las células epiteliales que resultan dañadas en los procesos crónicos (Hwang et al., 1993).

Actualmente sabemos que el complejo SP-NK1R desempeña un papel fundamental en la regulación de la actividad inmunológica, modulando la respuesta inflamatoria y la inmunidad del huésped:

1. Neutrófilos: La SP regula la actividad y función de los neutrófilos ya que estimula la producción y liberación de citoquinas, quimioquinas (citoquinas con capacidad de inducir quimiotaxis), metaloproteasas y potencia la fagocitosis bacteriana (Augustyniak et al., 2012), la exocitosis y promueve el paso de situación de reposo a estado activado (Lloyds & Hallett, 1993; Tanabe et al., 1996). Además, la SP a altas concentraciones prolonga la vida media de los neutrófilos al retrasar

su apoptosis (Böckmann et al., 2001), aumenta su concentración intracelular de calcio y estimula la liberación de radicales O₂ y de IL-8 por estas células (Lloyds & Hallett, 1993; Serra, Calzetti, Ceska, & Cassatella, 1994).

2. Monocitos y macrófagos. Expresan SP de forma constitutiva (Yaraee, Ebtekar, Ahmadiani, Sabahi, & Ghazanfari, 2007). La expresión de NK1R en los macrófagos se afecta en ciertas condiciones. Por ejemplo, la hipoxia en ratas regula positivamente la expresión de NK1R en los macrófagos pulmonares (Zee, Schomberg, & Carpenter, 2006) y está incrementado en macrófagos de fumadores comparado con no fumadores (Bardelli et al., 2005). En pacientes con mielofibrosis con mayor predisposición a la inflamación y malignización, se ha observado un aumento en los niveles de SP y TGF- β (Harrison, Corcoran, Joshi, Sophacelus, & Rameshwar, 2006) y se ha visto que la expresión de NK1R está aumentada en células mieloides infiltrantes. En los focos inflamatorios de enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa o el asma, tanto los macrófagos como los eosinófilos son productores activos de SP (Ho et al., 1997; Metwali et al., 1994; Pascual & Bost, 1990).
3. La células dendríticas (CD), pertenecientes al sistema mononuclear fagocítico, forman parte de la inmunidad innata y actúan como las células presentadoras de antígenos profesionales más potentes de nuestro sistema inmune. Estas células expresan NK1R y NK2R regulando la vía NF- κ B (Janelsins et al., 2009; O'Connor et al., 2004). La liberación de SP en el foco inflamatorio es capaz de reclutar CD inmaduras hacia el mismo (Lambrecht, 2001) e inducen un efecto antiapoptótico sobre estas CD (Janelsins et al., 2009). El estímulo in vivo de CD con agonistas NK1R promueve una respuesta inmune del tipo CD4⁺/Th1 (T helpers) y CD8⁺/Tc (T citotóxicos) (Mathers et al., 2007). Por otro lado, la naturaleza e intensidad de la respuesta inmune depende en gran medida de la diferenciación de las células Th CD4⁺ efectoras. A este respecto, se ha descrito recientemente que tanto la SP como la HK-1 inducen la diferenciación de células T CD4⁺ memoria hacia células Th17, a través de la producción monocitaria de IL-1 β , IL-23 y TL1A (Cunin et al., 2011). Esta respuesta inmune Th17 se caracteriza por la liberación de gran

cantidad de citoquinas inflamatorias por diferentes tejidos y tipos celulares que, en su conjunto, conducirán al reclutamiento de células como neutrófilos y monocitos hacia el foco inflamatorio (Crome, Wang, & Levings, 2010). De esta manera, la SP y la HK-1, liberadas tanto por terminaciones nerviosas sensitivas como por células inflamatorias, estimularían la activación y producción de citoquinas de las células mieloides infiltrantes, lo que conduciría a la generación de células Th17 y al inicio o mantenimiento de este tipo de respuesta inflamatoria (Cunin et al., 2011).

4. Mastocitos. La SP induce la liberación de $\text{TNF-}\alpha$, factor de crecimiento del endotelio vascular (Shaik-Dasthagirisheb et al., 2013), leucotrienos e histamina de los mastocitos contribuyendo a su efecto en la inflamación, inmunidad y angiogénesis. También produce infiltración eosinofílica regulados por la estimulación de los mastocitos de la piel.
5. Linfocitos. Los linfocitos T sintetizan SP y expresan NK1R durante la infección y la inflamación y la SP regula positivamente la proliferación de linfocitos T, la liberación de citoquinas y quimioquinas y su actividad citotóxica (Wang et al., 2006). La HK-1 a través de NK1R regula el desarrollo de la linfopoyesis de células B y su diferenciación (Y. Zhang et al., 2000).
6. Las células Natural-Killer constituyen la principal población linfocitaria de la inmunidad innata. Expresan NK1R y responden a la SP favoreciendo su actividad citotóxica, reduciendo su actividad migratoria y promoviendo la liberación de citoquinas (Lang, Drell, Niggemann, Zänker, & Entschladen, 2003). Estudios posteriores han demostrado que si se deja incubar a dichas células con SP el efecto es contrario y su citotoxicidad disminuye (y se reduce su degranulación), siendo este efecto mediado por el NK1R (Monaco-Shawver et al., 2011). Esta aparente contradicción se podría explicar por la mayor exposición a SP a la que se sometían las células natural-killer del segundo estudio, y puede justificar el hecho de que en circunstancias en las que se eleva la concentración plasmática de SP, como también ocurre con la infección por VIH o la depresión, estas células

disminuyen su capacidad funcional.

4.2 HEMATOPOYESIS Y TAQUICININAS

4.2.1 TK Y HEMATOPOYESIS FISIOLÓGICA

La hematopoyesis está regulada por mediadores como citoquinas, quemoquinas, neurotransmisores, neurohormonas, proteínas de la matriz extramedular así como por la interacción entre células. Las citoquinas han sido consideradas tradicionalmente como el prototipo de mediador de la hematopoyesis. Sin embargo, también existe una comunicación bidireccional con el sistema nervioso a través de la liberación de neurotransmisores desde las fibras nerviosas que inervan la (Yamazaki & Allen, 1990). Estos neurotransmisores, entre ellos las TK, interactúan con receptores específicos en las células de la MO para liberar otros reguladores de la hematopoyesis, entre ellas las citoquinas. De este modo, tanto las TK como las citoquinas formarían parte del complejo entramado de la regulación de la hematopoyesis a través de la liberación e inducción tanto de citoquinas como de TK, la activación de promotores de receptores taquicinérgicos como NK1R por parte de las citoquinas y por último por la inducción de receptores de citoquinas por las propias TK (Figura 29)(Greco, Corcoran, Cho, & Rameshwar, 2004; P. Rameshwar & Gascón, 1997). Por otro lado, las células del estroma medular que son fuente de moléculas que sostienen a las CMH (Müller-Sieburg & Deryugina, 1995) son particularmente relevantes por dos razones: son una fuente no neuronal de neurotransmisores y expresan receptores específicos para TK.

La inervación medular es necesaria para la producción y retención de las CMH y otros progenitores en la propia MO (Afan, Broome, Nicholls, Whetton, & Miyan, 1997) ya que se ha observado que la denervación de la MO implica un aumento en la movilización de células hematopoyéticas hacia la periferia a expensas de una depleción en la celularidad medular. Existen terminaciones nerviosas en la MO que contienen TK (Goto & Tanaka, 2002), siendo la SP y NKA los neurotransmisores principales que actúan como moduladores de la inmunidad y la hematopoyesis (Greco et al., 2004; P.

Rameshwar, 1997). Existen dos fuentes de SP y NKA en la MO, como neurotransmisores liberados por las fibras nerviosas peptidérgicas, y por otro lado los liberados por las propias células que residen en la médula (P. Rameshwar & Gascón, 1996). Tienen efectos antagónicos sobre las CMH. La SP a través de NK1R promueve la proliferación y maduración celular en diversos puntos, mientras que NKA, a través de NK2R, inhibe esta proliferación celular (P. Rameshwar, Ganea, & Gascón, 1993; P. Rameshwar & Gascón, 1996) como se muestra en la figura 30. El efecto de la SP sobre la hematopoyesis no está limitada al compartimento mieloide con la estimulación de progenitores de granulocitos-monocitos y progenitores eritroides sino que también es un co-estimulador durante la fase tardía de la maduración de las células B (Pascual, Bost, Xu-Amano, Kiyono, & McGhee, 1992) y está implicado en el desarrollo de linfocitos T en el timo (Santoni et al., 2002).

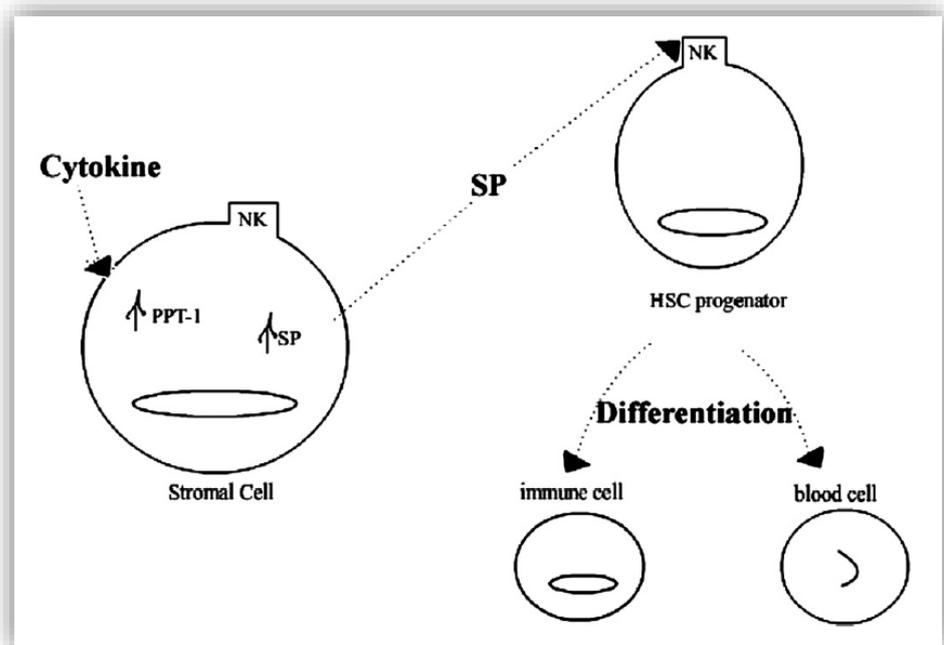


Figura 29. Regulación de la hematopoyesis por la SP. La SP estimula la proliferación de progenitores e induce la producción de citoquinas en el estroma medular que inducen asimismo la expresión de TAC1 (PPT-1) y SP. Imagen tomada de Liu K et al. 2007. Pag 31. (Liu, Castillo, Murthy, Patel, & Rameshwar, 2007).

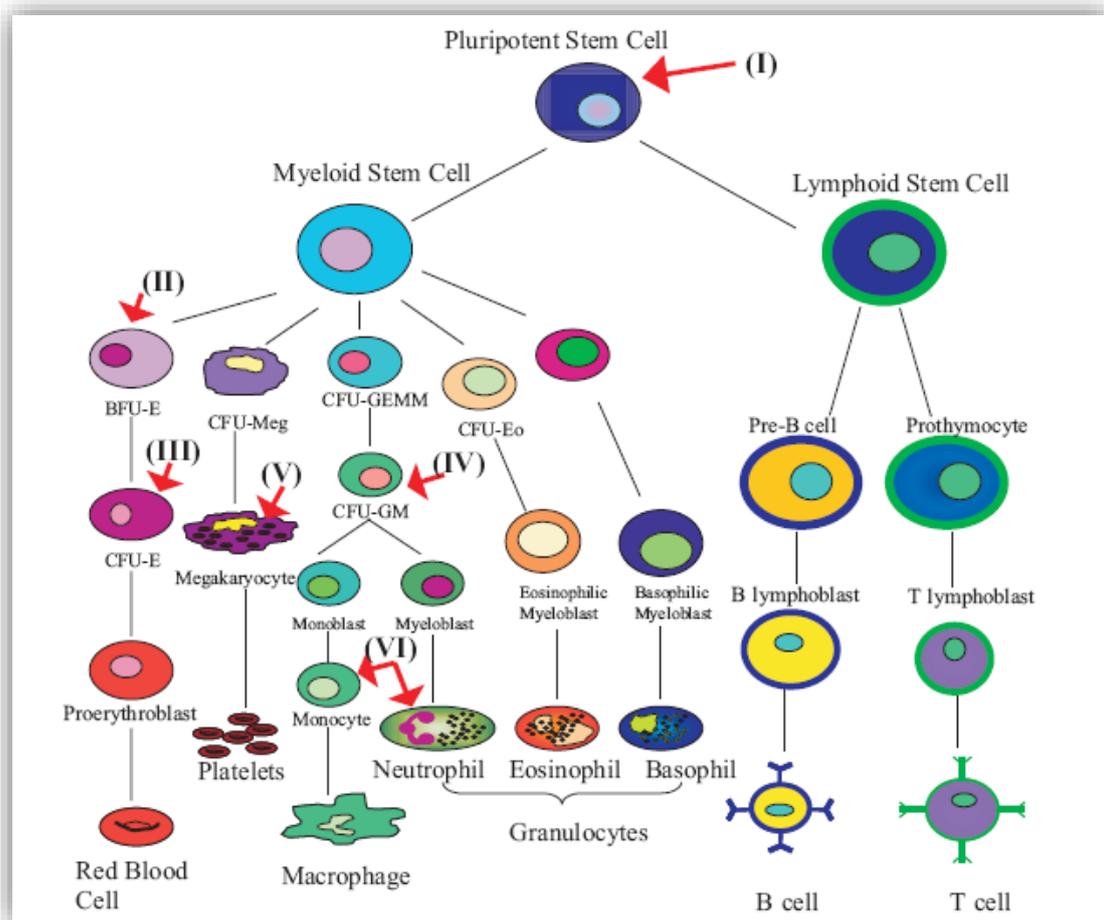


Figura 30. Resumen de las acciones de la SP y NKA sobre la hematopoyesis. (I) La SP tiene un efecto estimulador sobre los progenitores primitivos de la médula ósea. (II) La SP estimula la proliferación de los progenitores eritroides precoces (BFU-E) y tardíos (CFU-E). (III-VI) La SP tiene un efecto sinérgico con diversas citoquinas para inducir la proliferación de las colonias mixtas mieloides-eritroides. Las flechas indican estimulación hematopoyética por la SP. La NKA muestra efectos inhibitorios opuestos a SP (Imagen tomada de H. S. Kang et al., 2004, p. 341).

El estroma medular parece ser crucial en la comunicación entre TK y hematopoyesis (Figura 31A). Estudios in vitro muestran como cada TK induce la producción de citoquinas específicas (P. Rameshwar, Poddar, & Gascón, 1997). Las citoquinas ligadas a las funciones en la hematopoyesis de la SP incluyen IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF (Colonia estimuladora de granulocitos y macrófagos) y SCF (Stem-cell factor). Estas citoquinas tienen efectos estimuladores de la hematopoyesis y la producción de

todas ellas es inducida por la SP. Estas mismas citoquinas inducidas por la SP pueden activar células de la MO por mecanismos autocrinos y paracrinos para producir otras citoquinas estimuladoras de la hematopoyesis (P. Rameshwar, 1997) y además, tanto directa como indirectamente activan el NF- κ B para activar los promotores del receptor NK1R (Simeonidis et al., 2003).

La NKA inhibe la proliferación de progenitores de granulocitos-monocitos aunque estimula a progenitores eritroides (P. Rameshwar & Gascón, 1996). Sus efectos negativos sobre la hematopoyesis pueden ser explicados por la producción de citoquinas supresoras como MIP-1 α y TGF- β (P. Rameshwar et al., 1997). Se sugiere que la NKA por sus efectos negativos en la proliferación de los progenitores de la MO le conferiría un papel protector sobre las CMH (P. Rameshwar & Gascón, 1996). Esta afirmación se basa en los genes predominantes en las células normales y en las leucémicas, de manera que las células normales del estroma medular expresan sobre todo β -TAC1 (codifica SP y NKA) mientras que las células leucémicas expresan sólo α -TAC1 que codifica exclusivamente para SP (P. Rameshwar, Oh, Yook, Gascon, & Chang, 2003). Estos mecanismos de regulación de la proliferación de progenitores hematopoyético que veríamos en una célula normal a través de SP y NKA no se producirían en una célula leucémica donde sólo se produce SP (Nowicki, Miśkowiak, & Ostalska-Nowicka, 2003; M. Nowicki & Miśkowiak, 2003; P. Rameshwar et al., 2003).

La expresión de NK1R y NK2R se ha demostrado tanto en células del sistema inmune maduras como en progenitores hematopoyéticos, CMM y en células del estroma medular como células endoteliales y macrófagos. El NK1R está expresado de forma constitutiva en las células nerviosas y es inducible en las células del estroma medular modulando el número y afinidad de NK1R (P. Rameshwar & Gascón, 1995). En las células del estroma medular, los receptores taquicinérgicos NK1R y NK2R tienen una expresión de tipo ying-yang o fuerzas opuestas ya que son capaces de regular su propia expresión (Figura 31B) e inhibir la expresión del otro subtipo de receptor. Como ejemplo, se ha demostrado que la SP y GM-CSF son capaces de controlar negativamente la inducción de NKA-NK2R mediada por la activación de p53 en una línea celular humana de progenitores hematopoyéticos (Vishalakumar, Patel, Moharita, Harrison, & Rameshwar, 2006). Por el otro lado, TGF- β como citoquina inductora de NK2R disminuye la expresión de NK1R en el estroma medular (P.S Bandari et al., 2003).

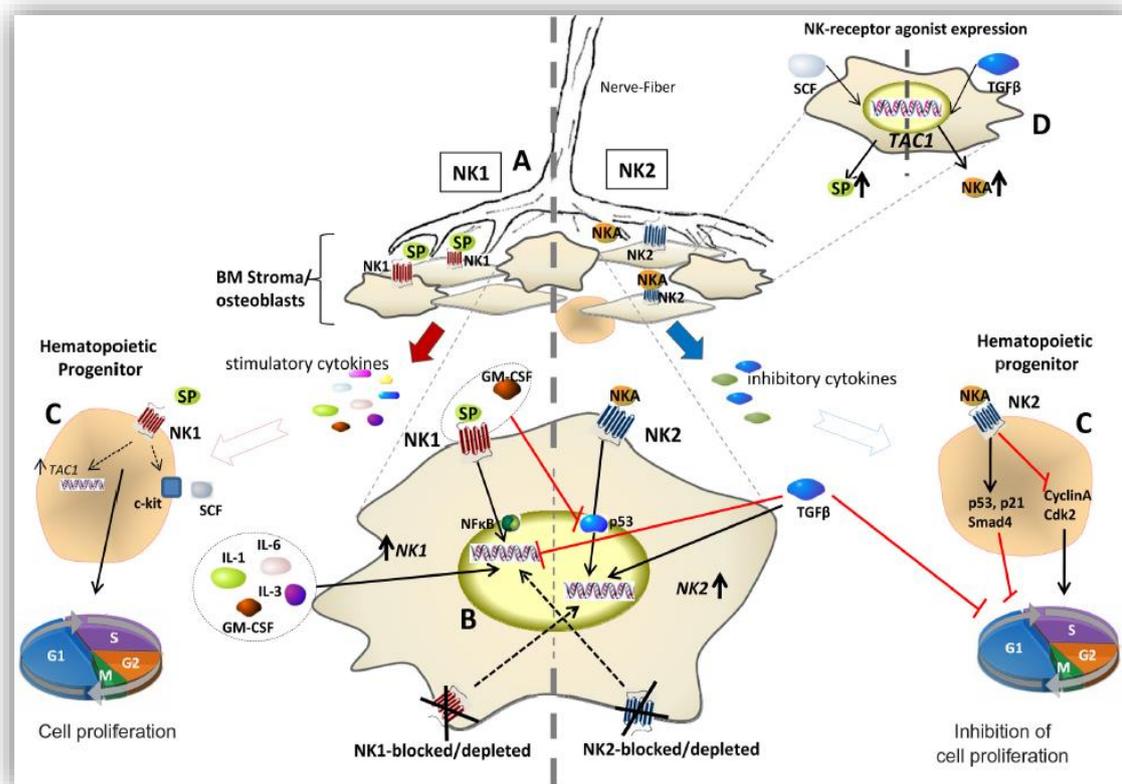


Figura 31. Imagen que resume la implicación de los receptores taquicinérgicos en la regulación de la hematopoyesis y el resultado de la comunicación entre NK1R y NK2R. A la izquierda se muestra como NK1R media la proliferación celular. A la derecha vemos como NK2R media la inhibición hematopoyética. La SP-NK1R permite la producción de citoquinas estimuladoras en el estroma medular mientras que NKA-NK2 libera citoquinas inhibitorias. (A y B) La comunicación entre los receptores se muestra a través de la expresión de NK1R o NK2R en las células del estroma medular. La expresión de los genes de estos receptores está ligado y regulado por el propio ligando (SP o NKA) y por las citoquinas que ellos mismos liberan. (C y D) La expresión de cada isoforma de TAC 1 depende del ligando (SCF para SP y TGF-β para NKA). Las líneas negras indican “upregulation” y las líneas rojas “downregulation”. Imagen tomada de T.E. Klassert et al. 2010, pag 57) (Klassert, Patel, & Rameshwar, 2010).

En las células del estroma la co-expresión de ambos receptores no suele existir (P.S Bandari et al., 2003; P. Rameshwar & Gascón, 1997). Sin embargo, en las células madre mesenquimales (CMM) sí existe una co-expresión de NK1R y NK2R al igual que ocurre en las células neuronales (P. S. Bandari et al., 2002; Greco et al., 2004). En este

caso, se sugiere que esta co-expresión de receptores taquicinérgicos podría permitir a las CMM responder rápidamente a los neurotransmisores liberados desde las fibras nerviosas que están en íntimo contacto con ellas.

Resulta interesante saber que la SP₁₋₄, fragmento de la SP resultado de la digestión de ésta por la endopeptidasa endógena, compite con la propia SP por el NK1R y realiza un efecto opuesto y una retroalimentación negativa sobre este receptor de manera similar a la NKA (H. S. Kang, Trzaska, Corcoran, Chang, & Rameshwar, 2004) produciendo TGF- β y TNF α (Figura 32). De esta manera, el NK1R estimula la hematopoyesis al interactuar con la SP y la inhibe si el ligando es SP₁₋₄ por lo que se deduce que este último cumple una función de “feed-back” negativo.

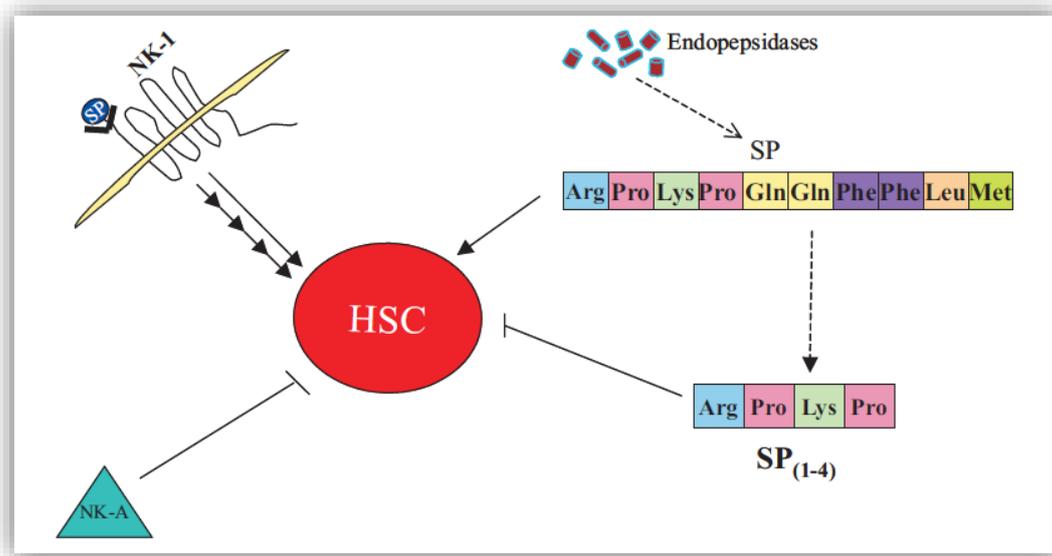


Figura 32. Efectos de SP, NKA y SP₁₋₄ sobre las células madre hematopoyéticas (HSC: hematopoietic stem cells). La SP a través de NK1R estimula la hematopoyesis por un efecto directo o indirecto a través de citoquinas. Las endopeptidasas usan la SP como sustrato para producir el fragmento SP₁₋₄ que inhibe la proliferación de las células hematopoyéticas de forma paralela a la NKA. (Imagen tomada de H. S. Kang et al., 2004, p. 344).

Por otro lado, si la señalización de NK1R es bloqueada, la SP interacciona con NK2R mostrando un efecto inhibitorio de la hematopoyesis (P.S Bandari et al., 2003). Podemos concluir que la función de las TK (SP, NKA y SP₁₋₄) sobre la hematopoyesis involucra a redes formadas por citoquinas y comunicaciones intracelulares que implican

a los receptores NK1R y NK2R para el mantenimiento de la homeostasis hematopoyética (P.S Bandari et al., 2003; P. Rameshwar et al., 1997).

Como ya hemos comentado, cuando la expresión de genes de NK1R está regulado positivamente, de forma concomitante la expresión de NK2R está inhibida. Pero además, se ha visto que en las células del estroma medular puede haber otros receptores con un mimetismo molecular con NK1R y por tanto son capaces de interactuar con SP. Nos referimos a NK1R en su isoforma truncada y HGFIN (hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type), una glicoproteína transmembrana (Persis S. Bandari et al., 2003) molecularmente similar a NK1R (Figura 33). A través de estos receptores, la SP teóricamente dejaría de estar disponible para actuar a través de NK1R y como resultado la SP tendría un efecto negativo en la hematopoyesis como ocurre cuando SP se une a NK2R cuando el NK1R está suprimido.

La fibronectina, un componente de las proteínas de la matriz extracelular de la MO, también se asemeja a los sitios de unión de NK1R permitiendo interacciones no covalentes entre SP y fibronectina (Pranela Rameshwar et al., 2002). Esto podría explicar el aumento de SP que se ha visto en pacientes con fibrosis medular (P. Rameshwar et al., 2001) ya que a través de la similitud entre NK1R y fibronectina, la SP podría protegerse de la degradación por parte de las endopeptidasas endógenas de manera que la fibronectina evitaría la degradación de SP a SP₁₋₄ y permitiría mantener los efectos estimuladores de la SP sobre los progenitores hematopoyéticos (P. Rameshwar et al., 2003).

Podemos concluir que los efectos que modulan la actividad de NK1R y NK2R entre sí y la interacción entre ambos receptores parecen importantes para mantener el correcto balance en el resultado final de la hematopoyesis. Esta modulación entre receptores incluye mecanismos mediados por citoquinas, señalización intracelular y comunicaciones a nivel molecular. Todo ello podría jugar un papel relevante no sólo en la fisiología de la hematopoyesis sino también en algunos procesos patológicos como fibrosis medular y leucemia. Sin embargo, el conocimiento exacto de este complejo entramado de mecanismos de comunicación, regulación e inter-comunicación entre receptores y ligandos no está todavía bien aclarado.

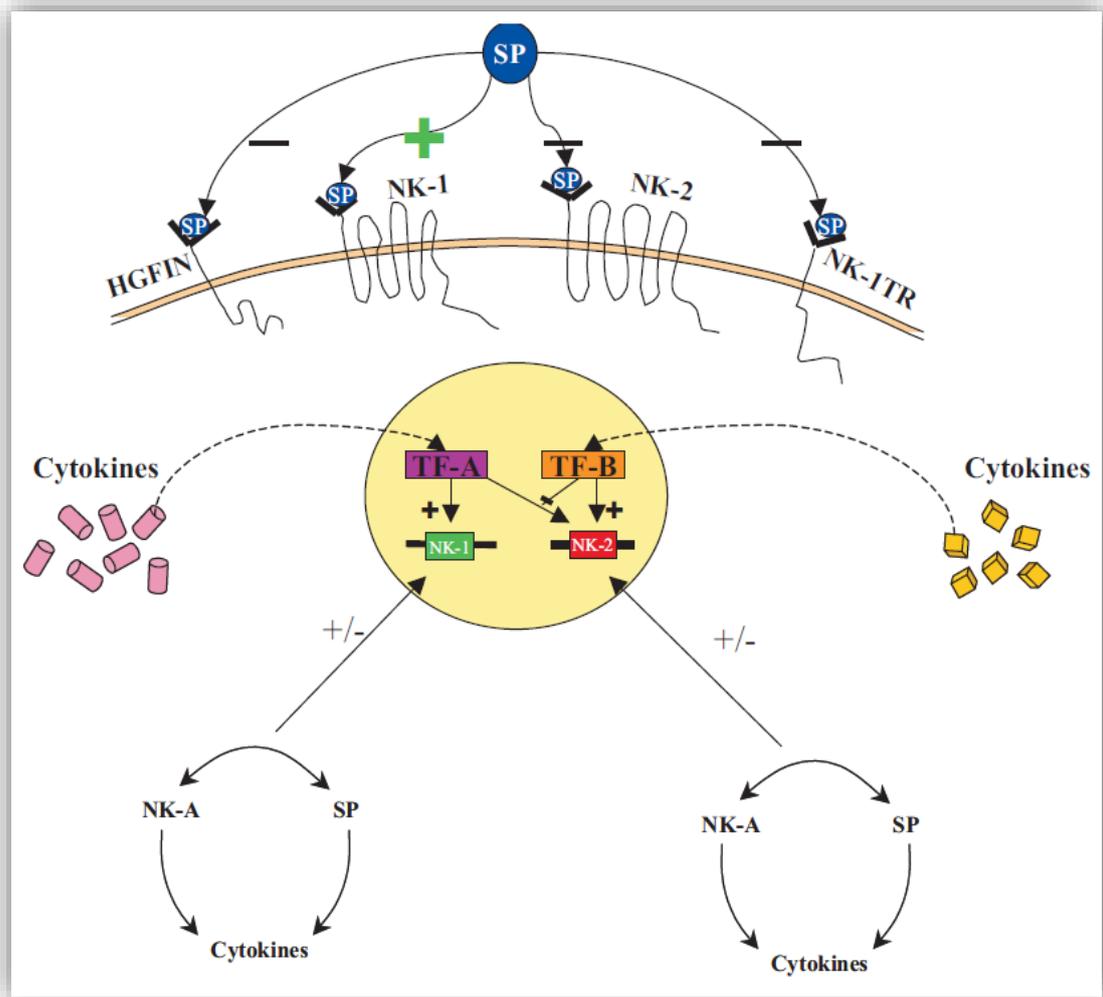


Figura 33. Interacción de la SP con distintos receptores y su efecto sobre la hematopoyesis: Mecanismo por el cual SP, NKA y las citoquinas están ligadas a los receptores taquicinérgicos NK1R y NK2R en la regulación de la hematopoyesis. En las células del estroma medular puede haber otros receptores como son NK1R en su isoforma truncada (NK-1TR) y HGFIN (hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type) que actúan como receptores señuelo interactuando con SP y con efectos negativos en la proliferación de células hematopoyéticas. Las citoquinas producidas por la interacción entre SP/NK1R o NKA/NK2R conllevan la activación de factores de transcripción (TF-A y TF-B) específicos para inducir el receptor NK1R o NK2R respectivamente (Imagen tomada de H. S. Kang et al., 2004, p. 343).

4.2.2 TK Y HEMATOPOYESIS PATOLÓGICA. LEUCEMIA Y MIELOFIBROSIS

La alteración del eje neuro-inmune hematopoyético podría estar implicado en la fisiopatología de algunas hemopatías malignas. Estudios experimentales comparando aspirado de MO de sujetos sanos con pacientes con trastornos mieloproliferativos con o sin fibrosis, han demostrado la importancia de NK1R y NK2R en la homeostasis hematopoyética (Greco et al., 2004; Liu et al., 2007). En concreto, la SP parece estar implicada en la transformación neoplásica de la MO.

LEUCEMIA

Los procesos de control de la hematopoyesis implican diversas vías y distintos componentes, por lo que no es fácil demostrar el papel de un solo factor in vivo, como la SP, en la patogénesis de la leucemia aguda.

Los estudios realizados por De Giorgio R. y colaboradores en 1998 demostraron la existencia de SP en granulocitos y monocitos normales de sangre periférica (De Giorgio, Tazzari, Barbara, Stanghellini, & Corinaldesi, 1998). Sin embargo, la inmunorreactividad frente a SP estaba ausente o era débilmente positiva en linfocitos circulantes normales. Por otro lado, en linfocitos T activados in vitro, en células leucémicas de pacientes con leucemia mieloide aguda y crónica y en leucemia linfoblástica crónica, se detectaba una fuerte inmunorreactividad frente a SP. Esto sugería que la expresión de SP en la célula leucémica podía ser indicativo de su estado de activación anómala.

En 2003, Nowicki M. y colaboradores encontraron que la expresión de SP en los blastos de niños con LLA de bajo riesgo representaba un factor de riesgo desfavorable (Michał Nowicki et al., 2003; M. Nowicki & Miśkowiak, 2003). En 2008 este mismo grupo demostró que blastos de LLA-B común (CD10 positivo) incubados con un agonista de la SP producían un aumento significativo de IL-1b (una citoquina con propiedades mitogénicas sobre los linfocitos) mientras que si se incubaban con un antagonista de SP (Spantide) disminuían los niveles de esta citoquina. Con estos resultados los autores sugerían que la SP estimulaba de forma indirecta la proliferación de las células leucémicas LLA-B común a través del incremento en la síntesis de IL-1b (M. Nowicki, Ostalska-Nowicka, & Miskowiak, 2008).

Estudios in vitro con dos líneas celulares de LLA han demostrado que las células blásticas de LLA expresan tanto SP como el receptor NK1R con distintas isoformas (33, 58 y 75 kDa). Expresaban aproximadamente 30 veces más NK1R que las células normales. Por otro lado, la adición de SP exógena a bajas concentraciones (nanomolares) inducía proliferación de las células de LLA en comparación con los controles. Cuando se utilizaba un antagonista de NK1R se producía inhibición del crecimiento celular de las dos líneas de LLA dosis-dependiente y muerte por apoptosis. Por último, después de la administración de siRNA (gen silenciador) del gen TAC1R a ambos cultivos celulares, se observaba un descenso del número de células comparado con células siRNA negativas. (M Muñoz, González-Ortega, & Coveñas, 2012).

Por otro lado, la hipoplasia medular, aunque no es una enfermedad maligna, sí se considera una entidad pre-neoplásica, precursora de algunos tipos de leucemia. Nowicki M. y colaboradores sugieren que la proporción de células SP-positivas de una MO hipoplásica podría predecir su transformación neoplásica. Ellos encontraron un incremento progresivo de células nucleadas SP-positivas en la médula hipoplásica en ausencia morfológica de células neoplásicas comparando con células de una MO (M. Nowicki, Ostalska-Nowicka, Konwerska, & Miskowiak, 2006).

METÁSTASIS A NIVEL MEDULAR DE TUMORES SÓLIDOS

Estudios in vitro han demostrado que líneas celulares de neuroblastoma expresan tanto TAC1 como los genes promotores de NK1R y NK2R y que éstos podrían ser importantes en la proliferación tumoral y en la capacidad de metastatizar en la MO. Encontraron que las células de neuroblastoma deficientes en NK1R no proliferaban cuando se cultivaban con estroma medular lo cual sugería que la señalización NK1R podría ser importante para la supervivencia de las células de neuroblastoma en la MO (Mukerji, Ramkissoon, Reddy, & Rameshwar, 2005).

Las células del cáncer de mama son capaces de migrar y permanecer quiescentes en la MO utilizando el microambiente del estroma medular evadiendo el efecto de los tratamientos quimioterápicos convencionales. La MO es por tanto un lugar preferente para la progresión tumoral y metástasis. Líneas celulares de varios cánceres de mama han demostrado tener una expresión aumentada de TAC1 y NK1R. Los estudios realizados por Rao G. y colaboradores demostraron que células de mama normales no eran capaces

de sobrevivir cuando se cultivaban con estroma medular. Esta situación se revertía cuando por ingeniería genética esas mismas células de mama expresaban TAC1. Además, la supresión de TAC1 en las líneas tumorales de cáncer de mama limitaban su malignidad y afectaban al proceso de colonización medular (Rao et al., 2004).

MIELOFIBROSIS

La fibrosis medular con frecuencia se desarrolla secundariamente a muchos trastornos hematológicos. Esta condición se caracteriza por un incremento de los niveles de proteínas de la matriz extracelular, un aumento de angiogénesis, hiper celularidad y un exceso en el número de células fibroblastoides (Barosi, 1999). En pacientes con mielofibrosis, los niveles de SP están aumentados en sangre periférica y en MO (Greco et al., 2004). En este sentido, la SP induce la producción de citoquinas implicadas en la proliferación de fibroblastos y la promoción de angiogénesis, ambos marcadores de fibrosis medular (Bianco, Riminucci, Gronthos, & Robey, 2001). Además, la SP se encuentra unida a la fibronectina quedando protegida de la degradación a SP₁₋₄. Chang VT. y colaboradores observaron que los monocitos de pacientes con mielofibrosis expresan TAC1 y que existía un sinergismo entre fibronectina y TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) en la producción de SP por parte de estos monocitos de pacientes con mielofibrosis (V. T. Chang, Yook, & Rameshwar, 2013).

Por otro lado, la citoquina CXCL12 o SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) es un ligando que a través de su receptor CXCR4 (N. Patel, Castillo, & Rameshwar, 2007) está implicado en la hematopoyesis contribuyendo a la migración celular, angiogénesis y supervivencia de las células hematopoyéticas (Lapidot, Dar, & Kollet, 2005). Estudios in vitro describen que CXCL12 o SDF-1 induce la expresión de TAC1 (Figura 34) (Corcoran, Patel, & Rameshwar, 2007). A este respecto se ha encontrado que un incremento de CXCL12 puede contribuir al desarrollo de enfermedades hematológicas malignas así como a las metástasis medulares de otras células tumorales (Reddy, Greco, Patel, Trzaska, & Rameshwar, 2009).

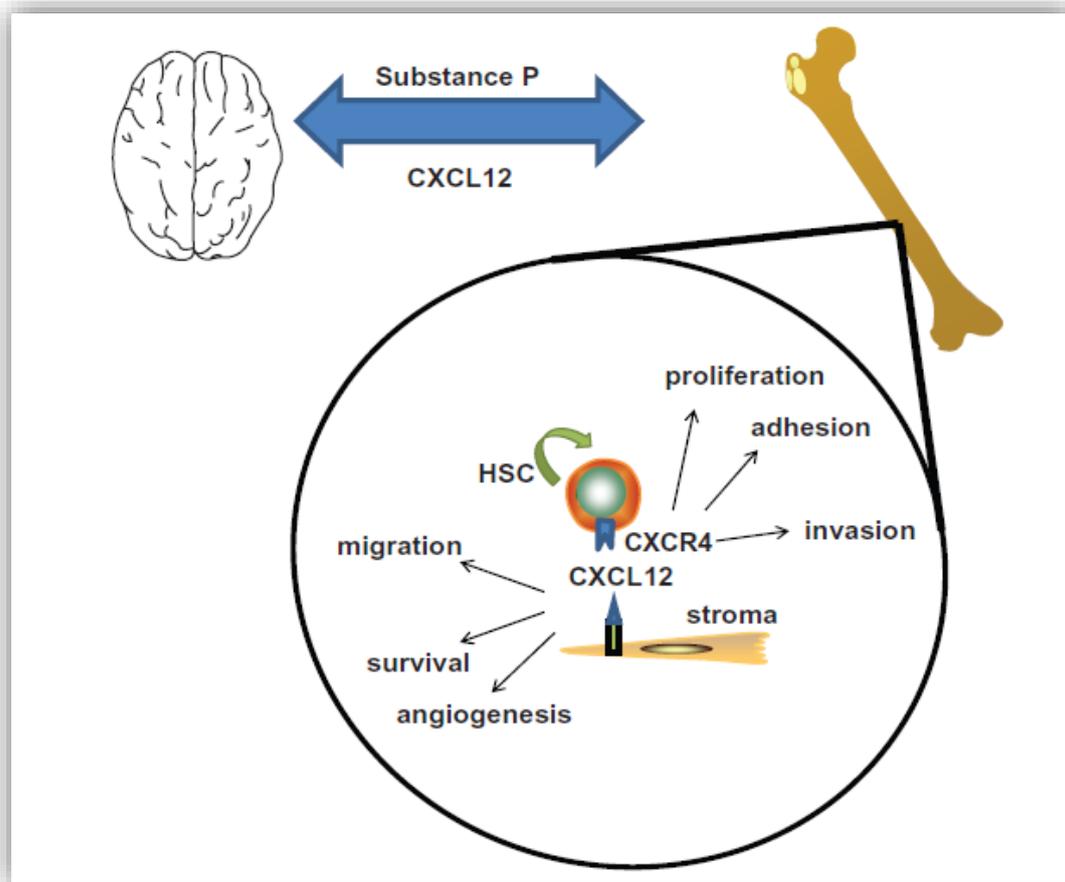


Figura 34. Control del SNC sobre la hematopoyesis a través de comunicaciones bidireccionales entre el cerebro y la MO. La célula madre hematopoyética (HSC) interactúa con células del estroma medular a través del receptor CXCR4 y CXCL12 para la migración y auto-renovación de HSC. ". Imagen tomada de T.E. Klassert et al. 2010, pag 55) (Klassert, Patel, & Rameshwar, 2010).

La capacidad del SNC para interactuar con el sistema inmune y la hematopoyesis mediante una comunicación bidireccional entre ambos está basada en un lenguaje químico de neurotransmisores, hormonas y citoquinas el cual podría tener su relevancia en la génesis y progresión de las células cancerígenas. Este planteamiento unido a datos experimentales han llevado a algunos autores a formular la hipótesis de que el SNC a través de sus neurotransmisores y en nuestro caso de NP como la SP, podrían ser capaces de modular la hematopoyesis normal y en condiciones patológicas podría estar implicado en la expansión de una clona leucémica a través de interacciones del eje neuro-inmuno-hematopoyético y participando en la fisiopatología de la tumorigénesis (Figura 35) (Gidron, Perry, & Glennie, 2005; Mravec et al., 2006).

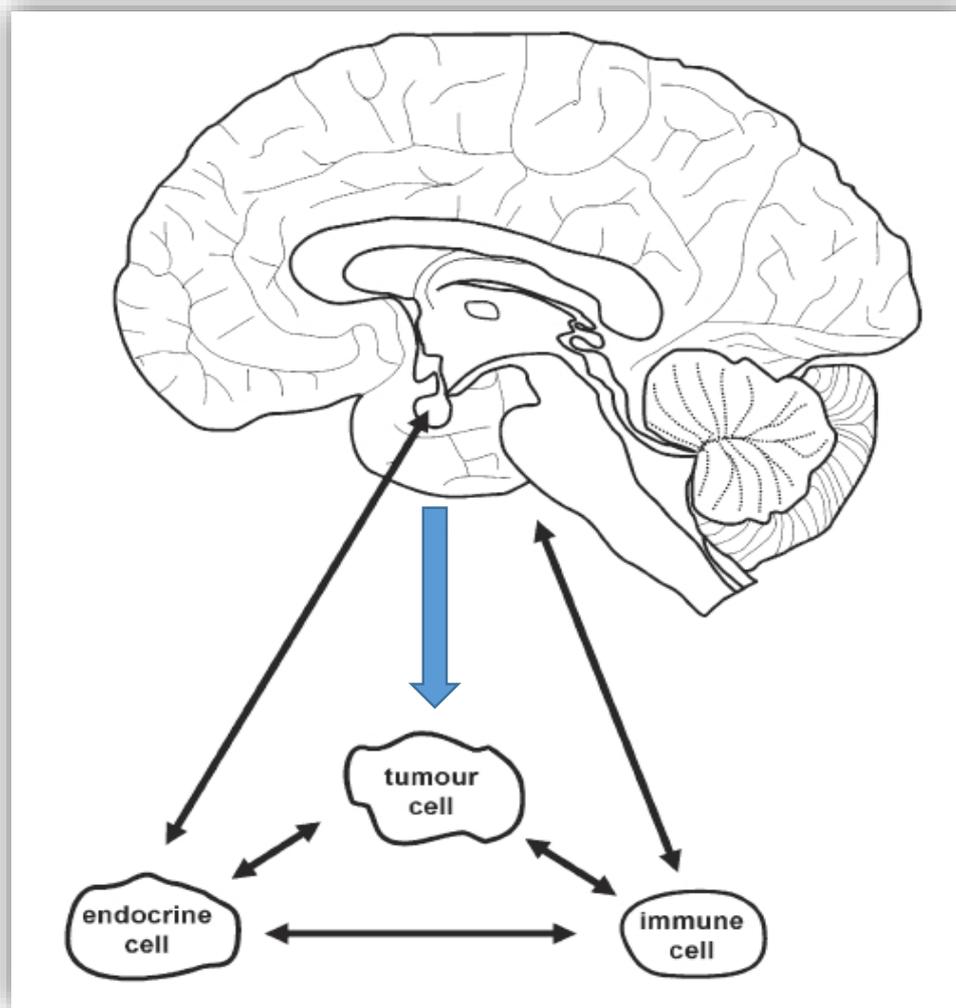


Figura 35. Modelo propuesto de interacción entre el sistema nervioso, endocrino, inmune y las células tumorales. La comunicación bidireccional del tumor con las células inmunes y las consiguientes interconexiones entre el sistema inmune con el nervioso constituirían la base de esta modulación indirecta de la tumorigénesis por parte del cerebro (Imagen modificada de Mravec et al., 2006, p. 112). El sistema nervioso podría liberar sustancias como la SP que modulasen de forma directa el crecimiento del tumor (flecha azul).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La SP como parte de la familia de las TK tiene un papel relevante en la regulación de la hematopoyesis a través de su receptor de mayor afinidad, NK1R. Este receptor está presente en las células hematopoyéticas tanto maduras como en los progenitores hematopoyéticos. Algunos estudios ya señalan un papel relevante de este eje neuro-inmune-hematopoyético SP-NK1R en la patofisiología de procesos hematológicos como la LLA y la mielofibrosis. Además, numerosos estudios han puesto de manifiesto que los fármacos antagonistas del NK1R presentan un efecto antitumoral. Sin embargo, en la actualidad, la presencia de los receptores NK1R en las células tumorales de LMA no ha sido demostrada ni se conoce si existe una isoforma del receptor predominante. Tampoco se ha estudiado el efecto de los diferentes antagonistas de NK1R sobre estas células.

Por todo ello, la hipótesis de trabajo es que las células tumorales de LMA expresarían NK1R y que este receptor estaría sobreexpresado en las células de LMA en comparación con los controles, siendo la isoforma truncada la más prevalente. La SP exógena, actuando a través de dichos receptores, regula la proliferación celular de LMA y la administración de antagonistas de NK1R inhibiría la proliferación celular y produciría muerte por apoptosis específicamente en células de LMA. Por último cabría confirmar estos resultados comprobando el efecto antitumoral de un antagonista de NK1R en modelo in vivo de ratón xenoinjertado con una línea celular de LMA.

OBJETIVOS

1. Demostrar la existencia de los NK1R en dos líneas de LMA (KG-1 y HL-60) y determinar si existe una isoforma de NK1R predominante en las líneas celulares de LMA (KG-1 y HL-60) y evaluar la implicación del NK1R en la viabilidad y proliferación de las células tumorales de LMA.
2. Comprobar que la SP provoca aumento en la mitogénesis de las líneas celulares KG-1 y HL-60 y confirmar que los antagonistas específicos del NK1R (L-733,060, L-732,138, CP96-345 y Aprepitant) inhiben la proliferación de las líneas celulares.
3. Demostrar el efecto antileucémico de los antagonistas de los NK1R y examinar su efecto sobre células sanas.
4. Confirmar el efecto antileucémico de los antagonistas de NK1R in vivo en modelo murino.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

MATERIAL FUNGIBLE

- Frascos de cultivo no pirógenos estériles de 25 cm² o de 75 cm². (Falcon, Heidelberg; Alemania).
- Puntas de pipetas estériles de 0,5-1 µL, 1-10 µL y 20-200 µL.
- Pipetas serológicas estériles de 25 ml, 10 ml y 5 ml (Becton Dickinson, Francia).
- Cámara de contaje celular Neubauer
- Tubos de polipropileno con fondo cónico Falcon de 15 ml para centrifuga (Becton Dickinson, Francia).
- Placas de siembra de 96 pocillos Nunclon TM surface (Nunc Brad Products. Nalge Nunc International Dinamarca).
- Placas de 6 pocillos (Nunc Brad Products. Nalge Nunc International Dinamarca).
- Criotubos de 1,8 ml (Nunc Internacional Dinamarca).
- Tubos eppendorf de 0,2 ml y 0,5 ml (CMB bioline)
- Capilares Light Cycler (Roche-Applied system)
- Papel de filtro (Auxilab, S.L., España)
- Parafina (Merck, España)

MATERIAL CONSUMIBLE

- Medios de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Barcelona, España).
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (BIOMOL, Sevilla, España).
- L-glutamina 2 mM (BIOMOL, Sevilla, España).
- Estreptomicina / Penicilina (GIBCO, Barcelona, España).
- Azul tripan (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Dimetil sulfoxido DMSO (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

- Tripsina EDTA (tripsina 0,05% y 0,02% EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) (GIBCO, Barcelona, España)
- Suero fisiológico (GIBCO, Barcelona, España)
- PBS (GIBCO, Barcelona, España)
- Tween 20 (PANREAC QUÍMICA, S.A., España)
- Agua destilada en monodosis (Fraserius Kabi España)
- Suero bovino fetal SBF (BIOMOL, Sevilla, España).
- Anexina V- 100 test (BD)
- Binding buffer- 100 test (BD)
- Actinomicina – 1 mg (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride, DAPI Dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Diluyente de anticuerpo (DAKO, España)
- Bromuro de etidio solución 10 mg/ml (Bio Rad Laboratories, España)

MATERIAL INVENTARIABLE

- Cabina de flujo laminar vertical Heraguard Mod.HPH9 (SORVALL_Heraeus U.S.A)
- Baño de agua 2-6 L: (SORVALL_Heraeus, U.S.A).
- Congelador de – 80 °C REVCO LEGACI™ Refrigeration system Asheville North Carolina USA.
- Frigorífico-congelador (-20°C) Superser Ecologic.
- Incubadora para Tª de 37°C y CO₂ a 5% Termo-Forma Hepa filter.
- Microscopio invertido (Olimpus CKX41 Optical España, S.A.).
- Microscopio óptico NIKON AFX-DX.
- Vortex (Gene 2 Scientific Industries, U.S.A)
- Centrifuga Megafuge 1.0 R (SORVALL_Heraeus).
- Microcentrifuga EPPENDORF

- Balanza analítica de precisión (Expert, España)
- Lector de placa TECAN (Spectra classic, Barcelona, España).
- Micropipetas Pipetman de 10, 100 y 200 μL (Gilson Medical Electronics, Francia).
- ECL Western blotting detection; Amersham Life Science, United Kingdom
- NanoDrop N-1000
- Light Cycler de Roche
- Cubetas de electroforesis horizontal y vertical BioRad
- Cubetas para tinción con tapa y gradilla de vidrio (Marienfeld, Alemania)
- Gradilla de acero inoxidable (Marienfeld, Alemania)
- Cronómetro digital (Digital timer, China)
- Ordenador / Impresora
- Análisis estadístico. SPSS

MATERIAL BIOLÓGICO

- Anticuerpos

1. Anticuerpo primario específico contra el NK1R de la SP.

Desarrollado en conejo usando un péptido sintético correspondiente al C-terminal de un NK1R originado en rata con 393-407 aminoácidos conjugado con KLH como inmunógeno. (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

2. Anticuerpo secundario (polímero) anti inmunoglobulina G de conejo (Amershan Biosciences) conjugado con Peroxidasa de rábano picante (Cell Signaling Technology, United States peroxidasa

- SP (péptido de unión a anticuerpo anti SP) (Sigma Aldrich, España)
- Fragmento C-terminal de 14 aminoácidos de la cadena de aminoácidos del receptor NK1 (péptido de unión a anticuerpo anti NK1 para preabsorción) (Sigma Aldrich, España)
- Primers o cebadores TAC1R forward y reverse (Tib MolBio, Roche)
- Primers o cebadores Beta-Actina forward y reverse (SIGMA-Aldrich, Madrid, España)

- Las líneas celulares de LMA: KG-1 y HL-60
- Linfocitos de donante sano

MATERIAL FARMACOLÓGICO IN VITRO

- L-733,060:(2S,3S)3-([3,5-Bis(trifluorometil)fenil]metoxi-2fenilpiperidina,(Sigma Aldrich, Madrid, España) vial de 5 mg, es un antagonista de los RNK1 con PM 438,9, polvo de aspecto blanco soluble en DMSO.
- L-732,138 (N-Acetyl-L-tryptophan 3,5-bis (triofluoromethyl)benzyl ester) (Tocris Bioscience, Bristol UK) vial 5mg, antagonista de los RNK1 con PM 472,39, polvo
- Aprepitant:(5-(((2R, 3S)-2-((R)-1-(3,5-bis (trifluorometil)phenyl)ethoxy)-3-(4-fluorophenyl)morpholino)metil)-1H-1,2,4-triazol-3(2H)-one (MedKoo Bioscience, USA), vial 5g, antagonista de los RNK1 con PM 534,43, polvo de aspecto blanco soluble en acetonitrilo. Suministrado por Merck Research Laboratories, Madrid, España. Se diluye 15mg en 2,8ml de acetonitrilo, y luego añadir 2,8ml de agua destilada, obteniendo un volumen final de 5,6 ml (la proporción acetonitrilo y agua destilada es 1:1). De la mezcla madre se toma alícuotas de 100µl con la concentración de 0,2678mg.
- CP96-345: (2S,3S)-N-(2-Methoxyphenyl)methyl-2-diphenylmethyl-1-azabicyclo [2.2.2]octan-3-amine (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- SP: (Sigma Aldrich, Madrid, España) vial 25 mg. Potente agonista RNK1 con PM 1347,6, polvo blanco con una pureza del 98% soluble en agua.
- Fosaprepitant dimeglumina (Ivemend®). Laboratorio MSD (Merck Sharp & Dohme, Madrid, España). Vial de 150 mg polvo para solución para perfusión. Medicamento antagonista NK1R aprobado por la FDA para los vómitos inducidos por la quimioterapia vía intravenosa.

MODELO ANIMAL

Se emplearon ratones (mus musculus) de la cepa NSG y genotipo NOD/SCID/Il2rg, procedente inicialmente de “The Jackson Laboratory” (referencia: 005557). Se estableció una colonia en el animalario del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), de donde proceden los ratones utilizados en nuestros estudios. Se eligieron ratones NSG porque pertenecen a una línea óptima para el injerto de células tumorales humanas hematopoyéticas al ser ratones altamente inmunosuprimidos, carentes de células T maduras y células B, y deficientes en células NK funcionales y en la señalización de citoquinas (Figura 36)

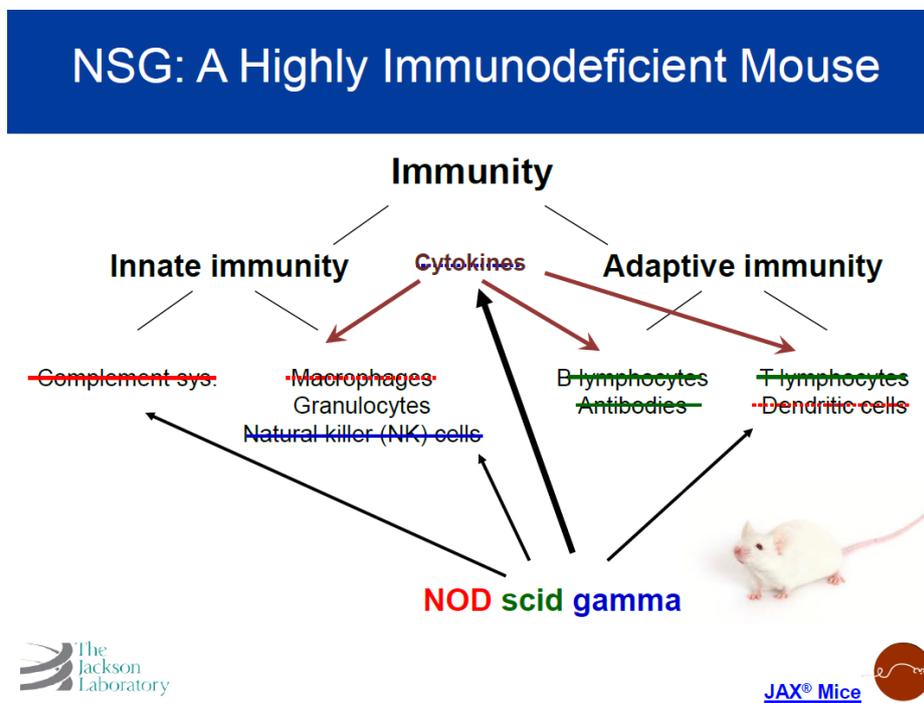


Figura 36. Modelo de ratón NSG (NOD/SCID/ Il2rg). Ratón altamente inmunosuprimido con déficit tanto en la inmunidad innata como adquirida. Imagen tomada de “The Jackson Laboratory” www.jax.org/strain/005557

MÉTODO

CULTIVOS CELULARES

Utilizamos dos líneas celulares de LMA:

- KG1 [American Type Culture Collection (ATCC) CCL-246, Manassas, VA, USA]. Línea celular de médula ósea de leucemia aguda mieloblástica. Paciente adulto de 59 años. 1977.
- HL60 [American Type Culture Collection (ATCC) CCL 240, Manassas, VA, USA]. Línea celular de sangre periférica de leucemia aguda promielocítica. Paciente de 36 años.

Otras células primarias o líneas celulares usadas en los distintos experimentos como controles:

- Células mononucleares de médula ósea de donantes sanos obtenidas tras firma de consentimiento informado. Laboratorio Hematología. IBIS. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla
- Linfocitos de sangre periférica de donantes sanos del Hospital Virgen del Rocío. Sevilla. Se obtienen mediante centrifugación en gradiente de densidad con ficoll-hypaque (Amersham Biosciences) para obtener las células mononucleadas; a continuación se realiza selección de células T CD3+ mediante separación inmunomagnética en el AUTOMACS® haciendo uso de las microbeads anti-CD3 (AutoMACS CD3 Reagent, Miltenyi Biotec)

La manipulación de las células se realizó en condiciones de asepsia dentro de una campana de flujo laminar, la cual era previamente sometida durante 30 minutos a luz ultravioleta.

Las soluciones que se usan para el cultivo y mantenimiento de las líneas celulares, se calientan en un baño de agua a 37°C antes de entrar en contacto con las mismas. Los criotubos que contienen las líneas celulares se descongelan al baño maría a una temperatura de 37°C. Una vez descongelado el contenido completo de los criotubos, se extraen bajo campana de flujo laminar con ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se

deposita en tubos Falcon de 15 ml junto con 2 ml de medio de cultivo. Se centrifugan durante 5 minutos a 1000 revoluciones por minuto (r.p.m). Se comprueba el pellet obtenido y se elimina el sobrenadante. Resuspendemos el pellet con 1 ml de medio de cultivo hasta obtener una suspensión celular homogénea.

Las líneas celulares de LMA se mantuvieron con medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, BRL) suplementado con 10% de suero bovino fetal (heat-inactivated fetal bovine serum) (GIBCO BRL), 2 mM glutamina, 100 unidades/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina (1%). El cultivo y crecimiento de estas células se realiza en suspensión con morfología ovoide-circular. Las líneas celulares han sido cultivadas en matraces de cultivo tisular de 75 cm² (Flacon, Heidelberg; Germany) y mantenidas en $0,3-1,0 \times 10^6$ células/ml. Se suministraba medio de cultivo dos veces por semana y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda (95%aire/5%CO₂)

WESTERN BLOT

Se procedió a la extracción y cuantificación de las proteínas de los cultivos celulares KG-1 y HL-60 usando el kit BIO-RAD de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De cada muestra se separan 15 µg de proteína para electroforesis en 10% gel poliacrilamida-SDS (dodecilsulfato) para que las proteínas desnaturalizadas puedan ser separadas únicamente por su peso molecular. Posteriormente fueron transferidas a una membrana absorbente de PVDF para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos específicos para NK1R. Para ello se apilan los siguientes elementos: esponja, varios papeles de filtro empapados en buffer de transferencia, gel, membrana, más papeles de filtro empapados y otra esponja. Todo ello se dispone en el sistema de transferencia y se aplica una corriente eléctrica para que las proteínas del gel se desplacen hacia el polo positivo y queden atrapadas por la membrana. Para evitar que los anticuerpos se una a lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia se procede al bloqueo incubando la membrana con una solución de bloqueo (5% leche en polvo en PBS, 0,1% Tween 20, también llamada PBS-T). De este modo, las proteínas de la solución se unirán a todos aquellos lugares de unión de la membrana que no estén ya ocupados por las transferidas desde el gel. Así el anticuerpo sólo podrá unirse a su

antígeno específico reduciendo así los falsos positivos. La noche anterior se incuban con los anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal de conejo anti-receptor SP (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluido 1:2,000 y un anticuerpo policlonal también de conejo anti-tubulina (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) diluido 1:1,000.

Las membranas se lavan con PBS-T para eliminar el anticuerpo primario que no se ha unido y se incuban con un anticuerpo secundario de cabra IgG anti-conejo conjugado o marcado con peroxidasa de rábano picante (Cell Signaling Technology, United States) durante 2 horas a temperatura ambiente diluido 1:3,000 para que pueda unirse al anticuerpo primario amplificando la señal.

La detección del anticuerpo se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia (ECL Western blotting detection; Amersham Life Science, United Kingdom). Se utiliza un software densitométrico Image J (Version 1.6, National Institutes of Health, Bethesda, MD) para el análisis cuantitativo densitométrico de las bandas de proteínas. Las bandas seleccionadas se cuantifican basándose en sus intensidades relativas.

DETECCIÓN DEL RNA MENSAJERO PARA GEN TAC1R EN LAS LÍNEAS CELULARES KG-1 Y HL-60 MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL (REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION)

Se extrajo RNA total de las células cultivadas (KG-1 y HL-60) con Rneasy Mini Kit (QIAGEN) y se trató con Rneasy MinElute Clean Up (QIAGEN) para eliminar el DNA contaminante. La retrotranscripción a cDNA se realiza según las instrucciones del fabricante usando iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio Rad). Tras la síntesis de cDNA, el análisis cuantitativo en tiempo real RT-PCR se realiza en termociclador Light Cycler de Roche con un sistema de detección de fluorogénicos (SYBRgreen) que emite fluorescencia con la amplificación de la secuencia estudio, obteniendo unas curvas de amplificación que se comparan con una curva patrón de número de copias ya conocida. El número de ciclos de PCR para NK1R fue 95°C durante 7 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 15 segundos, 72°C durante 30 segundos. Por último se realiza un ciclado final a 72°C durante 7 minutos. Tanto para TAC1R

isoforma completa como truncada se usaron las siguientes condiciones: 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos seguido de un ciclado final a 72°C durante 7 minutos.

Se diseñaron dos primers (cebadores) (forward-reverse) según la secuencia homóloga que presentaban el gen TAC1R humano (NM 001058, NM 015727): TAC1R-Forward (GGTTCCGAGGTGTTAGTGGA) y TAC1R-Reverse (AAGAGTGCTGCCAGAAAAAG). Para la isoforma truncada TAC1R fue TAC1R-truncado-Forward (GGCTGTGGCCTTTGATAGGT) y TAC1R-truncado-Reverse (GTCCCCACTTGTCCCTCTTG). Para la isoforma TAC1R completa o “full-length” se utilizó TAC1R-completo-Forward (AACCCCATCATCTACTGCTGC) y TAC1R completo-Reverse (ATTTCCAGCCCCTCATAGTCG). Producen un fragmento de 186 pares de bases.

El gen de la beta Actina es el que se usa como control endógeno. Las secuencias de los cebadores del gen de Beta actina son los siguientes: Se usa BACTIN-Forward (CGGCATCGTCACCAACTG) y BACTIN-Reverse (CACGCAGCTCATTGTAGAAGGT) originan una secuencia de 41 pb. El producto de amplificación resultante, se identifica mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio

Los datos se normalizan usando la Actina en cada muestra por el método 2(-Delta Delta Ct) (Livak & Schmittgen, 2001). Se considera la significación estadística en $p < 0.05$. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada dato

ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

El conteo celular se realizó por medio de azul tripán diluyéndose al 50%, la misma cantidad de azul tripán que de la suspensión celular. Se usa una cámara de recuento celular (cámara de Neubauer) y se mira al microscopio (Figura 37). Contar las células de los cuadros de las esquinas y usar el siguiente cálculo.

En nuestro caso: Concentración celular (Nº células) = $(\text{Total células contadas} / 4) \times 2$
(factor de dilución azul tripán) $\times 10^4$

Para saber cuánto volumen de la suspensión celular cogemos para sembrar 10.000 células en cada pocillo realizamos una sencilla regla de tres sabiendo que el nº de células contadas está en 1000 μl (cantidad de medio en la que diluimos el pellet celular). En el caso de los experimentos con linfocitos se utiliza la misma metodología para sembrar 20.000

linfocitos en cada pocillo.

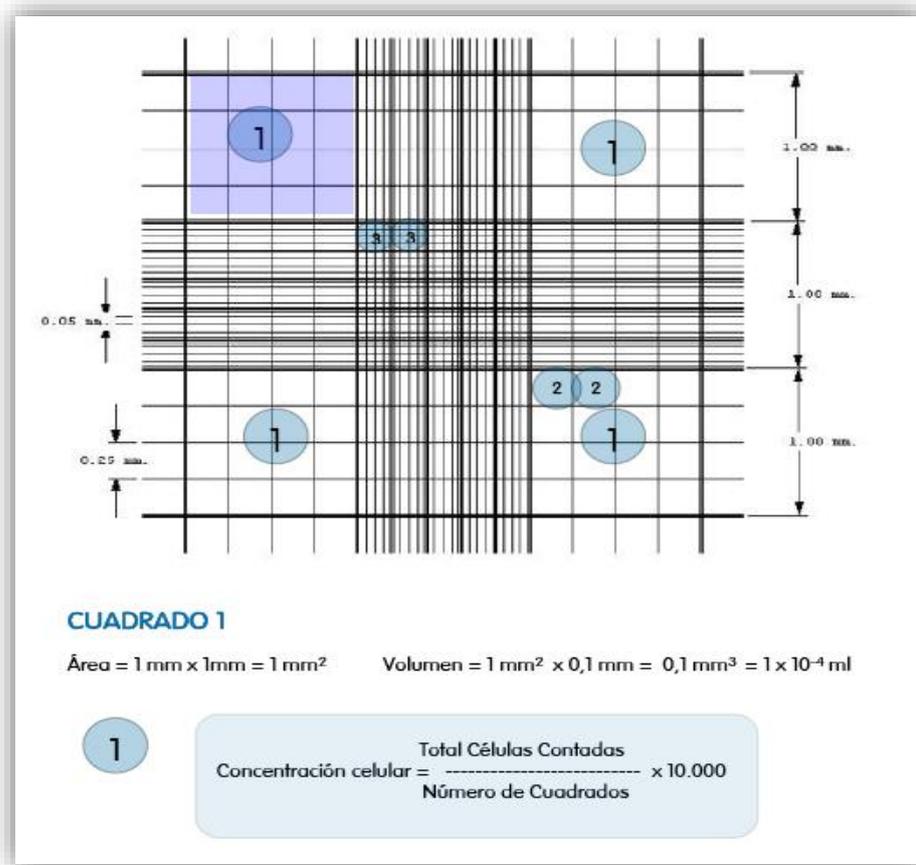


Figura 37: Cámara Neubauer. Los números 1 marcan las zonas elegidas para el conteo celular. Se muestra fórmula del cálculo de la concentración celular. Imagen tomada de la página web: www.celeromics.com

Para determinar la IC50 (Concentración inhibitoria que reduce el 50% de la población celular) se usaron distintas concentraciones de antagonistas NK1R en ambas líneas leucémicas:

- 10-50 nM de L-733,060
- 20-100 μM de L-732,138
- 20-100 μM de CP 96-345
- 0-60 μM de apéritant

La SP se disuelve en agua destilada con 1% de BSA en un pH ácido (0.05 M ácido acético) y a diferentes concentraciones 10, 25, 50, 100 nM. La concentración nanomolar más mitogénica de la SP para cada línea celular fue la que posteriormente se utilizó para los experimentos farmacológicos de inhibición celular. Esta concentración se añadía a los

cultivos celulares y se dejaba incubar durante 1 hora antes de añadir los diferentes inhibidores NK1R

Las células se siembran en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos, cada uno con estas 10^4 células en el volumen calculado y añadir droga a estudiar más el medio de cultivo de la línea celular hasta completar un volumen total de 100 μ l en cada pocillo.

Preparación de las placas: Cada ensayo incluye una placa de 96 pocillos con:

- ✚ Pocillos blancos (0 células / 0.1 ml de medio de cultivo).
- ✚ Pocillos controles (10^4 células/ 0.1 ml de medio de cultivo).
- ✚ Pocillos controles con acetonitrilo (10^4 células/0.1 ml de medio de cultivo y Acetonitrilo)
- ✚ Pocillos tratados con antagonistas NK1R (10^4 células más determinadas concentraciones (μ M) de cada antagonista para ambas líneas celulares)
- ✚ Pocillos tratados con SP exógena a diferentes concentraciones (10^4 células más 10,25, 50 y 100 nM de SP para las dos líneas celulares de LMA)
- ✚ Para determinar si la acción inhibitoria del antagonista de los NK1R ocurre vía específica con el NK1R se realiza un estudio de competición con pocillos tratados con la dosis más mitogénica de SP y la dosis del antagonista correspondiente a la IC₅₀ para las dos líneas celulares, inoculando la dosis de SP más efectiva una hora antes a la adición previa del antagonista.
- ✚ Los pocillos no utilizados de las distintas placas se completan con 100 μ L de medio de cultivo

Las placas se incuban a Tª de 37 °C y a 5% de CO₂ durante el tiempo de duplicación celular.

En el ensayo, el estudio de proliferación celular se evalúa usando MTS, un método colorimétrico para determinar el número de células viables en proliferación; el preparado comercial utilizado se denomina CellTiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA). El compuesto de tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium,(MTS) es biorreducido en las células metabólicamente activas hacia un producto coloreado. El resultado es una medida de densidad óptica (DO), la cual es directamente proporcional al número de células vivas. Se añaden 20 μ l de MTS a cada pocillo 90 minutos antes de leer las muestras en un lector de placas multiscaner (TECAN Spectra classic) a una longitud de onda de 492 nm. El valor de absorbancia resultante es directamente proporcional al número de

células vivas en el cultivo.

El porcentaje de Viabilidad se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{DO células tratadas} / \text{DO células control}) \times 100$$

Cada pocillo fue sembrado por duplicado y todos los experimentos fueron realizados al menos en tres ocasiones en experimentos separados.

Para determinar la IC₅₀ de los antagonistas se usa la formula de la ecuación de la recta, que se obtiene con la recta de regresión de los puntos conocidos y validados del experimento (mediante Microsoft EXCEL) procedentes de la absorbancia obtenida para cada concentración, usando el método de los mínimos cuadrados

DETECCIÓN APOPTOSIS CELULAR. MÉTODO TINCIÓN DAPI

Se realiza para determinar si los antagonistas NK1R inducen apoptosis en ambas líneas celulares de LMA. Después de incubar las líneas celulares con el antagonista NK1R, aprepitant (IC₅₀ y IC₁₀₀), durante aproximadamente el primer tiempo de duplicación celular, se fija en paraformaldehído al 4% durante 20-30 minutos. Centrifugar 10 minutos a 1000 r.p.m, eliminar sobrenadante y añadir PBS (aproximadamente 150 µl). Tras una nueva centrifugación se añade la solución DAPI (Sigma-Aldrich, Spain) a una dilución 1/1.000 que equivale a 1mg/ml durante 15 minutos en condiciones de oscuridad. Se observan las células bajo un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Oberkochen, Germany). Las células apoptóticas son aquellas con cromatina condensada y fragmentación celular. Se cuenta el número de células apoptóticas en tres preparaciones o portas diferentes y cinco campos diferentes de forma secuencial.

MODELO ANIMAL

Se utilizaron ratones NSG de ambos sexos, de 20-30 gramos de peso y de 8-12 semanas de edad, mantenidos en el laboratorio IBIS por técnicos del animalario. Los animales se criaron y mantuvieron en jaulas en un ambiente controlado con ciclos de luz/oscuridad estándar 12 horas/12 horas. Los animales se alimentaron con piensos comerciales y tuvieron libre acceso a agua y comida (ad libitum) durante todo el tiempo

de experimentación. El cuidado y tratamiento de los animales se realizó siguiendo la legislación española en “Protección de los Animales utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos”, de acuerdo con las normas de la Unión Europea 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

1) Trasplante xenogénico de una línea celular humana leucémica:

Se generaron animales NSG portadores de células leucémicas de LMA de origen humano HL60 (ATCC CCL 240). Para realizar el trasplante xenogénico se inocularon 5×10^6 de células HL-60 mediante inyección intravenosa en la vena de la cola del ratón. Previamente, los ratones NSG se sometieron a un régimen de acondicionamiento que consiste en una dosis subletal de irradiación de 250 cGy. Se dejaron 3 ratones NSG irradiados sin xenoinjertar para comprobar que no existía toxicidad por irradiación letal. Posteriormente se realizó un seguimiento clínico y observacional de los animales. Se realizó un aspirado de MO a las tres semanas desde la inoculación de HL-60 de acuerdo con estudios previos para confirmar la infiltración leucémica definida como blastos en MO $\geq 20\%$ según la definición de la OMS 2008 (Weltgesundheitsorganisation, Swerdlow, & International Agency for Research on Cancer, 2008) y que definimos como porcentaje de células CD45 positivas humanas $\geq 20\%$.

Las muestras de MO se analizan mediante citometría de flujo con citómetro FACSCantoII-BD. El aspirado medular se incubó con los anticuerpos anti-human CD45 conjugado a Pacific Blue™ (CD45 CF Blue Monoclonal antibody to human. Immunostep. Referencia 45CFB2-100T) y anticuerpo anti-mouse CD45 conjugado a APC (APC Rat Anti-Mouse CD45. Clone 30-F11. Cat 559864. BD Biosciences).

2) Tratamiento farmacológico en modelo de ratón:

Fosaprepitant (Ivemend®): Cada vial contiene fosaprepitant dimeglumina equivalente a 150 mg de fosaprepitant, que corresponde a 130,5 mg de aprepitant. Después de la reconstitución de fosaprepitant con 10 ml de cloruro sódico 9 mg/ml (0,9%) o suero salino fisiológico (SSF) dentro del vial, cada ml de solución contiene 15 mg de fosaprepitant (15 mg/ml). El cloruro sódico al 0,9% se inyecta dentro del vial a lo largo de la pared del mismo para evitar que se forme espuma y se comprueba que el aspecto de la solución reconstituida es el mismo que el aspecto del diluyente empleado.

Según fuentes publicadas mediante estudios de estabilidad farmacológica, se ha comprobado la estabilidad de fosaprepitant una vez reconstituido durante 14 días conservado a 4°C de temperatura (Martínez-Gómez, 2014).

Se realizaron 2 grupos experimentales:

Grupo control: Ratón NSG xenoinjertado con LMA (HL-60) que recibe suero salino fisiológico intraperitoneal

Grupo tratamiento: Raton NSG xenoinjertado con LMA (HL-60) que recibe fosaprepitant a dosis de 80 mg/kg/día de aprepitant.

La administración del fármaco fosaprepitant se realiza vía intraperitoneal a dosis de 80 mg/kg/día de aprepitant de acuerdo con bibliografía previa reciente (M. Berger et al., 2014; M Muñoz et al., 2014) y con una duración prevista de 10-14 días que es el tiempo estimado de supervivencia de los ratones xenoinjertados una vez infiltrados en MO. Al grupo de ratones control se le administra volumen equivalente de SSF vía intraperitoneal. Durante todo el período de ensayo se valoró el aspecto general del animal, la posible aparición de diarreas y se controló el peso de los animales diariamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado con el software SPSS estadístico para Microsoft Windows, versión 18.0 (Professional Statistic, Chicago).

Los datos se expresan como media \pm DE (desviación estándar) o como media \pm SEM (Standard error median o error estándar de la media).

Se utiliza la prueba de Shapiro-Wik para contrastar la normalidad de la muestra.

La expresión cuantitativa relativa de las líneas KG-1 y HL-60 y el control de mRNA fue analizado mediante test no paramétrico U-Mann-Whitney.

Los resultados de los análisis descriptivos de proliferación celular se analizaron mediante test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas.

Se utiliza la prueba denominada Log-rank (Mantel-Cox) para el análisis de supervivencia en modelo animal.

Como nivel de significancia se toma la $p \leq 0,05^*$ y $p \leq 0,01^{**}$ y se usa la desviación típica (DE) o el error estándar de la media (EEM) para determinar el error interno de los datos.

IV. RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NK1R EN LAS CÉLULAS DE LMA

1.1 WESTERN BLOT

Estudiamos por Western Blot la expresión de NK1R en las líneas celulares de LMA tanto KG-1 como HL-60 y las comparamos con células mononucleares de médula ósea de donante sano (Control). Los resultados obtenidos tras incubar el total de proteínas extraídas con un anticuerpo contra un epítopo cuya secuencia está conservada en varias especies, muestran la presencia de dos isoformas del receptor NK1 en ambas líneas celulares (KG-1 y HL-60). Se obtienen dos bandas correspondientes a dos isoformas de aproximadamente 60 y 50 Kda cada una. En las células usadas como control sólo observamos una isoforma de unos 60 Kda (Figura 38). La isoforma truncada del receptor podría corresponder a la banda de 50 KDa (más pequeña que la isoforma “full-length”). A continuación comparamos la expresión de las dos isoformas del NK1R por densitometría y obtenemos que la expresión de la isoforma de 50 Kda es mayor que la de 60 Kda (2 veces mayor en KG-1 y HL-60). Además observamos por densitometría que la expresión de NK1R en KG-1 y HL-60 es 20 y 12 veces mayor que el control respectivamente.

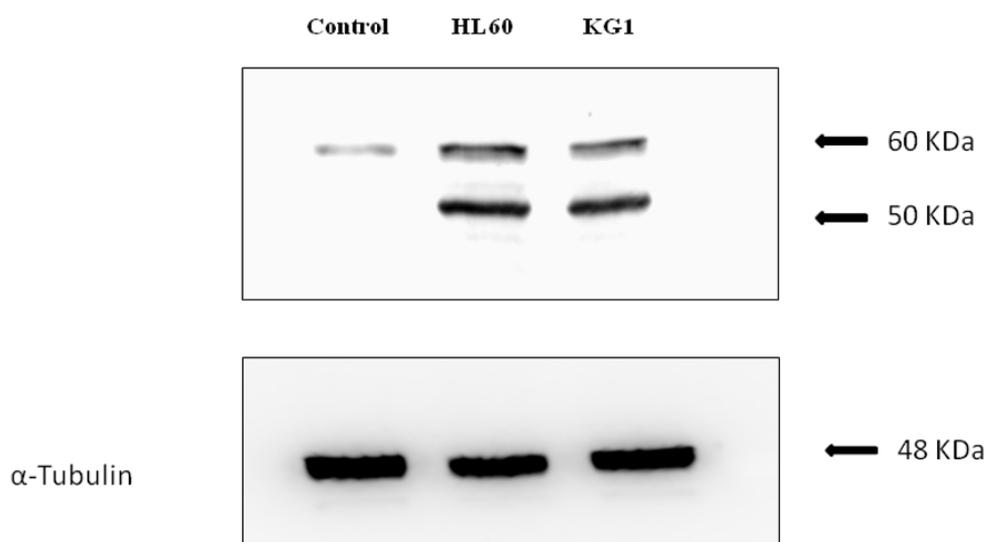


Figura 38: Niveles de proteína de NK1R detectados por Western blot en las líneas HL-60, KG-1 y células mononucleares de médula ósea de donante sano como cultivo de control. La α -tubulina

es el control de carga interno. Se observan dos bandas de 60 y 50 Kda en cada línea celular de LMA. Las líneas indican las bandas con pesos moleculares similares a los comunicados previamente.

1.2 REAL TIME- PCR

La RT-PCR cuantitativa se realizó para analizar la expresión de NK1R usando beta-actina como control. Las líneas de LMA, tanto KG-1 como HL-60 expresan mRNA para el NK1R (gen TAC1R) con un ratio de 2.21 y 2.43 veces superior en comparación con linfocitos de sangre periférica (grupo control) (Figura 39). Esta diferencia es estadísticamente significativa $p=0.0014$ y $p=0.0027$, respectivamente.

Diferenciando las dos isoformas del NK1R, no encontramos diferencias significativas en la expresión de la isoforma full-length del gen TAC1R, entre las células leucémicas (ratio de 1,01 veces para KG-1 y 0,945 veces para HL-60) y los linfocitos. Por el contrario, sí existen diferencias estadísticamente significativas entre las dos líneas celulares y los linfocitos para la expresión de TAC1R truncado con un aumento de la ratio de 3,78 y 4,81 veces para KG-1 y HL-60 respectivamente ($p=0.016$ y 0.009 respectivamente usando el test de la U de Mann Whitney). (Figura 40)

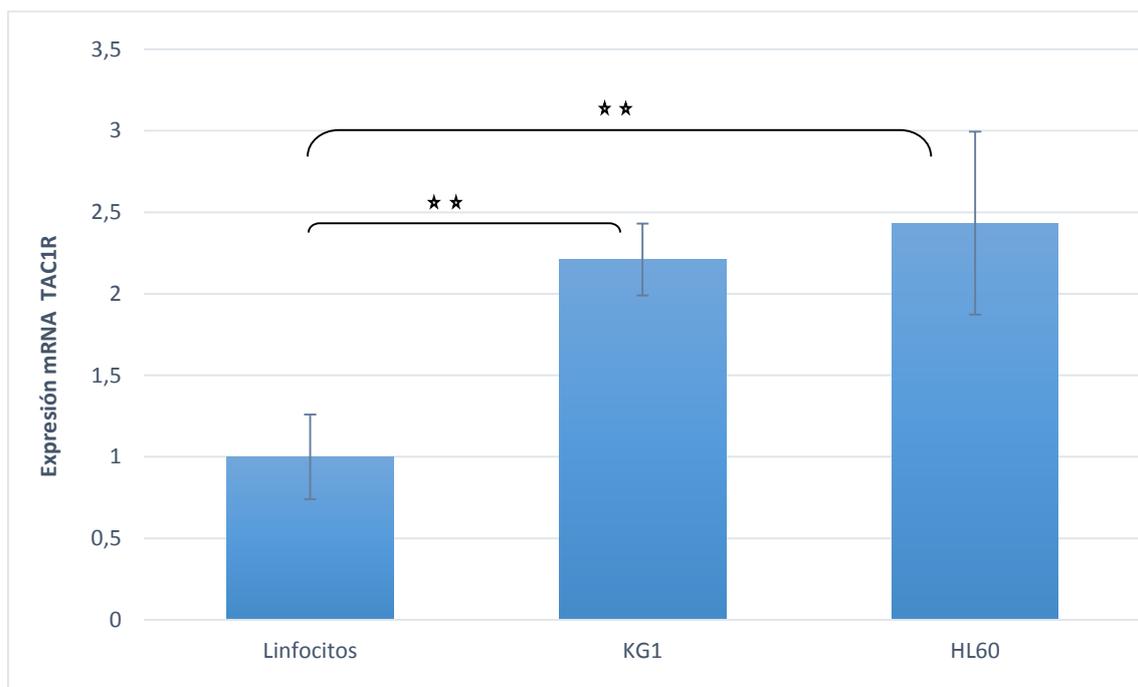


Figura 39. Análisis de los niveles de expresión del mRNA del gen TAC1R mediante la reacción en

cadena de la polimerasa en tiempo real. Los datos se muestran como media de los ratios \pm desviación estándar en linfocitos, KG-1 y HL-60. ** $p < 0.01$

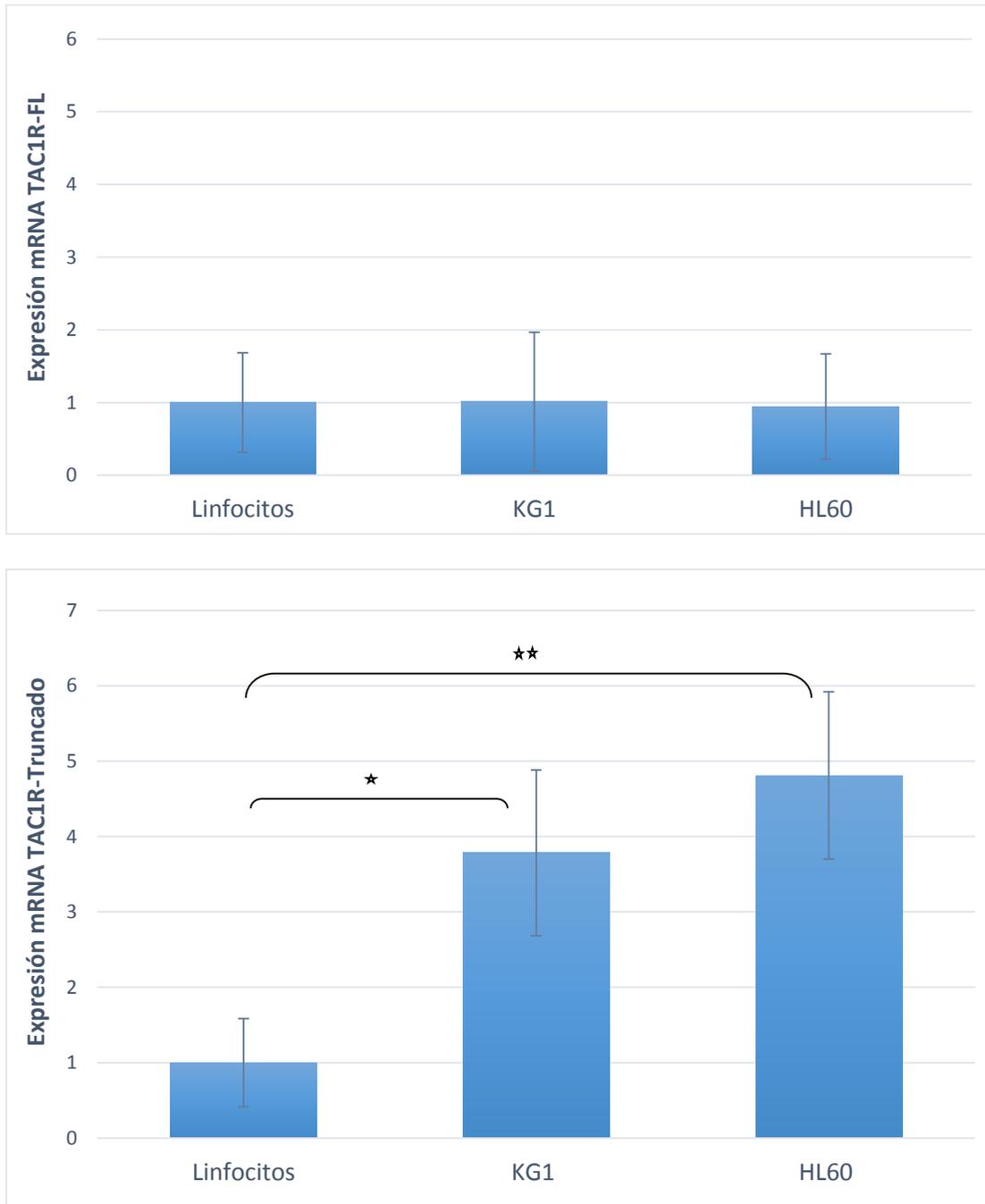
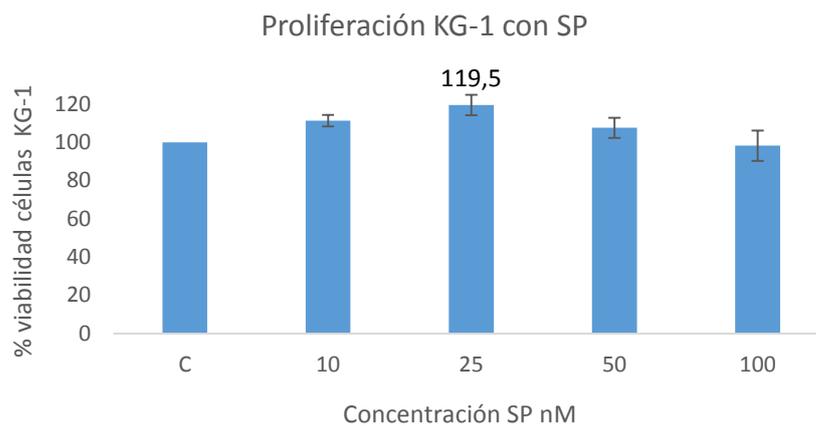


Figura 40. Niveles de expresión del mRNA del gen TAC1R FL (full-length) (gráfico superior) y TAC1R-truncado (gráfico inferior) en linfocitos, KG-1 y HL-60 mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Los datos se muestran como media de los ratios \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

2. EFECTO PROLIFERATIVO DE LA SP SOBRE LAS LÍNEAS CELULARES DE LMA

Demostramos un crecimiento dosis dependiente de las líneas KG-1 y HL-60 cuando añadimos concentraciones crecientes de SP. El máximo crecimiento celular se observa con SP a 25 nM para la línea celular KG-1 ($p=0.109$) y 50 nM para la línea celular HL-60 ($p=0.028$) con diferencias significativas cuando comparamos con el control mediante test de Wilcoxon para muestras pareadas. Con concentraciones superiores a éstas de la SP, el efecto proliferativo disminuye o se pierde probablemente por los mecanismos de desensibilización del receptor y recaptación y degradación de la SP. El porcentaje de proliferación celular observado alcanza un máximo del $19.5\% \pm \text{SEM } 5,36$ en la línea KG-1 y un $31.6\% \pm \text{SEM } 5,56$ en la línea HL-60 (Figura 41).

A



B

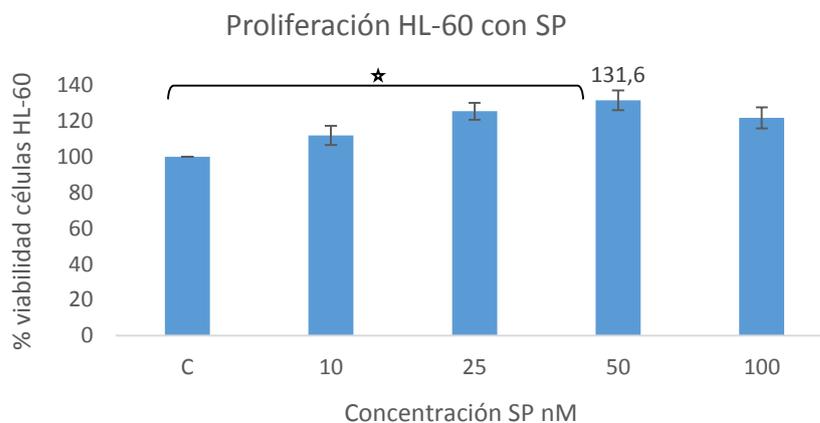


Figura 41: Ensayos de proliferación con SP en LMA mediante ensayos de MTS. Proliferación de las líneas KG-1 (A) y HL-60 (B) con concentraciones crecientes de SP. Media \pm SEM (Standard error median) * $p<0.05$

Del mismo modo, realizamos el mismo experimento con linfocitos de sangre periférica de donante sano y se aprecia proliferación celular hasta un 28% con una concentración de SP exógena de 100 nM ($p=0.144$) (Figura 42).

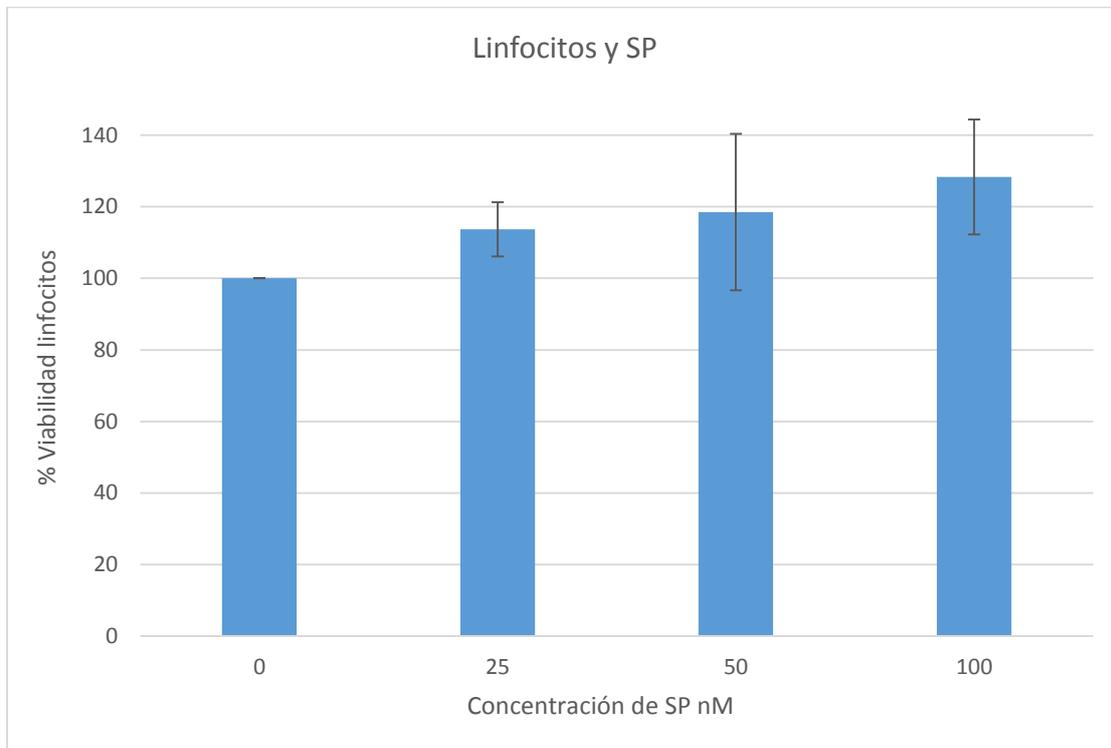


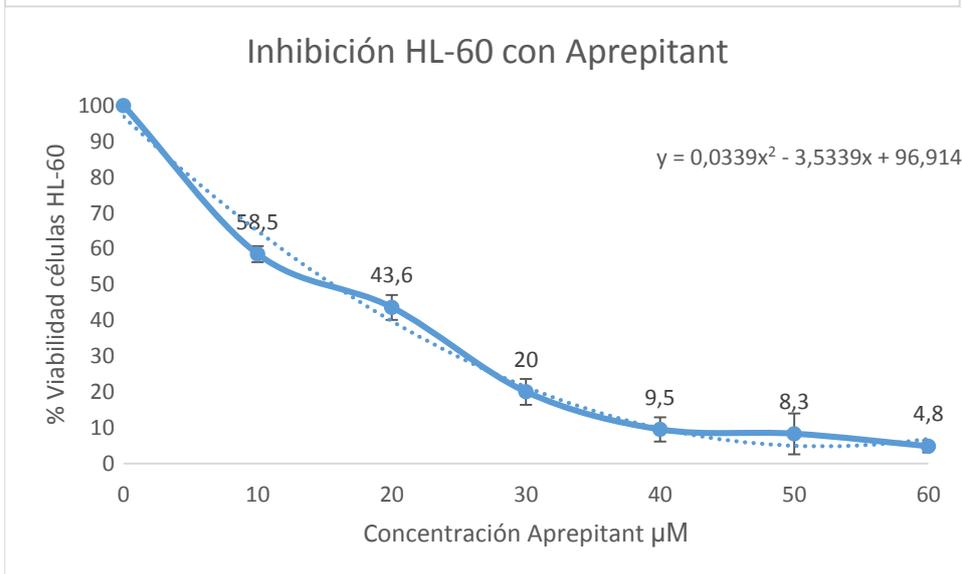
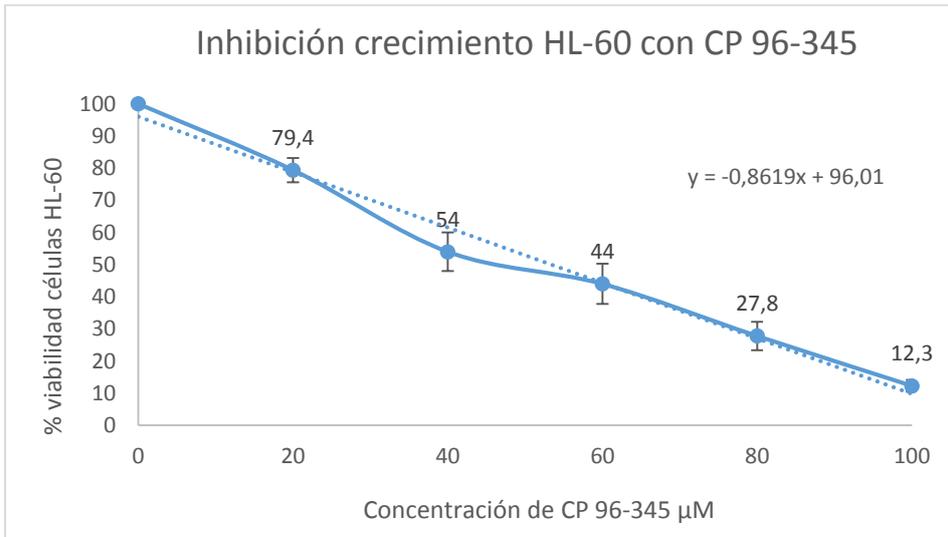
Figura 42: Ensayos de proliferación con SP en linfocitos. Porcentaje de linfocitos vivos mediante ensayos de proliferación con MTS con concentraciones crecientes de SP. Los valores se expresan como media \pm SEM (Standard error median) con un máximo de proliferación (28%) con SP a 100 nM.

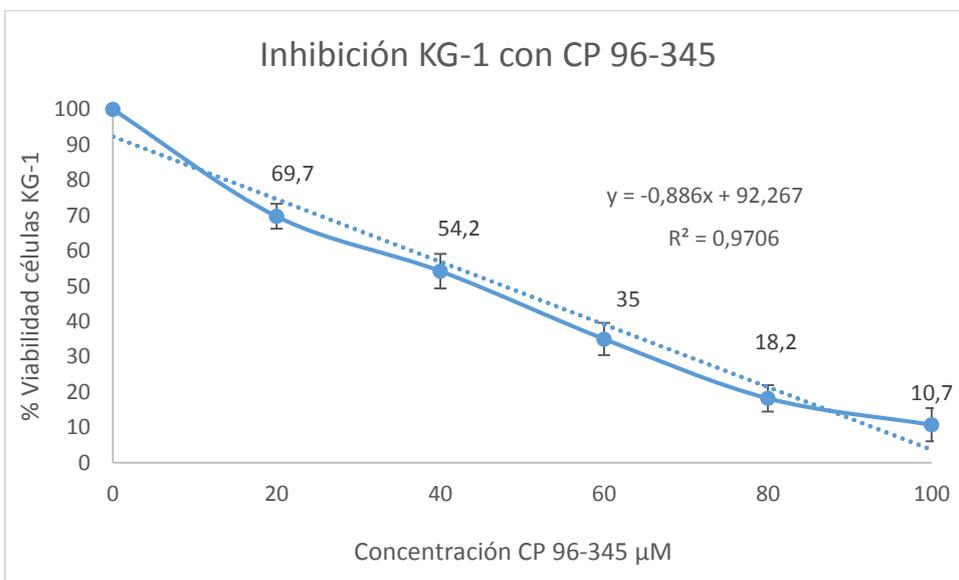
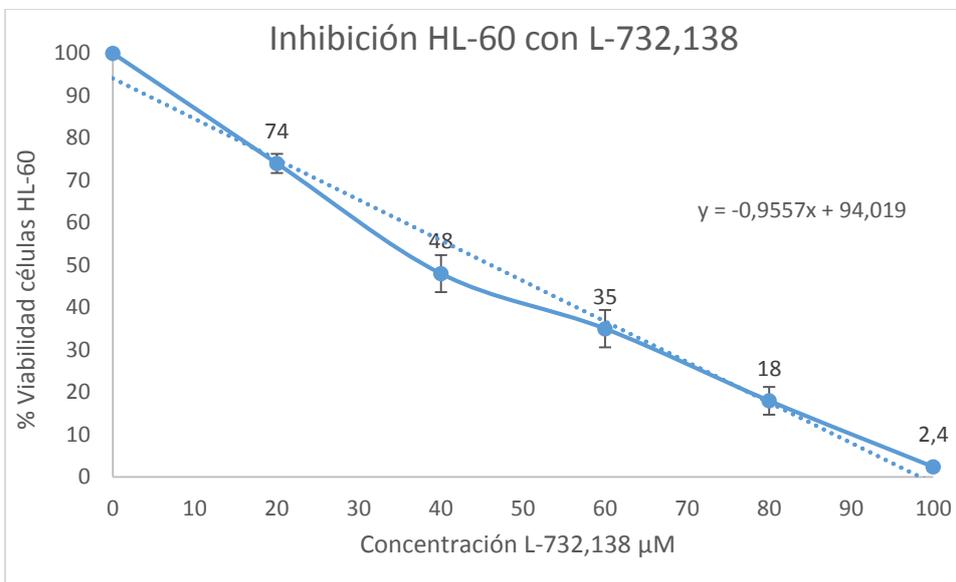
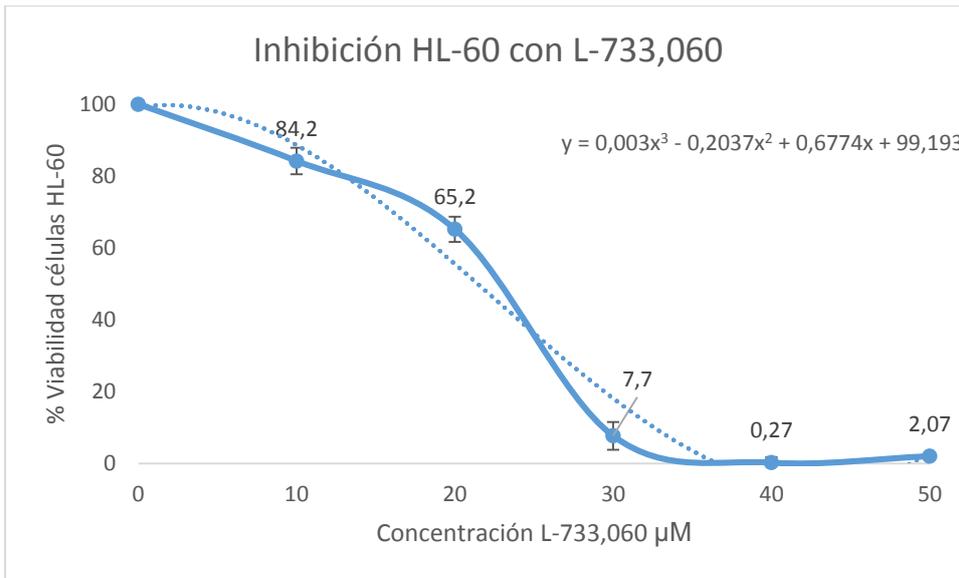
3- EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NK1R SOBRE LA PROLIFERACIÓN

Se comprueba una inhibición de proliferación de ambas líneas celulares de LMA (KG-1 y HL-60) con concentraciones crecientes de cada uno de los cuatro antagonistas de NK1R estudiados: (20-120 μ M) de CP 96-345, (10-60 μ M) aprepitant, (10-50 μ M) de L-733,060 y (20-100 μ M) de L-732,138. Se muestran los valores medios \pm SEM. (Figura

43).

La máxima inhibición celular se observa con concentraciones del antagonista 100 μM para CP 96-345, 60 μM para aprepitant, 43 μM para L-733,060 y 100 μM para L-732,138 en la línea KG1, y 100 μM de CP 96-345, 62 μM de aprepitant, 37 μM de L-733,060 y 98 μM de L-732,138 para la línea HL60.





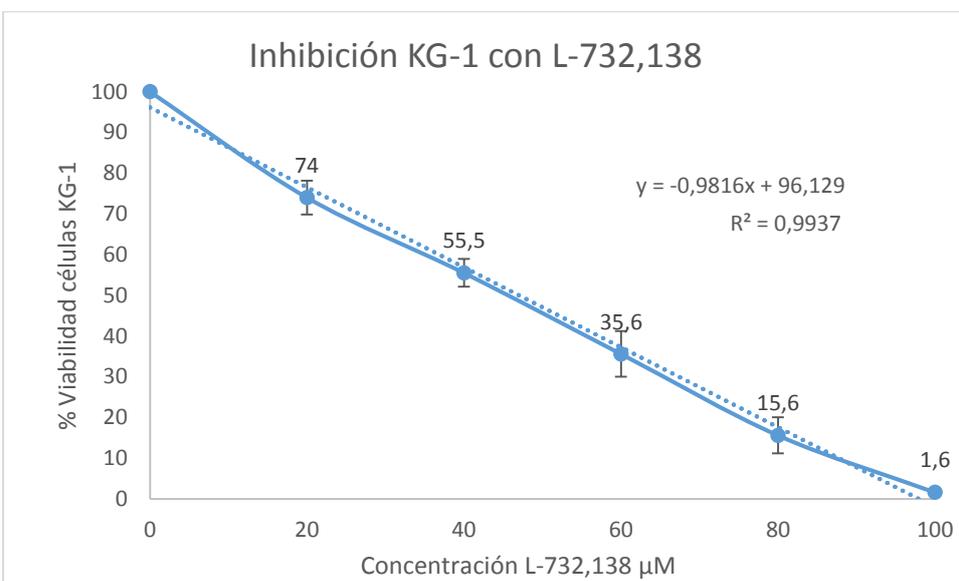
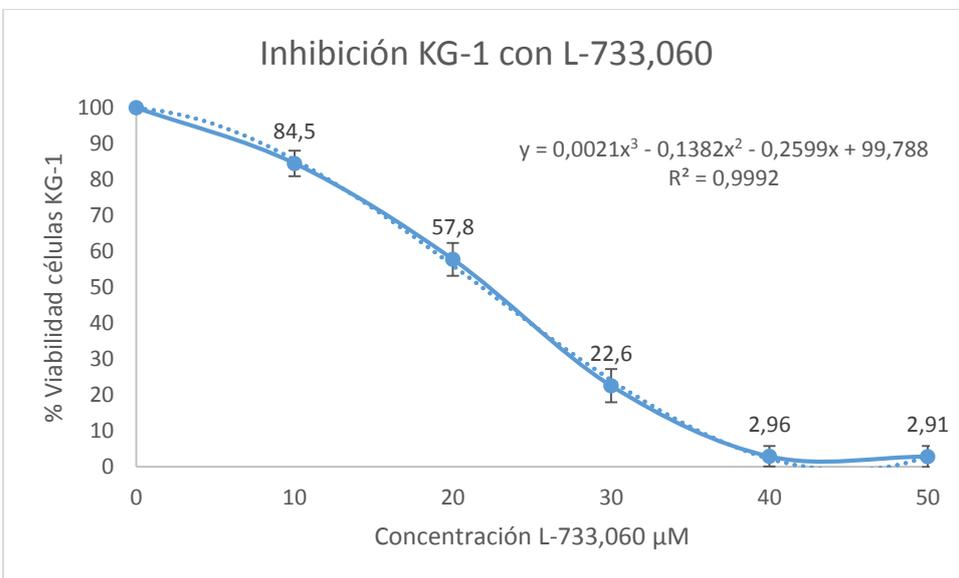
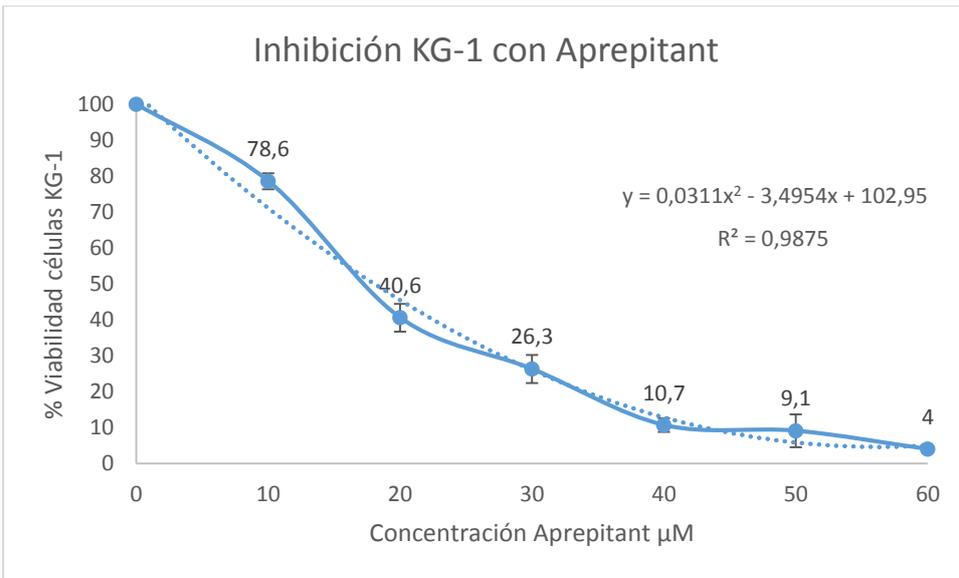


Figura 43: Gráficos de citotoxicidad de células de LMA: Viabilidad de las células de las líneas HL-60 y KG-1 mediante ensayo de MTS utilizando distintas concentraciones de los 4 antagonistas estudiados: CP 96-345, aprepitant, L-733,060 y L-732,138. La línea continua une los distintos valores medios y la barras de error en vertical corresponden a la SEM (standart error median). La línea discontinua corresponde a la línea de tendencia. Se muestra la ecuación de la curva (lineal o polinómica según corresponda).

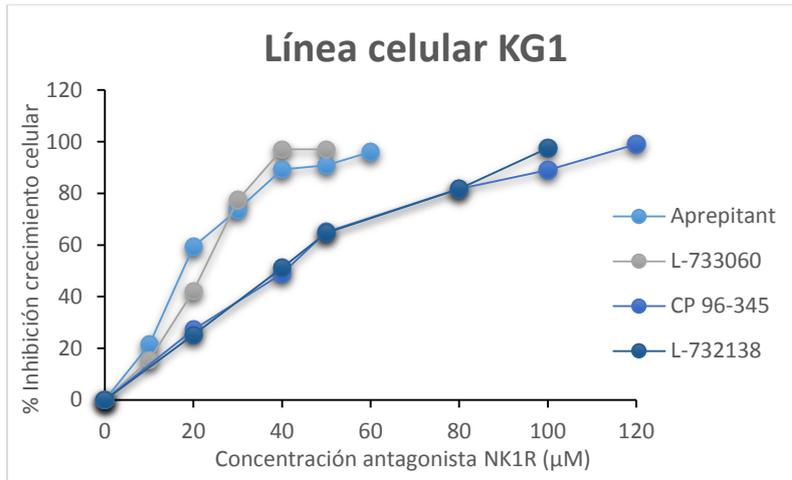
Mediante las líneas de tendencia correspondientes, se calcula la concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}), es decir, la concentración de antagonista necesario para reducir al 50% la densidad celular óptica después de 48 horas de incubación (tiempo de duplicación celular). La IC_{100} se estima igualmente con las líneas de tendencia. (Tabla 8).

	CP 96-345	Aprepitant	L-733,060	L-732,138
KG-1 IC_{50}	47.07 μ M	18.8 μ M	21.85 μ M	47 μ M
KG-1 IC_{100}	104.14 μ M	60 μ M	42.7 μ M	98 μ M
HL-60 IC_{50}	53.4 μ M	14.8 μ M	21.33 μ M	46.48 μ M
HL-60 IC_{100}	111.6 μ M	60 μ M	37 μ M	98.65 μ M
Linfocitos IC_{50}		176.2 μ M		
Linfocitos IC_{100}		344.72 μ M		

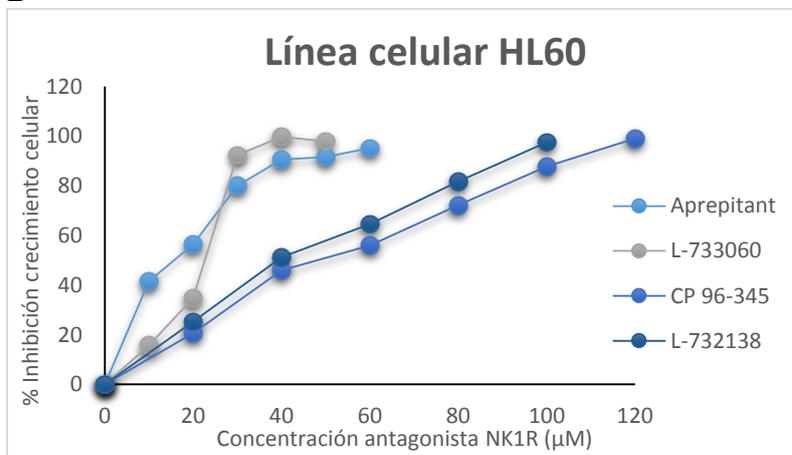
Tabla 8: Resultados IC_{50} - IC_{100} sobre las líneas KG-1, HL-60 y linfocitos con los distintos antagonistas de NK1R. Resultados obtenidos mediante la ecuación de la gráfica de las líneas de tendencia mostradas en la Figura 42.

El efecto concentración-dependiente en las líneas KG-1 y HL-60 se observa con los 4 antagonistas del NK1R estudiados. La inhibición casi completa de la población celular viable de LMA se alcanza con concentraciones más bajas de aprepitant y L-730,060 (Figura 44 A y B). Por el contrario, no se observa este efecto de inhibición sobre la población de linfocitos de donante sano viables tras 72 horas de cultivo celular con concentraciones crecientes de aprepitant (10-60 μ M) (Figura 44C).

A



B



C

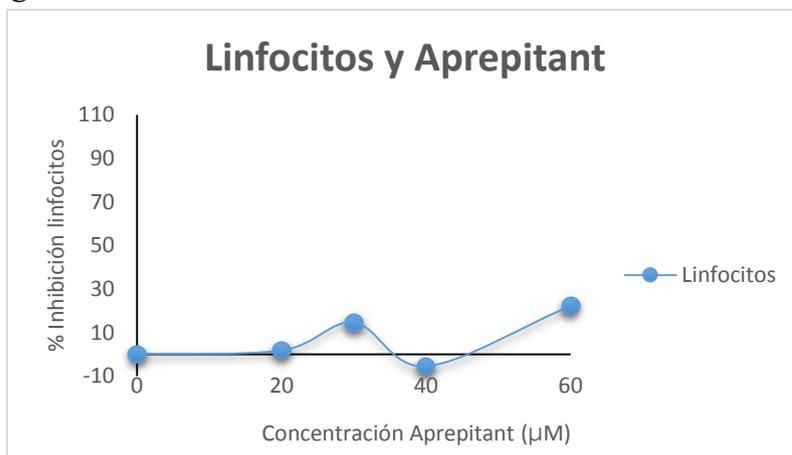


Figura 44: Gráficos de inhibición: Efecto citotóxico de los antagonistas NK1R (µM) sobre las líneas celulares de LMA. Porcentaje de inhibición de crecimiento celular de las líneas celular KG-1 (A), HL-60 (B) utilizando ensayos de proliferación in vitro con MTS (viabilidad celular – 100) para mostrar gráficamente el % de inhibición de la población celular con concentraciones crecientes de antagonista NK1R. Se comparan los distintos antagonistas del NK1R. (C) Porcentaje de inhibición de linfocitos con el antagonista NK1R aprepitant.

Al evaluar detenidamente el efecto del antagonista NK1R aprepitant sobre linfocitos de donante sano observamos que a diferencia de lo que ocurre con las líneas tumorales de LMA, la máxima reducción del porcentaje de viabilidad de linfocitos corresponde a una reducción máxima del 22,2% con la máxima concentración de aprepitant (60 μ M). Con dosis de aprepitant de hasta 20 μ M la población de linfocitos viables se reduce menos del 2% (Figura 45).

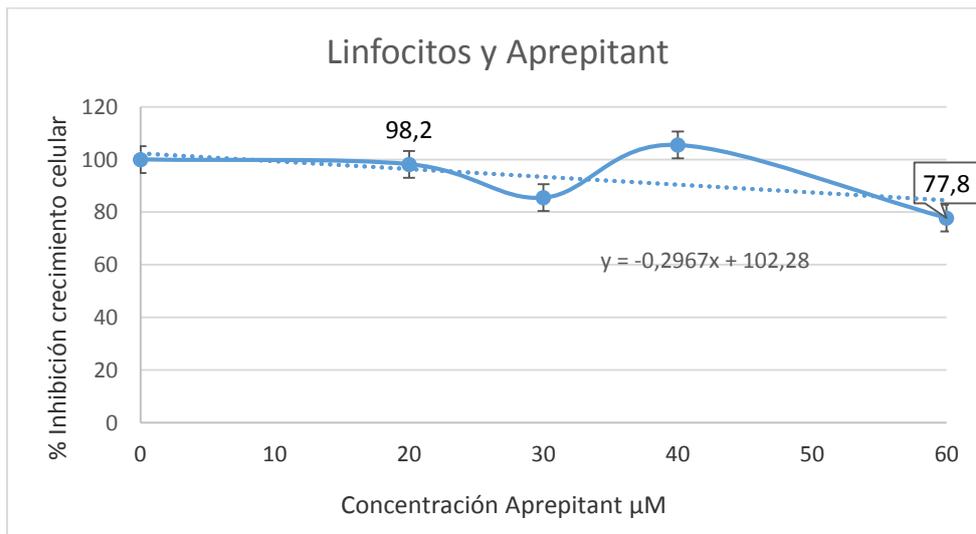


Figura 45: Gráfico de citotoxicidad de linfocitos con aprepitant. Se muestra el porcentaje de viabilidad de linfocitos de donante sano mediante ensayo de MTS cuando se exponen a dosis crecientes de aprepitant. La línea discontinua muestra la línea de tendencia. Las barras verticales corresponden a las barras de error con los valores de SEM.

4. LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R BLOQUEN PARCIALMENTE LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDA POR LA SP EXÓGENA

Para examinar si los antagonistas del NK1R inhiben la proliferación celular a través de su interacción con el receptor NK1R, usamos el agonista o ligando natural del NK1R, la SP, en experimentos de inhibición competitiva. Para ello usamos la IC_{50} de cada antagonista con la concentración de SP que produce una mayor proliferación en cada línea celular: 25 nM de SP para KG-1, 50 nM de SP para HL-60 y 100 nM de SP para los linfocitos.

Observamos que la concentración celular es mayor cuando usamos los antagonistas de NK1R en presencia de SP que en ausencia de SP. En la línea KG-1 existe un incremento en la concentración celular del 18% para CP 96-345, del 10,88% con aprepitant, 12.7% con L-733,060 y del 19% con L-732,138 cuando usamos estos antagonistas en presencia de SP en comparación con los valores obtenido con el antagonista solo (Figura 46). Para la línea HL-60 el incremento en el porcentaje de celularidad en presencia de antagonista y SP es de 18.72% para CP 96-345, 15.8% con aprepitant, 13.92% con L-733,060 y del 18.52% con L-732,138. (Figuras 47). Estas diferencias son estadísticamente significativas con el test no paramétrico de Wilcoxon con CP-96345, aprepitant y L-732,138 en ambas líneas celulares ($p < 0.05$). Con L-733,060 no se apreciaron diferencias significativas ($p = 0.138$ en KG1 y $p = 0.051$ en HL60). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el control y el control-DMSO.

Estos resultados indican que los antagonistas NK1R utilizados bloquean la estimulación mitogénica de la SP sobre las líneas tumorales de LMA de forma parcial en un porcentaje variable pero importante y por otro lado nos indica que la inhibición obtenida por los antagonistas NK1R es parcialmente revertida por la administración exógena de la concentración nanomolar más mitogénica de la SP. Además la inhibición competitiva nos indica que los antagonistas NK1R actúan a través de NK1R.

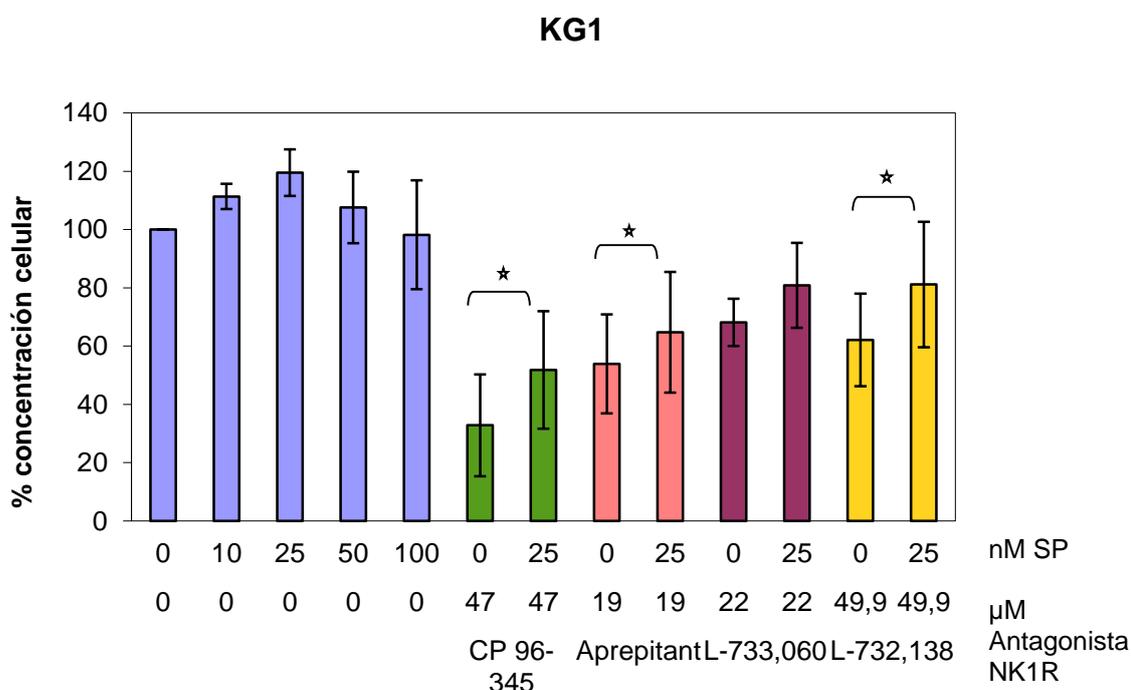


Figura 46: Gráfico de inhibición competitiva LMA KG-1: Porcentaje de células viables de LMA KG-

1 con los cuatro antagonistas NK1R en presencia o ausencia de SP. Inducción de proliferación celular de las células KG-1 en presencia de concentraciones nanomolares crecientes de SP (10, 25, 50 y 100 nM). Se añade la concentración IC₅₀ de cada antagonista del NK1R CP 96-345, aprepitant, L-733,060 and L-732,138 (47, 18.8, 21.85 y 49.99 μM respectivamente) en presencia (25 nM) o ausencia (0 nM) de SP y se deja incubar durante su tiempo de duplicación celular como experimento de inhibición competitiva. * p<0.05 Los valores se presentan como media ± desviación estandar (SD) analizados con el test de los rangos con signo de Wilcoxon

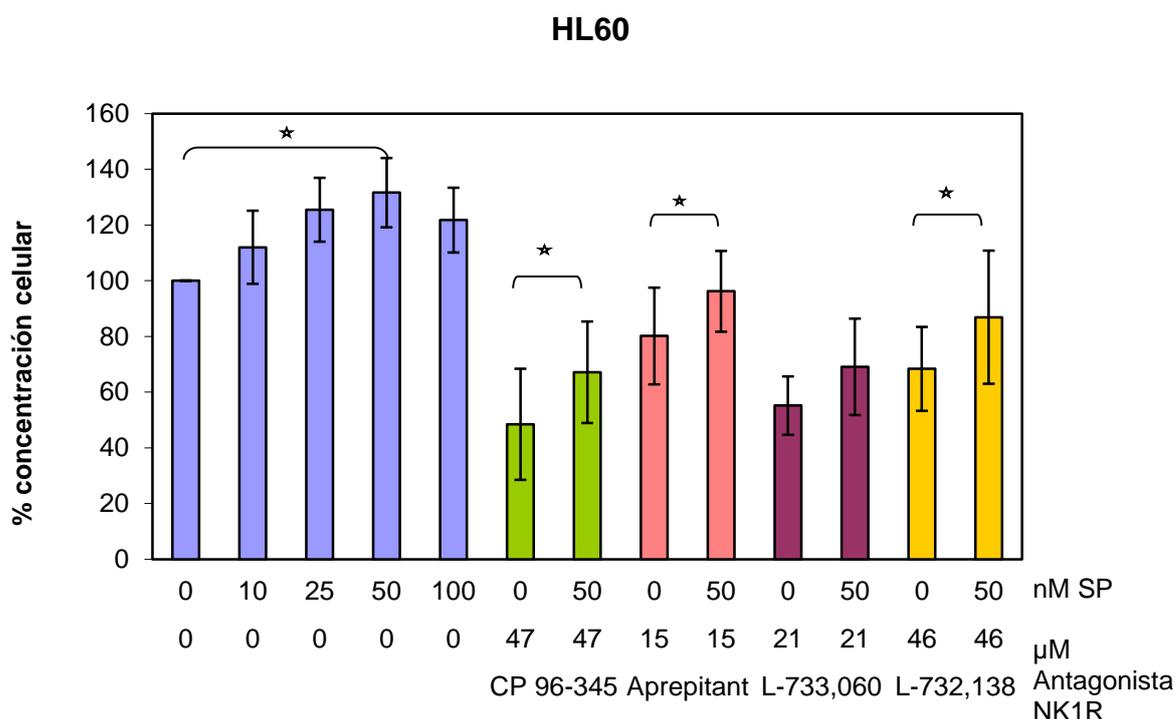


Figura 47: Gráfico de inhibición competitiva LMA HL-60. Porcentaje de células viables de LMA HL-60 con los cuatro antagonistas NK1R en presencia o ausencia de SP.

Inducción de proliferación celular de las células HL-60 en presencia de concentraciones nanomolares crecientes de SP (10, 25, 50 y 100 nM).

Se añade la concentración IC₅₀ de cada antagonista del NK1R CP 96-345, aprepitant, L-733,060 and L-732,138 (53.4, 14.8, 21.33 y 46.48 μM respectivamente) en presencia (50 nM) o ausencia (0 nM) de SP y se deja incubar durante su tiempo de duplicación celular como experimento de inhibición competitiva

* p<0.05. Los valores se presentan como media ± desviación estandar (SD) analizados con el test de los rangos con signo de Wilcoxon

En los experimentos de inhibición competitiva realizados con Aprepitant y las dos líneas celulares de LMA a distintas concentraciones volvemos a observar que la concentración celular es mayor cuando usamos los antagonistas de NK1R en presencia de SP que en ausencia de SP. Para la línea KG-1 encontramos diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de 10, 20, 30 y 60 μM de Aprepitant ($p=0,025$, $p=0,038$, $p=0,036$, $p=0,008$ respectivamente) (Figura 48). Para la línea celular HL-60 se obtiene significación estadística con las dosis de 10, 20 y 80 μM de Aprepitant en presencia o ausencia de SP usando el test de Wilcoxon ($p=0,017$, $p=0,047$ y $p=0,008$ respectivamente) (Figura 49).

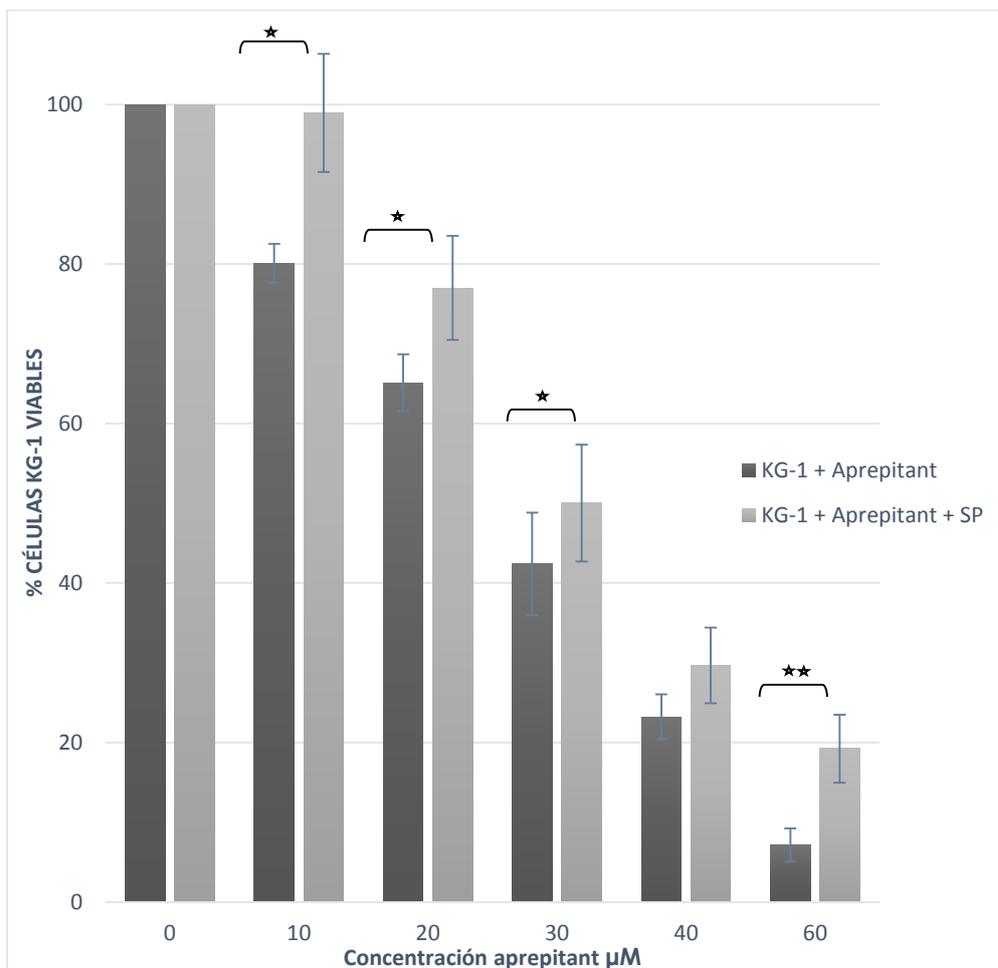


Figura 48: Gráfico de inhibición competitiva en la línea celular de LMA KG-1 con Aprepitant en ausencia o presencia de SP a su dosis de máxima proliferación (25 nM). * $p<0,05$, ** $p<0,01$

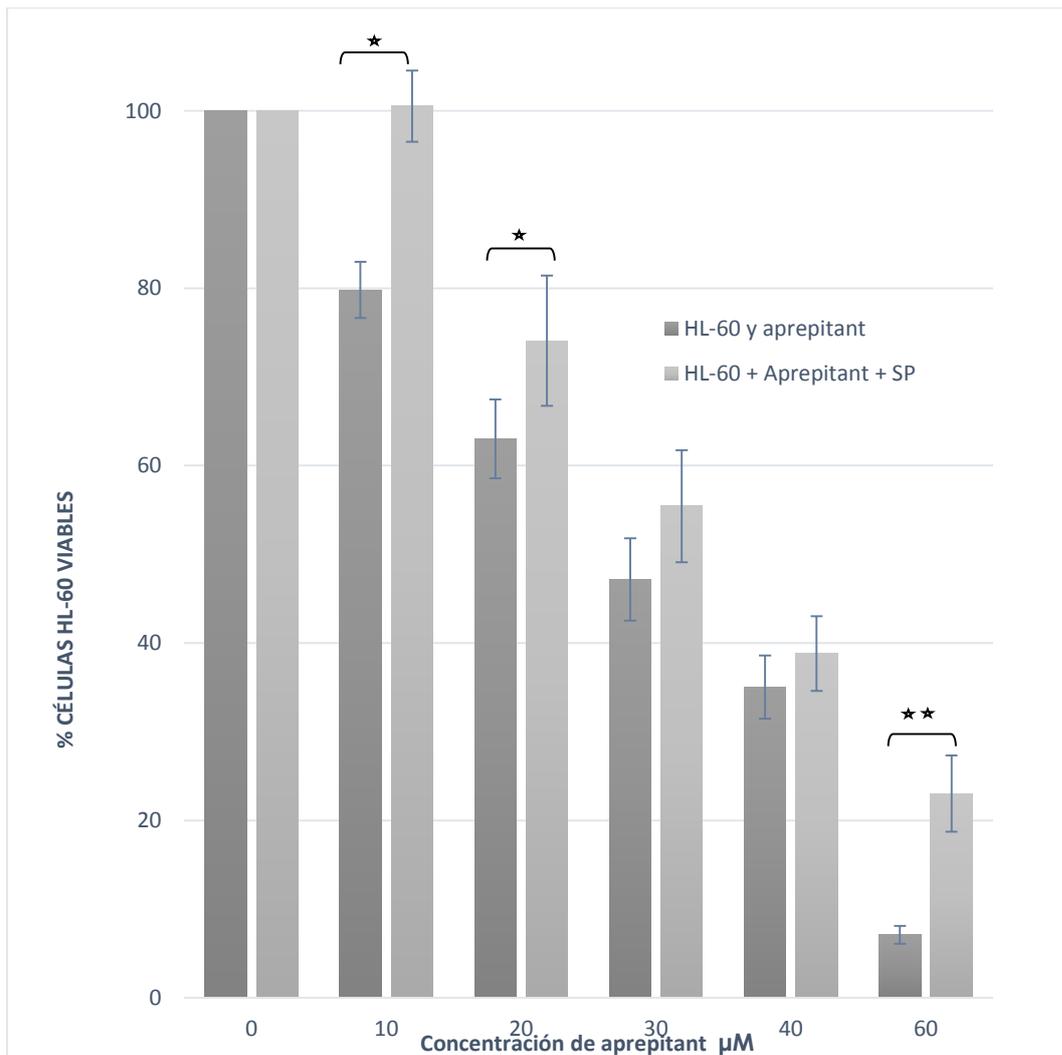


Figura 49: Gráfico de inhibición competitiva en la línea celular de LMA HL-60 con aprepitant en ausencia o presencia de SP a su dosis de máxima proliferación (50 nM). * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$

5. EFECTO DEL ANTAGONISTA NK1R APREPITANT SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR INDUCIDA POR SP SOBRE LINFOCITOS DE DONANTE SANO

Realizamos el mismo experimento de inhibición competitiva con el antagonista aprepitant y los linfocitos de donante sano. Observamos que la concentración de

linfocitos con dosis crecientes de aprepitant es similar en presencia o ausencia de SP con diferencias sin significación estadística. (Figura 50)

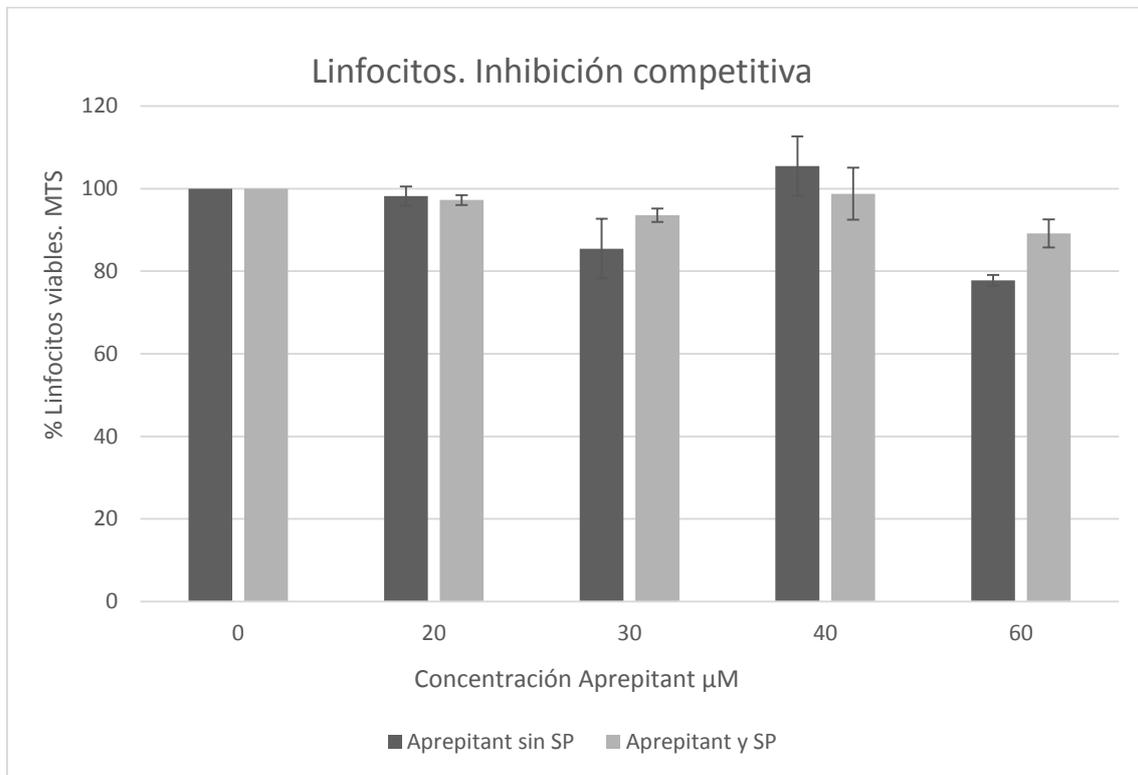


Figura 50: Ensayos de inhibición competitiva en linfocitos sanos con aprepitant: Inducción de proliferación celular de linfocitos con varias concentraciones de aprepitant a 20, 30, 40 y 60 μM en presencia (100 nM) o ausencia (0 nM) de SP durante su tiempo de duplicación celular. Se muestran los valores medios \pm SEM. No significación estadística

6. DETECCIÓN CÉLULAS LMA EN APOPTOSIS

En los cultivos teñidos con DAPI se obtiene el porcentaje de células en proceso de muerte celular programada o apoptosis (Tabla 9). Con el antagonista CP 96-345 observamos un $40.21\% \pm 7.21$ SD y un $42.66\% \pm 8.96$ SD de células apoptóticas, respectivamente en las líneas de LMA KG-1 y HL-60 tras la administración de su IC_{50} y un

76.66%±15.37 SD y 79.21%±6.08 SD después de la administración de la IC₁₀₀ CP 96-345.

Con aprepitant observamos un 49.43%±2.05 SD y 41.45%±9.82 SD de células apoptóticas respectivamente en KG-1 y HL-60 tras la administración de la IC₅₀ del aprepitant (Figura 51) y 79.78%±9.15 SD y 80.27%±4.69 SD tras añadir la IC₁₀₀.

Obtenemos un 47.12%±3.60 SD y 49.23%±1.42 SD de células apoptóticas en las líneas KG1 y HL60 cuando se administra la IC₅₀ de L-733,060 y por último 72.7%±5.55 SD y 87.50%±1.26 SD de células apoptóticas para KG-1 y HL-60 respectivamente administrando la IC₁₀₀ de L-733,060.

En todos los casos anteriores la viabilidad media de los cultivos celulares en ausencia de antagonistas NK1R (control) fue de 96,3% para KG-1 y 96,07% para HL-60.

	KG-1			HL-60		
	Control	IC50	IC100	Control	IC50	IC100
CP 96-345		40,21	76,66		42,66	79,21
Aprepitant	3,7	49,43	79,78	3,93	41,45	80,27
L-733,060		47,12	72,7		49,23	87,5

Tabla 9: Cultivos teñidos con DAPI: Porcentaje de células apoptóticas. Se muestra la media de células apoptóticas usadas como control sin antagonista NK1R para cada línea celular de LMA

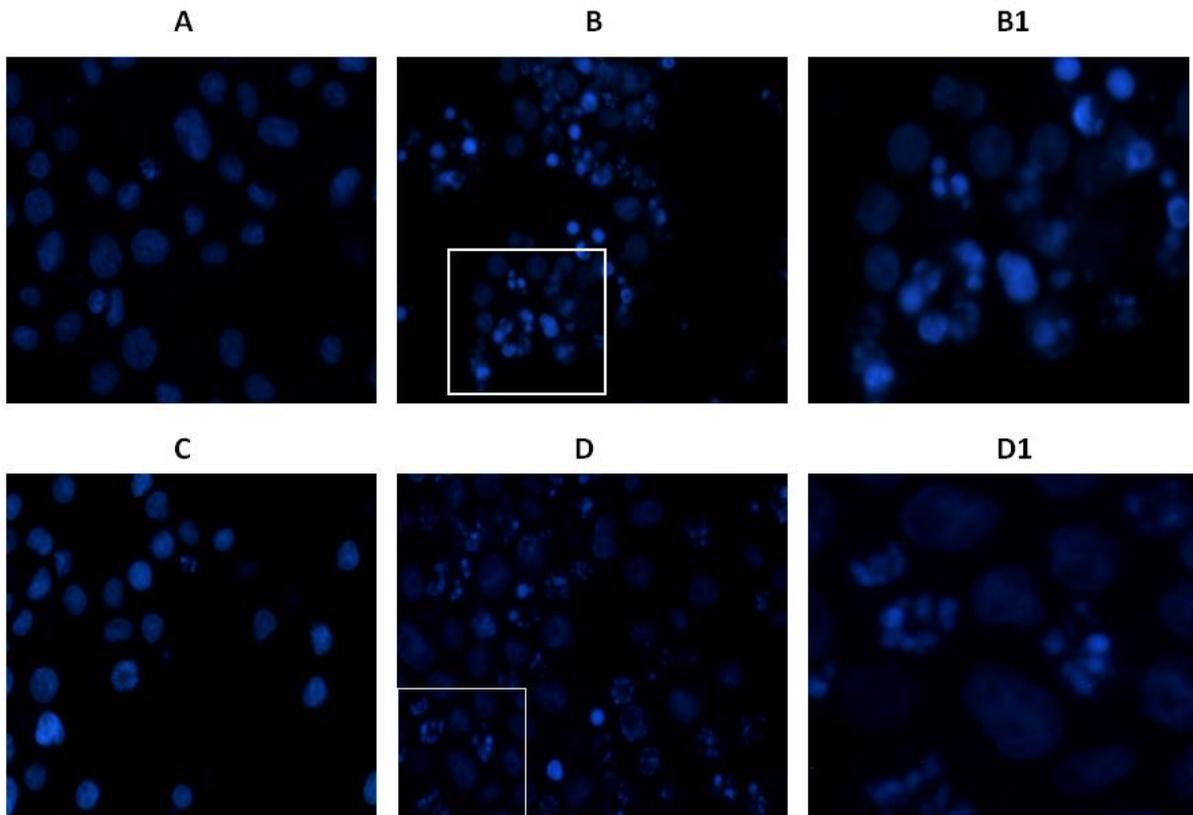


Figura 51: Cultivos de LMA tratados con aprepitant teñidos con DAPI. Líneas KG1 (**A,B,B1**,) y HL60 (**C,D, D1**). **A** y **C** corresponde a cultivos celulares no tratados con antagonista del NK1R. **B** y **D** representan los cultivos celulares tratados con aprepitant a la dosis correspondiente a cada IC_{50} . Las imágenes **B1** y **D1** son áreas ampliadas indicadas por el recuadro de las imágenes **B** y **D**, respectivamente.

7. MODELO ANIMAL

Previo al modelo de experimentación con ratones NSG xenoinjertados con la línea celular HL-60, realizamos un experimento piloto con 7 ratones NSG en los que se administra fosaprepitant a dosis de 100 mg/Kg/día de aprepitant mediante inyección intraperitoneal diaria a una concentración de 15 mg/ml de fosaprepitant con un volumen de administración intraperitoneal medio de 200 μ l con el objetivo de detectar toxicidad relacionada con la vía de administración de un fármaco potencialmente irritante al estar usando una concentración mayor a la recomendada por ficha técnica de 1 mg/ml vía intravenosa en humanos como fármaco para los vómitos inducidos por

En el experimento de fosaprepitant como fármaco citotóxico en modelo animal de LMA, los ratones NSG recibieron una dosis de irradiación subletal de 250 cGy y 24 horas después fueron xenoinjertados con células de la línea de LMA HL-60. Tres ratones no fueron xenoinjertados y fueron controlados paralelamente durante todo el experimento. Dos de estos ratones irradiados sobrevivieron todo el tiempo que duró el experimento (35 días) sin pérdida de peso y fueron sacrificados. El otro ratón murió a los 14 días.

Tras 3 semanas de seguimiento se procedió a un aspirado de MO bajo anestesia para confirmar la infiltración leucémica. Finalmente contamos con un modelo de 12 ratones vivos con infiltración leucémica HL-60 con CD45 positivo humano $\geq 20\%$. En la figura 53 se muestra el diagrama de ratones supervivientes tras cada procedimiento.

En la figura 54 se muestra dos estudios de citometría de dos ratones con y sin infiltración leucémica respectivamente.

La mediana de infiltración medular en los ratones fue del 61,4% (rango 20-96,7%). Tres de los ratones con detección de CD45 humano $< 20\%$ (0.1-10,7%) fueron descartados (Figura 55).

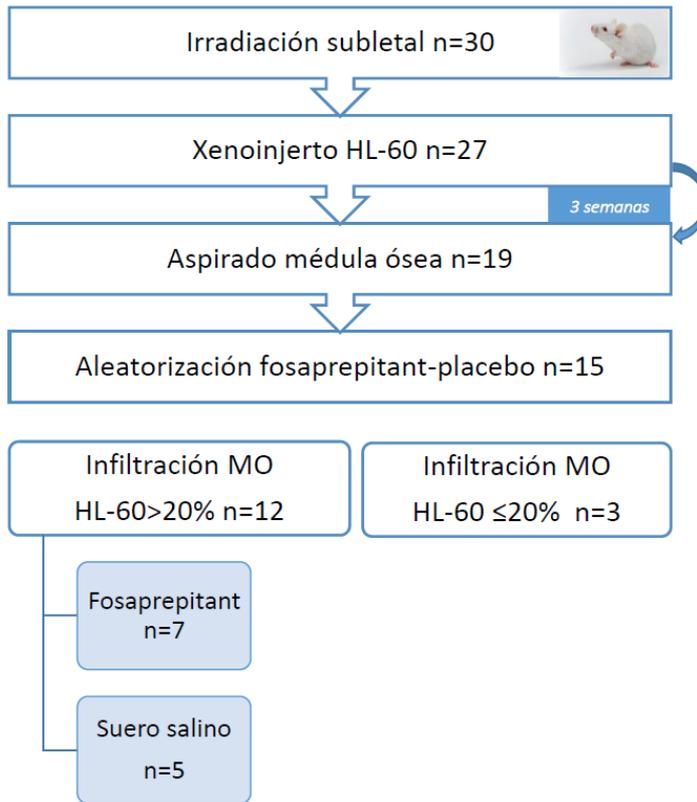


Figura 53: Diagrama de proceso del modelo animal. Se muestran los procedimientos ordenados cronológicamente y el número de ratones vivos en cada momento. Se muestran el diagrama con los 12 ratones infiltrados en MO que posteriormente fueron aleatorizados

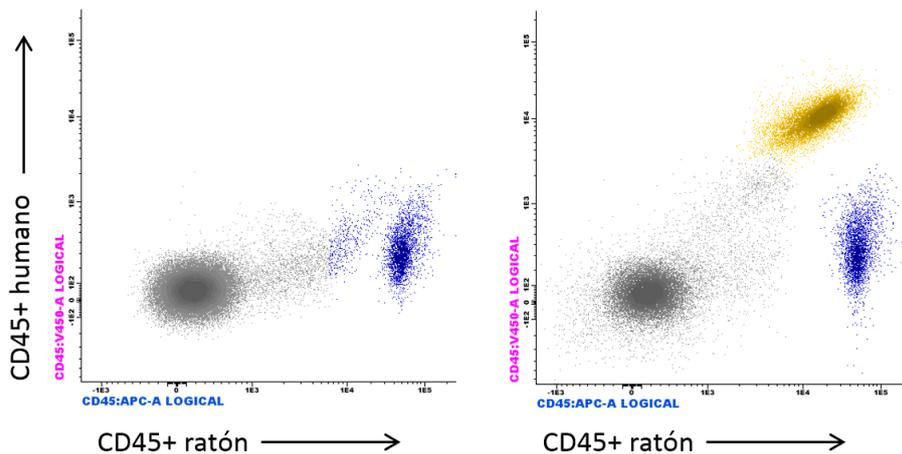


Figura 54: Estudio de citometría de muestras de MO. A la izquierda ratón no infiltrado por células leucémicas HL-60 y a la derecha ratón con infiltración medular. Por expresión de CD45 se identifican dos poblaciones de células marcadas con diferentes fluorocromos: la azul se corresponde con expresión intensa de CD45 de ratón y la amarilla con expresión intensa de CD45 humano

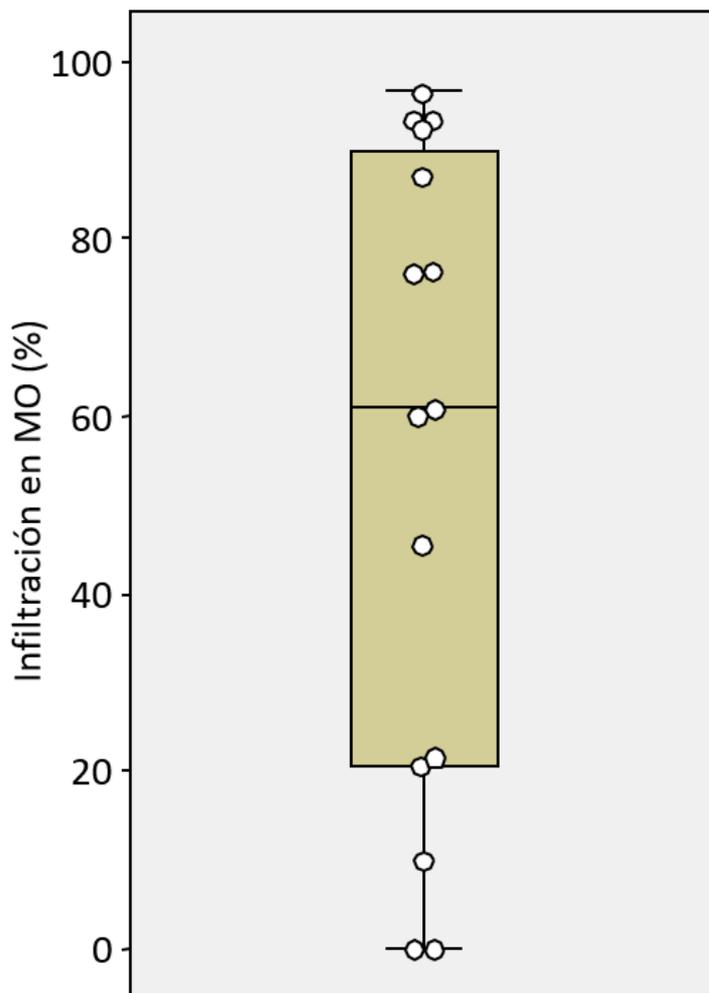


Figura 55: Diagrama de caja con los niveles de infiltración en MO. Los puntos muestran el porcentaje de infiltración con CD45 humano de cada uno de los 15 ratones a los que se les realizó una aspirado de médula ósea. La línea central delimita la mediana de infiltración (61,4%) y las barras verticales el nivel de máxima y mínima infiltración detectada. Representados en la barra vertical inferior los tres ratones excluidos.

En la tabla 10 se muestran las características de los 12 ratones aleatorizados: grupo control (n=5) y grupo tratamiento (n=7). Fueron aleatorizados por observador externo.

La media de infiltración medular con CD45 humano del grupo fosaprepitant fue del 61,4% (20-96,7%) y la media en el grupo control de SSF fue del 79% (45.4-93.4%) sin significación estadística mediante prueba t-student ($p=0,29$).

Nº Ratón	Sexo	Peso inicial (gr)	% Infiltración MO CD45 humano	Grupo	Supervivencia (días)
1	♀	20	76.3	Fosaprepitant	7
2	♀	19	96.68	Fosaprepitant	5
3	♀	20	93.44	SSF	5
4	♀	24	93.4	Fosaprepitant	5
5	♀	22	61	Fosaprepitant	10
6	♀	22	76.51	SSF	4
7	♀	25	45.56	SSF	6
8	♀	24	20	Fosaprepitant	9
9	♂	29	87.17	SSF	5
10	♂	28	60.15	Fosaprepitant	4
11	♀	25	92.51	SSF	3
12	♂	28	21.77	Fosaprepitant	6

Tabla 10: Tabla descriptiva de los ratones xenoinjertados: Descripción de las características de cada ratón, grupo de tratamiento y supervivencia en días

Durante los días de administración del fármaco o SSF intraperitoneal, se hizo seguimiento de peso de los ratones sin observar diferencias en las curvas de peso según grupo de tratamiento (Figura 56).

La supervivencia media del grupo de fosaprepitant fue de 6 días mientras que en el grupo SSF fue de 5 días con diferencias no estadísticamente significativas en la curva de supervivencia mediante el test de Log-Rank ($p=0.078$). La supervivencia máxima en el grupo de tratamiento fue de 10 días mientras que el máximo de supervivencia en el grupo de SSF fue de 6 días (Figura 57)

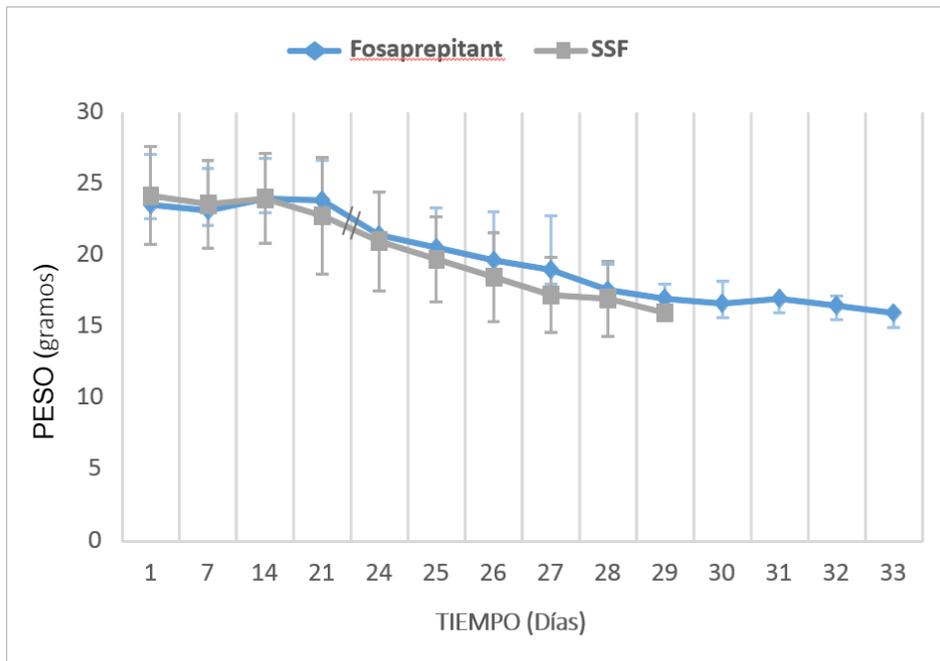


Figura 56: Curva de peso de los ratones según grupo de tratamiento. Los valores se presentan como media de los pesos de los ratones. Las barras de error en vertical corresponden a la desviación estándar. Se observa una caída de peso similar en ambos grupos a los 21 días que corresponde con el momento del aspirado de MO.

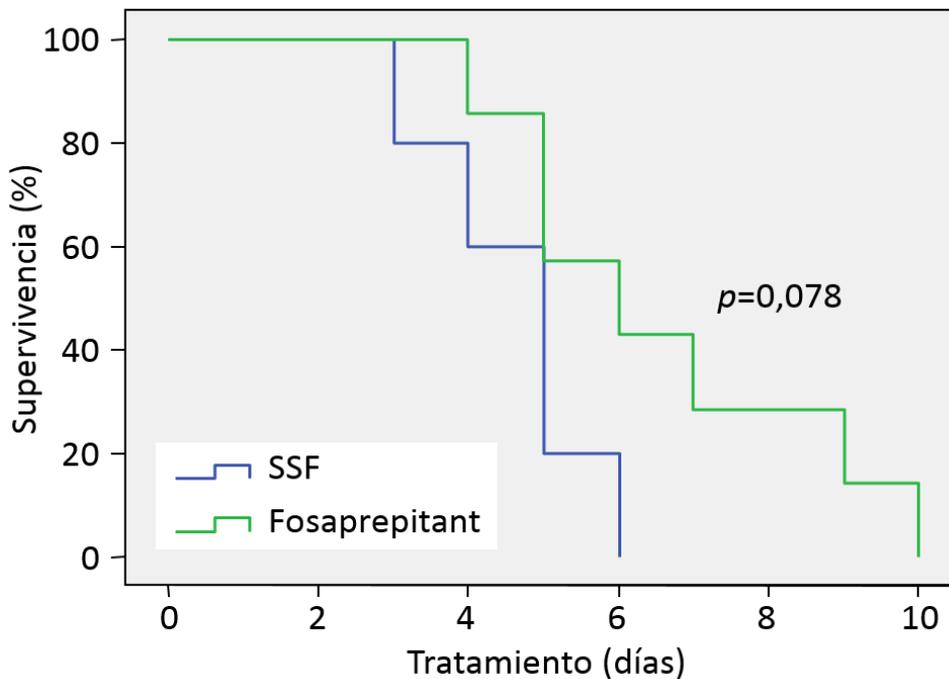


Figura 57: Curva de supervivencia según grupo de tratamiento. Supervivencia media en el grupo fosaprepitant de 6 días y en el grupo placebo (SSF) de 5 días.

V. DISCUSIÓN

El potencial mitogénico de la SP ha sido descrito en una gran variedad de células cancerígenas, en su mayoría en tumores sólidos. El papel de la SP sobre la hematopoyesis está ligado a su acción proliferativa sobre las células hematopoyéticas a través de mecanismos de auto-regulación, a su liberación como neurotransmisor a través de las fibras simpáticas que inervan la MO y al balance con otros neuropéptidos, citoquinas y quemoquinas. La acción estimuladora de la SP sobre la hematopoyesis se produce a través de la inducción de citoquinas estimuladoras como IL-1, IL-3, IL-6, IL11, SCF o TNF α y la estimulación directa de colonias de progenitores hematopoyéticos, así como a través de SDF-1 o CXCL12, quemoquina constitutivamente producida en el estroma medular que aumenta la expresión de SP a través del aumento de expresión del gen TAC1. Todos estos factores intervienen en el proceso de regulación del ciclo celular de las células hematopoyéticas, contribuyendo a mantener su quiescencia en la MO o permitiendo su salida a periferia pasando a un estado mitogénico.

La SP actúa a través del receptor NK1R. En células sanas, cuando NK1R está expresado, el NK2R está reprimido. El predominio de un subtipo de receptor con respecto al otro resulta interesante por el hecho de tener efectos opuestos en la proliferación de células hematopoyéticas (Greco et al., 2004) pudiendo el sistema SP-NK1R estar sobreexpresado en condiciones patológicas. En el estroma medular, el NK2R está constitutivamente expresado en células del estroma medular no estimuladas mientras que la expresión de NK1R es inducible por parte de citoquinas con efectos estimuladores sobre la hematopoyesis como la IL-1 (Corcoran et al., 2007; P. Rameshwar & Gascón, 1995).

La pérdida de los mecanismos de auto-regulación o el exceso de liberación autocrina de SP por las propias células hematopoyéticas podrían estar implicadas en la pérdida de la homeostasis medular. Así, la SP actúa de forma fisiológica a concentraciones bajas (picomolares). Sin embargo, se ha observado una alteración en el balance entre receptores taquicinérgicos y sus ligandos con un incremento de SP en enfermedades hematológicas malignas como LLA (Joshi et al., 2001) y en mielofibrosis (P. Rameshwar et al., 2001) así como en las células de cáncer de mama que invaden la MO (Rao et al., 2004). Podríamos decir que en condiciones fisiopatológicas la actividad del sistema SP/NK1R estaría aumentada o “up-regulated”.

Por todo ello nos hemos centrado en la SP por su potencial capacidad mitogénica sobre las células hematopoyéticas y en el NK1R como su receptor para el estudio in vitro sobre células de LMA con el objetivo de investigar nuevas dianas terapéuticas contra este tipo de leucemia.

A) EL RECEPTOR NK1R SE EXPRESA EN CÉLULAS DE LMA

1) NK1R se expresa en líneas celulares de leucemia mieloblástica aguda:

El ligando natural del receptor taquicinérgico NK1R es la SP. Este receptor está presente en células hematopoyéticas maduras y en progenitores hematopoyéticos así como en el estroma medular (en células mesenquimales, fibroblastos y células endoteliales).

En 1994, Lucey DR y colaboradores demostraron que los monocitos y macrófagos humanos de sangre periférica expresaban un receptor específico para SP (Lucey, Novak, Polonis, Liu, & Gartner, 1994). NK1R también se expresa en linfocitos y células linfoblastos (Payan, Brewster, Missirian-Bastian, & Goetzl, 1984).

Posteriormente, en 1998, De Giorgio identificó la expresión de SP en leucocitos mediante estudios de citometría e inmunohistoquímica. Identificó que los granulocitos y monocitos contenían SP, mientras que los linfocitos eran negativos o débilmente positivos. Sin embargo tanto en diferentes tipos de leucemia (LMA, LLC y LMC) como en linfocitos T activados demostraron una fuerte expresión de SP (De Giorgio et al., 1998). Más tarde, Nowicki y colaboradores detectaron SP en células de LLA infantil usando inmunocitometría y técnicas de hibridación in situ (Nowicki et al., 2003) y más tarde describieron que las LLA-B infantiles cuyos blastos expresaban SP tenían un pronóstico más desfavorable (M. Nowicki & Miśkowiak, 2003).

Nosotros demostramos por primera vez en este estudio que el NK1R está presente en dos líneas diferentes de LMA. Mediante western blot detectamos dos isoformas de NK1R, una de 50 kDa y otra de 60 kDa. La isoforma de menos peso molecular que podría corresponder a la isoforma truncada del receptor la cual se expresa el doble que la isoforma de 60kDa. Si comparamos estos datos con los descritos en estudios previos, en linfocitos humanos ya se ha demostrado la presencia de un receptor NK1R glicosilado de 58kDa (McGillis et al., 1990) mientras que en linfoblastos

se han detectado isoformas de 38 y 33 kDa (Organist, Harvey, McGillis, & Payan, 1988). Además se han descrito cuatro isoformas más abundantes del receptor (33-38, 46, 54-58 y 75 kDa) en distintos tejidos tumorales humanos como melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma laríngeo, adenocarcinoma gástrico y de colon, cáncer de mama, y LLA (Muñoz, Covenas, Esteban, & Redondo, 2015). Al igual que en nuestro trabajo, la isoforma de 50kDa se ha identificado también en la línea HepT1 de hepatoblastoma mientras que la isoforma de 60 kDa la describimos por primera vez en LMA (líneas KG-1 y HL-60). Actualmente se desconoce el papel funcional de las diferentes isoformas del receptor en las diversas líneas tumorales. De hecho, podría ser que las células tumorales expresasen con mayor frecuencia distintas isoformas de NK1R en comparación con las células normales debido a su mayor tasa de proliferación o podría deberse a otros motivos aún desconocidos. A este respecto, Tansky MF y colaboradores demostraron que un defecto en los sitios de glicosilación de NK1R (Asparagina Asn 14 y 18) reducía la funcionalidad del receptor en la membrana plasmática y una rápida internalización del mismo tras la unión de SP (Tansky, Pothoulakis, & Leeman, 2007). De este modo, las distintas isoformas del receptor encontrada en LMA (50 y 60 kDa) pueden corresponder a isoformas glicosiladas de NK1R las cuales estabilizan el receptor en la membrana plasmática manteniendo el NK1R expuesto y aumentando su capacidad de respuesta a la SP en la célula de LMA.

2) NK1R está sobreexpresado en células de LMA

Las células de LMA poseen NK1R en su membrana pero además este receptor se encuentra incrementado entre 12 y 20 veces en comparación con células mononucleares de MO de donante sano mediante densitometría de las bandas obtenidas por western-blot. Mediante RT-PCR demostramos que la intensidad de expresión de NK1R en ambas líneas de LMA es más del doble de la observada en linfocitos de sangre periférica de donante sano y que esta sobreexpresión se hace más evidente detectando la isoforma truncada de NK1R mediante primers específicos con un ratio de 3,78 y 4,81 veces para KG-1 y HL-60 respectivamente.

Estos resultados están en consonancia con los estudios previos en los se ha visto que las células normales expresan un menor número de NK1R en comparación con las células tumorales como ya se demostró en cáncer de páncreas (Friess et al., 2003), LLA,

mama y astrocitoma/glioma (Fowler & Brännström, 1994) y cáncer de pulmón (Muñoz, González-Ortega, Rosso, et al., 2012) entre otros. Además, se ha demostrado que las células tumorales con los fenotipos de mayor malignidad muestran un incremento en la expresión de NK1R (Friess et al., 2003; Miguel Muñoz, Rosso, & Coveñas, 2011) correlacionando los fenotipos más malignos y los tumores más avanzados con los mayores tasa de NK1R sobreexpresado (Friess et al., 2003; Hennig et al., 1995).

Ho y colaboradores demostraron la producción de SP endógena y la presencia de NK1R en monocitos y macrófagos humanos (Ho et al., 1997). Además, se ha demostrado la expresión de KN1R en otras células hematopoyéticas como las células CD34+ (Rameshwar P & Gascón P, 1994) así como en mastocitos derivados de células CD34+ estimuladas (Kulka, Sheen, Tancowny, Grammer, & Schleimer, 2008).

Lucey y colaboradores estimaron que el número de estos sitios de unión para SP en monocitos/macrófagos humanos de sangre periférica mediante ^{125}I -SP eran aproximadamente 70.000 por célula (Lucey et al., 1994), mucho más de lo esperado y lo descrito por otros estudios en los que describen que las células normales expresan menor cantidad de NK1R que las células tumorales. A este respecto, la expresión de receptores de SP en linfoblastos B se estima en unos 25.000-30.000 receptores por célula en los estudios realizados por el equipo de Payan (Payan, McGillis, & Organist, 1986) en comparación con los 7.000 sitios de unión SP por célula en linfocitos T humanas. En astrocitoma hallaron también una sobreexpresión de hasta 40.000 receptores por célula (Fowler & Brännström, 1994). Por todo ello, los datos que presentan Lucey y colaboradores podrían englobar tanto sitios de unión de SP de alta afinidad NK1R, como otros sitios de unión no específicos de baja afinidad como los descritos por Kavelaars y colaboradores en monocitos via receptor acoplado a proteína Gi (Kavelaars, Broeke, et al., 1994) u otros receptores taquicinérgicos de menor afinidad.

Recientemente, M. Muñoz y colaboradores demostraron la expresión de NK1R por RT-PCR en linfoblastos mediante estudios in vitro con dos tipos de LLA, una de estirpe B y la otra T (M Muñoz, González-Ortega, & Coveñas, 2012) con unos niveles de NK1R entre 1,23 y 3,2 veces mayor para las líneas BE-13 y SD-1 respectivamente en comparación con células normales (HEK 293) de un modo muy similar a nuestros hallazgos en LMA

3) La isoforma predominante es NK1R truncado

El hecho de que el mismo gen TAC1R sea capaz de generar dos isoformas (completa o “full-length” y truncada) por un mecanismo desconocido complica el entendimiento de dicho receptor.

Muy recientemente se ha empezado a plantear la posibilidad de que la isoforma truncada sea la predominante en las células malignas y que además induzca vías de señalización diferentes a las clásicas conocidas y reconocidas del NK1R. Por todo ésto, resulta muy interesante identificar qué subtipo del receptor está presente en nuestras células tumorales de LMA.

En este trabajo hemos demostrado por primera vez que las células de LMA (KG-1 y HL-60) expresan mRNA para el NK1R y que predomina significativamente la isoforma truncada a la cual se le ha llegado a llamar la isoforma oncogénica del receptor por su expresión predominante en tejidos tumorales. Este dato concuerda con el trabajo de Lai y colaboradores quienes demostraron la existencia de este receptor truncado en un línea celular humana de monocitos de sangre periférica derivada de un paciente con leucemia aguda monocítica (TPH1) (J.-P. Lai et al., 2006). Posteriormente este mismo grupo encabezado por Chernova y colaboradores demostraron que la SP aumentaba la inducción de la quimocina CCL5 la cual media la movilización intracelular del calcio en monocitos indiferenciados de sangre periférica los cuales expresaban NK1R truncado (Chernova et al., 2009), mientras que la movilización de calcio intracelular a través de NK1R completo expresado en mononocitos TPH-1 diferenciados era a través de SP. Este grupo concluía que el NK1R truncado en monocitos humanos era funcional a través de la inducción de CCL5 y por tanto era a través de una vía independiente del dominio C-terminal del NK1R completo.

Estudios recientes han demostrado que la isoforma truncada de NK1R es predominante en otros tipos de enfermedades malignas como cáncer de mama (Ramkissoon, Patel, Taborga, & Rameshwar, 2007), hepatoblastoma (M. Berger et al., 2014) y glioma (Cordier et al., 2014). Gillespie y colaboradores analizaron la isoforma truncada y la forma completa o “full-length” en el cáncer relacionado con colitis y encontraron que la expresión del receptor truncado y no la isoforma completa era predictor de progresión desde una colitis quiescente a una displasia de alto grado y posterior cáncer (Gillespie et al., 2011).

En cáncer de mama se ha descrito recientemente que NK1R está presente en células normales, benignas y malignas de tejido mamario; sin embargo, la expresión de NK1R “full-length” está significativamente disminuido en carcinomas metastásicos mientras que está altamente expresado en células de tejido mamario no tumorigénico (Y. Zhou et al., 2013). Por el contrario, en líneas celulares malignas de cáncer de mama sólo se detecta la expresión de la forma truncada del receptor NK1R. Estos autores encontraron que la expresión de NK1R “full-length” en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) estaba inversamente relacionada con proliferación, potencial invasivo y capacidad metastásica, mientras que la sobreexpresión de NK1R truncado era capaz de promover la transformación maligna y progresión tumoral de las células de tejido mamario no tumorales (HBL-100) (Y. Zhou et al., 2013).

En los últimos años han aumentado el número de publicaciones que relacionan la SP con la mielofibrosis. A este respecto Chang VT y colaboradores demostraron la presencia de NK1R en su forma truncada en monocitos de pacientes con mielofibrosis (V. T. Chang et al., 2013).

Según parece, la isoforma truncada es capaz de unirse también a proteínas G pero adoptando distintas conformaciones que activan vías de señalización diferentes y con una menor eficiencia en cuanto a internalización y desensibilización del receptor. El receptor “full-length” o receptor completo media un crecimiento lento de las células mientras que la forma truncada incrementa ampliamente el crecimiento celular además de estimular la producción de citoquinas con capacidad proliferativa (H. J. Patel, Ramkissoon, Patel, & Rameshwar, 2005).

Las vías de señalización de NK1R truncado permanecen en proceso de investigación. Al carecer del extremo carboxi-terminal es bien sabido que la unión de la SP no activaría los mismos mecanismos que la isoforma completa. La forma truncada pierde los sitios de fosforilación del extremo C-terminal necesario para la interacción de alta afinidad de β -arrestina, de manera que no se forma el complejo endosomal o signalosoma para la activación de la vía ERK/MAPK y además presenta defectos en la internalización del receptor y resistencia a la desensibilización, lo que conduciría a una sobreexposición y externalización del NK1R en la membrana celular y justificaría su implicación en procesos malignos como la LMA.

Lai JP y colaboradores demostraron que con la activación de la forma truncada de NK1R de la línea celular TPH1 derivada de monocito/macrófago indiferenciada, se inhibía la producción de IL-8 (Jian-Ping Lai et al., 2008) y PKC δ y se detectaba menor movilización del calcio intracelular a través de la interacción del NK1R truncado con otros RAPGs. Todo esto puede reflejar una posible preferencia de NK1R truncado por distintas proteínas G o por distintos cambios conformacionales de la proteína G, una interacción con otros RAPGs o incluso que existan vías de señalización intracelular independientes de proteína G.

Existen también diferencias en la activación de la vía ERK-MAPK del NK1R truncado con respecto a tiempo y duración de la misma. El NK1R truncado no tiene el extremo C-terminal, pero sí mantiene el tercer loop intracelular que sí podría interactuar con β -arrestina2 (Schmidlin, Roosterman, & Bunnett, 2003) mediando la activación de la vía ERK-MAPK por una vía independiente de proteína G. Esta activación sería mucho más lenta comparada con la activación a través de proteína G que ocurre con el NK1R “full length” (Ahn, Shenoy, Wei, & Lefkowitz, 2004).

En nuestro caso, observamos que las células de LMA tienen una sobreexpresión de NK1R a expensas de su isoforma truncada y por tanto, los mecanismos de internalización y desensibilización en presencia de SP estarían alterados y permanecerían externalizados en la membrana celular. Por otro lado, los linfocitos normales de sangre periférica expresan niveles mucho menores de esta isoforma y niveles similares de la isoforma completa del receptor.

A la hora de interpretar estos resultados, debemos considerar que el ratio de expresión del NK1R total es más bajo en linfocitos normales que en células leucémicas, lo que explicaría su mayor resistencia a los efectos del aprepitant. Otros estudios han demostrado esto mismo en fibroblastos donde la expresión de NK1R total es baja y la de la isoforma truncada casi despreciable y el aprepitant produce una mínima inhibición del crecimiento celular mostrando valores de IC₅₀ para aprepitant en fibroblastos y HEK293 cercano a los 60-90 μ M en comparación con los 28-38 μ M de IC₅₀ hallados para distintas líneas de hepatoblastoma que sí expresan la isoforma truncada y no la “full-length”. En este mismo trabajo, Berger y colaboradores describen una reducción

significativa en el nivel de mRNA de la isoforma truncada en las muestras de tejidos tumorales de ratones con hepatoblastoma tratados con aprepitant.

Por el momento, no obstante, no se conoce con certeza si los antagonistas de NK1R son capaces de bloquear del mismo modo la isoforma completa y la truncada del receptor. A este respecto cabe destacar el trabajo de Lai y colaboradores en el que demuestran que aprepitant inhibe tanto el incremento de calcio intracelular mediado por SP en la línea celular mieloide (TPH-1) diferenciada como el mediado por CCL5 en la línea celular mieloide indiferenciada con expresión de NK1R truncado, indicando que el efecto de aprepitant es a través tanto de NK1R truncado como “full-length” (J.-P. Lai et al., 2006).

Se necesitan más investigaciones que clarifiquen el papel funcional de las distintas isoformas del NK1R que se han encontrado en distintas líneas tumorales (Miguel Muñoz et al., 2014), incluyendo los diferentes sitios de glicosilación del NK1R

B) LA SP INDUCE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LMA

La SP está presente en células tumorales. Ha sido encontrada tanto en el citoplasma como en el núcleo de células de carcinoma de células escamosas (Brenner et al., 2009), carcinoma laríngeo (Francisco Esteban et al., 2009), células blásticas de LLA (Nowicki et al., 2003), melanoma (Khare et al., 1998), glioma, hepatoblastoma, neuroblastoma (Nowicki & Miśkowiak, 2002), cáncer de pulmón y retinoblastoma (Tarkkanen et al., 1983) (Muñoz et al., 2015; Carla Palma, 2006) (Tabla 11).

La alta presencia de SP en el núcleo de células tumorales en comparación con su predominio en el citoplasma de células sanas sugiere la importancia de la SP en la regulación de la actividad nuclear de la célula tumoral y su papel en la regulación de la mitogénesis. La expresión de SP en todos estos tumores sugiere que el péptido puede ser secretado de forma primaria en los tumores. Este dato no ha sido analizado en el presente trabajo, aunque sí ha sido demostrada con anterioridad por Nowicki y colaboradores la expresión de SP en el citoplasma de linfoblastos humanos (Nowicki et al., 2003).

En este trabajo nos hemos centrado en la acción proliferativa de SP sobre las células malignas de LMA y en su receptor NK1R como posible diana terapéutica. La SP

induce un incremento en la proliferación celular de LMA concentración dependiente usando concentraciones nanomolares de SP hasta determinada concentración a partir de la cual el efecto proliferativo se pierde lo cual se podría relacionar con los mecanismos de internalización y desensibilización conocidos del NK1R .

Tumour cells/Samples	Substance P	NK-1 receptor
B and T cells acute lymphoblastic leukaemia	+	+
Breast carcinoma	+	+
Colon carcinoma	Not studied	+
Gastric carcinoma	Not studied	+
Glioma/Astrocytoma	+	+
Hepatoblastoma	+	+
Larynx carcinoma	+	+
Lung cancer: small- and non-small-cells	+	+
Melanoma	+	+
Neuroblastoma	+	+
Oral carcinoma	+	+
Osteosarcoma	Not studied	+
Pancreatic carcinoma	Not studied	+
Retinoblastoma	+	+
Thyroid carcinoma	Not studied	+

Tabla 11. Presencia de SP y NK1R en muestras de distintos tumores humanos. Imagen tomada de (Muñoz et al., 2015) página 444.

La SP está relacionada con angiogénesis (Ziche, Morbidelli, Pacini, Geppetti, et al., 1990), proliferación celular, migración celular (Meshki et al., 2009) y fibrosis medular. Estas tres propiedades son comunes a los procesos malignos. Tras la activación de NK1R por la SP, existe un incremento en la síntesis de DNA en las células tumorales al activarse la vía MAPK, incluyendo ERK1/2 (Luo et al., 1996). Una vez activado, ERK1/2 es traslocado al núcleo para inducir proliferación y proteger a la célula tumoral de la apoptosis vía Akt o Protein kinase B (DeFea et al., 2000).

A este respecto, Mayordomo y colaboradores encontraron que la inhibición de SP mediante un anticuerpo monoclonal específico contra SP inhibía significativamente el crecimiento celular en cultivos de células tumorales de mama, colon y próstata con un aumento en la apoptosis acompañado de un descenso en las vías de señalización MAPK (Mayordomo et al., 2012). La SP podría considerarse por tanto un mitógeno universal de todas las células en las que se ha demostrado una expresión de NK1R.

La síntesis de SP está regulada por la expresión de TAC1, el gen que codifica SP y por las metalo-endopeptidasas de membrana responsables de la degradación de SP (Skidgel, Engelbrecht, Johnson, & Erdös, 1984). La SP en el microambiente medular provendría de varias fuentes probablemente interconectadas entre sí (Figura 58 y 59):

MECANISMO AUTOCRINO. Existen evidencias de que las células neoplásicas por sí mismas son capaces de producir SP creando un estímulo de crecimiento autocrino que favorecería la expansión del clon tumoral influenciando notablemente el microambiente tumoral (Rosso et al., 2012). La liberación autocrina de SP ha sido demostrada en otras líneas tumorales como en el colangiocarcinoma, donde se evidencia un incremento en la expresión de TAC1 mediante RT-PCR, así como altos niveles de SP comparado con células epiteliales biliares intrahepáticas normales (Meng et al., 2014). Nowicki y colaboradores detectaron SP y su mRNA en linfoblastos de pacientes pediátricos con LLA (Nowicki et al., 2003).

MECANISMO PARACRINO: La SP liberada por las células tumorales ejercerían una acción mitogénica sobre otras células tumorales y células endoteliales adyacentes. Esta afirmación está basada en estudios que han demostrado que la SP/NK1R está presente tanto en las células tumorales como en vasos sanguíneos intra y peritumorales así como la demostración de que la SP induce la proliferación de las células endoteliales (Ziche, Morbidelli, Pacini, Geppetti, et al., 1990) influenciando la estructura vascular e incrementando el flujo sanguíneo tumoral. Este efecto sobre la neo-angiogénesis a través de NK1R no se ha encontrado en otros receptores taquicinérgicos como NK2R o NK3R (Hennig et al., 1995).

MECANISMO ENDOCRINO: Por un lado, la SP generada por el propio tumor sería liberada al torrente sanguíneo y por otro lado existe una fuente de SP que alcanza el torrente sanguíneo y llegaría a cualquier parte del organismo regulada por el SNC (Sistema límbico, hipocampo y área postrema) apareciendo el concepto de eje neuro-

inmune-hematopoyético que podría contribuir en el proceso de la tumorigénesis (Greco et al., 2004; M. Muñoz, Rosso, & Coveñas, 2010). Otra fuente importante de SP sería la liberada por las fibras simpáticas que inervan la MO como neurotransmisor (Goto & Tanaka, 2002). La regulación de la actividad medular de las células blásticas a través de fibras nerviosas sensoriales que contienen SP relacionaría directamente el sistema nervioso con la leucemia a través del sistema SP/NK1R.

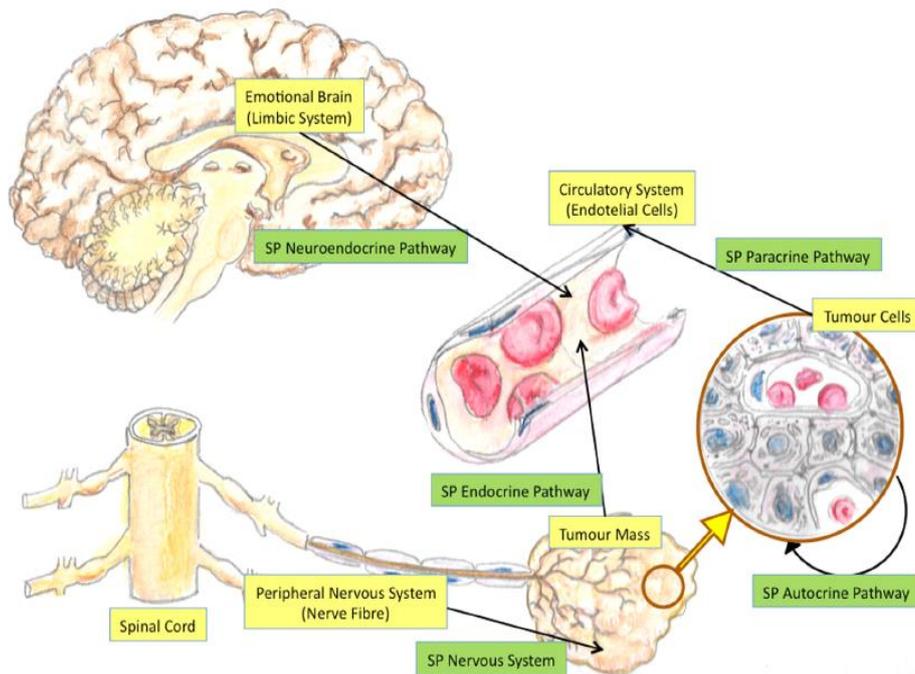


Figura 58. Fuentes de liberación de SP. Imagen tomada de M. Muñoz J. Biosci 2015 (página 448). La SP podría inducir mitogénesis de las células tumorales a través de una vía autocrina (SP secretada por el propio tumor), paracrino (la SP ejerce su acción mitogénica en otras células tumorales y en células endoteliales) y/o endocrino (SP secretada desde las células tumorales al torrente sanguíneo). Además la SP es liberada desde las terminaciones nerviosas que rodean la masa tumoral y a todo el organismo a través de su liberación al torrente sanguíneo por una vía neuroendocrina regulada por el sistema límbico.

Por último se ha sugerido la inducción de liberación de SP en la MO a través de CXC12 (también llamado SCF-1 stem cell factor 1), que ejerciendo su acción sobre las células del estroma medular a través del receptor CXCR4 liberaría SP y contribuiría al efecto proliferativo de la SP sobre la hematopoyesis (Klassert et al., 2010; Muñoz et al., 2015) (Figura 59).

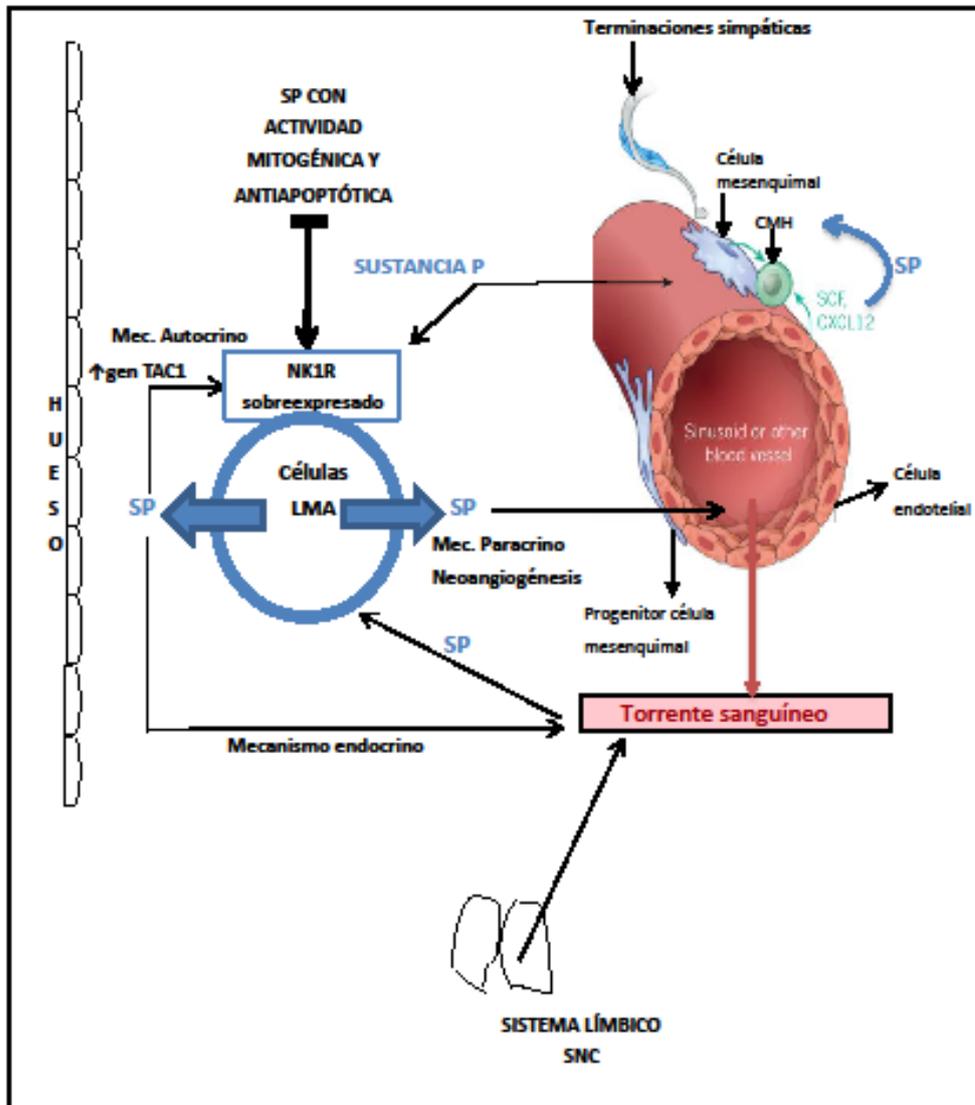


Figura 59: Posibles fuentes de liberación de SP sobre la célula de LMA en la que hemos demostrado sobreexpresión de NK1R y un efecto proliferativo de la SP

C) LA INHIBICIÓN DEL NK1R MEDIANTE ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DISMINUYE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS DE LMA IN VITRO

Las células tumorales desarrollan estrategias para neutralizar las vías que llevan a la muerte celular programada o apoptosis. Se ha sugerido que uno de estos

mecanismos pueda ser la sobreexpresión de NK1R truncado a través de la actividad antiapoptótica vía Akt (F. Esteban, Muñoz, González-Moles, & Rosso, 2006).

La célula tumoral tendría varios mecanismos para mantener el NK1R expresado de forma mantenida en la membrana y regulado y activado de forma mantenida por la SP para potenciar su efecto proliferativo sobre la células tumoral: 1) sobreexpresión del NK1R en la célula tumoral, 2) sobreexpresión de la isoforma truncada con mayor resistencia a la desensibilización del receptor, 3) distintas isoformas glicosiladas del receptor con capacidad para mantener el NK1R externalizado en la membrana. Tanto la sobreexpresión de NK1R como la sobreexpresión de la isoforma truncada por RT-PCR ha sido demostrada por nosotros en LMA. Además encontramos 2 isoformas predominantes del receptor por western-blot que podrían corresponder tanto a la isoforma truncada de menor peso molecular como a isoformas glicosiladas del mismo. Todo ellos justifica la investigación de este receptor como posible diana terapéutica y el uso experimental de antagonistas de NK1R en LMA.

En experimentos in vitro, los antagonistas de NK1R han demostrado poseer un potente efecto antitumoral sobre una gran cantidad de células tumorales humanas de distinto tipo: glioma, carcinoma laríngeo, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, LLA, astrocitoma, osteosarcoma, retinoblastoma, melanoma, pulmón, mama, carcinoma gástrico, páncreas y carcinoma de colon (Bigioni et al., 2005; W.-Q. Huang, Wang, Chen, Wei, & Chen, 2010; Muñoz, González-Ortega, Rosso, et al., 2012; M Muñoz et al., 2010, 2014; M Muñoz, Rosso, Pérez, Coveñas, Rosso, Zamarriego, Soult, et al., 2005; M Muñoz, González-Ortega, & Coveñas, 2012; Miguel Muñoz & Coveñas, 2014; Miguel Muñoz et al., 2011; M. Muñoz, Pérez, Coveñas, et al., 2004; M Muñoz & Rosso, 2010; M. Muñoz, Rosso, et al., 2010; Rosso et al., 2008). Este efecto se produciría al bloquear la acción fisiopatológica de su agonista natural, la SP, de manera que dichos fármacos tendrían un efecto antitumoral de amplio espectro y con capacidad antiangiogénica y antimigratoria obstaculizando la capacidad metastásica de las células tumorales.

Nosotros demostramos por primera vez que distintos antagonistas NK1R bloquean la acción proliferativa de la SP sobre las células de LMA de un modo concentración dependiente. La IC_{50} e IC_{100} obtenidas para KG-1 y HL-60 son similares a las descritas en otras líneas tumorales así como las dosis nanomolares que demuestran un efecto mitogénico de la SP sobre estas células (Tabla 12).

Para examinar si los antagonistas NK1R L-733,060, L-732,138, CP-96,345 inhiben la proliferación de células de LMA a través de la interacción con el receptor NK1R, usamos el agonista natural de dicho receptor, la SP, en experimentos de inhibición competitiva. De este modo, la proliferación celular en presencia de antagonistas a su IC_{50} junto con dosis nM de SP es inferior a la observada con diferentes dosis de SP en ausencia de antagonista en ambas líneas de LMA. Estos resultados indican que la acción mitogénica de la SP es llevada cabo a través de NK1R ya que los antagonistas bloquean la acción mitogénica de SP y por otro lado la SP a concentraciones bajas puede revertir parcialmente la acción antiproliferativa de los antagonistas NK1R usando la dosis de SP exógena más mitogénica

Todo ello muestra que el efecto de la SP sobre la proliferación celular se genera específicamente a través de su interacción con el receptor NK1R.

Después de confirmar una sustancial inhibición en la proliferación de las líneas KG-1 y HL-60 en presencia de antagonistas de NK1R, cultivamos las células con los fármacos antagonistas a las dosis previamente encontradas para su IC_{50} y IC_{100} y teñimos con DAPI para poder determinar que la inhibición celular encontrada con estos fármacos se corresponde con células apoptóticas, constatando de este modo la muerte por apoptosis.

Tumor	Línea celular	L-733,060		Aprepitant		L-732,138	
		IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}	IC_{50}	IC_{100}
<i>LLA-B</i>	SD-1	18.4	50	29.4	59.2	49.7	103.5
<i>LLA-T</i>	BE-13	15.4	40	19.5	50	63.9	124
<i>Ca. Mama</i>	BT-474	10.6	20.6	31.4	59	25.4	58
<i>Ca. Colon</i>	SW-403	14.5	25.8	30.5	60.5		
<i>Glioma</i>	GAMG	21.3	43	33	66	48	100
<i>Hepatoblastoma</i>	HepT1	16		31		42	
<i>Neuroblastoma</i>	SKNBE2	11.6	21	24.6	48.8	41	80.5
<i>Osteosarcoma</i>	MG-63	14.5	30	28.6	80	58.6	100

<i>Ca. Páncreas</i>	PA-TU-8902	18	38.4	31.2	63		
<i>Ca. Pulmón</i>	H-69	18.7	39.2	21.8	45.2	51.9	109
<i>Retinoblastoma</i>	Y-79	12.2	25	30.4	59	56.8	132
<i>Melanoma</i>	MEL HO	27.5	54	29.6	56.5	76	140
LMA	KG-1	21.8	42.7	18.8	60	50	100
	HL-60	21.3	37	14.8	60	46.4	98

Tabla 12: Tabla comparativa del efecto citotóxico de tres antagonistas NK1R sobre distintas líneas tumorales. Se muestran las concentraciones (μM) de tres antagonistas ordenados de mayor a menor potencia (L-733,060, aprepitant y L-732,138) y las concentraciones (nM) de SP con efecto mitogénico. Sombreado en azul oscuro se muestran los datos de inhibición obtenidos en nuestro trabajo en LMA similar en porcentaje y potencia en comparación con otras líneas tumorales. Modificado de (Muñoz et al., 2015).

D) FÁRMACOS ANTAGONISTAS NK1R

Los antagonistas de los receptores NK1R se dividen en peptídicos y no peptídicos. Nos centraremos en discutir los segundos ya que los antagonistas peptídicos han demostrado tener una potencia pobre, una débil capacidad de discriminación entre los distintos subtipos del receptor y una neurotoxicidad asociada significativa. Por el contrario, los antagonistas no peptídicos son compuestos liposolubles que no son degradados por peptidasas y que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica a diferencia de los compuestos peptídicos. Este último hecho sería importante en el potencial tratamiento de la LMA, una enfermedad con tendencia a infiltrar el sistema nervioso central. Hasta la fecha, se han desarrollado más de 300 compuesto antagonistas NK1R no peptídicos (Miguel Muñoz & Coveñas, 2013).

Los antagonistas no peptídicos incluyen compuestos con diferentes composiciones químicas pero que tienen en común que demuestran características estereoquímicas similares (Figura 60). CP-96-345 es un compuesto bencil amino quinuclidina, L-732,138 es un compuesto derivado del triptófano, aprepitan es un derivado morfolínico y L-733,060 es un antagonista NK1R no peptídico selectivo que pertenece a la familia bencil éter piperidina. Estos antagonistas usados en nuestros

experimentos son diferentes en su composición química pero comparten conformaciones estructurales similares que le permiten tener en común su afinidad por el receptor NK1R. Evidentemente, la acción antitumoral no sería producida por la composición química de los compuestos sino por su estructura tridimensional o estereoquímica que los caracteriza para unirse al NK1R y bloquear las funciones fisiopatológicas de la SP.

El antagonista L-733,060 es el que ha demostrado tener una mayor potencia de acción antitumoral contra las células de LMA. La IC_{100} para L-733,060 se alcanza con concentraciones del fármaco en torno a $40 \mu M$ mientras que con aprepitant se obtiene con dosis de $60 \mu M$. Por otra parte, el aprepitant ha demostrado ser mucho más potente que L-732,138 y CP-96,345 en la inhibición de células leucémicas mieloblásticas en concordancia con los estudios realizado en otras líneas celulares (Miguel Muñoz et al., 2011) donde L-733,060 ha demostrado ser de 4 a 6 veces más potente que L-732,138. (Tabla 11).

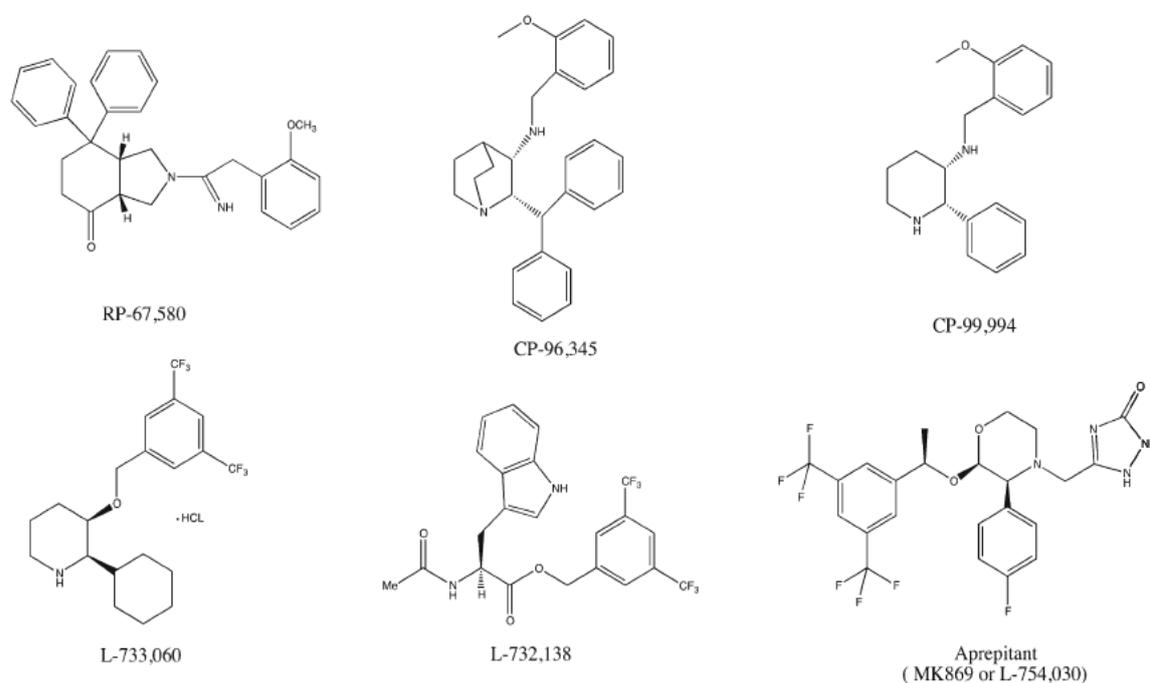


Figura 60. Composición química de distintos antagonistas NK1R no peptídicos.

En líneas de hepatoblastoma se demostró sinergia in vitro con cisplatino o doxorubicina con un incremento significativo de la citototoxicidad de los citostáticos y de

los antagonistas NK1R cuando se usaban de forma conjunta (M. Berger et al., 2014). También se ha demostrado un efecto sinérgico de aprepitant con fármacos quimioterápicos clásicos en el tratamiento del osteosarcoma (M Muñoz et al., 2014) mientras que no ocurría en células benignas HEK 293 y por último se ha descrito un efecto sinérgico de acción antitumoral usando de forma concomitante antagonistas NK1R con agentes desestabilizantes de los microtúbulos como la vinblastina (Kitchens, McDonald, Pollack, Wipf, & Lazo, 2009).

Este hecho abre un nuevo campo de posibilidades terapéuticas en LMA. Sería interesante comprobar en un futuro en estudios *in vitro* y en modelo animal el efecto de los antagonistas NK1R junto con quimioterápicos clásicos para el tratamiento de la LMA como citarabina, idarrubicina y etopósido, sobre nuestras células mieloblásticas KG1 y HL60. Dada la evidencia previa, sería esperado encontrar que con el uso concomitante de quimioterápicos y antagonistas NK1R la IC_{50} e IC_{100} encontrada en nuestro estudio se reduciría aún más e incluso que la IC_{50} e IC_{100} requerida con el uso aislado de quimioterápicos sería probablemente menor usando antagonistas NK1R lo que sería un avance para disminuir los efectos adversos que producen altas dosis de quimioterapia sistémica para la LMA.

Por otro lado, también resultaría interesante determinar si el tratamiento de LMA con otros antagonistas de NK1R estudiados en humanos como antieméticos como CP-122,721, ezlopitant (CJ-11,974), vofopitant (GR-205,171) y fosaprepitant (L-758,298) (Diemunch) producen la misma inhibición celular de LMA que la encontrada con L-733,060, L-732,138, CP-96,345 y aprepitant en este trabajo y ampliarlo a estudios en modelo animal

E) APREPITANT. USO CLÍNICO

Muchas son las utilidades terapéuticas que se han intentado aplicar a los antagonistas de NK1R como parte de la intervención del sistema SP-NK1R en diversos procesos fisiopatológicos.

Antiemético: Una de las áreas en la que los antagonistas NK1R han encontrado una mayor utilidad clínica ha sido en prevenir el vómito post quirúrgico y post

quimioterápico; así cabe destacar los trabajos de (Bountra et al., 1993; Gonsalves, Watson, & Ashton, 1996; Tattersall, Rycroft, Hargreaves, & Hill, 1993) en modelos animales. Actualmente aprepitant y fosaprepitant (un profármaco del aprepitant de formulación intravenosa) son los dos únicos antagonistas NK1R disponibles en la práctica clínica para la prevención de las náuseas y vómitos asociados a la quimioterapia y post-operatorio. La quimioterapia induce la liberación de SP y el aprepitant bloquea los efectos no deseados de la SP sobre el SNC en el reflejo nauseoso nauseoso (Abidi et al., 2012; Diemunsch et al., 2007).

El aprepitant usado como fármaco antiemético tiene una eficacia y una seguridad adecuada demostrada en distintos ensayos clínicos. Además de las náuseas inducidas por quimioterapia, el aprepitant también se ha usado satisfactoriamente como fármaco off-label para el tratamiento del dolor, migraña y depresión. Todo esto resulta especialmente interesante puesto que todos estos síntomas están a menudo ligados al paciente con cáncer por lo que inducir una respuesta terapéutica antitumoral con aprepitant supondría hipotéticamente un efecto antitumoral universal común a múltiples líneas neoplásicas ligado a una mejoría en síntomas asociados al cáncer y a los efectos indeseables conocidos de los tratamientos quimioterápicos convencionales.

Analgésico: La primera generación de antagonistas no peptídico son potentes inhibidores de la excitación del asta dorsal de la médula (Radhakrishnan & Henry, 1991). Muchos estudios se realizaron a lo largo de los años noventa para intentar encontrar aquel antagonista no peptídico que tuviera buena penetrancia en el SNC y fuera de larga duración de acción (Cirillo et al., 1998; Rupniak, Carlson, Boyce, Webb, & Hill, 1996) dos ventajas presentes en la molécula L-733,060. Sin embargo, a pesar de los datos preclínicos publicados mostrando un efecto analgésico con los antagonistas de NK1R, los ensayos clínicos en humanos se han mostrado ineficaces en el tratamiento del dolor incluyendo la migraña excepto en el caso de un ensayo con CP-99,994 que disminuía el dolor dental post-operatorio (Borsook et al., 2012).

Antidepresivo y ansiolítico: Los estudios realizados en este área se basaron en la presencia de NK1R en las regiones cerebrales relacionadas con el comportamiento emocional, de ahí que se plantearan ensayos preclínicos en gerbos y cobayas por tener NK1R de las mismas propiedades que los existentes en humanos. Destacan los ensayos realizados por (Kramer et al., 1998; Rupniak et al., 2000) en que demostraban la

capacidad antidepresiva de estos compuestos. De los estudios realizados en humanos cabe destacar un ensayo clínico a doble ciego comparando el MK-869 con la paroxetina y el placebo, observando igual eficacia como antidepresivo y con efectos secundarios similares al placebo utilizando dosis de aprepitant de 300 mg al día (Kramer et al., 1998). Sin embargo, ensayos posteriores con dosis de 160 mg/día no demostraron este efecto antidepresivo (Keller et al., 2006). La acción de aprepitant al igual que otros antagonistas NK1R es concentración dependiente por lo que su efecto clínico no se ha demostrado con dosis inferiores infraterapéuticas (Keller et al., 2006).

Antitumoral: A principios de los noventa crece un interés por los antagonistas de los receptores taquicinérgicos como inhibidores de la proliferación tumoral como bien reflejan los trabajos realizados por Woll y colaboradores sobre los antagonistas peptídicos en el cáncer de pulmón de células pequeñas, tanto in vitro como in vivo en ratones Swiss 3T3 obteniéndose inhibición del crecimiento de células cancerosas (Woll, 1991). A finales de los noventa comienzan a utilizarse los antagonistas no peptídicos para antagonizar a los receptores taquicinérgicos expresados en líneas celulares tumorales humanas (Luo et al., 1996; Palma et al., 2000).

Hasta el año 2008 se pensaba que los análogos sintéticos de la SP “SP analogue antagonist” actuaban como antagonistas de la SP de forma inespecífica en células tumorales de pulmón. Posteriormente en 2012 se demuestra que las células de cáncer de pulmón expresan SP y NK1R y que los antagonistas no peptídicos NK1R actúan como antitumoral a través de NK1R (Muñoz, González-Ortega, Rosso, et al., 2012) y que los “SP analogue antagonist” previamente testados con acción antitumoral en el pulmón ejercían su acción a través de NK1R (M. Muñoz, Recio, Rosso, Redondo, & Covenas, 2015).

Se han desarrollado distintos antagonistas NK1R (Giardina, Gagliardi, & Martinelli, 2003) con la esperanza de tratar distintos cánceres aunque los ensayos clínicos humanos aún no se han desarrollado y sólo se ha probado este efecto antitumoral en estudios in vitro e in vivo en animales (M Muñoz, Juan Martinez-Armesto, et al., 2012). Está generalmente aceptado que las dosis de antagonistas necesarias para encontrar un efecto antitumoral en estudios in vivo con animales son comparativamente más altas a las usadas como antieméticos y antidepresivos.

Un antagonista especialmente prometedor para el estudio del efecto antitumoral

bloqueando NK1R sería el aprepitant (Emend®) puesto que actualmente está aprobado por la FDA para el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia y disponible vía oral. Fosaprepitant (Ivemend®) es el profármaco de aprepitant y cuando se administra por vía intravenosa se convierte rápidamente en aprepitant.

En este estudio hemos demostrado que el aprepitant no inhibe la proliferación de linfocitos normales *in vitro*. Hemos usado estas células como control por ser una muestra representativa de las células inmunes maduras del sistema hematopoyético. Nuestro objetivo era demostrar que el aprepitant no tenía un efecto sobre las células de LMA como consecuencia de una citotoxicidad indiscriminada sobre las células del sistema hematopoyético. En este sentido, la IC₅₀ para linfocitos es unas 10 veces mayor que la encontrada para ambas líneas de LMA. En concordancia con estos datos el Dr. F. Tuluc de la universidad de Pensilvania nos ha proporcionado datos de no citotoxicidad en monocitos de donante sano con dosis de aprepitant de 10 µM. (Wang et al., 2007).

La seguridad de aprepitant ya ha sido demostrada en fibroblastos donde la IC₅₀ es tres veces mayor que la IC₅₀ para células tumorales (M Muñoz & Rosso, 2010). En el trabajo de Berger y colaboradores 2014 se describe cómo los fibroblastos expresan menos NK1R que las células de hepatoblastoma al igual que ocurre en osteosarcoma (M. Berger et al., 2014; M Muñoz et al., 2014) y que, en consecuencia, los fibroblastos eran mucho más resistentes a la acción de aprepitant, indicando que el efecto estaba específicamente dirigido vía SP/NK1R. Además, la IC₅₀ para células no tumorales (HEK 293) es de 90 µM mientras que la IC₁₀₀ para distintas células tumorales está en torno a 60 µM (M Muñoz & Rosso, 2010) coincidiendo con la IC₁₀₀ obtenida en nuestras líneas celulares de LMA. Si la citotoxicidad selectiva o incrementada de las células malignas de LMA en comparación con células benignas como los linfocitos dependen de la menor cantidad de NK1R truncado encontrado en linfocitos es una cuestión que aún no está del todo aclarada.

La seguridad carcinogénica de aprepitant es evidentemente superior a la de los fármacos quimioterápicos convencionales y los antagonistas de NK1R como el aprepitant, podrían actuar de forma selectiva sobre células tumorales con sobreexpresión de NK1R e incluso se podrían obtener efectos beneficiosos como antiemético, analgésico, antiinflamatorio y ansiolítico.

En estudios de farmacocinética se obtiene una concentración máxima de 7 μM con una dosis oral única de aprepitant 240 mg (Bergman et al., 2005). Recientemente el grupo de Tebas P. ha utilizado aprepitant en pacientes con VIH a dosis de 375 mg oral diario sin efectos secundarios significativos obteniendo una concentración pico de aprepitant de 14 μM (Tebas et al., 2015). Esta concentración equivaldría casi a la IC_{50} de aprepitant obtenida en nuestros estudios in vitro para ambas líneas de LMA (14,8 μM y 18.8 μM respectivamente).

F) Hematopoyesis: Interacciones del sistema SP-NK1R con otros factores de crecimiento. CONTROVERSIAS

Muchas cuestiones quedan aún sin resolver sobre el papel exacto de SP/NK1R en la progresión y proliferación celular de LMA. Por ejemplo, los antagonistas NK1R están diseñados sin tener en cuenta las dos isoformas descritas del receptor, la isoforma completa y la truncada. Aunque como comentamos previamente existen evidencias de la acción de aprepitant sobre la isoforma truncada (M. Berger et al., 2014; J.-P. Lai et al., 2006), tal vez, el desarrollo de fármacos antagonistas de la isoforma truncada de NK1R pudieran resultar en una nueva terapia contra células tumorales de mayor eficacia contra LMA al ser la isoforma que hemos encontrado claramente sobreexpresada. Aunque por otro lado sabemos que las distintas isoformas glicosiladas del receptor no interfieren en la unión a su ligando y a la maquinaria que activa la vía MAPK (Tansky et al., 2007).

El papel que juega el receptor NK1 en la hematopoyesis ya ha sido demostrado y evidencias previas nos han permitido centrar nuestros experimentos en el sistema NK1R-SP como posible centro regulador y potencial diana antitumoral de células tumorales hematopoyéticas de LMA. Sin embargo, al igual que ocurre con el gen TAC1, la expresión de NK1R en las células sanas es inducible y los mecanismos de regulación por otras moléculas, su auto-regulación así como la comunicación con otros receptores no están completamente establecidos y se requieren futuras investigaciones para el conocimiento y las implicaciones del bloqueo de NK1R así como la posibilidad de vías alternativas de escape.

La hematopoyesis está regulada por factores solubles, proteínas de la matriz extracelular e interacciones intercelulares a través de diferentes moléculas de adhesión

(Carlesso & Cardoso, 2010). En la MO existen moléculas que se asemejan a los receptores taquicinérgicos. El estudio del microambiente medular y de estas moléculas y receptores podría explicar posibles factores de confusión que aparecen con el uso de los antagonistas de los receptores taquicinérgicos.

Discutiremos a continuación los posibles factores de confusión e interacción de la SP con otros receptores así como de otras moléculas con el receptor NK1R como parte del complejo entramado de la regulación de la hematopoyesis por parte del sistema NK1R-SP

1- Inducción y regulación de la expresión de SP y NK1R en la MO

Expresión de SP

La expresión del gen TAC1 y por tanto de SP es inducible por las propias células del sistema inmune, tanto por CMH, como células inmunes maduras y por el propio estroma medular y las CMM, además de la liberación de SP como neurotransmisor a través de la innervación medular. Además, la SP es capaz de regular su propia producción (Kavelaars, Broeke, et al., 1994) aunque aún no conocemos si la autorregulación de la SP es mediada directa o indirectamente por otros factores solubles.

El estroma medular responde a distintos estímulos y produce factores que actúan a través de mecanismos autocrinos y/o paracrinos para regular la hematopoyesis (Dorshkind, 1990). Uno de esos factores es la quemoquina SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1) también llamada CXCL12 que tiene un papel importante para la retención de CMH cerca del endostio medular. Sin embargo, cambios en el gradiente de SDF-1 α facilitan la movilización de CMH al compartimento proliferativo y a la circulación periférica. De esta manera, SDF-1 α es importante para mantener el estado quiescente de las CMH cerca del nicho medular como célula madre pluripotente, mientras que cambios en los niveles de SDF-1 α estimulan la hematopoyesis movilizándolo las CMH del nicho quiescente al nicho proliferativo (Arai et al., 2005; Moharita et al., 2006). La movilización de CMH desde la MO a la periferia se ha demostrado en los trabajos realizados con el antagonista AMD3100 que bloquea CXCL12-CXCR4 (Plerixafor®) (Corcoran et al., 2007; Hattori, Heissig, & Rafii, 2003; Lapidot et al., 2005). Por otro lado, se ha visto que esta vía está implicada en la capacidad de las células de cáncer de mama de producir metástasis en la MO según estudios de Singh (Singh et al., 2000) y Reddy y

colaboradores (Reddy et al., 2009). Así, la concentración de SDF-1 α determina el destino de la CMH de manera que con niveles elevados de SDF-1 α la interacción entre CMH y las células estromales queda interrumpida y a través de su receptor CXCR4 induce la expresión del gen TAC1 y mediante la producción de SP se estimula la hematopoyesis vía NK1R (Corcoran et al., 2007). Los estudios de Corcoran no evidencian que la SP regule la producción de SDF-1 α ni positiva ni negativamente. Esto descarta la posibilidad de que la SP, en presencia de antagonistas de NK1R, puedan actuar inhibiendo la producción de SDF-1 α para reducir la hematopoyesis.

Otro hecho a destacar es que la SP puede mediar el incremento en la producción del factor estimulador de colonias granulocítica-macrofágicas en células mononucleares de la MO (Corcoran et al., 2007; P. Rameshwar, Ganea, & Gascón, 1994). Este factor de crecimiento podría ser también importante en la movilización de CMH a la periferia actuando a través de la regulación negativa de SDF-1 α .

Todo ello justificaría el papel de la SP en el microambiente medular y en las funciones de regulación de la homeostasis y en última instancia podría relacionarse con la movilización y proliferación incontrolada de células previamente en estado quiescente que se movilizan al nicho proliferativo favoreciendo la progresión de una clona leucémica mieloblástica

Expresión NK1R

La expresión del receptor NK1R requiere la inducción por citoquinas estimuladoras de la hematopoyesis como la IL-1 cuya producción está inducida por la propia SP. Además, la expresión de este receptor se correlaciona con la regulación negativa de NK2R

En células sanas, cuando NK1R está expresado, el NK2R está reprimido (expresión tipo yin-yang). El predominio de un subtipo de receptor con respecto al otro resulta interesante por el hecho de tener efectos opuestos en la proliferación de células hematopoyéticas (Greco et al., 2004; Patacchini & Maggi, 1995).

Además, existen mecanismos de comunicación entre receptores taquicinérgicos que no están bien establecidos. Lo que sí parece claro es que se ha visto un desbalance entre receptores taquicinérgicos y sus ligandos en hemopatías malignas como la LLA en

las que se ha visto un incremento de SP y aumento de fibrosis medular secundaria (Harrison et al., 2006; Joshi et al., 2001; P. Rameshwar et al., 2001, 2003).

El NK1R es capaz de producir una desensibilización reversible del receptor cuando se expone a concentraciones altas de su ligando la SP. Cuando la estimulación del receptor NK1R es óptima, la inactivación del receptor se acompaña de su internalización (DeFea et al., 2000).

Nuestro trabajo demuestra que existe una sobreexpresión de NK1R en la célula leucémica mieloblástica por lo que los mecanismos de internalización estarían fallando. El hecho de que la sobreexpresión del receptor encontrada sea a expensas de la isoforma truncada tiene sentido puesto que los mecanismos de internalización son deficientes en esta isoforma y existe más resistencia a la desensibilización con la isoforma truncada que con la completa. Bloqueando el receptor NK1R farmacológicamente evitaríamos el efecto proliferativo de la SP vía NK1R y teóricamente el receptor NK2R se haría predominante y se induciría permitiendo el control de la homeostasis mediante su capacidad de inhibición celular

2. Otras moléculas o ligandos que actúan sobre NK1R en la MO

Existe un sistema de activación multimodal con distintos cambios de conformación del receptor NK1R que le permiten activar distintas vías dependiendo tanto del microambiente extracelular como del propio ligando. De este modo, el mismo receptor NK1R adopta distintas conformaciones según si se une a él su ligando natural SP u otras TK como HK1, NKA o septide

La HK-1 es un potente ligando del NK1R expresado en tejidos no neurales como las células inmunes. Se ha descrito que tanto SP como HK-1 exhiben un efecto antiapoptótico sobre las células dendríticas derivadas de la MO a través de NK1R (Janelins et al., 2009). Además se ha demostrado una co-expresión de HK-1 y NK1R en líneas celulares monocito/macrófagos y un descenso de la expresión génica de los mismos tras ser activados mediante citoquinas proinflamatorias (interferón gamma y IL1 β) lo cual coincide con la diferenciación monocítica. Esta regulación también se ha observado en precursores de los monocitos en la MO sugiriendo que este sistema HK-

1/NK1R pudiera estar controlado por redes de citoquinas y tener impacto en la regulación de la hematopoyesis al igual que SP/NK1R (A. Berger, Tran, & Paige, 2007).

Parece claro que el agonista natural de NK1R en el SNC es la SP pero podría ser que la HK-1 fuera relevante como agonista natural en los tejidos periféricos y no está establecida su acción sobre células tumorales como en el caso de la SP ni las implicaciones que tiene bloquear su efecto con el uso de los antagonistas NK1R. Sería por tanto interesante incluir esta TK en futuros proyectos de investigación y ser estudiada con más profundidad para aclarar cuál es su papel como agonista del NK1R y cómo se relaciona con la SP en la regulación de la hematopoyesis. Nuestro grupo de investigación está realizando un proyecto de la acción proliferativa de SP y HK-1 sobre células de mesotelioma y a concentraciones nM producen similar proliferación tumoral.

3. Vías alternativas para la SP en la MO cuando el NK1R está bloqueado

HGFIN

HGFIN (Hematopoietic Growth Factor inducible neurokinin-1 type) es una proteína transmembrana similar a NK1R con capacidad para interactuar con SP (P.S Bandari et al., 2003).

HGFIN se expresa en células inmunes diferenciadas en MO y periferia pero no se detecta en progenitores hematopoyéticos con alta capacidad de proliferación. En las células normales, HGFIN es considerada una molécula con capacidad de supresión tumoral regulada por p53 (Metz, Yehia, Fernandes, Donnelly, & Rameshwar, 2005).

La interacción entre HGFIN y SP podría parcialmente explicar por qué HGFIN es considerado un gen supresor de tumores ya que si HGFIN actúa como señuelo de la SP impediría su unión a NK1R. En este contexto, cuando la SP está patológicamente expresada en una MO con enfermedad medular como LMA, si somos capaces de bloquear su receptor natural que es NK1R, podría unirse a HGFIN permitiendo su acción supresora de tumores. Sin embargo, por otro lado, también se ha escrito un papel en la oncogénesis de HGFIN (Rich et al., 2003).

En un futuro será necesario determinar cómo se afecta HGFIN durante el bloqueo farmacológico de NK1R.

Fibronectina

La fibronectina forma parte de las proteínas de la matriz extracelular del nicho hematopoyético y también comparte una similaridad estructural con NK1R (P. Rameshwar et al., 2001). Esta semejanza estructural permite que la fibronectina pueda competir con NK1R por la SP al igual que HGFIN. Aunque esta similitud pudiese ser ventajosa para la hematopoyesis, podría también estar implicada en procesos patológicos de la MO.

En una MO sana, la SP con propiedades de inducción de la proliferación y con un posible papel oncogénico, tendría un mecanismo de autorregulación normal a través de las endopeptidasa que permitiría transformarse en SP(1-4) el cual ejerce un efecto de inhibición sobre la hematopoyesis. Sin embargo, la fibronectina estabiliza la SP protegiéndola de la degradación por parte de la endopeptidasas endógenas por lo que en un estado patológico, esta propiedad de la fibronectina a través de la SP justificaría los niveles de SP elevados encontrados en el suero de pacientes con mielofibrosis y leucemia (Michal Nowicki, Ostalska-Nowicka, Kondraciuk, & Miskowiak, 2007; P. Rameshwar et al., 2003) y sería relevante ya que también se ha descrito la existencia de un incremento de fibronectina en pacientes con mielofibrosis (Reilly, Nash, Mackie, & McVerry, 1985). Las funciones de SP a través de NK1R relacionadas con la inducción de fibrosis medular en el contexto de las hemopatías malignas son la inducción de angiogénesis, el efecto mitogénico sobre fibroblastos y progenitores hematopoyéticos (hipercelularidad) así como la inducción de citoquinas fibrogenéticas como TGF- β de células inmunes y células mesenquimales (Jin, Hong, & Son, 2015) así como la liberación de SP y TGF- β 1 por parte de monocitos mielofibróticos potenciada por la fibronectina descrita por Chang y colaboradores (V. T. Chang et al., 2013)

Lo que aún se desconoce es si existe un mecanismo competitivo entre NK1R y fibronectina para interactuar con la SP. A este respecto resulta interesante el efecto fibrinolítico que se ha demostrado en ratones con la inyección intraperitoneal del antagonista NK1R, aprepitant reduciendo la tasa de adhesiones intraabdominales postquirúrgicas (Lim et al., 2008) y que estaría en consonancia con el efecto beneficioso esperado del bloqueo farmacológico de la acción de SP a través de NK1R en pacientes con mielofibrosis primaria o secundaria.

En resumen, existen factores de confusión en torno al sistema SP-NK1R y la hematopoyesis. Al bloquear el NK1R farmacológicamente, somos capaces de inhibir el crecimiento de LMA in vitro. Sin embargo, cabría la posibilidad de que su ligando la SP pudiese permanecer disponible para interactuar con la fibronectina y el HGFIN ambas moléculas estructuralmente similares a NK1R, o unirse al NK2R cuando su receptor de mayor afinidad NK1R estuviese bloqueado (Figura 61). Habría que considerar la necesidad de bloquear también estas moléculas y receptores estructuralmente similares a NK1R sobre los que la SP pudiese actuar (fibronectina, HGFIN y NK2R).

Por otro lado, al bloquear NK1R también podríamos bloquear la acción de otras TK como NKA y HK-1 cada una de ellas con distintos grados de afinidad por el receptor y con implicaciones desconocidas en la actualidad.

Para optimizar la estrategia de tratamiento antitumoral podría ser necesario el uso concomitante de otros reguladores de la hematopoyesis para bloquear otros receptores relacionados con SP y hematopoyesis, el uso de fármacos agonistas del NK2R para potenciar el efecto inhibitorio de la hematopoyesis de NKA o incluso bloquear NK2R, fibronectina y HGFIN para evitar que la SP actuase a nivel de este receptor en presencia de los antagonistas de NK1R.

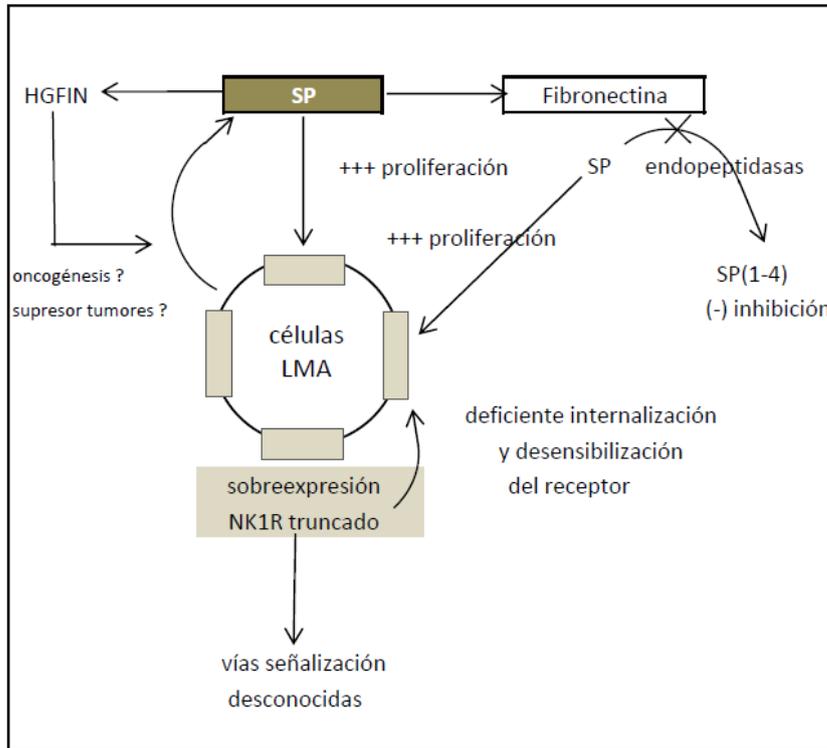


Figura 61: Vías alternativas para la SP en la MO cuando el NK1R está bloqueado. Esquema propuesto de la acción mitogénica de la SP sobre las células de LMA a través del receptor NK1R truncado sobreexpresado. En un estado patológico con sobreproducción de SP y/o bloqueo del NK1R, la SP podría unirse a fibronectina y/o HGFIN por su similitud estructural con NK1R.

Bloqueando el NK1R en pacientes con LMA y tal vez en ausencia de señalización de estos receptores estructuralmente similares, los niveles de citoquinas podrían disminuir y revertir la sobreexpresión de NK1R encontrada en nuestro estudio sobre LMA y retornar a un estado de balance homeostático NK1R-NK2R regulado por mecanismos internos medulares así como por el SNC como parte del eje neuro-inmune-hematológico.

G) EFECTO ANTITUMORAL DE FOSAPREPITANT EN MODELO ANIMAL

Los estudios de carcinogénesis con aprepitant y fosaprepitant en ratones y ratas (FDA) refieren que en ratones machos, aprepitant inducía un incremento de adenomas hepatocelulares y/o carcinomas con dosis de 1000-2000 mg/Kg/día y fibrosarcomas

cutáneos con 125-500 mg/Kg/día. En ratas macho se vió incrementado el riesgo de carcinoma tiroideo con dosis de 2000 mg/kg/día. En ratas hembras se observó aumento de adenomas hepatocelulares con dosis 10-2000 mg/kg/día y carcinoma hepatocelular y adenoma folicular de tiroides con 250-2000 mg/kg/día. Con respecto a los fibrosarcomas cutáneos se requieren dosis altas y prolongadas en el tiempo.

Extrapolando las concentraciones de aprepitant como agente antitumoral in vitro, la posible dosis para el tratamiento del cáncer sería mucho menor (40-50 mg/kg/día) que las dosis implicadas en carcinogénesis (125-1000 mg/kg/día).

Como se ha mencionado anteriormente, en modelos animales ya se ha documentado la acción antitumoral de los antagonistas de NK1R. Prasad demostró una regresión del volumen tumoral de cáncer primario de colon en ratones “nude” atímicos con antagonistas NK1R (Prasad, Mathur, Jaggi, Singh, & Mukherjee, 2007). Además, diversos estudios han mostrado un potencial efecto antitumoral de estos fármacos en diferentes tipos de neoplasias como carcinoma de pulmón (Seckl, Higgins, Widmer, & Rozengurt, 1997), cáncer de páncreas (Guha et al., 2005) o glioma (C. Palma et al., 2000).

Se ha demostrado que la administración subcutánea o intravenosa de antagonistas NK1R son efectivos en la prevención del crecimiento tumoral en cáncer de mama con la línea celular MDA-MB-231 con ratones “nude” (Bigioni et al., 2005) y posteriormente con las líneas de cáncer de mama MDA-MB-453 y MDA-MB-468 (García-Rocio et al., 2013) así como disminución del crecimiento tumoral in vivo con la línea U373 MG de glioma humano en ratones “nude” con el antagonista MEN 11467 (C. Palma et al., 2000).

En concreto con el antagonista NK1R aprepitant se ha demostrado una reducción del crecimiento tumoral en ratones nude xenoinjertados con la línea HuH6 de hepatoblastoma con dosis de 80 mg/kg/día de aprepitant via oral durante 24 días demostrando una disminución del volumen y peso tumoral, una disminución de los niveles séricos de alfa-fetoproteína y una reducción del número de células Ki-67 positivas indicando una menor tasa de crecimiento celular (M. Berger et al., 2014). Por otro lado, en este mismo trabajo estudiaron el efecto de aprepitant sobre la angiogénesis y encontraron que los animales tratados con aprepitant oral presentaban un número total de vesículas peritumorales de menor tamaño en hepatoblastoma en concordancia con los trabajos de Guha y colaboradores en cáncer de páncreas (Guha et al., 2005).

Así mismo M. Muñoz y colaboradores demostraron el efecto antitumoral *in vivo* en ratones nude xenoinjertados con la línea tumoral humana MG-63 con fosaprepitant a dosis de 80 mg/kg/día diario subcutáneo peritumoral durante 28 días (M Muñoz et al., 2014) y en tumor cerebral (disminución de volumen y proliferación celular) con el antagonista NK1R fosaprepitant (Harford-Wright, Lewis, Vink, & Ghabriel, 2014).

En contra de estos hallazgos de inhibición tumoral en modelos de ratón, encontramos el trabajo de Manske y colaboradores en un modelo murino de melanoma, aunque en este caso se añadió SP antes del desarrollo del tumor lo que podría haber tenido un efecto beneficioso previo (Manske & Hanson, 2005), y más reciente en modelo de ratón no encontraron efecto antitumoral en tumores cerebrales secundarios a cáncer de mama. En este último caso la metodología pudo ser insuficiente ya que usaron dosis de aprepitant administrado intravenoso en vez de oral durante tan sólo tres días (Lewis, Harford-Wright, Vink, & Ghabriel, 2013).

Todavía no se ha determinado cuál es el método o vía de administración óptima para estudiar el efecto de los antagonistas NK1R en modelos de ratón xenoinjertados ni si estos datos son extrapolables a humanos aunque en ratones se ha demostrado el efecto terapéutico antitumoral independientemente de la vía de administración. Nosotros hemos usado por primera vez la vía intraperitoneal para estudiar el efecto de fosaprepitant en modelos murinos xenoinjertados con líneas humanas tumorales. Previamente el grupo de García-Recio había usado esta vía en su modelo animal de cáncer de mama con el antagonista NK1R L-733,060 a dosis de 5 mg/kg 3 veces a la semana durante 42 días (García-Recio et al., 2013). Por tanto realizan un total de 18 inyecciones intraperitoneales que suponen un número equivalente a las inyecciones intraperitoneales diarias previstas en nuestro modelo de ratón estimando una supervivencia media de 14 días desde el inicio de infiltración leucémica en la MO para los ratones xenoinjertados con la línea HL-60 de LMA.

En nuestro modelo de ratón encontramos una tendencia a favor de los ratones tratados con fosaprepitant en la curva de supervivencia, aunque el tamaño muestral fue insuficiente para demostrar una diferencia estadísticamente significativa. Cabe destacar que el nivel de infiltración medular tras 3 semanas de espera hasta el aspirado de médula ósea ha sido mayor del esperado y la supervivencia total de los ratones, entre 3 y 10 días, menor del esperado por el estado avanzado de la leucemia en el momento del inicio de

tratamiento con fosaprepitant con una mediana de infiltración del 76% en MO. Estos datos nos permitirán optimizar el modelo in vivo con la línea leucémica HL-60 disminuyendo el tiempo desde la inoculación de las células HL-60 hasta el momento de confirmar la infiltración leucémica para permitirnos estudiar el avance de la enfermedad desde estadios más precoces que nos permitan evaluar de forma más eficaz las curvas de supervivencia para poder confirmar en estudios in vivo posteriores los resultados preliminares favorables presentados en este trabajo.

Por tanto, se necesita profundizar más en estudios in vivo con modelos animales antes del desarrollo de ensayos clínicos en humanos. No obstante, con los datos actuales el aprepitant y su profármaco el fosaprepitant parecen fármacos seguros y con un potencial efecto antitumoral en LMA que requiere de futuros modelos in vivo que lo confirmen. Así, a dosis más altas de las actualmente aprobadas por la FDA como antiemético, el aprepitant parece tener una actividad antitumoral en LMA e incluso podría plantearse su uso concomitante con quimioterápicos convencionales que podrían reducir la dosis necesaria de estos quimioterápicos.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1) Las células de LMA sobreexpresan NK1R y en concreto la isoforma truncada en comparación con células mononucleares de médula ósea y linfocitos de donante sano.

2) Tras la unión a NK1R, la SP exógena concentración dependiente (nM) induce la proliferación de células leucémicas de LMA.

3) Los antagonistas de NK1R (L-733,060, L-732,138, CP96-345 y Aprepitant) concentración dependiente (μM) inhiben la proliferación de las células de LMA.

4) Los antagonistas de NK1R concentración dependiente (μM) producen muerte celular por apoptosis en las líneas celulares de LMA.

5) Los antagonistas de NK1R ejercen su acción sobre la proliferación y la apoptosis en células de LMA independiente de su composición química, dicha función está ligada a la estereoquímica que tienen en común dichos compuestos.

6) El efecto antitumoral de los antagonistas de NK1R (L-733,060, L-732,138, CP96-345 y Aprepitant) en LMA es a través del NK1R.

7) El fármaco antagonista de NK1R aprepitant, no inhibe la proliferación de linfocitos normales in vitro, por lo que su efecto sobre las células de LMA no es consecuencia de una citotoxicidad inespecífica sobre las células del sistema hematopoyético sino específica sobre las células tumorales sugiriendo un rango de seguridad importante de aprepitant en humanos.

8) Las implicaciones del sistema SP/NK1R sobre células de LMA contribuyen a una mejor comprensión de la fisiopatología celular de la LMA.

9) Nuestros resultados in vitro identifican al receptor NK1R como una diana terapéutica prometedora en la LMA y los antagonistas de NK1R como una nueva generación de fármacos para el tratamiento de la LMA.

10) Existen datos preliminares in vivo alentadores con el uso de fosaprepitant en ratones xenoinjertados con LMA aunque se necesita profundizar más en estudios in vivo con modelos animales antes del desarrollo de ensayos clínicos en humanos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Advenier, C., Joos, G., Molimard, M., Lagente, V., & Pauwels, R. (1999). Role of tachykinins as contractile agonists of human airways in asthma. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 29(5), 579-584.
- Afan, A. M., Broome, C. S., Nicholls, S. E., Whetton, A. D., & Miyan, J. A. (1997). Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. *British Journal of Haematology*, 98(3), 569-577.
- Ahn, S., Shenoy, S. K., Wei, H., & Lefkowitz, R. J. (2004). Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35518-35525.
- Alberts, B. (2008). *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega.
- Aliakbari, J., Sreedharan, S. P., Turck, C. W., & Goetzl, E. J. (1987). Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148(3), 1440-1445.
- Allen, J. M., Hoyle, N. R., Yeats, J. C., Ghatei, M. A., Thomas, D. G., & Bloom, S. R. (1985). Neuropeptides in neurological tumours. *Journal of Neuro-Oncology*, 3(3), 197-202.
- Almeida, T. A., Rojo, J., Nieto, P. M., Pinto, F. M., Hernandez, M., Martín, J. D., & Candenás, M. L. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 11(15), 2045-2081.
- Anichini, M., Cesaretti, S., Lepori, M., Maddali Bonghi, S., Maresca, M., & Zoppi, M. (1997). Substance P in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Revue Du Rhumatisme (English Ed.)*, 64(1), 18-21.
- Antonio Martín-Araguz (Ed.). (2005). En *Arte y Neurología*. Madrid: Saned.
- Arai, A., Jin, A., Yan, W., Mizuchi, D., Yamamoto, K., Nanki, T., & Miura, O. (2005). SDF-1 synergistically enhances IL-3-induced activation of the Raf-1/MEK/Erk signaling pathway through activation of Rac and its effector Pak kinases to promote hematopoiesis and chemotaxis. *Cellular Signalling*, 17(4), 497-506.

<http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.09.007>

- Armendariz, H., Barbieri, M. A. F., Freigeiro, D., Lastiri, F., Felice, M. S., & Dibar, E. (2005). Treatment strategy and long-term results in pediatric patients treated in two consecutive AML-GATLA trials. *Leukemia*, *19*(12), 2139-2142.
- Armstrong, D. M., Pickel, V. M., Joh, T. H., Reis, D. J., & Miller, R. J. (1981). Immunocytochemical localization of catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptides in area postrema and medial nucleus tractus solitarius of rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *196*(3), 505-517.
- Augustyniak, D., Jankowski, A., Mackiewicz, P., Skowyrza, A., Gutowicz, J., & Drulis-Kawa, Z. (2012). Innate immune properties of selected human neuropeptides against *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Immunology*, *13*, 24.
- Baertschi, A. J., Zingg, H. H., & Dreifuss, J. J. (1981). Enkephalins, substance P, bradykinin and angiotensin II: differential sites of action on the hypothalamo-neurohypophysial system. *Brain Research*, *220*(1), 107-119.
- Baker, S. J., Morris, J. L., & Gibbins, I. L. (2003). Cloning of a C-terminally truncated NK-1 receptor from guinea-pig nervous system. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *111*(1-2), 136-147.
- Bandari, P. ., Qian, J., Oh, H. S., Potian, J. A., Yehia, G., Harrison, J. S., & Rameshwar, P. (2003). Crosstalk between neurokinin receptors is relevant to hematopoietic regulation: cloning and characterization of neurokinin-2 promoter. *Journal of Neuroimmunology*, *138*(1-2), 65-75.
- Bandari, P. S., Qian, J., Yehia, G., Joshi, D. D., Maloof, P. B., Potian, J., ... Rameshwar, P. (2003). Hematopoietic growth factor inducible neurokinin-1 type: a transmembrane protein that is similar to neurokinin 1 interacts with substance P. *Regulatory Peptides*, *111*(1-3), 169-178.
- Bandari, P. S., Qian, J., Yehia, G., Seegopaul, H. P., Harrison, J. S., Gascon, P., ... Rameshwar, P. (2002). Differences in the expression of neurokinin receptor in neural and bone marrow mesenchymal cells: implications for neuronal expansion from bone marrow cells. *Neuropeptides*, *36*(1), 13-21.
- Bang, R., Sass, G., Kiemer, A. K., Vollmar, A. M., Neuhuber, W. L., & Tiegs, G. (2003). Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from

- cytokine-mediated liver injury. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305(1), 31-39.
- Bardelli, C., Gunella, G., Varsaldi, F., Balbo, P., Del Boca, E., Bernardone, I. S., ... Brunelleschi, S. (2005). Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF-kappaB pathway. *British Journal of Pharmacology*, 145(3), 385-396.
- Bargmann W. (1968). *Neurohypophysial hormone and similar polypeptides*. (B. Berde, Ed.). Berlin: Springer.
- Barosi, G. (1999). Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(9), 2954-2970.
- Beaujouan, J. C., Saffroy, M., Torrens, Y., Sagan, S., & Glowinski, J. (1999). Pharmacological characterization of tachykinin septide-sensitive binding sites in the rat submaxillary gland. *Peptides*, 20(11), 1347-1352.
- Beaujouan, J.-C., Torrens, Y., Saffroy, M., Kemel, M.-L., & Glowinski, J. (2004). A 25 year adventure in the field of tachykinins. *Peptides*, 25(3), 339-357.
- Benuck, M., & Marks, N. (1975). Enzymatic inactivation of substance P by a partially purified enzyme from rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 65(1), 153-160.
- Berger, A., Tran, A. H., & Paige, C. J. (2007). Co-regulated decrease of Neurokinin-1 receptor and Hemokinin-1 gene expression in monocytes and macrophages after activation with pro-inflammatory cytokines. *Journal of Neuroimmunology*, 187(1-2), 83-93. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.04.019>
- Berger, M., Neth, O., Ilmer, M., Garnier, A., Salinas-Martín, M. V., de Agustín Asencio, J. C., ... Muñoz, M. (2014). Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *Journal of Hepatology*, 60(5), 985-994.
- Bergman, A. J., Marbury, T., Fosbinder, T., Swan, S., Hickey, L., Bradstreet, T. E., ... Majumdar, A. (2005). Effect of impaired renal function and haemodialysis on the pharmacokinetics of aprepitant. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(6), 637-647. <http://doi.org/10.2165/00003088-200544060-00005>

- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., & Robey, P. G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *19*(3), 180-192.
- Bigioni, M., Benzo, A., Irrissuto, C., Maggi, C. A., & Goso, C. (2005). Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anti-Cancer Drugs*, *16*(10), 1083-1089.
- Blanco Martinez B. (2012). *La SP y el RNK1 en la esclerosis mesial temporal*. Sevilla, Sevilla.
- Böckmann, S., Seep, J., & Jonas, L. (2001). Delay of neutrophil apoptosis by the neuropeptide substance P: involvement of caspase cascade. *Peptides*, *22*(4), 661-670.
- Böhm, S. K., Khitin, L. M., Smeekens, S. P., Grady, E. F., Payan, D. G., & Bunnett, N. W. (1997). Identification of potential tyrosine-containing endocytic motifs in the carboxyl-tail and seventh transmembrane domain of the neurokinin 1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(4), 2363-2372.
- Bondy, B., Baghai, T. C., Minov, C., Schüle, C., Schwarz, M. J., Zwanzger, P., ... Möller, H. J.ürgen. (2003). Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. *Biological Psychiatry*, *53*(6), 538-542.
- Brener, S., González-Moles, M. A., Tostes, D., Esteban, F., Gil-Montoya, J. A., Ruiz-Avila, I., ... Muñoz, M. (2009). A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, *29*(6), 2323-2329.
- Brown, E. R., Roth, K. A., & Krause, J. E. (1991). Sexually dimorphic distribution of substance P in specific anterior pituitary cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(4), 1222-1226.
- Büchner, T., Berdel, W. E., Haferlach, C., Haferlach, T., Schnittger, S., Müller-Tidow, C., ... Hiddemann, W. (2009). Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(1), 61-69. <http://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4245>
- Bünemann, M., & Hosey, M. M. (1999). G-protein coupled receptor kinases as

- modulators of G-protein signalling. *The Journal of Physiology*, 517 (Pt 1), 5-23.
- Burcher, E., Alouan, L. A., Johnson, P. R., & Black, J. L. (1991). Neuropeptide gamma, the most potent contractile tachykinin in human isolated bronchus, acts via a «non-classical» NK2 receptor. *Neuropeptides*, 20(2), 79-82.
- Byrd, J. C., Mrózek, K., Dodge, R. K., Carroll, A. J., Edwards, C. G., Arthur, D. C., ... Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). (2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, 100(13), 4325-4336.
- Caberlotto, L., Hurd, Y. L., Murdock, P., Wahlin, J. P., Melotto, S., Corsi, M., & Carletti, R. (2003). Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *The European Journal of Neuroscience*, 17(9), 1736-1746.
- Calvo, C. F., Chavanel, G., & Senik, A. (1992). Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 148(11), 3498-3504.
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2013). Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 368(22), 2059-2074.
- Cao, Y. Q., Mantyh, P. W., Carlson, E. J., Gillespie, A. M., Epstein, C. J., & Basbaum, A. I. (1998). Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, 392(6674), 390-394.
- Carlesso, N., & Cardoso, A. A. (2010). Stem cell regulatory niches and their role in normal and malignant hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 17(4), 281-286. <http://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833a25d8>
- Cascieri, M. A., Huang, R. R., Fong, T. M., Cheung, A. H., Sadowski, S., Ber, E., & Strader, C. D. (1992). Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Molecular Pharmacology*, 41(6), 1096-1099.
- Ceballos M. (1997). Péptidos neurotransmisores. En Andreu D & Rivas L (Eds.), *Péptidos en biología y biomedicina* (pp. 463-78). Madrid: Editorial CSIC - CSIC Press.

- Chang, M. M., Leeman, S. E., & Niall, H. D. (1971). Amino-acid sequence of substance P. *Nature: New Biology*, 232(29), 86-87.
- Chang, V. T., Yook, C., & Rameshwar, P. (2013). Synergism between fibronectin and transforming growth factor- β 1 in the production of substance P in monocytes of patients with myelofibrosis. *Leukemia & Lymphoma*, 54(3), 631-638.
- Chapman, R. W., Hey, J. A., McLeod, R., Minnicozzi, M., & Rizzo, C. (1998). Tachykinins in the lungs. *Drug News & Perspectives*, 11(8), 480-489.
- Chernova, I., Lai, J.-P., Li, H., Schwartz, L., Tuluc, F., Korchak, H. M., ... Kilpatrick, L. E. (2009). Substance P (SP) enhances CCL5-induced chemotaxis and intracellular signaling in human monocytes, which express the truncated neurokinin-1 receptor (NK1R). *Journal of Leukocyte Biology*, 85(1), 154-164. <http://doi.org/10.1189/jlb.0408260>
- Chizh, B. A., Göhring, M., Tröster, A., Quartey, G. K., Schmelz, M., & Koppert, W. (2007). Effects of oral pregabalin and aprepitant on pain and central sensitization in the electrical hyperalgesia model in human volunteers. *British Journal of Anaesthesia*, 98(2), 246-254. <http://doi.org/10.1093/bja/ael344>
- Choi, J. Y., Khansaheb, M., Joo, N. S., Krouse, M. E., Robbins, R. C., Weill, D., & Wine, J. J. (2009). Substance P stimulates human airway submucosal gland secretion mainly via a CFTR-dependent process. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1189-1200.
- Corcoran, K. E., Patel, N., & Rameshwar, P. (2007). Stromal derived growth factor-1 α : another mediator in neural-emerging immune system through Tac1 expression in bone marrow stromal cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(4), 2075-2082.
- Cordier, D., Gerber, A., Kluba, C., Bauman, A., Hutter, G., Mindt, T. L., & Mariani, L. (2014). Expression of different neurokinin-1 receptor (NK1R) isoforms in glioblastoma multiforme: potential implications for targeted therapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 29(5), 221-226. <http://doi.org/10.1089/cbr.2013.1588>
- Cottrell, G. S., Padilla, B. E., Amadesi, S., Poole, D. P., Murphy, J. E., Hardt, M., ... Bunnett, N. W. (2009). Endosomal endothelin-converting enzyme-1: a regulator of beta-arrestin-dependent ERK signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 22411-22425. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.026674>

- Creutzig, U., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Gibson, B., Dworzak, M. N., Adachi, S., de Bont, E., ... AML Committee of the International BFM Study Group. (2012). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood*, *120*(16), 3187-3205. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-03-362608>
- Creutzig, U., Zimmermann, M., Reinhardt, D., Dworzak, M., Stary, J., & Lehrnbecher, T. (2004). Early deaths and treatment-related mortality in children undergoing therapy for acute myeloid leukemia: analysis of the multicenter clinical trials AML-BFM 93 and AML-BFM 98. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *22*(21), 4384-4393. <http://doi.org/10.1200/JCO.2004.01.191>
- Creutzig, U., Zimmermann, M., Ritter, J., Reinhardt, D., Hermann, J., Henze, G., ... Schellong, G. (2005). Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia*, *19*(12), 2030-2042.
- Crome, S. Q., Wang, A. Y., & Levings, M. K. (2010). Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clinical and Experimental Immunology*, *159*(2), 109-119.
- Cunin, P., Caillon, A., Corvaisier, M., Garo, E., Scotet, M., Blanchard, S., ... Jeannin, P. (2011). The tachykinins substance P and hemokinin-1 favor the generation of human memory Th17 cells by inducing IL-1 β , IL-23, and TNF-like 1A expression by monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *186*(7), 4175-4182.
- DeFea, K. A., Vaughn, Z. D., O'Bryan, E. M., Nishijima, D., Déry, O., & Bunnett, N. W. (2000). The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(20), 11086-11091. <http://doi.org/10.1073/pnas.190276697>
- De Felipe, C., Herrero, J. F., O'Brien, J. A., Palmer, J. A., Doyle, C. A., Smith, A. J., ... Hunt, S. P. (1998). Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, *392*(6674), 394-397.
- De Giorgio, R., Tazzari, P. L., Barbara, G., Stanghellini, V., & Corinaldesi, R. (1998).

- Detection of substance P immunoreactivity in human peripheral leukocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 82(2), 175-181.
- Déry, O., Defea, K. A., & Bunnett, N. W. (2001). Protein kinase C-mediated desensitization of the neurokinin 1 receptor. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 280(5), C1097-1106.
- DeVane, C. L. (2001). Substance P: a new era, a new role. *Pharmacotherapy*, 21(9), 1061-1069.
- Dluzniewska, A., Balwierz, W., Armata, J., Balcerska, A., Chybicka, A., Kowalczyk, J., ... Wysocki, M. (2005). Twenty years of Polish experience with three consecutive protocols for treatment of childhood acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, 19(12), 2117-2124.
- Dobrescu, G. (1998). [Intercellular communication]. *Revista Medico-Chirurgicală a Societății De Medici Și Naturaliști Din Iași*, 102(3-4), 17-24.
- Döhner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., Burnett, A. K., ... European LeukemiaNet. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 115(3), 453-474. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>
- D'Orléans-Juste, P., Dion, S., Mizrahi, J., & Regoli, D. (1985). Effects of peptides and non-peptides on isolated arterial smooth muscles: role of endothelium. *European Journal of Pharmacology*, 114(1), 9-21.
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annual Review of Immunology*, 8, 111-137. <http://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.000551>
- Douglas, Ho, W. Z., Gettes, D. R., Cnaan, A., Zhao, H., Leserman, J., ... Evans, D. L. (2001). Elevated substance P levels in HIV-infected men. *AIDS (London, England)*, 15(15), 2043-2045.
- Douglas, (primero), Cnaan, A., Lynch, K. G., Benton, T., Zhao, H., Gettes, D. R., & Evans, D. L. (2008). Elevated substance P levels in HIV-infected women in comparison to HIV-negative women. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 24(3), 375-378.
- Dunzendorfer, S., Meierhofer, C., & Wiedermann, C. J. (1998). Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 64(6),

828-834.

- Eberlin, M., Mück, T., & Michel, M. C. (2012). A comprehensive review of the pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical effects of the neutral endopeptidase inhibitor racecadotril. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 93.
- Eglezos, A., Andrews, P. V., Boyd, R. L., & Helme, R. D. (1991). Modulation of the immune response by tachykinins. *Immunology and Cell Biology*, 69 (Pt 4), 285-294. <http://doi.org/10.1038/icb.1991.39>
- Ellis, J. L., & Udem, B. J. (1994). Pharmacology of non-adrenergic, non-cholinergic nerves in airway smooth muscle. *Pulmonary Pharmacology*, 7(4), 205-223.
- Ernst, O. P., & Bartl, F. J. (2002). Active states of rhodopsin. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 3(10), 968-974.
- Esteban, F., Gonzalez-Moles, M. A., Castro, D., Martin-Jaen, M. del M., Redondo, M., Ruiz-Avila, I., & Muñoz, M. (2009). Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*, 54(2), 258-260.
- Esteban, F., Muñoz, M., González-Moles, M. A., & Rosso, M. (2006). A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Reviews*, 25(1), 137-145. <http://doi.org/10.1007/s10555-006-8161-9>
- Evans, T. W., Dixon, C. M., Clarke, B., Conradson, T. B., & Barnes, P. J. (1988). Comparison of neurokinin A and substance P on cardiovascular and airway function in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 25(2), 273-275.
- Feistritzer, C., Clausen, J., Sturn, D. H., Djanani, A., Gunsilius, E., Wiedermann, C. J., & Kähler, C. M. (2003). Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regulatory Peptides*, 116(1-3), 119-126.
- Fernandez, H. F., Sun, Z., Yao, X., Litzow, M. R., Luger, S. M., Paietta, E. M., ... Tallman, M. S. (2009). Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 361(13), 1249-1259. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa0904544>
- Fiebich, B. L., Schleicher, S., Butcher, R. D., Craig, A., & Lieb, K. (2000). The neuropeptide substance P activates p38 mitogen-activated protein kinase resulting in IL-6 expression independently from NF-kappa B. *Journal of Immunology (Baltimore)*,

- Md.*: 1950), 165(10), 5606-5611.
- Fong, T. M., Anderson, S. A., Yu, H., Huang, R. R., & Strader, C. D. (1992). Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Molecular Pharmacology*, 41(1), 24-30.
- Forman, S. J., & Rowe, J. M. (2013). The myth of the second remission of acute leukemia in the adult. *Blood*, 121(7), 1077-1082. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-08-234492>
- Fowler, C. J., & Brännström, G. (1994). Substance P enhances forskolin-stimulated cyclic AMP production in human UC11MG astrocytoma cells. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 16(1), 21-28.
- Friess, H., Zhu, Z., Liard, V., Shi, X., Shrikhande, S. V., Wang, L., ... Büchler, M. W. (2003). Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 83(5), 731-742.
- Furness, J. B., Papka, R. E., Della, N. G., Costa, M., & Eskay, R. L. (1982). Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience*, 7(2), 447-459.
- Fuxe, K., Li, X. M., Bjelke, B., Hedlund, P. B., Biagini, G., & Agnati, L. F. (1994). Possible mechanisms for the powerful actions of neuropeptides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 739, 42-59.
- García-López, M. J., Martínez-Martos, J. M., Mayas, M. D., Carrera, M. P., & Ramírez-Expósito, M. J. (2002). [Physiology of the neuropeptides]. *Revista De Neurología*, 35(8), 784-793.
- García-Recio, S., Fuster, G., Fernández-Nogueira, P., Pastor-Arroyo, E. M., Park, S. Y., Mayordomo, C., ... Almendro, V. (2013). Substance P autocrine signaling contributes to persistent HER2 activation that drives malignant progression and drug resistance in breast cancer. *Cancer Research*, 73(21), 6424-6434. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4573>
- Gether, U., Johansen, T. E., Snider, R. M., Lowe, J. A., Nakanishi, S., & Schwartz, T. W. (1993). Different binding epitopes on the NK1 receptor for substance P and non-peptide antagonist. *Nature*, 362(6418), 345-348. <http://doi.org/10.1038/362345a0>

- Giardina, G. A. M., Gagliardi, S., & Martinelli, M. (2003). Antagonists at the neurokinin receptors--recent patent literature. *IDrugs: The Investigational Drugs Journal*, 6(8), 758-772.
- Gibson, B. E. S., Wheatley, K., Hann, I. M., Stevens, R. F., Webb, D., Hills, R. K., ... Harrison, C. J. (2005). Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia*, 19(12), 2130-2138.
- Gidron, Y., Perry, H., & Glennie, M. (2005). Does the vagus nerve inform the brain about preclinical tumours and modulate them? *The Lancet. Oncology*, 6(4), 245-248.
- Gillberg, P. G., Aquilonius, S. M., Eckernäs, S. A., Lundqvist, G., & Winblad, B. (1982). Choline acetyltransferase and substance P-like immuno-reactivity in the human spinal cord: changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research*, 250(2), 394-397.
- Gillespie, E., Leeman, S. E., Watts, L. A., Coukos, J. A., O'Brien, M. J., Cerda, S. R., ... Becker, J. M. (2011). Truncated neurokinin-1 receptor is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(42), 17420-17425.
- Gitter, B. D., Regoli, D., Howbert, J. J., Glasebrook, A. L., & Waters, D. C. (1994). Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. *Journal of Neuroimmunology*, 51(1), 101-108.
- González Moles, M. A., Esteban, F., Ruiz-Avila, I., Gil Montoya, J. A., Brener, S., Bascones-Martínez, A., & Muñoz, M. (2009). A role for the substance P/NK-1 receptor complex in cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus. *Oral Diseases*, 15(2), 162-169. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01504.x>
- Goto, T., & Tanaka, T. (2002). Tachykinins and tachykinin receptors in bone. *Microscopy Research and Technique*, 58(2), 91-97.
- Grady, E. F., Garland, A. M., Gamp, P. D., Lovett, M., Payan, D. G., & Bunnett, N. W. (1995). Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor. *Molecular Biology of the Cell*, 6(5), 509-524.
- Greco, S. J., Corcoran, K. E., Cho, K. J., & Rameshwar, P. (2004). Tachykinins in the emerging immune system: relevance to bone marrow homeostasis and maintenance of hematopoietic stem cells. *Frontiers in Bioscience: A Journal and*

- Virtual Library*, 9, 1782-1793.
- Grimwade, D., Hills, R. K., Moorman, A. V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A. H., ... National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, 116(3), 354-365.
- Groneberg, D. A., Quarcoo, D., Frossard, N., & Fischer, A. (2004). Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy*, 59(11), 1139-1152.
- Guard, S., & Watson, S. P. (1991). Tachykinin receptor types: Classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochemistry International*, 18(2), 149-165.
- Guha, S., Eibl, G., Kisfalvi, K., Fan, R. S., Burdick, M., Reber, H., ... Rozengurt, E. (2005). Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 65(7), 2738-2745. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3197>
- Guiard, B. P., Przybylski, C., Guilloux, J.-P., Seif, I., Froger, N., De Felipe, C., ... Gardier, A. M. (2004). Blockade of substance P (neurokinin 1) receptors enhances extracellular serotonin when combined with a selective serotonin reuptake inhibitor: an in vivo microdialysis study in mice. *Journal of Neurochemistry*, 89(1), 54-63.
- Hadley ME. (1997). Mecanismos generales de la acción hormonal. En Stumpf J (Ed.), *Endocrinología* (pp. 66-96). Madrid: Prentice Hall.
- Hallberg, M., & Nyberg, F. (2003). Neuropeptide conversion to bioactive fragments--an important pathway in neuromodulation. *Current Protein & Peptide Science*, 4(1), 31-44.
- Harford-Wright, E., Lewis, K. M., Vink, R., & Ghabriel, M. N. (2014). Evaluating the role of substance P in the growth of brain tumors. *Neuroscience*, 261, 85-94. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.12.027>
- Harrison, J. S., Corcoran, K. E., Joshi, D., Sophacelus, C., & Rameshwar, P. (2006). Peripheral monocytes and CD4+ cells are potential sources for increased

- circulating levels of TGF-beta and substance P in autoimmune myelofibrosis. *American Journal of Hematology*, 81(1), 51-58.
- Hastrup, H., & Schwartz, T. W. (1996). Septide and neurokinin A are high-affinity ligands on the NK-1 receptor: evidence from homologous versus heterologous binding analysis. *FEBS Letters*, 399(3), 264-266.
- Hattori, K., Heissig, B., & Rafii, S. (2003). The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1. *Leukemia & Lymphoma*, 44(4), 575-582. <http://doi.org/10.1080/1042819021000037985>
- Hennig, I. M., Laissue, J. A., Horisberger, U., & Reubi, J. C. (1995). Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 61(6), 786-792.
- Herpfer, I., & Lieb, K. (2003). Substance P and Substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 4(2), 56-63.
- Hershey, A. D., Dykema, P. E., & Krause, J. E. (1991). Organization, structure, and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(7), 4366-4374.
- Hershey, A. D., & Krause, J. E. (1990). Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4945), 958-962.
- Hill, R. (2000). NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(7), 244-246.
- Hökfelt, T., Broberger, C., Xu, Z. Q., Sergeev, V., Ubink, R., & Diez, M. (2000). Neuropeptides--an overview. *Neuropharmacology*, 39(8), 1337-1356.
- Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J. M., & Schultzberg, M. (1980). Peptidergic neurones. *Nature*, 284(5756), 515-521.
- Hökfelt, T., Pernow, B., & Wahren, J. (2001). Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *Journal of Internal Medicine*, 249(1), 27-40.
- Hökfelt, T., Vincent, S., Dalsgaard, C. J., Skirboll, L., Johansson, O., Schultzberg, M., ... Jancsó, G. (1982). Distribution of substance P in brain and periphery and its possible role as a co-transmitter. *Ciba Foundation Symposium*, (91), 84-106.

- Ho, Lai, J.-P., Li, Y., & Douglas, S. D. (2002). HIV enhances substance P expression in human immune cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(6), 616-618.
- Holzer, P., & Holzer-Petsche, U. (1997a). Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacology & Therapeutics*, 73(3), 173-217.
- Holzer, P., & Holzer-Petsche, U. (1997b). Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 73(3), 219-263.
- Ho, W. Z., Lai, J. P., Zhu, X. H., Uvaydova, M., & Douglas, S. D. (1997). Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(11), 5654-5660.
- Huang, P.-Q., Liu, L.-X., Wei, B.-G., & Ruan, Y.-P. (2003). Asymmetric synthesis of (+)-L-733, 060 and (+)-CP-99, 994 based on a new chiral 3-piperidinol synthon. *Organic Letters*, 5(11), 1927-1929.
- Huang, W.-Q., Wang, J.-G., Chen, L., Wei, H.-J., & Chen, H. (2010). SR140333 counteracts NK-1 mediated cell proliferation in human breast cancer cell line T47D. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 29, 55. <http://doi.org/10.1186/1756-9966-29-55>
- Hwang, L., Leichter, R., Okamoto, A., Payan, D., Collins, S. M., & Bunnett, N. W. (1993). Downregulation of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in the inflamed rat intestine. *The American Journal of Physiology*, 264(4 Pt 1), G735-743.
- Ingi, T., Kitajima, Y., Minamitake, Y., & Nakanishi, S. (1991). Characterization of ligand-binding properties and selectivities of three rat tachykinin receptors by transfection and functional expression of their cloned cDNAs in mammalian cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259(3), 968-975.
- Janelins, B. M., Mathers, A. R., Tkacheva, O. A., Erdos, G., Shufesky, W. J., Morelli, A. E., & Larregina, A. T. (2009). Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood*, 113(13), 3017-3026.
- Jiang, Z., Dun, N. J., & Karczmar, A. G. (1982). Substance P: a putative sensory transmitter in mammalian autonomic ganglia. *Science (New York, N.Y.)*, 217(4561), 739-741.
- Jin, Y., Hong, H. S., & Son, Y. (2015). Substance P enhances mesenchymal stem cells-

- mediated immune modulation. *Cytokine*, 71(2), 145-153.
<http://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.003>
- Joos, G. F., Germonpré, P. R., & Pauwels, R. A. (2000). Role of tachykinins in asthma. *Allergy*, 55(4), 321-337.
- Jorgensen, R., Holliday, N. D., Hansen, J. L., Vrecl, M., Heding, A., Schwartz, T. W., & Elling, C. E. (2008). Characterization of G-protein coupled receptor kinase interaction with the neurokinin-1 receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Molecular Pharmacology*, 73(2), 349-358.
- Joshi, D. D., Dang, A., Yadav, P., Qian, J., Bandari, P. S., Chen, K., ... Rameshwar, P. (2001). Negative feedback on the effects of stem cell factor on hematopoiesis is partly mediated through neutral endopeptidase activity on substance P: a combined functional and proteomic study. *Blood*, 98(9), 2697-2706.
- Juliusson, G., Antunovic, P., Derolf, A., Lehmann, S., Möllgård, L., Stockelberg, D., ... Höglund, M. (2009). Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 113(18), 4179-4187.
- Juliusson, G., Karlsson, K., Lazarevic, V. L., Wahlin, A., Brune, M., Antunovic, P., ... Swedish Acute Leukemia Registry Group, the Swedish Acute Myeloid Leukemia Group, the Swedish Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Group. (2011). Hematopoietic stem cell transplantation rates and long-term survival in acute myeloid and lymphoblastic leukemia: real-world population-based data from the Swedish Acute Leukemia Registry 1997-2006. *Cancer*, 117(18), 4238-4246.
<http://doi.org/10.1002/cncr.26033>
- Juliusson, G., Lazarevic, V., Hörstedt, A.-S., Hagberg, O., Höglund, M., & Swedish Acute Leukemia Registry Group. (2012). Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed. *Blood*, 119(17), 3890-3899.
<http://doi.org/10.1182/blood-2011-12-379008>
- Jurcic, J. G. (2012). What happened to anti-CD33 therapy for acute myeloid leukemia? *Current Hematologic Malignancy Reports*, 7(1), 65-73.
<http://doi.org/10.1007/s11899-011-0103-0>
- Kang, B. N., Jeong, K. S., Park, S. J., Kim, S. J., Kim, T. H., Kim, H. J., & Ryu, S. Y. (2001). Regulation of apoptosis by somatostatin and substance P in peritoneal

- macrophages. *Regulatory Peptides*, 101(1-3), 43-49.
- Kang, H. S., Trzaska, K. A., Corcoran, K., Chang, V. T., & Rameshwar, P. (2004). Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 52(5), 338-347.
- Kardos, G., Zwaan, C. M., Kaspers, G. J. L., de-Graaf, S. S. N., de Bont, E. S. J. M., Postma, A., ... Hählen, K. (2005). Treatment strategy and results in children treated on three Dutch Childhood Oncology Group acute myeloid leukemia trials. *Leukemia*, 19(12), 2063-2071.
- Kaspers, G. J. L., & Zwaan, C. M. (2007). Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica*, 92(11), 1519-1532.
- Kast, R. E. (2009). Why cerebellar glioblastoma is rare and how that indicates adjunctive use of the FDA-approved anti-emetic aprepitant might retard cerebral glioblastoma growth: a new hypothesis to an old question. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 11(7), 408-410.
- Kavelaars, A., Broeke, D., Jeurissen, F., Kardux, J., Meijer, A., Franklin, R., ... Heijnen, C. J. (1994). Activation of human monocytes via a non-neurokinin substance P receptor that is coupled to Gi protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 153(8), 3691-3699.
- Kavelaars, A., Jeurissen, F., & Heijnen, C. J. (1994). Substance P receptors and signal transduction in leukocytes. *ImmunoMethods*, 5(1), 41-48.
- Khare, V. K., Albino, A. P., & Reed, J. A. (1998). The neuropeptide/mast cell secretagogue substance P is expressed in cutaneous melanocytic lesions. *Journal of Cutaneous Pathology*, 25(1), 2-10.
- Kitchens, C., McDonald, Pollack, Wipf, & Lazo. (2009). Synergy between microtubule destabilizing agents and neurokinin 1 receptor antagonists identified by an siRNA synthetic lethal screen, 23, 756.13.
- Klassert, T. E., Patel, S. A., & Rameshwar, P. (2010). Tachykinins and Neurokinin Receptors in Bone Marrow Functions: Neural-Hematopoietic Link. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, 2010(3), 51-61.

- Kowall, N. W., Quigley, B. J., Krause, J. E., Lu, F., Kosofsky, B. E., & Ferrante, R. J. (1993). Substance P and substance P receptor histochemistry in human neurodegenerative diseases. *Regulatory Peptides*, *46*(1-2), 174-185.
- Kramer, M. S., Cutler, N., Feighner, J., Shrivastava, R., Carman, J., Sramek, J. J., ... Rupniak, N. M. (1998). Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science (New York, N.Y.)*, *281*(5383), 1640-1645.
- Krause, J. E., Bu, J. Y., Takeda, Y., Blount, P., Raddatz, R., Sachais, B. S., ... DiMaggio, D. (1993). Structure, expression and second messenger-mediated regulation of the human and rat substance P receptors and their genes. *Regulatory Peptides*, *46*(1-2), 59-66.
- Krause, J. E., Takeda, Y., & Hershey, A. D. (1992). Structure, functions, and mechanisms of substance P receptor action. *The Journal of Investigative Dermatology*, *98*(6 Suppl), 2S-7S.
- Kulka, M., Sheen, C. H., Tancowny, B. P., Grammer, L. C., & Schleimer, R. P. (2008). Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*, *123*(3), 398-410. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02705.x>
- Kurosawa, S., Yamaguchi, T., Miyawaki, S., Uchida, N., Sakura, T., Kanamori, H., ... Fukuda, T. (2010). Prognostic factors and outcomes of adult patients with acute myeloid leukemia after first relapse. *Haematologica*, *95*(11), 1857-1864.
- Kurtz, M. M., Wang, R., Clements, M. K., Cascieri, M. A., Austin, C. P., Cunningham, B. R., ... Liu, Q. (2002). Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*, *296*(1-2), 205-212.
- Lai, J. P., Douglas, S. D., Rappaport, E., Wu, J. M., & Ho, W. Z. (1998). Identification of a delta isoform of preprotachykinin mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, *91*(1-2), 121-128.
- Lai, J.-P., Ho, W. Z., Kilpatrick, L. E., Wang, X., Tuluc, F., Korchak, H. M., & Douglas, S. D. (2006). Full-length and truncated neurokinin-1 receptor expression and function during monocyte/macrophage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(20), 7771-7776.
- Lai, J.-P., Lai, S., Tuluc, F., Tansky, M. F., Kilpatrick, L. E., Leeman, S. E., & Douglas, S. D. (2008). Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional

- properties of neurokinin-1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12605-12610.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0806632105>
- Lambrecht, B. N. (2001). Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respiratory Research*, 2(3), 133-138.
- Lambrecht, B. N., Germonpré, P. R., Everaert, E. G., Carro-Muino, I., De Veerman, M., de Felipe, C., ... Pauwels, R. A. (1999). Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. *European Journal of Immunology*, 29(12), 3815-3825.
[http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199912\)29:12<3815::AID-IMMU3815>3.0.CO;2-#](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199912)29:12<3815::AID-IMMU3815>3.0.CO;2-#)
- Lang, K., Drell, T. L., Niggemann, B., Zänker, K. S., & Entschladen, F. (2003). Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells. *Immunology Letters*, 90(2-3), 165-172.
- Lapidot, T., Dar, A., & Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood*, 106(6), 1901-1910.
- Lapteva, N., Yang, A.-G., Sanders, D. E., Strube, R. W., & Chen, S.-Y. (2005). CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer Gene Therapy*, 12(1), 84-89.
- Lecat, S., Bucher, B., Mely, Y., & Galzi, J.-L. (2002). Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signaling but preserve intracellular calcium responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42034-42048.
- Lecci, A., & Maggi, C. A. (2003). Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 7(3), 343-362.
- Lee, C. M., Campbell, N. J., Williams, B. J., & Iversen, L. L. (1986). Multiple tachykinin binding sites in peripheral tissues and in brain. *European Journal of Pharmacology*, 130(3), 209-217.
- Lembeck, F. (1953). [Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord]. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 219(3), 197-213.

- Leopold, L. H., & Willemze, R. (2002). The treatment of acute myeloid leukemia in first relapse: a comprehensive review of the literature. *Leukemia & Lymphoma*, *43*(9), 1715-1727.
- Lewis, K. M., Harford-Wright, E., Vink, R., & Ghabriel, M. N. (2013). NK1 receptor antagonists and dexamethasone as anticancer agents in vitro and in a model of brain tumours secondary to breast cancer. *Anti-Cancer Drugs*, *24*(4), 344-354. <http://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32835ef440>
- Lieb, Ahlvers, K., Dancker, K., Strohmusch, S., Reincke, M., Feige, B., ... Voderholzer, U. (2002). Effects of the neuropeptide substance P on sleep, mood, and neuroendocrine measures in healthy young men. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *27*(6), 1041-1049.
- Lieb, K., Fiebich, B. L., Berger, M., Bauer, J., & Schulze-Osthoff, K. (1997). The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *159*(10), 4952-4958.
- Lie, S. O., Abrahamsson, J., Clausen, N., Forestier, E., Hasle, H., Hovi, L., ... AML Study Group. (2005). Long-term results in children with AML: NOPHO-AML Study Group--report of three consecutive trials. *Leukemia*, *19*(12), 2090-2100.
- Li, H., Leeman, S. E., Slack, B. E., Hauser, G., Saltsman, W. S., Krause, J. E., ... Boyd, N. D. (1997). A substance P (neurokinin-1) receptor mutant carboxyl-terminally truncated to resemble a naturally occurring receptor isoform displays enhanced responsiveness and resistance to desensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(17), 9475-9480.
- Lim, R., Morrill, J. M., Prushik, S. G., Reed, K. L., Gower, A. C., Leeman, S. E., ... Becker, J. M. (2008). An FDA Approved Neurokinin-1 Receptor Antagonist is Effective in Reducing Intraabdominal Adhesions when Administered Intraperitoneally, But Not Orally. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, *12*(10), 1754-1761. <http://doi.org/10.1007/s11605-008-0634-4>
- Li, M., & Shang, Y. (2012). Inhaled corticosteroids inhibit substance P receptor expression in asthmatic rat airway smooth muscle cells. *BMC Pulmonary Medicine*, *12*, 79.
- Linnik, M. D., & Moskowitz, M. A. (1989). Identification of immunoreactive substance P

- in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides*, 10(5), 957-962.
- Liu, K., Castillo, M. D., Murthy, R. G., Patel, N., & Rameshwar, P. (2007). Tachykinins and hematopoiesis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 385(1-2), 28-34.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lloyds, D., & Hallett, M. B. (1993). Activation and priming of the human neutrophil oxidase response by substance P: distinct signal transduction pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1175(2), 207-213.
- Lotz, M., Carson, D. A., & Vaughan, J. H. (1987). Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4791), 893-895.
- Lotz, M., Vaughan, J. H., & Carson, D. A. (1988). Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4870), 1218-1221.
- Lucey, D. R., Novak, J. M., Polonis, V. R., Liu, Y., & Gartner, S. (1994). Characterization of substance P binding to human monocytes/macrophages. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1(3), 330-335.
- Luc, S., Buza-Vidas, N., & Jacobsen, S. E. W. (2008). Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment. *Seminars in Immunology*, 20(4), 213-220.
- Luo, W., Sharif, T. R., & Sharif, M. (1996). Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Research*, 56(21), 4983-4991.
- Maggi, C. A. (1995). The mammalian tachykinin receptors. *General Pharmacology*, 26(5), 911-944.
- Maggi, C. A. (1997). The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regulatory Peptides*, 70(2-3), 75-90.
- Maggi, C. A., Patacchini, R., Rovero, P., & Giachetti, A. (1993). Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 13(1), 23-93.
- Maghni, K., Michoud, M.-C., Alles, M., Rubin, A., Govindaraju, V., Meloche, C., & Martin,

- J. G. (2003). Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 28(1), 103-110.
- Manak, Moshkoff, D. A., Nguyen, L. T., Meshki, J., Tebas, P., Tuluc, F., & Douglas, S. D. (2010). Anti-HIV-1 activity of the neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant and synergistic interactions with other antiretrovirals. *AIDS (London, England)*, 24(18), 2789-2796.
- Manola, K. N. (2009). Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*, 83(5), 391-405. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01308.x>
- Manske, J. M., & Hanson, S. E. (2005). Substance-P-mediated immunomodulation of tumor growth in a murine model. *Neuroimmunomodulation*, 12(4), 201-210. <http://doi.org/10.1159/000085652>
- Mantyh, P. W. (2002). Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 63 Suppl 11, 6-10.
- Mantyh, P. W., DeMaster, E., Malhotra, A., Ghilardi, J. R., Rogers, S. D., Mantyh, C. R., ... Maggio, J. E. (1995). Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5217), 1629-1632.
- Mantyh, P. W., Hunt, S. P., & Maggio, J. E. (1984). Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand. *Brain Research*, 307(1-2), 147-165.
- Mantyh, P. W., Rogers, S. D., Ghilardi, J. R., Maggio, J. E., Mantyh, C. R., & Vigna, S. R. (1996). Differential expression of two isoforms of the neurokinin-1 (substance P) receptor in vivo. *Brain Research*, 719(1-2), 8-13.
- Martínez-Gómez, M. A. (2014). Physico-Chemical Stability of Mixtures of Fosaprepitant used in Clinical Practice. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 5(4). <http://doi.org/10.4172/2155-9872.1000197>
- Martin, F. C., Charles, A. C., Sanderson, M. J., & Merrill, J. E. (1992). Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Research*, 599(1), 13-18.

- Marzioni, D., Fiore, G., Giordano, A., Nabissi, M., Florio, P., Verdenelli, F., ... Castellucci, M. (2005). Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *90*(4), 2378-2383.
- Massot, O., Rousselle, J. C., Fillion, M. P., Grimaldi, B., Cloëz-Tayarani, I., Fugelli, A., ... Fillion, G. (1996). 5-hydroxytryptamine-moduline, a new endogenous cerebral peptide, controls the serotonergic activity via its specific interaction with 5-hydroxytryptamine_{1B/1D} receptors. *Molecular Pharmacology*, *50*(4), 752-762.
- Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M., & Nakanishi, S. (1987). cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature*, *329*(6142), 836-838.
- Mathers, A. R., Tkacheva, O. A., Janelsins, B. M., Shufesky, W. J., Morelli, A. E., & Larregina, A. T. (2007). In vivo signaling through the neurokinin 1 receptor favors transgene expression by Langerhans cells and promotes the generation of Th1- and Tc1-biased immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *178*(11), 7006-7017.
- Mayordomo, C., García-Recio, S., Ametller, E., Fernández-Nogueira, P., Pastor-Arroyo, E. M., Vinyals, L., ... Almendro, V. (2012). Targeting of substance P induces cancer cell death and decreases the steady state of EGFR and Her2. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(4), 1358-1366.
- Mazzone, S. B. (2004). Sensory regulation of the cough reflex. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, *17*(6), 361-368.
- McGillis, J. P., Mitsuhashi, M., & Payan, D. G. (1990). Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *594*, 85-94.
- McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., ... Foord, S. M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, *393*(6683), 333-339.
- Medrano, S., Gruenstein, E., & Dimlich, R. V. (1994). Substance P receptors on human astrocytoma cells are linked to glycogen breakdown. *Neuroscience Letters*, *167*(1-2), 14-18.
- Meng, F., DeMorrow, S., Venter, J., Frampton, G., Han, Y., Francis, H., ... Alpini, G. (2014). Overexpression of membrane metalloendopeptidase inhibits substance P

- stimulation of cholangiocarcinoma growth. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(9), G759-768.
<http://doi.org/10.1152/ajpgi.00018.2014>
- Mengis, C., Aebi, S., Tobler, A., Dähler, W., & Fey, M. F. (2003). Assessment of differences in patient populations selected for excluded from participation in clinical phase III acute myelogenous leukemia trials. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(21), 3933-3939.
- Menzin, J., Lang, K., Earle, C. C., Kerney, D., & Mallick, R. (2002). The outcomes and costs of acute myeloid leukemia among the elderly. *Archives of Internal Medicine*, 162(14), 1597-1603.
- Meshinchi, S., & Arceci, R. J. (2007). Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. *The Oncologist*, 12(3), 341-355.
- Meshki, J., Douglas, S. D., Lai, J.-P., Schwartz, L., Kilpatrick, L. E., & Tuluc, F. (2009). Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing in HEK293 cells through a Rho/Rho-associated coiled-coil kinase-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(14), 9280-9289.
- Metwali, A., Blum, A. M., Ferraris, L., Klein, J. S., Fiocchi, C., & Weinstock, J. V. (1994). Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. *Journal of Neuroimmunology*, 52(1), 69-78.
- Metz, R. L., Yehia, G., Fernandes, H., Donnelly, R. J., & Rameshwar, P. (2005). Cloning and characterization of the 5' flanking region of the HGFIN gene indicate a cooperative role among p53 and cytokine-mediated transcription factors: relevance to cell cycle regulation. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(2), 315-322.
- Moharita, A. L., Torga, M., Corcoran, K. E., Bryan, M., Patel, P. S., & Rameshwar, P. (2006). SDF-1alpha regulation in breast cancer cells contacting bone marrow stroma is critical for normal hematopoiesis. *Blood*, 108(10), 3245-3252.
<http://doi.org/10.1182/blood-2006-01-017459>
- Monaco-Shawver, L., Schwartz, L., Tuluc, F., Guo, C.-J., Lai, J. P., Gunnam, S. M., ... Orange, J. S. (2011). Substance P inhibits natural killer cell cytotoxicity through the neurokinin-1 receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 113-125.
- Moore, C. A. C., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual Review of Physiology*, 69, 451-482.

- Moore, J. O., George, S. L., Dodge, R. K., Amrein, P. C., Powell, B. L., Kolitz, J. E., ... Schiffer, C. A. (2005). Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as postremission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222. *Blood*, *105*(9), 3420-3427. <http://doi.org/10.1182/blood-2004-08-2977>
- Mravec, B., Gidron, Y., Kukanova, B., Bizik, J., Kiss, A., & Hulin, I. (2006). Neural-endocrine-immune complex in the central modulation of tumorigenesis: facts, assumptions, and hypotheses. *Journal of Neuroimmunology*, *180*(1-2), 104-116.
- Mukerji, I., Ramkissoon, S. H., Reddy, K. K. R., & Rameshwar, P. (2005). Autocrine proliferation of neuroblastoma cells is partly mediated through neurokinin receptors: relevance to bone marrow metastasis. *Journal of Neuro-Oncology*, *71*(2), 91-98. <http://doi.org/10.1007/s11060-004-9182-2>
- Müller-Sieburg, C. E., & Deryugina, E. (1995). The stromal cells' guide to the stem cell universe. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *13*(5), 477-486.
- Muñoz, Covenas, R., Esteban, F., & Redondo, M. (2015). The substance P/NK-1 receptor system: NK-1 receptor antagonists as anti-cancer drugs. *Journal of Biosciences*, *40*(2), 441-463.
- Muñoz, González-Ortega, A., Rosso, M., Robles-Frias, M. J., Carranza, A., Salinas-Martín, M. V., & Coveñas, R. (2012). The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists. *Peptides*, *38*(2), 318-325.
- Muñoz, M., Berger, M., Rosso, M., Gonzalez-Ortega, A., Carranza, A., & Coveñas, R. (2014). Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *International Journal of Oncology*, *44*(1), 137-146.
- Muñoz, M., & Coveñas, R. (2013). Involvement of substance P and the NK-1 receptor in cancer progression. *Peptides*, *48*, 1-9.
- Muñoz, M., & Coveñas, R. (2014). Involvement of substance P and the NK-1 receptor in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *20*(9), 2321-2334.
- Muñoz, M., González-Ortega, A., & Coveñas, R. (2012). The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Investigational New Drugs*, *30*(2), 529-540.

- Muñoz, M., González-Ortega, A., Salinas-Martín, M. V., Carranza, A., Garcia-Recio, S., Almendro, V., & Coveñas, R. (2014). The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant is a promising candidate for the treatment of breast cancer. *International Journal of Oncology*, *45*(4), 1658-1672. <http://doi.org/10.3892/ijo.2014.2565>
- Muñoz, M., Pavón, A., Rosso, M., Salinas, M. V., Pérez, A., Carranza, A., & González-Ortega, A. (2010). Immunolocalization of NK-1 receptor and Substance P in human normal placenta. *Placenta*, *31*(7), 649-651.
- Muñoz, M., Pérez, A., Coveñas, R., Rosso, M., & Castro, E. (2004). Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Archives Italiennes De Biologie*, *142*(2), 105-112.
- Muñoz, M., Pérez, A., Rosso, M., Zamarriego, C., & Rosso, R. (2004). Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Research*, *14*(3), 183-188.
- Muñoz, M., Recio, S., Rosso, M., Redondo, M., & Covenas, R. (2015). The antiproliferative action of [D-Arg(1), D-Phe(5), D-Trp(7,9), LEU(11)] substance P analogue antagonist against small-cell- and non-small-cell lung cancer cells could be due to the pharmacological profile of its tachykinin receptor antagonist. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, *66*(3), 421-426.
- Muñoz, M., & Rosso, M. (2010). The NK-1 receptor antagonist aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Investigational New Drugs*, *28*(2), 187-193.
- Muñoz, M., Rosso, M., Aguilar, F. J., González-Moles, M. A., Redondo, M., & Esteban, F. (2008). NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEp-2. *Investigational New Drugs*, *26*(2), 111-118.
- Muñoz, M., Rosso, M., & Coveñas, R. (2010). A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Current Medicinal Chemistry*, *17*(6), 504-516.
- Muñoz, M., Rosso, M., & Coveñas, R. (2011). The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Current Drug Targets*, *12*(6), 909-921.
- Muñoz, M., Rosso, M., Coveñas, R., Montero, I., González-Moles, M. A., & Robles, M. J. (2007). Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines:

- antitumor action of its antagonist, L-732,138. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(6), 2775-2781.
- Muñoz, M., Rosso, M., Pérez, A., Coveñas, R., Rosso, R., Zamarriego, C., ... Montero, I. (2005). Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of substance P on human retinoblastoma cell lines. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(7), 2567-2570.
- Muñoz, M., Rosso, M., Pérez, A., Coveñas, R., Rosso, R., Zamarriego, C., & Piruat, J. I. (2005). The NK1 receptor is involved in the antitumoral action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides*, 39(4), 427-432.
- Muñoz, M., Rosso, M., Robles-Frias, M. J., Salinas-Martín, M. V., Rosso, R., González-Ortega, A., & Coveñas, R. (2010). The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 90(8), 1259-1269.
- Murphy, J. E., Padilla, B. E., Hasdemir, B., Cottrell, G. S., & Bunnett, N. W. (2009). Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 17615-17622.
- Nakagawa, N., Sano, H., & Iwamoto, I. (1995). Substance P induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 on vascular endothelial cells and enhances neutrophil transendothelial migration. *Peptides*, 16(4), 721-725.
- Nakanishi, S. (1991). Mammalian tachykinin receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 14, 123-136.
- Navari, R. M. (2007). Fosaprepitant (MK-0517): a neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(12), 1977-1985.
- Neumann, S., Doubell, T. P., Leslie, T., & Woolf, C. J. (1996). Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature*, 384(6607), 360-364.
- Niewerth, D., Creutzig, U., Bierings, M. B., & Kaspers, G. J. L. (2010). A review on allogeneic stem cell transplantation for newly diagnosed pediatric acute myeloid

- leukemia. *Blood*, 116(13), 2205-2214.
- Nilsson, J., von Euler, A. M., & Dalsgaard, C. J. (1985). Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature*, 315(6014), 61-63.
- Nowicki, & Miśkowiak, B. (2002). Comparison of the cell immunophenotype of metastatic and primary foci in stage IV-S neuroblastoma. *Folia Histochemica Et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 40(3), 297-303.
- Nowicki, Miśkowiak, B., & Ostalska-Nowicka, D. (2003). Detection of substance P and its mRNA in human blast cells in childhood lymphoblastic leukaemia using immunocytochemistry and in situ hybridisation. *Folia Histochemica Et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 41(1), 33-36.
- Nowicki, M., & Miśkowiak, B. (2003). Substance P--a potent risk factor in childhood lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 17(6), 1096-1099.
- Nowicki, M., Ostalska-Nowicka, D., Kondraciuk, B., & Miskowiak, B. (2007). The significance of substance P in physiological and malignant haematopoiesis. *Journal of Clinical Pathology*, 60(7), 749-755. <http://doi.org/10.1136/jcp.2006.041475>
- Nowicki, M., Ostalska-Nowicka, D., Konwerska, A., & Miskowiak, B. (2006). The predicting role of substance P in the neoplastic transformation of the hypoplastic bone marrow. *Journal of Clinical Pathology*, 59(9), 935-941.
- Nowicki, M., Ostalska-Nowicka, D., & Miskowiak, B. (2008). In vitro substance P-dependent induction of bone marrow cells in common (CD10) acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia Research*, 32(1), 97-102.
- O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., & Shanahan, F. (2004). The role of substance P in inflammatory disease. *Journal of Cellular Physiology*, 201(2), 167-180.
- Offermanns, & Rosenthal (Eds.). (2008). *Encyclopedia of Molecular Pharmacology / Springer* (2th ed.). Springer. Recuperado a partir de <http://product-page-live-online.live.cf.i.springer.com/gp/book/9783540389163>
- Okada, T., & Palczewski, K. (2001). Crystal structure of rhodopsin: implications for vision and beyond. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(4), 420-426.

- Organist, M. L., Harvey, J. P., McGillis, J. P., & Payan, D. G. (1988). Processing of the human IM-9 lymphoblast substance P receptor. Biosynthetic and degradation studies using a monoclonal anti-receptor antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *151*(1), 535-541.
- Pagel, J. M., Gooley, T. A., Rajendran, J., Fisher, D. R., Wilson, W. A., Sandmaier, B. M., ... Appelbaum, F. R. (2009). Allogeneic hematopoietic cell transplantation after conditioning with ¹³¹I-anti-CD45 antibody plus fludarabine and low-dose total body irradiation for elderly patients with advanced acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*, *114*(27), 5444-5453. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-03-213298>
- Page, N. M. (2004). Hemokinins and endokinins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *61*(13), 1652-1663.
- Page, N. M., Bell, N. J., Gardiner, S. M., Manyonda, I. T., Brayley, K. J., Strange, P. G., & Lowry, P. J. (2003). Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(10), 6245-6250.
- Page, N. M., Woods, R. J., Gardiner, S. M., Lomthaisong, K., Gladwell, R. T., Butlin, D. J., ... Lowry, P. J. (2000). Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature*, *405*(6788), 797-800.
- Painter, R. G., Dukes, R., Sullivan, J., Carter, R., Erdös, E. G., & Johnson, A. R. (1988). Function of neutral endopeptidase on the cell membrane of human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(19), 9456-9461.
- Palanche, T., Ilien, B., Zoffmann, S., Reck, M. P., Bucher, B., Edelstein, S. J., & Galzi, J. L. (2001). The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(37), 34853-34861.
- Palma, C. (2006). Tachykinins and their receptors in human malignancies. *Current Drug Targets*, *7*(8), 1043-1052.
- Palma, C., Bigioni, M., Irrissuto, C., Nardelli, F., Maggi, C. A., & Manzini, S. (2000). Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *British Journal of Cancer*, *82*(2), 480-487.
- Parenti, C., Aricò, G., Ronsisvalle, G., & Scoto, G. M. (2012). Supraspinal injection of

- Substance P attenuates allodynia and hyperalgesia in a rat model of inflammatory pain. *Peptides*, 34(2), 412-418.
- Park, S.-W., Yan, Y.-P., Satriotomo, I., Vemuganti, R., & Dempsey, R. J. (2007). Substance P is a promoter of adult neural progenitor cell proliferation under normal and ischemic conditions. *Journal of Neurosurgery*, 107(3), 593-599.
- Pascual, D. W., & Bost, K. L. (1990). Substance P production by P388D1 macrophages: a possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology*, 71(1), 52-56.
- Pascual, D. W., Bost, K. L., Xu-Amano, J., Kiyono, H., & McGhee, J. R. (1992). The cytokine-like action of substance P upon B cell differentiation. *Regional Immunology*, 4(2), 100-104.
- Patacchini, Lecci, A., Holzer, P., & Maggi, C. A. (2004). Newly discovered tachykinins raise new questions about their peripheral roles and the tachykinin nomenclature. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(1), 1-3.
- Patacchini, R., & Maggi, C. A. (1995). Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie*, 329(1), 161-184.
- Patacchini, R., & Maggi, C. A. (2001). Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *European Journal of Pharmacology*, 429(1-3), 13-21.
- Patel, H. J., Ramkissoon, S. H., Patel, P. S., & Rameshwar, P. (2005). Transformation of breast cells by truncated neurokinin-1 receptor is secondary to activation by preprotachykinin-A peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48), 17436-17441. <http://doi.org/10.1073/pnas.0506351102>
- Patel, J. P., Gönen, M., Figueroa, M. E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., ... Levine, R. L. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 366(12), 1079-1089.
- Patel, N., Castillo, M., & Rameshwar, P. (2007). An in vitro method to study the effects of hematopoietic regulators during immune and blood cell development. *Biological Procedures Online*, 9, 56-64. <http://doi.org/10.1251/bpo133>
- Payan, D. G., Brewster, D. R., & Goetzl, E. J. (1983). Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 131(4), 1613-1615.
- Payan, D. G., McGillis, J. P., & Organist, M. L. (1986). Binding characteristics and affinity

- labeling of protein constituents of the human IM-9 lymphoblast receptor for substance P. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(30), 14321-14329.
- Pennefather, J. N., Lecci, A., Candenias, M. L., Patak, E., Pinto, F. M., & Maggi, C. A. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences*, 74(12), 1445-1463.
- Pernow, B. (1983). Substance P. *Pharmacological Reviews*, 35(2), 85-141.
- Pession, A., Rondelli, R., Basso, G., Rizzari, C., Testi, A. M., Fagioli, F., ... AML Strategy & Study Committee of the Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP). (2005). Treatment and long-term results in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP AML protocols. *Leukemia*, 19(12), 2043-2053.
- Petersdorf, S. H., Kopecky, K. J., Slovak, M., Willman, C., Nevill, T., Brandwein, J., ... Appelbaum, F. R. (2013). A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 121(24), 4854-4860. <http://doi.org/10.1182/blood-2013-01-466706>
- Piedimonte, G., Bertrand, C., Geppetti, P., Snider, R. M., Desai, M. C., & Nadel, J. A. (1993). A new NK1 receptor antagonist (CP-99,994) prevents the increase in tracheal vascular permeability produced by hypertonic saline. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 266(1), 270-273.
- Pinto, F. M., Almeida, T. A., Hernandez, M., Devillier, P., Advenier, C., & Candenias, M. L. (2004). mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *European Journal of Pharmacology*, 494(2-3), 233-239.
- Powell, D., Leeman, S., Tregear, G. W., Niall, H. D., & Potts, J. T. (1973). Radioimmunoassay for substance P. *Nature: New Biology*, 241(112), 252-254.
- Prasad, S., Mathur, A., Jaggi, M., Singh, A. T., & Mukherjee, R. (2007). Substance P analogs containing alpha,alpha-dialkylated amino acids with potent anticancer activity. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 13(8), 544-548. <http://doi.org/10.1002/psc.886>
- Puumala, S. E., Ross, J. A., Aplenc, R., & Spector, L. G. (2013). Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, 60(5), 728-733.
- Quinlan, K. L., Song, I. S., Bunnett, N. W., Letran, E., Steinhoff, M., Harten, B., ... Ansel, J.

- C. (1998). Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. *The American Journal of Physiology*, 275(6 Pt 1), C1580-1590.
- Rameshwar, P. (1997). Substance P: a regulatory neuropeptide for hematopoiesis and immune functions. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 85(2), 129-133.
- Rameshwar, P., Ganea, D., & Gascón, P. (1993). In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood*, 81(2), 391-398.
- Rameshwar, P., Ganea, D., & Gascón, P. (1994). Induction of IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by substance P in bone marrow cells is partially mediated through the release of IL-1 and IL-6. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 152(8), 4044-4054.
- Rameshwar, P., & Gascón, P. (1995). Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma: potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. *Blood*, 86(2), 482-490.
- Rameshwar, P., & Gascón, P. (1996). Induction of negative hematopoietic regulators by neurokinin-A in bone marrow stroma. *Blood*, 88(1), 98-106.
- Rameshwar, P., & Gascón, P. (1997). Hematopoietic modulation by the tachykinins. *Acta Haematologica*, 98(2), 59-64.
- Rameshwar, P., Gascon, P., Bandari, P. S., Joshi, D. D., Fernandes, A., & Dang, A. (2002). Structural similarity between the bone marrow extracellular matrix protein and neurokinin 1 could be the limiting factor in the hematopoietic effects of substance P. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(5), 475-481.
- Rameshwar, P., Gascon, P., & Ganea, D. (1993). Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 151(5), 2484-2496.
- Rameshwar, P., Joshi, D. D., Yadav, P., Qian, J., Gascon, P., Chang, V. T., ... Song, X. (2001). Mimicry between neurokinin-1 and fibronectin may explain the transport and stability of increased substance P immunoreactivity in patients with bone marrow fibrosis. *Blood*, 97(10), 3025-3031.
- Rameshwar, P., Oh, H. S., Yook, C., Gascon, P., & Chang, V. T. (2003). Substance p-fibronectin-cytokine interactions in myeloproliferative disorders with bone

- marrow fibrosis. *Acta Haematologica*, 109(1), 1-10.
- Rameshwar P, P., & Gascón P. (1994). Regulation of substance-P (SP)-like receptors in CD34+ cells by cytokines and neurotrophic factor, 1432, A248.
- Rameshwar, P., Poddar, A., & Gascón, P. (1997). Hematopoietic regulation mediated by interactions among the neurokinins and cytokines. *Leukemia & Lymphoma*, 28(1-2), 1-10.
- Ramkissoon, S. H., Patel, P. S., Taborga, M., & Rameshwar, P. (2007). Nuclear factor-kappaB is central to the expression of truncated neurokinin-1 receptor in breast cancer: implication for breast cancer cell quiescence within bone marrow stroma. *Cancer Research*, 67(4), 1653-1659. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3813>
- Rao, G., Patel, P. S., Idler, S. P., Maloof, P., Gascon, P., Potian, J. A., & Rameshwar, P. (2004). Facilitating role of preprotachykinin-I gene in the integration of breast cancer cells within the stromal compartment of the bone marrow: a model of early cancer progression. *Cancer Research*, 64(8), 2874-2881.
- Ravindranath, Y., Chang, M., Steuber, C. P., Becton, D., Dahl, G., Civin, C., ... Pediatric Oncology Group. (2005). Pediatric Oncology Group (POG) studies of acute myeloid leukemia (AML): a review of four consecutive childhood AML trials conducted between 1981 and 2000. *Leukemia*, 19(12), 2101-2116.
- Reddy, B. Y., Greco, S. J., Patel, P. S., Trzaska, K. A., & Rameshwar, P. (2009). RE-1-silencing transcription factor shows tumor-suppressor functions and negatively regulates the oncogenic TAC1 in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4408-4413.
- Reed-Hagen, A. E., Tsuchiya, M., Shimada, K., Wentland, J. A., & Obach, R. S. (1999). Pharmacokinetics of ezlopitant, a novel non-peptidic neurokinin-1 receptor antagonist in preclinical species and metabolite kinetics of the pharmacologically active metabolites. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 20(9), 429-439.
- Regoli, D., Boudon, A., & Fauchère, J. L. (1994). Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacological Reviews*, 46(4), 551-599.
- Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S., & D'Orléans-Juste, P. (1987). Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sciences*, 40(2), 109-117.
- Reilly, J. T., Nash, J. R., Mackie, M. J., & McVerry, B. A. (1985). Immuno-enzymatic

- detection of fibronectin in normal and pathological haematopoietic tissue. *British Journal of Haematology*, 59(3), 497-504.
- Reiter, E., & Lefkowitz, R. J. (2006). GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 17(4), 159-165.
- Ribeiro, R. C., Razzouk, B. I., Pounds, S., Hijiya, N., Pui, C.-H., & Rubnitz, J. E. (2005). Successive clinical trials for childhood acute myeloid leukemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. *Leukemia*, 19(12), 2125-2129.
- Richfield, E. K., Vonsattel, J.-P., MacDonald, M. E., Sun, Z., Deng, Y.-P. P., & Reiner, A. (2002). Selective loss of striatal preprotachykinin neurons in a phenocopy of Huntington's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 17(2), 327-332.
- Rich, J. N., Shi, Q., Hjelmeland, M., Cummings, T. J., Kuan, C.-T., Bigner, D. D., ... Wang, X.-F. (2003). Bone-related genes expressed in advanced malignancies induce invasion and metastasis in a genetically defined human cancer model. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 15951-15957. <http://doi.org/10.1074/jbc.M211498200>
- Rimón, R., Le Grevés, P., Nyberg, F., Heikkilä, L., Salmela, L., & Terenius, L. (1984). Elevation of substance P-like peptides in the CSF of psychiatric patients. *Biological Psychiatry*, 19(4), 509-516.
- Rosso, M., Muñoz, M., & Berger, M. (2012). The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 381434.
- Rosso, M., Robles-Frías, M. J., Coveñas, R., Salinas-Martín, M. V., & Muñoz, M. (2008). The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 29(4), 245-254.
- Rowe JM, Li X, Cassileth PA. (2005). Very poor survival of patients with AML who relapse after achieving a first complete remission: The Eastern Cooperative Oncology Group experience. *Blood*, 106, 162.

- Rowe, J. M., & Tallman, M. S. (2010). How I treat acute myeloid leukemia. *Blood*, *116*(17), 3147-3156. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-05-260117>
- Rubnitz, J. E., & Inaba, H. (2012). Childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, *159*(3), 259-276.
- Ruff, M. R., Wahl, S. M., & Pert, C. B. (1985). Substance P receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. *Peptides*, *6 Suppl 2*, 107-111.
- Rupniak, N. M., Carlson, E. C., Harrison, T., Oates, B., Seward, E., Owen, S., ... Wheeldon, A. (2000). Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology*, *39*(8), 1413-1421.
- Russell, I. J., Orr, M. D., Littman, B., Vipraio, G. A., Alboukrek, D., Michalek, J. E., ... MacKillip, F. (1994). Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, *37*(11), 1593-1601.
- San Miguel, J. F. S., Izquierdo, J. S. M., & Sánchez-Guijo, F. M. (2009). *Hematología : manual básico razonado*. Elsevier España.
- Santini, D., Vincenzi, B., Guida, F. M., Imperatori, M., Schiavon, G., Venditti, O., ... Tonini, G. (2012). Aprepitant for management of severe pruritus related to biological cancer treatments: a pilot study. *The Lancet. Oncology*, *13*(10), 1020-1024.
- Santoni, G., Amantini, C., Lucciarini, R., Pompei, P., Perfumi, M., Nabissi, M., ... Piccoli, M. (2002). Expression of substance P and its neurokinin-1 receptor on thymocytes: functional relevance in the regulation of thymocyte apoptosis and proliferation. *Neuroimmunomodulation*, *10*(4), 232-246.
- Schedlowski, M., Flüge, T., Richter, S., Tewes, U., Schmidt, R. E., & Wagner, T. O. (1995). Beta-endorphin, but not substance-P, is increased by acute stress in humans. *Psychoneuroendocrinology*, *20*(1), 103-110.
- Schmidlin, F., Roosterman, D., & Bunnett, N. W. (2003). The third intracellular loop and carboxyl tail of neurokinin 1 and 3 receptors determine interactions with beta-arrestins. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *285*(4), C945-958.
- Schratzberger, P., Reinisch, N., Prodinger, W. M., Kähler, C. M., Sitte, B. A., Bellmann, R., ... Wiedermann, C. J. (1997). Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *158*(8), 3895-3901.

- Schuback, H. L., Arceci, R. J., & Meshinchi, S. (2013). Somatic characterization of pediatric acute myeloid leukemia using next-generation sequencing. *Seminars in Hematology, 50*(4), 325-332.
- Schwartz, Spitsin, S. V., Meshki, J., Tuluc, F., Douglas, S. D., & Wolfe, J. H. (2013). Substance P enhances HIV-1 infection in human fetal brain cell cultures expressing full-length neurokinin-1 receptor. *Journal of Neurovirology, 19*(3), 219-227.
- Seckl, M. J., Higgins, T., Widmer, F., & Rozengurt, E. (1997). [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]substance P: a novel potent inhibitor of signal transduction and growth in vitro and in vivo in small cell lung cancer cells. *Cancer Research, 57*(1), 51-54.
- Seiffert, & Granstein, R. D. (2002). Neuropeptides and neuroendocrine hormones in ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *Methods (San Diego, Calif.), 28*(1), 97-103.
- Serra, M. C., Calzetti, F., Ceska, M., & Cassatella, M. A. (1994). Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology, 82*(1), 63-69.
- Severini, Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., & Erspamer, V. (2002). The tachykinin peptide family. *Pharmacological Reviews, 54*(2), 285-322.
- Shaik-Dasthagirisahab, Y. B., Varvara, G., Murmura, G., Saggini, A., Potalivo, G., Caraffa, A., ... Pandolfi, F. (2013). Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 26*(2), 327-335.
- Shimizu, Y., Matsuyama, H., Shiina, T., Takewaki, T., & Furness, J. B. (2008). Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 65*(2), 295-311.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians, 65*(1), 5-29. <http://doi.org/10.3322/caac.21254>
- Simeonidis, S., Castagliuolo, I., Pan, A., Liu, J., Wang, C.-C., Mykoniatis, A., ... Pothoulakis, C. (2003). Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF-kappa B site on its promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100*(5), 2957-

- 2962.
- Singh, D., Joshi, D. D., Hameed, M., Qian, J., Gascón, P., Maloof, P. B., ... Rameshwar, P. (2000). Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 388-393.
- Skidgel, R. A., Engelbrecht, S., Johnson, A. R., & Erdös, E. G. (1984). Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides*, 5(4), 769-776.
- Sonomura, T., Nakamura, K., Furuta, T., Hioki, H., Nishi, A., Yamanaka, A., ... Kaneko, T. (2007). Expression of D1 but not D2 dopamine receptors in striatal neurons producing neurokinin B in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 26(11), 3093-3103.
- Souza, D. G., Mendonça, V. A., de A Castro, M. S., Poole, S., & Teixeira, M. M. (2002). Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 135(2), 303-312.
- Speidel CC. (1922). Further comparative studies in other fishes of cell that are homologous to the large irregular glandular cells in the spinal cord of the skates, 34, 303.
- Steinhoff, M. S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., & Bunnett, N. W. (2014). Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiological Reviews*, 94(1), 265-301.
- Stenkamp, R. E., Teller, D. C., & Palczewski, K. (2002). Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 3(10), 963-967.
- Strand FL. (1999). Distribution and localization of neuropeptides. En Strand FL (Ed.), *Neuropeptides: regulators of physiological processes* (pp. 65-76). London: Bradford.
- Tallman, M. S., Gilliland, D. G., & Rowe, J. M. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, 106(4), 1154-1163. <http://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0178>

- Tanabe, T., Otani, H., Bao, L., Mikami, Y., Yasukura, T., Ninomiya, T., ... Inagaki, C. (1996). Intracellular signaling pathway of substance P-induced superoxide production in human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*, 299(1-3), 187-195.
- Tanaka, K., Masu, M., & Nakanishi, S. (1990). Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron*, 4(6), 847-854.
- Tansky, M. F., Pothoulakis, C., & Leeman, S. E. (2007). Functional consequences of alteration of N-linked glycosylation sites on the neurokinin 1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10691-10696. <http://doi.org/10.1073/pnas.0703394104>
- Tarkkanen, A., Tervo, T., Tervo, K., Eränkö, L., Eränkö, O., & Cuello, A. C. (1983). Substance P immunoreactivity in normal human retina and in retinoblastoma. *Ophthalmic Research*, 15(6), 300-306.
- Tattersall, F. D., Rycroft, W., Cumberbatch, M., Mason, G., Tye, S., Williamson, D. J., ... Hargreaves, R. J. (2000). The novel NK1 receptor antagonist MK-0869 (L-754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin-induced emesis in ferrets. *Neuropharmacology*, 39(4), 652-663.
- Tebas, P., Spitsin, S., Barrett, J. S., Tuluc, F., Elci, O., Korelitz, J. J., ... Douglas, S. D. (2015). Reduction of soluble CD163, substance P, programmed death 1 and inflammatory markers: phase 1B trial of aprepitant in HIV-1-infected adults. *AIDS (London, England)*, 29(8), 931-939. <http://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000638>
- Tortora GJ, & Derrickson B. (2009). *Principles of Anatomy and Physiology* (12th ed.). United States of America: John Wiley & Sons. Recuperado a partir de http://www.goodreads.com/work/best_book/2478404-principles-of-anatomy-and-physiology
- Tregear, G. W., Niall, H. D., Potts, J. T., Leeman, S. E., & Chang, M. M. (1971). Synthesis of substance P. *Nature: New Biology*, 232(29), 87-89.
- Tuluc, F., Meshki, J., Spitsin, S., & Douglas, S. D. (2014). HIV infection of macrophages is enhanced in the presence of increased expression of CD163 induced by substance P. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(1), 143-150.
- V Euler, U. S., & Gaddum, J. H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *The Journal of Physiology*, 72(1), 74-87.
- Villar, A. V., Goñi, F. M., Alonso, A., Jones, D. R., León, Y., & Varela-Nieto, I. (1998).

- Phospholipase cleavage of glycosylphosphatidylinositol reconstituted in liposomal membranes. *FEBS Letters*, 432(3), 150-154.
- Vishalakumar, S., Patel, H., Moharita, A. L., Harrison, J. S., & Rameshwar, P. (2006). The anti-proliferative effect of neurokinin-A on hematopoietic progenitor cells is partly mediated by p53 activating the 5' flanking region of neurokinin-2 receptor. *Cellular Signalling*, 18(4), 422-432.
- Wang, X., Douglas, S. D., Lai, J.-P., Tuluc, F., Tebas, P., & Ho, W.-Z. (2007). Neurokinin-1 receptor antagonist (aprepitant) inhibits drug-resistant HIV-1 infection of macrophages in vitro. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 2(1), 42-48. <http://doi.org/10.1007/s11481-006-9059-6>
- Wang, X., Douglas, S. D., Peng, J.-S., Zhou, D.-J., Wan, Q., & Ho, W.-Z. (2006). An in vitro model of morphine withdrawal manifests the enhancing effect on human immunodeficiency virus infection of human T lymphocytes through the induction of substance P. *The American Journal of Pathology*, 169(5), 1663-1670.
- Weinstock, J. V., Blum, A., Walder, J., & Walder, R. (1988). Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 141(3), 961-966.
- Weiss, D. W., Hirt, R., Tarcic, N., Berzon, Y., Ben-Zur, H., Breznitz, S., ... O'Dorisio, T. M. (1996). Studies in psychoneuroimmunology: psychological, immunological, and neuroendocrinological parameters in Israeli civilians during and after a period of Scud missile attacks. *Behavioral Medicine (Washington, D.C.)*, 22(1), 5-14.
- Weltgesundheitsorganisation, Swerdlow, S. H., & International Agency for Research on Cancer (Eds.). (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: [... reflects the views of a working group that convened for an Editorial and Consensus Conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, October 25 - 27, 2007]* (4. ed). Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer.
- Whittaker VP. (1984). What is Dale's principle? En Chan-Palay V & Palay SL (Eds.), *Coexistence of Neuroactive substances in neurons* (pp. 137-40). New York: Wiley.
- Woll, P. J. (1991). Neuropeptide growth factors and cancer. *British Journal of Cancer*, 63(3), 469-475.

- Yamazaki, K., & Allen, T. D. (1990). Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the «neuro-reticular complex». *The American Journal of Anatomy*, *187*(3), 261-276.
- Yaraee, R., Ebtekar, M., Ahmadiani, A., Sabahi, F., & Ghazanfari, T. (2007). The effect of substance P on nitric oxide production by HSV-1 infected macrophages. *International Immunopharmacology*, *7*(2), 135-139.
- Zee, E. D., Schomberg, S., & Carpenter, T. C. (2006). Hypoxia upregulates lung microvascular neurokinin-1 receptor expression. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *291*(1), L102-110.
- Zhang, Y., Lu, L., Furlonger, C., Wu, G. E., & Paige, C. J. (2000). Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nature Immunology*, *1*(5), 392-397.
- Zhang, Y., & Paige, C. J. (2003). T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. *Blood*, *102*(6), 2165-2172.
- Zhou, Q., & Nyberg, F. (2002). Injection of substance P (SP) N-terminal fragment SP(1-7) into the ventral tegmental area modulates the levels of nucleus accumbens dopamine and dihydroxyphenylacetic acid in male rats during morphine withdrawal. *Neuroscience Letters*, *320*(3), 117-120.
- Zhou, Y., Zhao, L., Xiong, T., Chen, X., Zhang, Y., Yu, M., ... Yao, Z. (2013). Roles of full-length and truncated neurokinin-1 receptors on tumor progression and distant metastasis in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *140*(1), 49-61. <http://doi.org/10.1007/s10549-013-2599-6>
- Ziche, M., Morbidelli, L., Pacini, M., Dolara, P., & Maggi, C. A. (1990). NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *British Journal of Pharmacology*, *100*(1), 11-14.
- Ziche, M., Morbidelli, L., Pacini, M., Geppetti, P., Alessandri, G., & Maggi, C. A. (1990). Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvascular Research*, *40*(2), 264-278.