

617300551  
011172307  
124069887

TD  
76



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, PEDIATRIA Y RADIOLOGIA

**“ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL ANTAGONISTA DE LOS  
RECEPTORES NK1, L-733,060 EN LA LINEA CELULAR DE  
NEUROBLASTOMA HUMANO SK-N-BE (2)”**

Tesis presentada por  
**DOÑA ELENA MARÍA CASTRO MÉNDEZ**  
para optar al grado de Doctor en Medicina

Sevilla, 2005



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE  
FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y RADIOLOGÍA  
Avda. Sánchez Pizjuán, 4  
41009 SEVILLA  
Teléfonos 954 55 17 75 - 76 - 78  
Fax 954 90 59 70

FD. 76

**MIGUEL MUÑOZ SAEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y ANA MARIA ALVAREZ SILVAN, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y RADIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**CERTIFICAN:**

Que bajo nuestra dirección el Licenciado en Medicina y Cirugía Dña Elena María Castro Méndez, ha realizado el trabajo titulado " Actividad antitumoral del antagonista de los receptores NK1, L-733,060 en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE(2)".

El trabajo reúne en nuestro criterio todas las características exigibles desde el punto legal y científico para que con su defensa pueda alcanzar el título de Doctor.

Sevilla a 15 de Junio de dos mil cinco

Fdo: Dr. Miguel Muñoz Sáez

Fdo: Prof. Ana María Álvarez Silván

Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología,  
Pediatría y Radiología

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
BIBLIOTECA  
CENTROS DE LA SALUD



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE  
FARMACOLOGIA, PEDIATRIA Y RADIOLOGIA  
Avda. Sánchez Pizjuán, 4  
41009 SEVILLA  
Teléfonos 954 55 17 75 - 76 - 78  
Fax 954 90 59 70

**Elena María Castro Méndez, licenciada en Medicina y  
Cirugía por la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado " Actividad antitumoral del antagonista de los receptores NK1, L-733,060 en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE(2)" ha sido realizado por mí para optar al grado de Doctor.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 032 número 538 del libro  
correspondiente.

Sevilla. 1-07-05

El Jefe del Departamento de Tesis

*Elena Méndez*

Sevilla a 15 de Junio de 2005

*Elena Castro Méndez*

Fdo: Elena María Castro Méndez



A Luis, luis y martín...el sitio de mi recreo



## **AGRADECIMIENTOS**

La finalización de este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y el esfuerzo de una serie de personas a las que quiero expresarles desde aquí mi agradecimiento más sincero:

Al Dr. Miguel Muñoz Sáez, que no solo me ha enseñado Medicina sino que me ha abierto las puertas del conocimiento científico. Su entusiasmo, dedicación, esfuerzo y constancia me alentaron desde el inicio, la elaboración hasta la culminación del trabajo.

A la Dra. Ana M<sup>a</sup> Álvarez Silván, por su colaboración y disposición en todo momento.

A Ana Pérez, Marisa Rosso, Carlota Rangel y a todos los que forman o han pertenecido al grupo de investigación, por su trabajo y apoyo durante todo este tiempo.

Al Dr. Javier Aznar y Miguel Arbolea que me permitieron trabajar en su laboratorio y me iniciaron pacientemente en la metodología del cultivo celular, elemento fundamental del estudio.

A Javier Sánchez García y el equipo técnico de la Unidad de Citogenética del H. Virgen del Rocío, especialmente a Ana y Tere, por su generosidad, profesionalidad y colaboración hasta el final.

A la Dra. Ana Fernández Palacín por su inestimable ayuda en el estudio estadístico.

Al Laboratorio de Medicina y Cirugía experimental, por su amabilidad y cooperación a lo largo de todo este tiempo.

A las doctoras M<sup>a</sup> Dolores García y Teresa Sáenz, profesoras de la Facultad de Farmacia por brindarme sus conocimientos y ofrecerme su lugar de trabajo de forma tan desinteresada.

A mis padres, por su inestimable ayuda y esfuerzo desde siempre.

A mis hermanos, familiares y amigos, que me han regalado su valioso tiempo y me alentaron en los momentos más difíciles, haciendo este proceso más llevadero.

# INDICE



<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	16
<b>I.1</b>	<b>Sobre el Cáncer en Pediatría</b>	17
I.1.1	Genética	17
I.1.2	Epidemiología	18
I.1.3	Etiología	22
I.1.4	Tratamiento	22
<b>I.2</b>	<b>Neuroblastoma</b>	23
I.2.1	Incidencia	24
I.2.2	Etiología	25
I.2.3	Histología	27
I.2.4	Genética	28
I.2.5	Clínica	30
I.2.6	Clasificación	31
I.2.7	Diagnóstico	32
I.2.8	Diagnóstico diferencial	33
I.2.9	Pronóstico	33
I.2.10	Tratamiento	34
I.2.11	Estrategias terapéuticas futuras	35
<b>I.3</b>	<b>Neuropéptidos</b>	37
I.3.1	Neurotransmisión	37
I.3.2	Coexistencia- Cotransmisión	40
I.3.3	Clasificación	42
<b>I.4</b>	<b>Taquicininas</b>	43
I.4.1	Estructura	43
I.4.2	Genética	43
I.4.3	Distribución	45
I.4.4	Receptores taquicinérgicos	45
	- Receptor NK1	48
<b>I.5</b>	<b>Sustancia P</b>	50
I.5.1	Datos históricos	50
I.5.2	Estructura y propiedades químicas	51
I.5.3	Distribución	52
I.5.4	Cotransmisión	54

	- SP y Catecolaminas	
	- SP y Acetilcolina	
	- SP y Serotonina	
	- SP y otros neuropéptidos	
I.5.5	Almacenamiento y Liberación .....	54
I.5.6	Metabolismo .....	55
I.5.7	Mecanismo de Acción .....	56
I.5.8	Propiedades .....	57
	a) SNC	
	b) Aparato Digestivo	
	c) Riñón y vías urinarias	
	d) Aparato Respiratorio	
	e) Sistema Circulatorio	
	f) Sistema visual	
	g) Cadena Ganglionar Simpática	
I.5.9	Fisiopatología .....	61
	- SP y Nocicepción	
	- SP e Inmunidad	
	- SP e Inflamación	
	- SP y Depresión	
	- SP y Cáncer	
I.6	<b>Antagonistas de la SP</b> .....	64
I.6.1	Clasificación .....	65
	- Antagonistas peptídicos	
	- Antagonistas no peptídicos	
I.6.2	Acciones .....	66
	- Nocicepción	
	- VIH	
	- Emesis postquimioterapia	
	- Depresión.Trastornos de ansiedad	
	- Patología intestinal	
	- Acción antitumoral	
	- SNC	

I.6.3	L-733,060 .....	68
<b>II.</b>	<b>HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL Y METODO.....</b>	<b>75</b>
<b>III.1</b>	<b>Cultivo celular .....</b>	<b>76</b>
III.1.1	Material.....	76
A)	Aparatos y material de cultivo celular.....	76
B)	Línea celular .....	77
C)	Medio de cultivo .....	79
III.1.2	Método.....	79
-	Normas generales de manipulación .....	79
-	Siembra de cultivo .....	80
-	Preparación de subcultivos .....	80
-	Congelación y descongelación celular .....	81
<b>III.2</b>	<b>Detección del receptor NK1 en la línea celular SK-N-BE (2)....</b>	<b>82</b>
-	Extracción y cuantificación de proteínas del cultivo celular .....	82
-	Detección de proteínas por Western Blot .....	84
<b>III.3</b>	<b>Determinación de la proliferación celular.....</b>	<b>84</b>
III.3.1	Material.....	84
III.3.2	Método.....	86
-	Descripción .....	86
-	Protocolo .....	87
-	Otros datos de interés.....	89
-	Análisis estadístico.....	90
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>92</b>
<b>IV.1</b>	<b>Resultados globales .....</b>	<b>93</b>
A.	Inhibición de L-733,060 sobre la línea celular SK-N-BE(2) .....	93
B.	Regresión y correlación .....	96

<b>IV.2 Estudio comparativo de los distintos grupos.....</b>	<b>98</b>
A. Inhibición de L-733,060 sobre la línea celular SK-N-BE(2) .....	98
B. Estudio comparativo del efecto inhibitorio de L-733,060 en T1 y T2.....	99
<b>IV.3 Estudio de competición de la SP y L-733,060 en la línea celular SK-N-BE(2) .....</b>	<b>99</b>
<b>IV.4 Microscopía óptica del efecto del antagonista RNK1 L-733,060 en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE(2).....</b>	<b>100</b>
<b>IV.5 Determinación de receptores NK1 en la línea celular SK-N-BE (2).....</b>	<b>102</b>
<b>V. DISCUSION.....</b>	<b>104</b>
<b>VI. RESUMEN.....</b>	<b>122</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>127</b>

#### **INDICE DE TABLAS**

- Tabla 1. Casos registrados por diagnóstico. Período 1980-1988 (RNTI)
- Tabla 2. Cáncer infantil en España. Incidencia 1980 – 1991
- Tabla 3. Distribución porcentual del Neuroblastoma por edades y sexo
- Tabla 4. Sistema Internacional de estadíos del Neuroblastoma
- Tabla 5. Clasificación Neuropeptidos
- Tabla 6. Estructura de las Taquicininas
- Tabla 7. Concentraciones regionales de Sustancia P
- Tabla 8. Características de la línea celular SK-N-BE (2)
- Tabla 9. Estadística inferencial: Comparación entre las dosis de L-733,060 y control en T1

- Tabla 10. Estadística inferencial: Comparación entre las dosis de L-733,060 y control en T2

## FIGURAS

- Figura 1. Porcentaje de distribución del cáncer en edad infantil (0-15 años)
- Figura 2. Pseudorrosetas de Homer- Wright
- Figura 3. Amplificación del oncogén n-myc
- Figura 4. Traslocación t (17;1)
- Figura 5. Esquema de la estructura de los genes humanos de las Taquicininas
- Figura 6. Disposición transmembrana de RNK1, RNK2 y RNK3
- Figura 7. Vista del RNK1 desde el exterior de la membrana celular
- Figura 8. Imagen tridimensional de la molécula SP
- Figura 9. Mecanismo de acción SP
- Figura 10. Estructura molecular de L-733,060
- Figura 11. Estructura de tetrazolium MTS y su derivado formazán
- Figura 12. Estadística descriptiva: Inhibición del crecimiento celular de L-733,060 en T1
- Figura 13. Estadística descriptiva: Inhibición del crecimiento celular de L-733,060 en T2
- Figura 14. Estadística descriptiva: Inhibición del crecimiento celular de L-733,060 en T1 y T2
- Figura 15. Gráfica de dispersión (T1)
- Figura 16. Gráfica de dispersión (T2)
- Figura 17. Efecto mitogénico de la SP y Estudio de competición de la SP y L-733,060 en la línea celular SK-N-BE(2)

- Figura 18. Crecimiento celular de la línea celular SK-N-BE (2) a las 30 horas (Muestra control). Microscopio óptico invertido con contraste de fase (x 40)
- Figura 19. Inhibición del crecimiento celular de la línea SK-N-BE (2) a las 30 horas, tras adición de L-733,060 (10  $\mu$ M). Microscopio óptico invertido con contraste de fase (x 40)
- Figura 20. Inhibición total del crecimiento celular en la línea SK-N-BE (2) a las 30 horas, tras adición de L-733,060 (20  $\mu$ M). Microscopio óptico invertido con contraste de fase (x 40)
- Figura 21. Isoformas del receptor NK1 en la línea celular SK-N-BE( 2)

## **GLOSARIO**

$\mu$ l: Microlitro  
 $\mu$ M: Micromolar  
ADN: Acido desoxirribonucleico  
ARNm: Acido ribonucleico mensajero  
BSA: Albúmina bovina  
CRF: Factor liberador de Corticotropina  
DE(50): Dosis efectiva 50  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
FISH: Hibridación in situ fluorescente  
GABA: Acido gamma-aminobutírico  
GnRH: Hormona liberadora de Gonadotrofinas  
GRP: Péptido liberador de Gastrina  
GTPasa: Guanosintrifosfatasa  
kDa: Kilodalton  
NB: Neuroblastoma  
NGF: Factor de crecimineto nervioso  
nm: Nanómetro  
nM: Nanomolar  
PBS: Buffer salino fosfato  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.  
Pmol/L: picomoles / litro  
PPT I: Gen Preprotaquicinina I  
PPT II: Gen Preprotaquicinina II  
PPT-I Péptidos: Péptidos codificados por el gen preprotaquicinina.  
Puentes S-S: puentes disulfuro  
PVDF: Polifluoruro de Vinilideno  
Receptor TRK: receptor del Factor de crecimiento nervioso  
RIA: radioinmuno ensayo  
RNK1: receptor neurokinina 1  
RNK2: receptor neurokinina 2



RNK3: receptor neurokinina 3

RNTI: Registro nacional de tumores infantiles

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa.

SCLC: Carcinoma de pulmón de células pequeñas (Small cell lung cancer)

SDS: dodecil sulfato de sodio

SEER program: Surveillance, Epidemiology, and End Results program.

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema nervioso periférico

TRH: Hormona liberadora de Tirotropina

TRKA: Gen del receptor del Factor de crecimiento nervioso

TRK: Receptor de Tirocinquinasa

VIP: Péptido Intestinal Vasoactivo

v/v: volumen por volumen

# **INTRODUCCION**

## **I.1 SOBRE EL CANCER EN PEDIATRÍA**

El cáncer en la infancia y adolescencia tienen rasgos diferenciales a los que encontramos en la edad adulta. Así hallamos características en la biología, histopatología, datos epidemiológicos, manifestaciones clínicas, respuesta al tratamiento y evolución, específicas de los tumores infantiles. Suelen tener periodos de latencia cortos, crecimiento rápido con invasión local o metástasis al diagnóstico; asientan en el sistema hematopoyético y en tejidos de origen mesenquimal como músculo y hueso, (Quesnel y Malkin, 1997), en los que la exposición a agentes cancerígenos no es tan intensa como ocurre en los tumores del adulto, donde ocupan un papel etiopatogénico destacado. En general responden mejor a las distintas modalidades de tratamiento y ello hace albergar ciertas expectativas de pronóstico y calidad de vida.

### **I.1.1 Genética**

Los tumores infantiles ocurren en un 85% de los casos de forma esporádica en familias con una baja incidencia de cáncer de adultos; el 15% restante pertenece a familias con antecedentes de neoplasias, o el niño presenta algún trastorno genético que predispone al desarrollo de determinados tipos de tumores (Li, 1988).

Los aspectos genéticos en el desarrollo del cáncer infantil han interesado especialmente en tanto que abren una posibilidad de diagnóstico precoz, además del seguimiento y vigilancia clínica en determinadas familias con enfermedades hereditarias o con cierta base genética ligadas a la aparición de tumores. Un ejemplo de ello es la aparición tardía de tumores del tubo digestivo en enfermedades como la Colitis Ulcerosa o la Enfermedad celíaca.

Por otro lado existe una interrelación muy importante entre el sistema inmune, la carcinogénesis y las alteraciones genéticas, como queda de manifiesto en Inmunodeficiencias hereditarias tales como la Enfermedad

linfoproliferativa ligada al X, Ataxia-telangiectasia y la enfermedad de Chediak-Higashi.

Hoy día se sabe que el genoma de la célula cancerosa es distinto al de la célula de origen; en su material genético podemos hallar multitud de aberraciones cromosómicas, que gracias a los avances en citogenética y biología molecular, se pueden determinar específicamente. Pueden portar en su ADN mutaciones puntuales, amplificación de genes, deleciones, inserciones virales, reordenamientos, los cuales pueden ocasionar una inestabilidad en el genoma que lleve a la célula a una posible transformación maligna.

No podemos dejar de mencionar aunque de forma breve, pues por su importancia y extensión desbordan el tema de este trabajo, el papel de los oncogenes y genes supresores en la producción del cáncer. Los primeros se activarían bien por una mutación, amplificación, incorporación de un retrovirus o reordenamiento de los cromosomas. Los genes supresores se inactivarían por mutaciones submicroscópicas, deleciones cromosómicas o pérdida de heterocigosidad. Cabe citar el Linfoma de Burkitt donde la traslocación recíproca entre los cromosomas 14 y 8, ó entre el 8 y 22, deja al protooncogén c-myc yuxtapuesto a la secuencia que codifica cadenas de inmunoglobulinas; de esta modo, los estímulos antigénicos que actúan en la producción de anticuerpos activan al protooncogén.

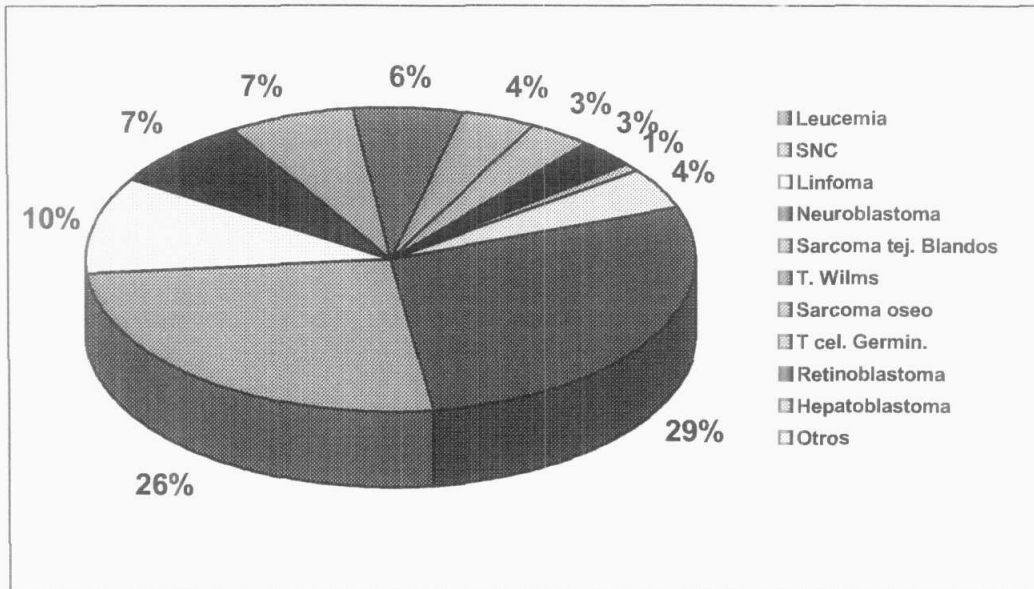
### **1.1.2 Epidemiología**

Los tumores malignos continúan siendo la primera causa de muerte por enfermedad entre 1 y 15 años de edad. Así, anualmente se producen unas 1.500 muertes relacionadas con el cáncer en los Estados Unidos. A pesar de ello, el cáncer se mantiene en niveles bajos de prevalencia en esta categoría de edad con un promedio de 1 a 2 de cada 1000 niños que desarrollan la enfermedad cada año en ese país; aproximadamente se estima que unos 8700 casos de cáncer son diagnosticados anualmente en niños con edad inferior a los 15 años.

La naturaleza, distribución y pronóstico de los mismos difiere de manera notable del cáncer en adultos. Entre los 12 tipos principales de cánceres de la niñez, las leucemias y tumores del sistema nervioso central (SNC) explican aproximadamente la mitad de los nuevos casos. El tipo más común de leucemia en niños es la leucemia linfoblástica aguda. Los tumores sólidos más frecuentes son los gliomas y los meduloblastomas; neuroblastoma, tumor de Wilms y rhabdomyosarcoma son menos comunes.

En el estudio epidemiológico realizado por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos se obtuvieron datos de incidencia relativamente estables entre los tumores infantiles en las dos últimas décadas, con incrementos puntuales en relación a avances en técnicas diagnósticas de imagen (Ries et al, 1999). La distribución de los tumores pediátricos según el Programa SEER es la indicada en la figura 1, (Linnet, 1999).

En las tres últimas décadas la incidencia de los niños diagnosticados con las formas de cáncer invasor ha experimentado un aumento importante. Así, en la población estadounidense, de una cifra de 11,4 por 100.000 niños en 1975 ha pasado a 15,2 por 100.000 niños en 1998. Sin embargo, durante este mismo tiempo, la tasa anual de mortalidad descendió en un 30% y la de supervivencia experimentó un ascenso para la mayoría de los cánceres de la niñez.



**Figura 1. Porcentaje de distribución del cáncer infantil 0-15 años, (National Cancer Institute, SEER Program)**

En nuestro país la prevalencia del cáncer se sitúa en el 3,6 % de la población general. España muestra unas características epidemiológicas similares a la de los países europeos desarrollados (Peris, 1997). Este perfil se ha mantenido constante y estable en los últimos 25 años, siendo claramente significativa la tendencia a la mejora en el pronóstico (Tabla 1 y 2).

La mortalidad infantil por cáncer en España ha disminuido un 36 % en el caso de los niños y un 45% en el de las niñas. A su vez, las tasas de supervivencia a los cinco años para todos los cánceres infantiles aumentaron del 55,7% en el período 1974-76 al 77,1% en 1992-97.

**Tabla 2. Cáncer infantil en España. Incidencia 1980 – 1991**

<b>Grandes grupos</b>	<b>Casos</b>	<b>Porcentaje</b>
Leucemias	2.415	23,3%
Linfomas	1.403	13,5%
T. Sistema nervioso	1.868	18%
<b>Neuroblastoma</b>	<b>1.081</b>	<b>10,4%</b>
T. Renales	663	6,4%
T. Hepáticos	110	1,1%
T. Óseos	804	7,8%
Sarcomas tej. blandos	768	7,4%
T. Germinales	311	3%
T. Epiteliales	201	1,9%
Retinoblastoma	280	2,7%
Otros	465	4,5%
<b>Total</b>	<b>10.369</b>	<b>100%</b>

<b>TASAS x 1.000.000 niños</b>	
Tasa cruda	132
Tasa ajustada (ASR)	141
<b>% PRINCIPALES GRUPOS</b>	
Leucemias	31 %
Sistema nervioso central	19 %
Linfomas	15 %
Sistema nervioso simpático	7 %

Fuente: International Incidence of Childhood Cancer. Lion, 1998

### **I.1.3 Etiología**

Las causas de cáncer en la infancia son en gran parte desconocidas. Algunas condiciones, tales como cromosomopatías u otras alteraciones cromosómicas y genéticas específicas, determinadas enfermedades inmunitarias y las exposiciones a radiación ionizante, explican un porcentaje pequeño de casos. Las causas ambientales (agentes físicos, químicos, microbianos) del cáncer en la niñez han sido sospechadas por muchos científicos aunque difíciles de concretar; en parte, por lo infrecuente del cáncer en la infancia y, por la dificultad de identificar niveles de exposición en niños en períodos potencialmente importantes tales como embarazo o incluso antes del momento de la fecundación. Además, cada uno de los distintos tipos de cánceres de la niñez puede potencialmente desarrollarse de forma diferente con una variedad amplia de causas y un curso clínico único en cuanto a raza, edad, género y otros muchos factores. En la actualidad es admitido por muchos investigadores que la carcinogénesis es la consecuencia de la interacción de varios factores unido a una determinada predisposición genética.

### **I.1.4 Tratamiento**

La terapéutica oncológica en pediatría ha de ser especialmente cuidadosa al planificar la combinación de los tres pilares del tratamiento tumoral, es decir, cirugía, quimioterapia y/o radioterapia.

La cirugía es el tratamiento de elección en el cáncer infantil. Es de suma importancia que la resección tumoral sea completa, preservando la integridad de las estructuras y la función de los órganos vecinos. Permite tomar muestras adecuadas para los estudios biológicos, especialmente importantes en el Neuroblastoma. En ocasiones son necesarias segundas y terceras intervenciones quirúrgicas después de haber reducido el tumor, con el tratamiento quimioterápico.



El tratamiento quimioterápico es fundamental. En los niños con grandes neoplasias en el momento del diagnóstico se administra siempre una quimioterapia de reducción tumoral para intentar una exéresis completa posterior. Por otra parte, la quimioterapia adyuvante se emplea para destruir las posibles micrometástasis existentes en el momento del diagnóstico y evitar recidivas. En la actualidad se tiende a intensificar los tratamientos con citostáticos y acortar su período de duración, con el objeto de disminuir resistencias y aumentar la eficacia del tratamiento.

El tratamiento quimioterápico puede conllevar importantes efectos secundarios así como complicaciones hematológicas, metabólicas e infecciosas, que pueden suponer un riesgo, mayor de lo deseable, para la supervivencia en este grupo de edad. Existe una mayor radiosensibilidad de los tejidos en la edad infantil y por tanto más probabilidad de afectación al desarrollo y crecimiento por lo que cada vez más se limita el uso de esta terapia en la edad pediátrica.

Por todo ello la Oncología pediátrica es una especialidad con un alto grado de complejidad, precisando un ambiente multidisciplinar en centros especializados, y un esfuerzo en investigación clínica y de laboratorio coordinados.

## **I.2 NEUROBLASTOMA**

Los tumores neuroblásticos que incluyen el neuroblastoma (NB), ganglioneuroma y ganglioneuroblastoma, derivan de las células primordiales de la cresta neural. Dichas células, en su migración y diferenciación normal, darán lugar en el feto a los ganglios simpáticos y a la médula adrenal (Brodeur, 1991). Se destacan por presentar una amplia variedad de características biológicas, histológicas y clínicas, lo cual hace que dichos tumores puedan manifestarse con una historia natural que comprende desde la regresión espontánea a la diferenciación hacia neoplasias benignas, incluyendo

comportamientos clínicos muy agresivos. La regresión espontánea y la maduración de las células tumorales, bien espontáneamente o inducida por el tratamiento quimioterápico, es particularmente frecuente en el lactante.

Sin embargo, en los últimos treinta años, el estudio profundo de un numeroso grupo de factores entre los que se incluyen la edad, el estadio, el perfil secretor del tumor, el nivel sérico de algunos marcadores, el grado de diferenciación patológica, la expresión del oncogén n-myc, el contenido de DNA y las alteraciones citogenéticas de las células tumorales, ha permitido avanzar considerablemente en la valoración de los pacientes con esta patología. La toma en consideración de todos estos factores nos aporta información muy importante acerca del probable comportamiento del tumor, y, por tanto, a la clasificación en un grupo de riesgo determinado para cada paciente (Katzenstein et al, 1998).

### **1.2.1 Incidencia**

La incidencia es de 8-10 por millón y año entre la población menor de 15 años de edad en los países industrializados, siendo ligeramente superior entre el sexo masculino (Miller et al, 1995). Esta tasa de incidencia hace que el NB suponga en torno al 10% de todos los cánceres pediátricos.

El NB es una neoplasia casi exclusiva de las etapas tempranas de la infancia, de tal forma que, el 40% de las veces se diagnostica en menores de un año y el 80% en menores de 4 años. Su presentación por encima de los 10 años no llega al 3% (Tabla 3). En una revisión de más de 3.000 casos de NB (1990-2000) de diversos grupos de estudios oncológicos, la edad media de diagnóstico fue de 17.3 meses (Olshan y Bunin, 2000).

En España, el informe estadístico del Registro Nacional de Tumores Infantiles (Peris, 1997) correspondiente al período de seguimiento de 1980 a 1988, pone de manifiesto que el NB ocupa el cuarto lugar en frecuencia tras las leucemias y linfomas y los tumores del Sistema Nervioso Central, con un

10.4% del total de casos. La tasa de incidencia anual en nuestro país es de 9,9/millón de habitantes, con una distribución por edad y sexo similar a la encontrada en otros países (Tabla 3).

Los programas de detección selectiva de este tumor, basados en la determinación de metabolitos urinarios de catecolaminas, no han demostrado una suficiente eficacia a la hora de disminuir la mortalidad global del mismo. (Woods et al, 1996; 2002).

**Tabla 3. Distribución porcentual de NB por edades y sexo**

<b>Sexo</b>	<b>&lt; 1 año</b>	<b>1-4 años</b>	<b>5-9 años</b>	<b>10-14 años</b>
Varón	37,8%	45,7%	13,7%	2,2%
Mujer	35,2%	49,9%	10,6%	3,7%
Total	36,6%	47,5%	12,3%	2,9%

### **1.2.2 Etiología**

La causa del NB es desconocida. Estudios sobre factores ambientales tales como exposición prenatal a hidantoínas, alcohol o influencia de campos electromagnéticos en el área profesional, determinadas profesiones como electricidad, jardinería o pintura y algunos virus no han sido definitivamente confirmados. A la luz de los conocimientos actuales, no se ha demostrado por tanto, que existan circunstancias del medio ambiente de cualquier índole que tengan interés epidemiológico en la incidencia del NB.

Algunos autores consideran como factor implicado en la patogénesis de ciertos subtipos histológicos de tumores neuroblásticos, con fenotipo maligno, una inadecuada respuesta a las señales reguladoras de la diferenciación celular (Castleberry, 1997). Una de las moléculas más relacionadas es el Factor de Crecimiento Nervioso (GNF) y su receptor, perteneciente a la familia

de las neurotrofinas, las cuales participan en la regulación de la diferenciación de los neuroblastos simpáticos. La expresión de este receptor se ha asociado a grupos de pacientes con biología y clínica favorable y de buen pronóstico (Nakagawara et al, 1993).

Se ha sugerido un papel de ciertos péptidos en el desarrollo del tumor, si bien no se ha establecido una relación definitiva. La expresión del receptor de la Somatostatina se ha relacionado con subtipos histológicos diferenciados, con bajos estadios de enfermedad y con buen pronóstico (Qualman et al, 1992; Kogner et al, 1997). Asimismo, el Péptido intestinal vasoactivo (VIP) se ha asociado a tumores diferenciados y se ha comprobado que es capaz de inducir diferenciación neuronal en cultivos celulares de NB humano; este proceso se correlacionó con un aumento de la síntesis de VIP, y de la expresión de su receptor, sugiriéndose su participación en los mecanismos de autorregulación de la maduración y proliferación del tumor (Pence y Shorter, 1993). Los neuropéptidos Cromogranina A y Neuropéptido Y podrían ser útiles como marcadores de enfermedad activa y de respuesta al tratamiento (Eder et al, 1998; Dotsch et al, 1998).

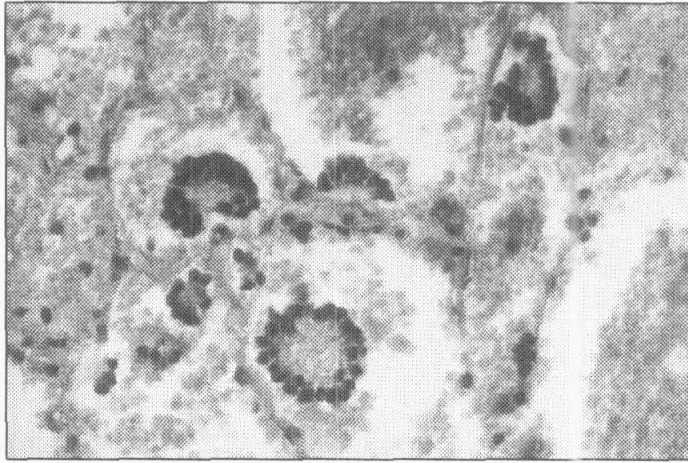
El NB es una enfermedad generalmente de aparición esporádica pero el 1-2 % de los casos presenta una historia familiar. Estos siguen un modelo autosómico dominante con penetrancia incompleta. En una revisión de casos familiares de NB la edad media de diagnóstico fue de 9 meses y al menos un 20% de los casos mostraron afectación adrenal bilateral o afectación primaria multifocal (Kushner et al, 1985). El gen responsable de los casos familiares de NB estaría localizado en el brazo corto del cromosoma 16 (Weiss et al, 2000).

Por otro parte la enfermedad de Hirschsprung, la hipoventilación central (Síndrome de Ondine) y la Neurofibromatosis tipo 1 han sido descritas en pacientes con NB, tanto esporádicos como familiares. Estos hallazgos sugieren que el NB puede formar parte de un espectro de síndromes que afectan al anormal desarrollo de las células de la cresta neural (Bower y Adkins, 1980; Maris et al, 1997; Kushner et al, 1986). Otros defectos congénitos y síndromes genéticos se han relacionado asociados a NB pero no se han podido identificar

anomalías específicas que se correspondan con un incremento de su frecuencia de presentación.

### **1.2.3 Histología**

El NB deriva probablemente de las células pluripotenciales simpáticas (Simpatogonias), las cuales proceden a su vez de la cresta neural. Se caracteriza por células pequeñas y redondeadas con abundantes gránulos, formando entre ellas agrupaciones denominadas Pseudorrosetas de Homer-Wright, y áreas de calcificación, necrosis y hemorragia (Figura 2).



**Figura 2. Pseudorrosetas de Homer- Wright (H&E, X40)**

El microscopio electrónico revela procesos dendríticos conteniendo microtúbulos orientados longitudinalmente y gránulos citoplásmicos periféricos electrondensos que contienen catecolaminas. Otras sustancias secretadas por el tumor son ferritina, sinaptofisina y enolasa neuroespecífica, así como la presencia de neurofilamentos, reconocidos por técnicas inmunohistoquímicas.

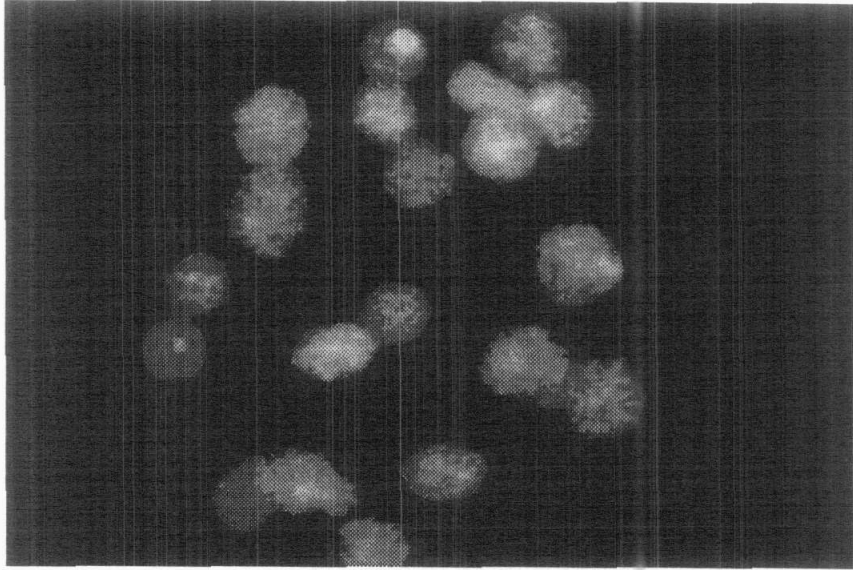
La clasificación histopatológica más utilizada es la desarrollada por Shimada et al, (1984), y revisada por Joshi et al (1992). Finalmente fue actualizada por ambos autores junto con otros destacados patólogos, denominándose Clasificación Histopatológica Internacional del Neuroblastoma

y establecida en torno a la edad, los hallazgos histológicos referidos al estroma celular, índice mitótico (mitosis- cariorrexis) y grado de diferenciación celular, correlacionados con factor pronóstico (Shimada et al, 1999).

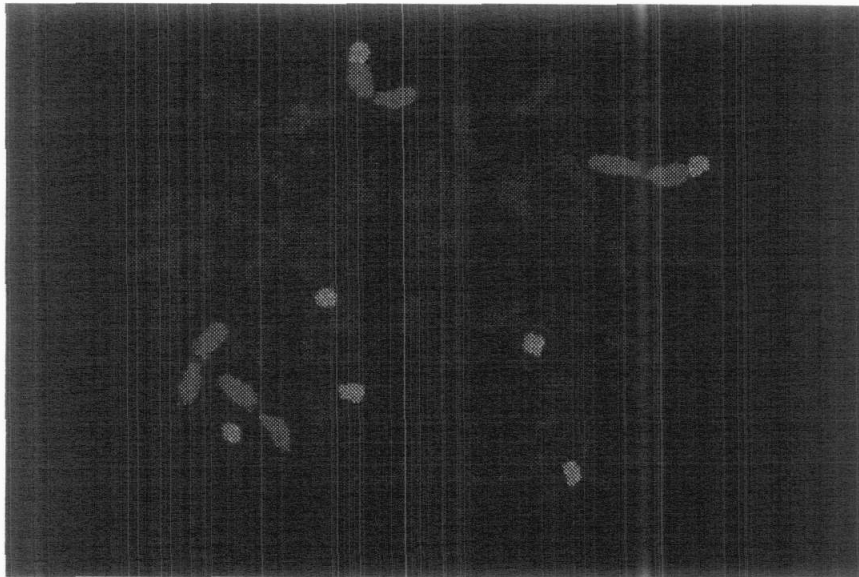
#### **I.2.4 Genética**

Las características citogenéticas, presentes en el 80% de los casos, con correlación pronóstico incluyen delección del cromosoma 1p, deleciones en el cromosoma 11q y 14q, anomalías en el cromosoma 17q, amplificación n-myc, índice DNA y otros marcadores tales como expresión del gen del receptor del Factor de crecimiento nervioso (TRKA), genes relacionados con multirresistencia a fármacos (MDR1 y MRP) y genes asociados a invasión y metástasis (nm23 y CD44).

El índice DNA presenta también correlación con la respuesta al tratamiento quimioterápico; la hiperdiploidía se asocia a estadios inferiores de enfermedad y buena respuesta a tratamiento en niños pequeños (Look et al, 1984). La amplificación del protooncogén n-myc se localiza en el brazo corto del cromosoma 2, ocurre en el 25% de los neuroblastomas no tratados y se asocia con estadios avanzados (Brodeur et al, 1984) y la delección del cromosoma 1p se asocia a estadios avanzados y progresión rápida del tumor. Las traslocaciones no balanceadas del extremo distal del cromosoma 17q son una de las anomalías más frecuentes en NB primarios con pérdida concomitante de material genético en el cromosoma 1p, asociándose a mal pronóstico (Figuras 3 y 4).



**Figura 3. Amplificación del oncogen n-myc. (FISH)**



**Figura 4. Traslocación t (17;1)**

### **I.2.5 Clínica**

El NB, por su procedencia, puede localizarse desde la fosa craneal posterior hasta el cóccix. El 65% surgen en el abdomen y, de éstos, la mitad en la glándula suprarrenal. Un 20% se origina en el tórax, preferentemente en el mediastino posterior. Entre los lactantes las regiones cérvico-torácica es la predominante, mientras que en niños mayores del año corresponde a la glándula adrenal (Castleberry, 1997).

El NB se manifiesta frecuentemente como masa dura e indolora en cuello, tórax y abdomen. Se disemina por invasión local y a ganglios linfáticos regionales; la vía hematógena a médula ósea, esqueleto, hígado y piel es frecuente. Aproximadamente el 60-75% de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico con la correspondiente sintomatología. Asimismo pueden aparecer hipertensión arterial, encefalopatía cerebelosa aguda y trastornos metabólicos asociados al tumor como cuadro de diarrea severa e hipokaliemia por producción del neuropéptido VIP, e hipercalcemia de causa desconocida.

La exploración física pone de manifiesto la existencia de una masa cervical o abdominal, adenopatías, signos secundarios a infiltración ósea periorbitaria con equimosis y proptosis; Síndrome de Horner o cuadro de debilidad de miembros secundario a una localización paraespinal.



Las pruebas complementarias pueden revelar alteraciones hematológicas, elevación de ferritina sérica, lactato deshidrogenasa, enolasa neuroespecífica; en orina hallaremos elevados los metabolitos de catecolaminas, ácidos vanilmandélico y homovanílico.

Las pruebas de imagen vienen determinadas según la localización del tumor e incluyen radiografía de tórax, tomografía computadorizada, resonancia magnética y gammagrafía ósea con meta-yodobencilguanidina.

### **1.2.6 Clasificación**

El sistema Internacional de estadios del Neuroblastoma (INSS) es en la actualidad el utilizado por los distintos grupos de oncología pediátrica. Está basado en las características clínicas, radiológicas y quirúrgicas del tumor (Brodeur et al, 1993) (Tabla 4).

**Tabla 4. Sistema Internacional de estadios del Neuroblastoma**

Estadio	Descripción
I	Tumor localizado confinado al área de origen, resección completa y total, con o sin enfermedad residual microscópica. Ganglios ipsilaterales y contralaterales negativos.
IIA	Tumor localizado resecado incompletamente; ganglios linfáticos ipsilaterales negativos.
IIB	Tumor localizado con o sin resección completa, con ganglios ipsilaterales no adherentes positivos y ganglios contralaterales negativos.
III	Tumor infiltrante más allá de la línea media, con o sin afectación de ganglios regionales, o tumor localizado unilateral con afectación ganglionar contralateral; o tumor en línea media con extensión bilateral por infiltración (no resecable) o por afectar a ganglios linfáticos.
IV	Cualquier tumor primario con diseminación a ganglios linfáticos distantes, hígado, médula ósea, hueso, piel, o cualquier otro órgano (a excepción de los definidos para el estadio IVs)
IVs	Tumor primario localizado (como se describe para los estadios I, IIA o IIB, con diseminación limitada a piel, hígado, o médula ósea (en niños <1 año)

### **I.2.7 Diagnóstico**

El diagnóstico se confirma con biopsia tisular. El aspirado y biopsia de médula ósea se debe realizar previo a cualquier intervención quirúrgica. Por

último se procede al estudio histopatológico del tumor y médula ósea si existe afectación así como al análisis citogenético.

Se han establecido unos criterios mínimos para el diagnóstico de NB, los cuales han sido elaborados por un grupo de oncólogos pediátricos (Brodeur et al, 1988). Se confirma la existencia del tumor si (1) un diagnóstico histológico inequívoco al microscopio óptico es realizado a partir de una muestra de tejido tumoral, con o sin inmunohistoquímica, microscopio electrónico o aumento sérico de catecolaminas o sus metabolitos; o bien (2) el aspirado o biopsia de médula ósea contiene células tumorales, y aumento sérico o urinario de catecolaminas o metabolitos. Si la histología e inmunohistoquímica son equívocas, los hallazgos genéticos característicos tales como delección del cromosoma 1p o amplificación n-myc, podrían apoyar al diagnóstico.

### **1.2.8 Diagnóstico diferencial**

Entre un 5-10% de los NB no producen catecolaminas y en el 1% de los pacientes no se halla el tumor primario. Debido a su variedad clínica se incluyen en el diagnóstico diferencial procesos inflamatorios o infecciosos sistémicos como Artritis Reumatoide, Osteomielitis, enfermedades neurológicas primarias e incluso enfermedad inflamatoria intestinal.

Entre los tumores metastásicos que afectan médula ósea a tener en cuenta se incluyen Rabdomiosarcoma, Sarcoma de Ewing, Neuroepitelioma, Linfoma y Leucemia.

### **1.2.9 Pronóstico**

La edad y el estadio en el momento del diagnóstico son las dos variables clínicas más importantes predictoras de evolución (Evans et al, 1987). Asimismo características genéticas entre las que se incluyen número de copias

n-myc, ploidía (Look et al, 1991) y delección o pérdida de heterocigosidad del cromosoma 1p (Maris et al, 2000), anomalías en el cromosoma 17q y expresión del gen del receptor TRKA han sido propuestas como marcadores pronóstico. Otros factores séricos, importantes en el pasado, son ferritina, enolasa neuroespecífica, lactato deshidrogenasa y el gangliósido de membrana GD<sub>2</sub>.

La supervivencia libre de enfermedad a los 3 años en pacientes con estadio I, II, y IVs de la clasificación INSS es del 75-90%. Lactantes con INSS III y IV tienen tasas de supervivencia del 85 y 65 %, sin embargo niños mayores del año con estadio similar alcanzan cifras del 50 y 15 % respectivamente.

### **1.2.10 Tratamiento**

Las modalidades de tratamiento para este tumor son tres: cirugía, quimioterapia y radioterapia. La cirugía es requerida en la mayoría de los pacientes; gracias a ella se consigue definir el diagnóstico y proveer de material histológico para definir el estadio, determinar la situación de los ganglios intracavitarios no adheridos al tumor primario así como la extirpación del mismo. El tratamiento posterior de quimioterapia y/o radioterapia es definido tras el estadio del paciente.

El NB está considerado un tumor radiosensible. El papel de esta modalidad terapéutica ha sido modificado con las nuevas clasificaciones de estadio-riesgo. Se utiliza combinada con quimioterapia en pacientes con afectación de ganglios linfáticos regionales, tratamiento paliativo de metástasis, tumores de localización intraespinal, irradiación total previa al trasplante autólogo de médula ósea o neonatos con estadio IVs y distrés respiratorio secundario a hepatomegalia.

La quimioterapia es la piedra angular del tratamiento de estos pacientes. En la actualidad se ha demostrado más ventajoso el tratamiento combinado de varios agentes que incluyen Ciclofosfamida, Ifosfamida, Doxorrubicina, Tenipósido, Etopósido, Cisplatino o Carboplatino (Brodeur y Maris, 2002).

Pacientes clasificados de bajo riesgo son tratados con cirugía únicamente debido a su alta tasa de curación; utilizando cirugía secundaria y quimioterapia para las posibles recurrencias locales.

Pacientes de riesgo intermedio reciben quimioterapia, siendo una de las combinaciones con carboplatino, etopósido, ciclofosfamida y doxorubicina, con cirugía de revisión en la mayoría de los casos; añaden al tratamiento radioterapia local (Matthay et al, 1998) excepto en pacientes con progresión de la enfermedad tras el tratamiento inicial o aquellos con tumor irreseccable con hallazgos biológicos desfavorables tras finalizar quimioterapia. El número de ciclos de quimioterapia viene determinado por los hallazgos biológicos.

En el grupo de alto riesgo se han utilizado terapias agresivas en un intento de mejorar las tasas de supervivencia. Se incluye la quimioterapia de inducción, el tratamiento de consolidación y la terapia de enfermedad mínima residual. Las mejores tasas de respuesta en la fase de inducción se han conseguido con aquellas combinaciones que incluyen el cisplatino a altas dosis. A continuación se realiza la terapia de consolidación con agentes citotóxicos mieloablativos con reinfusión autóloga de médula ósea. Los diferentes regímenes utilizados obtienen datos del 35% al 60% de supervivencia libre de enfermedad a los tres años. El tratamiento de la enfermedad mínima residual se basa en aquellos agentes cuya diana específica es la célula de NB; así ha demostrado cierta eficacia el tratamiento con 13-cis-retinoico, mejorando la supervivencia respecto al grupo no tratado (Matthay et al, 1999). Otros fármacos se describen en el siguiente apartado.

### **I.2.11 Estrategias terapéuticas futuras**

Los objetivos en el tratamiento del NB son conseguir un mejor control de la enfermedad así como alcanzar mejores expectativas para aquellos niños con

recaídas tras tratamiento inicial. En la actualidad el trabajo de los investigadores se centra en los siguientes aspectos:

- Identificación de nuevas drogas y combinaciones. Se ha utilizado topotecán en combinación con ciclofosfamida en enfermedad refractaria con aceptable toxicidad hematológica (Saylor et al, 2001).
- Métodos que permitan quimioterapia intensiva sin necesidad de reinfusión autóloga.
- Anticuerpos monoclonales contra el gangliósido G<sub>D2</sub>. Los datos preliminares hacen recabar esperanzas en dichas moléculas tras la quimioterapia citorreductora. Como contrapartida está la producción de anticuerpos neutralizantes y la aparición de dolor neuropático en la mayoría de los pacientes.
- Otras terapias experimentales son: utilización de MIBG radiactiva, desferroxiamina, Acido Valproico en combinación con Interferón alfa (Cinatl, 2002), terapia con sustancias inhibitoras de la angiogénesis, inhibidores de los receptores de la tirosinkinasa (TRK), nuevos retinoides que inducen muerte celular y antagonistas del TRKA, que bloquearían vías esenciales para la supervivencia celular.

## **I.3 NEUROPEPTIDOS**

### **I.3.1 Neurotransmisión**

Fue a partir del descubrimiento de la célula neurona como unidad estructural del Sistema Nervioso (Ramón y Cajal, 1888) cuando se planteó, unos años más tarde, la existencia de una sustancia de naturaleza química como mediadora de la transmisión sináptica (Sherrington, 1906).

La comunicación interneuronal, sabemos hoy día que es llevada a cabo principalmente por un mediador químico, denominado clásicamente neurotransmisor, y en menor cuantía, por transmisión eléctrica. En la actualidad se conocen más de medio centenar de sustancias químicas integrantes de la comunicación sináptica.

Se clasifican en dos categorías:

- Transmisores de molécula pequeña y acción rápida

Se caracterizan, en su mayoría, por síntesis y almacenamiento en gránulos del citosol del terminal presináptico, liberación a la hendidura sináptica tras despolarización de la membrana y unión al receptor postsináptico, con acción sobre los canales iónicos modificando la conductancia de los mismos, dando lugar a excitación o inhibición celular; todo ello ocurre en milisegundos. A continuación son inactivados por difusión a los tejidos o por destrucción enzimática, o bien reutilizados al ser nuevamente incorporados al terminal presináptico. Estos neurotransmisores son los que producen la mayoría de las respuestas inmediatas del sistema nervioso como la transmisión de las señales sensoriales al cerebro y de las señales motoras a los músculos. Ejemplos pertenecientes a este grupo son: Aminas (epinefrina, norepinefrina, dopamina, serotonina e histamina), Acetilcolina, y algunos aminoácidos como Glicina o Glutamato.

□ Neurotransmisores peptídicos

El descubrimiento de la existencia de sustancias de naturaleza peptídica en el Sistema Nervioso Central ha sido uno de los hallazgos que más ha influido en la evolución del conocimiento de sus funciones así como de sus complejas interrelaciones neuroquímicas. Los criterios que debe cumplir un neuropéptido para ser considerado como neurotransmisor son los establecidos para el grupo de monoaminas y aminoácidos.

La diferenciación clásica que dividía los neuropéptidos en neurotransmisores y neuromoduladores no se contempla actualmente; los neuromoduladores eran descritos como reguladores y con acción sobre grupos neuronales amplios de forma indirecta. Actualmente se sabe que un mismo neurotransmisor puede en determinadas localizaciones actuar como neuromodulador y viceversa.

Se sintetizan como moléculas precursoras de gran tamaño, Preproteína, en el retículo endoplásmico rugoso del soma celular y se almacenan en vesículas que son transportadas hacia el terminal presináptico, (Hökfelt et al, 1980). Allí es separada del resto por medio de una enzima, metaloendopeptidasa, originándose así la Proproteína. Posteriormente es almacenada tras varios procesos enzimáticos, que incluyen endopeptidasas y carboxipeptidasas, en gránulos secretores del Aparato de Golgi; durante este proceso la proproteína sufre modificaciones estructurales (glicosilación, formación de puentes disulfuro y fosforilación) por enzimas específicas que dan origen a los diferentes péptidos. Estos son finalmente liberados al espacio sináptico en la fase de despolarización. De una misma molécula de proproteína, dependiendo del tipo de enzima que actúa, se originan diferentes tipos de péptidos, (Costa et al, 1980). En función de la dotación enzimática de las neuronas sintetizadoras de neuropéptidos y de la actividad y especificidad de dichas enzimas, estas células tendrán mayor o menor producción y liberación de transmisores; por lo tanto, no sólo hay una regulación cuantitativa de la liberación de mensajeros, como en los neurotransmisores clásicos, sino que también es cualitativa.



La liberación ocurre por un mecanismo calcio-dependiente; es un proceso más lento y de menor cuantía (1.000 veces menos que las monoaminas y 100.000 veces menos que los aminoácidos); esto es compensado por la mayor potencia, afinidad a los receptores y duración de acción, bien directamente o actuando como neuromoduladores al activar segundos mensajeros.

Tras unirse a su receptor son eliminados al difundir a los tejidos circundantes e inactivados por peptidasas; parece no haber fenómeno de recaptación. Entre sus acciones cabe citar la activación o inactivación de genes, cierres prolongados de canales de calcio o modificaciones más o menos duraderas en el número de receptores.

### **1.3.2 Coexistencia-Cotransmisión**

La coexistencia o fenómeno por el cual una neurona puede sintetizar y almacenar distintos neurotransmisores, clásicos (monoaminas y aminoácidos) o peptídicos, fue introducido por Hökfelt et al (1980), invalidando el concepto clásico de Dale (1954) de una neurona-un neurotransmisor. El neurotransmisor clásico y el peptídico pueden estar almacenados en la misma vesícula o de forma independiente. La coexistencia de estas dos sustancias en la misma terminal sináptica amplía las posibilidades de acción y permite comprender algunas acciones hasta entonces carentes de base científica.

La liberación en el proceso de cotransmisión puede ser mixta ante un estímulo si su almacenaje es conjunto o del tipo diferenciado si su almacenamiento es en gránulos diferentes. También puede modificarse su liberación, de forma que sea independiente la liberación de los cotransmisores, en virtud de la intensidad de los estímulos que alcanzan la terminación sináptica. Todo ello es indicador de la capacidad de la neurona para emitir información y da idea del alto grado de plasticidad funcional que posee una terminación nerviosa (Bartfai et al, 1988).

El fenómeno de la cotransmisión entre las TK ha sido estudiado por Maggi et al (2000) y concluye que, SP y NKA son coliberados de neuronas entéricas y

terminaciones nerviosas sensoriales. Esta duplicación de mensajes taquicinérgicos, unida a la presencia de distintos subtipos de receptores en la célula diana, da idea de la complejidad que conlleva el análisis de la cotransmisión. La respuesta final tras la unión de los mensajeros a sus respectivos receptores es muy heterogénea y puede traducir:

- Señal activadora sumatoria: la activación de cada receptor potencia la acción del otro.
- Respuesta cooperadora entre cada uno de los receptores activados para llegar a la acción final.
- Respuesta especializada: en determinadas cotransmisiones ocurre lo que se ha llamado una respuesta especializada en cuanto a tiempo de actuación como a mecanismos activados en la misma célula diana.

### **I.3.3 Clasificación Neuropéptidos**

Se incluye la realizada por Salvador (1986) por ser una de las más completas y utilizadas (Tabla 5).

**Tabla 5. Clasificación Neuropéptidos**

<b>Familias Peptídicas</b>
<p>a) Opiáceos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Opiocortinas: ACTH, Alfa-MSH, Endorfinas (Alfa, Beta y Gamma).</li> <li>- Encefalinas: Metionina-encefalina , Leucina-encefalina.</li> <li>- Dinorfinas: Dinorfina 1-8, Dinorfina A (1-17), Dinorfina B o Rinorfina</li> <li>- Neoendorfinas</li> <li>- Otros péptidos opioides: Amida, FMRF, Péptido E, Péptido F.</li> <li>- BAM</li> </ul> <p>b) Neurohipofisarios: Vasopresina: Oxitocina, Neurofisina.</p> <p>c) Secretinas: Secretina, Glucacón, VIP, GIP, GHRF, PHI.</p> <p>d) Insulinas: Insulina, Relaxina. Somatomedina. NGF.</p> <p>e) Taquicininas</p> <p>f) Somatostatina y Polipéptidos pancreáticos: Somatostatina, Neuropéptido Y, Péptido YY.</p> <p>g) Gastrinas: Colecistoquinina, Gastrina</p>
<b>Otros Péptidos de familias no definitivamente establecidas</b>
<p>a) Hipofisarios: GH, Lipotrofina</p> <p>b) Hipotalámicos: GnRH, TRH, CRF</p> <p>c) Hormonas circulantes: Angiotensina II, Calcitonina</p> <p>d) Hormona digestiva: Motilina</p> <p>e) Otros: Bombesina, Bradiquinina, Carnosina, Proctolina, GRP, Oxintomodulina</p>

El listado de neuropéptidos es una serie abierta y continuamente se ve ampliada por nuevas sustancias, para lo que se precisa verificar su presencia a nivel cerebral así como el cumplimiento de los requisitos para ser considerados como neurotransmisores.

#### **I.4 TAQUICININAS**

La familia de las taquicininas (TK) constituye una familia de péptidos, los cuales se hallan estructuralmente relacionados y ampliamente distribuidos entre vertebrados e invertebrados; su denominación se debe a la rápida actividad contráctil sobre la musculatura lisa gastrointestinal. Las TK conocidas en mamíferos son seis:

- SP, descrita inicialmente por los autores Von Euler y Gaddum (1931).
- Neurokinina A (NKA) y Neurokinina B (NKB) descubiertas posteriormente por Kimura et al (1983) y Kangawa et al (1983), y que ha sido relacionada con la eclampsia.
- el Neuropéptido K (NPK) (Tatemoto et al, 1985) y Neuropéptido gamma (NPγ) (Kage et al, 1988), son formas elongadas de NKA, cuyas funciones no han sido totalmente definidas.
- Hemokinina-I (HK-I) es la TK recientemente clonada y se expresa principalmente en tejido no neuronal.

Erspamer (1981) describió otros péptidos pertenecientes a esta familia en especies no mamíferas: Fisalemina, Eledoisina, Kassinina, Filomedusina y Uperoleína.

Todas ellas presentan actividad sobre el músculo liso y órganos secretorios pero con distinta potencia relativa. Los efectos biológicos de las TK están mediados a través de tres tipos de receptores denominados receptor Neurokinina-1 (RNK1), RNK2 y RNK3.

### I.4.1 Estructura

Característicamente todas las TK presentan un grupo amida en el extremo Carboxi-terminal y la secuencia común: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, siendo X un residuo hidrófobo o aromático, y el extremo aminoterminal es distinto para cada péptido (Tabla 6). La secuencia carboxilica es esencial para la interacción y la activación del receptor, mientras que el extremo amino define la especificidad al subtipo de receptor, (Krause et al, 1992). Añadir que la estructura primaria de las TK se ha conservado a través de la evolución de las especies, sugiriendo el papel destacado de este grupo molecular en los sistemas biológicos.

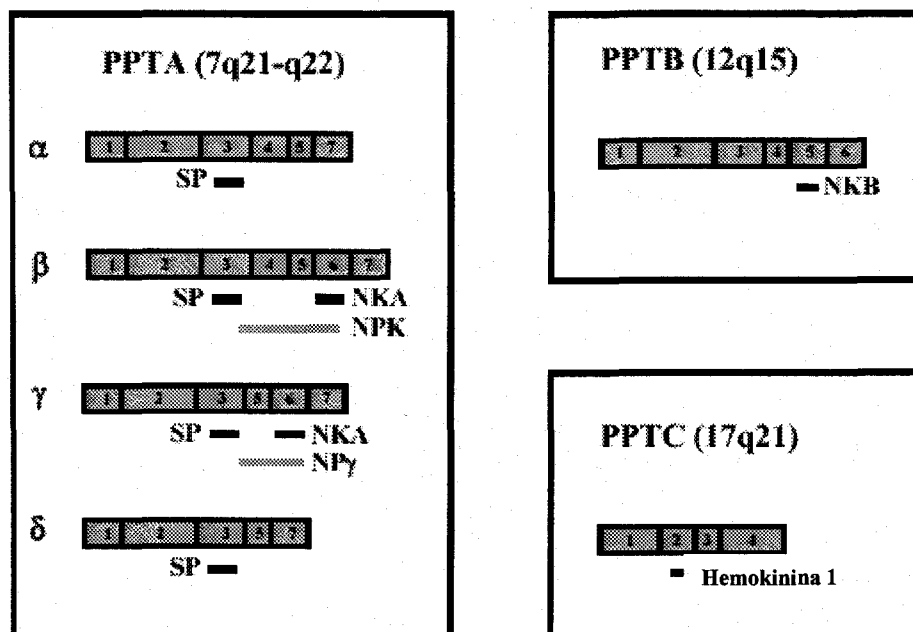
**Tabla 6. Estructura de las Taquicininas**

SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
NKA	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val- Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
NKB	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val- Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
NP K	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu- Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg- His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
NPγ	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys- Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
Physalemina	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr- Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
Eledoisina	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile- Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
Kassinina	Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val- Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
Phylomedusina	pGlu-Asn-Pro-Asn-Arg-Phe-Ile-Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>
Uperoleína	pGlu-Asn-Pro-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met NH <sub>2</sub>
Hemokinina 1	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH <sub>2</sub>

### I.4.2 Genética

Tres son los genes que codifican las TK en mamíferos: Preprotaquicinina A (PPT-A), Preprotaquicinina B (PPT-B) y Preprotaquicinina C (PPT- C).

El gen PPT-A humano contiene siete exones y puede expresar cuatro isoformas de ARNm que dan lugar a la SP, NKA, NPK y el Neuropeptido  $\gamma$  (Nakanishi, 1987). En humanos los genes contienen siete exones. La maduración alternativa de la transcripción primaria produce cuatro isoformas de ARNm  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , las cuales difieren en la combinación de sus exones. El gen PPT-B codifica la NKB y el gen PPTC, recientemente clonado, da lugar a cuatro isoformas de ARNm y codifica la Hemokinina 1 (Camarda et al, 2002; Almeida et al, 2004). (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de la estructura de los genes humanos PPT-A, PPT-B and PPT-C. Los exones de cada uno de los genes están expresados por números. Las isoformas del ARNm del gen PPT-A ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) y los productos codificados por cada exon están indicados. Se incluye la localización cromosómica de cada gen.**

### **I.4.3 Distribución**

Las TK se distribuyen ampliamente por el Sistema nervioso central (SNC); destacan los ganglios basales (el núcleo estriado en su proyección a la sustancia negra), la amígdala, el hipocampo, núcleos del tronco, corteza cerebral y asta posterior de la médula. También se localizan a nivel de las terminaciones periféricas en aparato respiratorio (NKA principalmente), digestivo y vías urinarias.

Fuera del Sistema Nervioso, la SP se ha detectado en células endoteliales, células de Leydig, y células pertenecientes al sistema inmune. En cuanto a la NKB, se halla en placenta y útero humanos, relacionándose con preclampsia. El ARm que expresa la HK-I fue demostrado por primera vez en células hematopoyéticas y parece ser un factor esencial en la maduración de células pre-B (Almeida et al, 2004).

Todo lo anteriormente expuesto sugiere una amplia distribución de las TK y no exclusiva del tejido nervioso.

### **I.4.4 Receptores taquicinérgicos**

Son glicoproteínas que forman parte de la familia de Receptores acoplados a la Proteína G, una superfamilia de proteínas que representa un 1% del genoma humano y con un papel clave en las señales intracelulares. En la actualidad los tres tipos de receptores taquicinérgicos reconocidos han sido caracterizados por estudios farmacológicos y clonación; se conocen su estructura y disposición transmembrana. Se han distinguido dos posibles lugares de unión utilizando péptidos marcados. Se denominan receptor NK1 (RNK1), NK2 (RNK2) y NK3 (RNK3) con diferente capacidad de unión para la SP, NKA y NKB, (Nakanishi, 1991; Betancur et al, 1997).

En cuanto a la estructura poseen siete dominios hidrofóbicos transmembrana (TMI-VII) con tres giros extracelulares, el extremo amino-terminal extracelular y el carboxiterminal intracitoplásmico (figura 6).

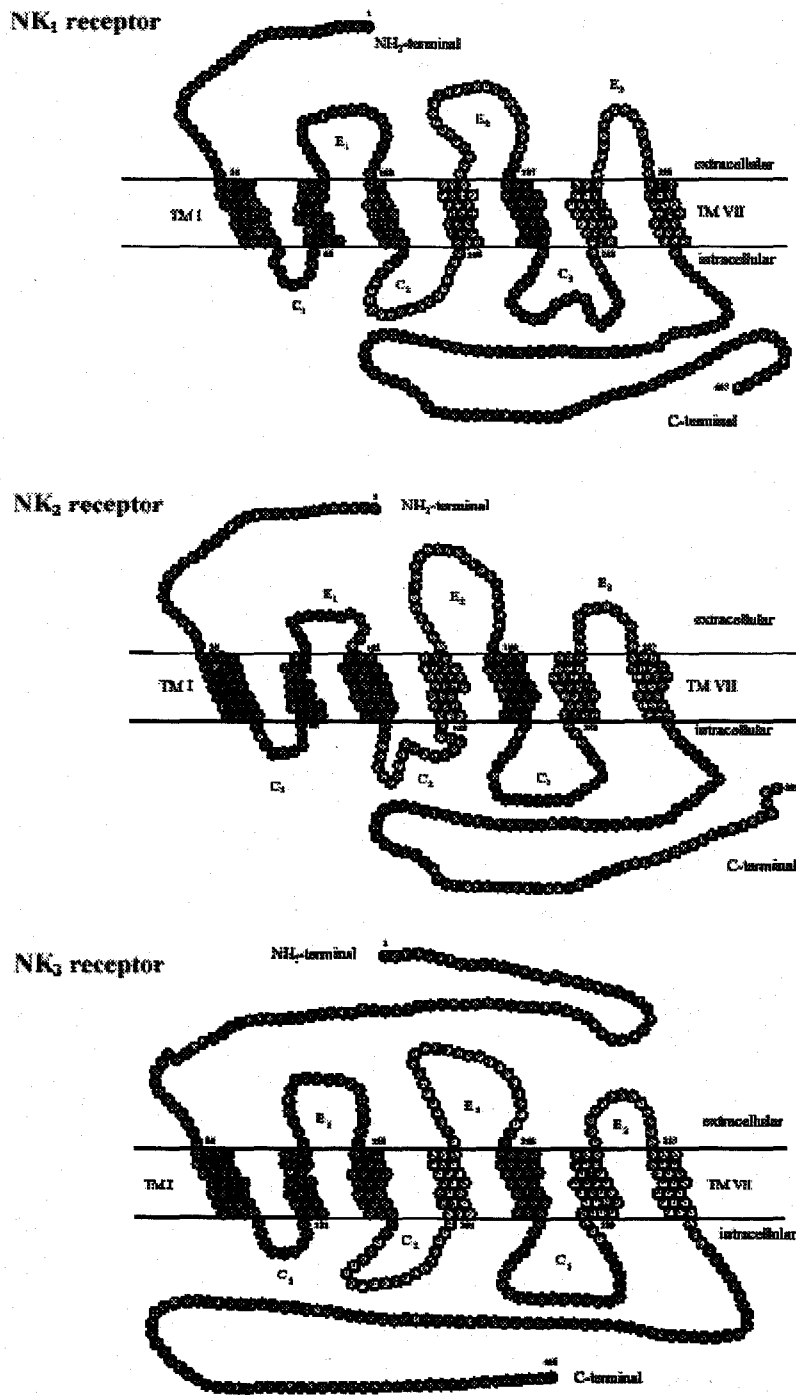


Figura 6. Disposición transmembrana de RNK1, RNK2 y RNK3



- RNK1: La afinidad que posee este receptor es: SP>> NKA > NKB. La SP tiene unas 100-1000 veces mayor afinidad que NKA y NKB. En cuanto a la HK1 se comporta como agonista NK1 (Camarda et al, 2002).

Estudios cuantitativos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), hibridación in situ y autorradiografía sobre la distribución del ARNm del RNK1 han demostrado una importante concentración del mismo en locus coeruleus, estriado ventral así como en hipocampo y núcleos amigdalares, en este sentido se ha destacado una relación importante del RNK1 con las áreas reguladoras del habla y las relacionadas con el estrés. Niveles más bajos se han hallado en corteza cerebral, fundamentalmente en córtex visual (Caberlotto et al, 2003). Otras localizaciones en SNC son bulbo olfatorio, tubérculos cuadrigéminos superiores, núcleo del tracto solitario y asta dorsal de la médula espinal (Otsuka y Yoshioka, 1993).

La distribución del receptor en tejido periféricos la encontramos en neuronas del plexo miéntérico intestinal, células acinares, fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas y del sistema inmune (Camarda et al, 2002).

- RNK2: Consta de 398 aminoácidos y su capacidad de unión es en este orden: NKA>NKB>SP. Principalmente localizado en tejidos periféricos como células musculares lisas, plexo mientérico, vías urinarias y respiratorias; en SNC lo encontramos en corteza frontal, estriado, septum, hipocampo, sustancia negra y cerebelo.

- RNK3: Este receptor esta constituido por 452 aminoácidos y muestra afinidad decreciente por NKB>NKA>SP. En SNC se halla en corteza cerebral, hipocampo y el núcleo interpeduncular; periféricamente alrededor de los vasos sanguíneos, células musculares lisas y recientemente se ha localizado en útero y placenta (Almeida et al, 2004).

## **- Receptor NK1**

En la actualidad es el receptor NK mejor caracterizado de los tres subtipos. Es una glicoproteína, de 407 residuos, miembro de la familia de receptores acoplados a la Proteína G, en concreto relacionado con las subunidades alfa de la proteína de Gq y G11, (McDonald et al, 1996). Muestra una gran similitud con los de otras especies, como rata y cobaya.

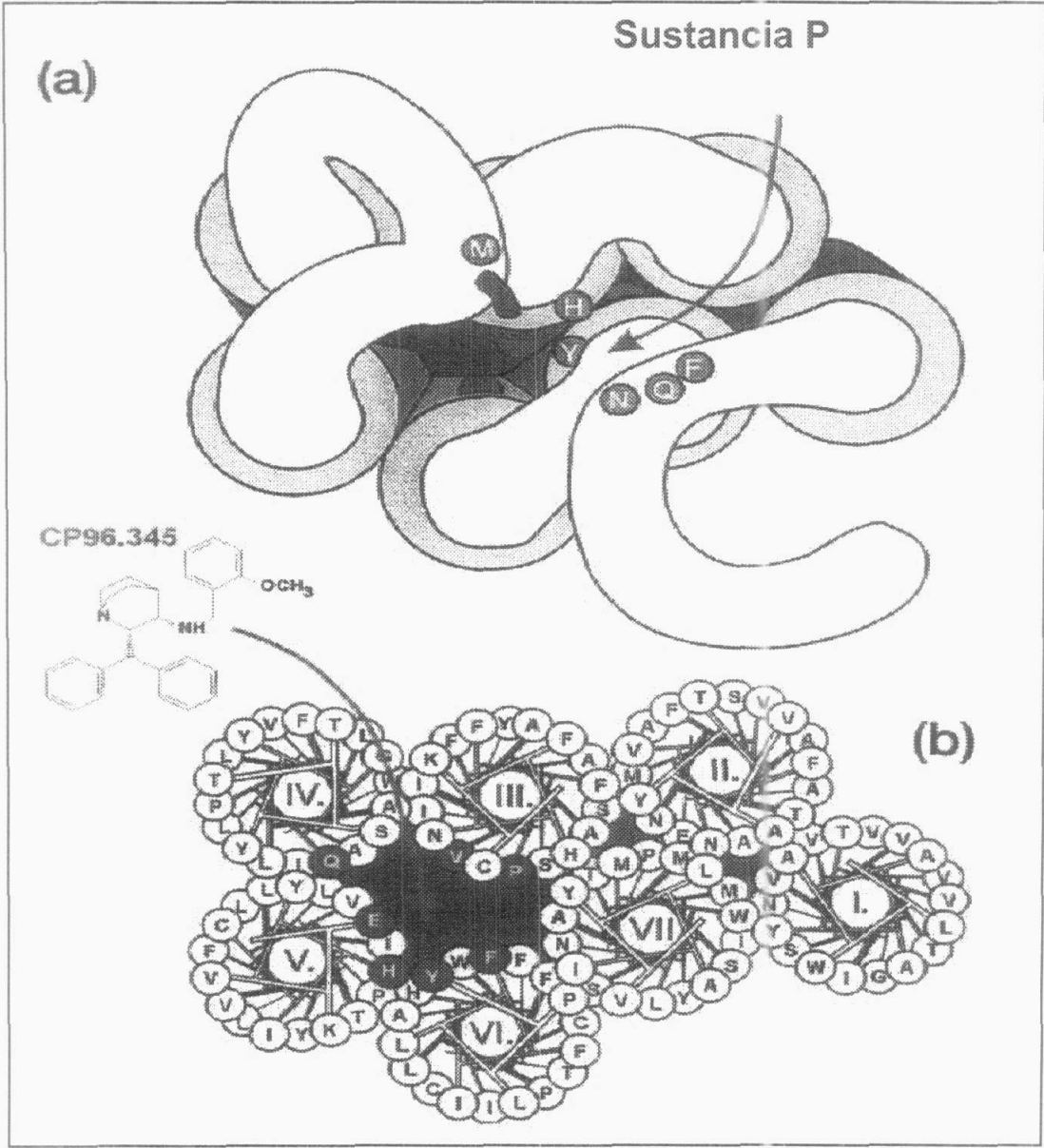
La transcripción primaria del RNK1 puede expresar varias isoformas de ARNm, que dan lugar a diferentes subtipos del RNK1. Estos se diferencian en la composición aminoacídica y en su peso molecular, aunque las características funcionales no son del todo conocidas.

En la actualidad han sido descritas en linfocitos humanos la isoforma de 58 kDa (McGillis et al, 1990), y en la línea linfoblástica humana IM-9, además de la anterior, otras dos de 33 y 38 kDa (Organist et al, 1988; van Ginkel y Pascual, 1996). Por el contrario, Friess et al (2003) ha informado de otra isoforma de 46 kDa en tejido pancreático normal y tumoral. Estudios en tejido cerebral de rata aportaron otros dos subtipos diferentes de receptores en el rango de 54 y 46 kDa. (Nakata et al, 1988; van Ginkel y Pascual, 1996).

Los sitios de unión al receptor, dentro de la estructura helicoidal, están situados muy superficialmente, en el extremo amino-terminal, y en los finales de las hélices III, VI y VII, (Fong et al, 1992).

El grupo de investigadores de Schwartz T ha estudiado y caracterizado en detalle el RNK1 consiguiendo un modelo de estudio sobre la interacción entre neurotransmisores y fármacos. Tras la aparición del primer antagonista no peptídico NK1, CP96345, se pudo estudiar de forma paralela los lugares de unión de éste y de la SP. Se observó que mientras la SP se liga a los puntos más periféricos, concretamente en los giros de la helicoidal, el antagonista se une, debido a su carácter hidrofóbico, a los segmentos transmembrana del receptor (Figura 7); éste lugar de unión no es crucial para la SP, pero al unirse

el antagonista podría bloquear los efectos del péptido (Gether et al, 1993). También se sabe que análogos de la SP pueden funcionar como agonistas al unirse a un punto de unión y como antagonista si lo hace en el otro lugar del RNK1, según la vía del segundo mensajero activado (Sachon et al, 2002).



**Figura 7. Vista del RNK1 desde el exterior de la membrana celular. Los puntos de interacción con la SP están marcados como círculos verde y blanco(a); el lugar de unión para el antagonista se halla marcado con círculos de color rojo (b)**

## **I.5 SUSTANCIA P**

### **I.5.1 Datos históricos**

La sustancia P (SP) se considera el neurotransmisor peptídico mejor y más ampliamente caracterizado en cuanto a distribución, liberación y propiedades biológicas. La SP fue descubierta por los doctores Von Euler y Gaddum en 1931 como un hallazgo serendípico mientras intentaban aislar acetilcolina de extractos de cerebro e intestino equinos. Hallaron una sustancia con acción espasmogénica e hipotensora a la que denominaron "preparación P", al prepararla en forma de polvo tras su separación de los tejidos. Cuatro décadas más tarde, los autores Chang y Leeman (1971) realizan la primera purificación completa de la SP. Leeman et al hallaron un material peptídico mientras intentaban aislar el factor liberador de corticotropina en hipotálamo de buey. Además observaron que dicha sustancia con actividad sialogoga no era antagonizada por atropina ni por bloqueantes adrenérgicos y poseía las mismas propiedades biológicas que las preparaciones de SP parcialmente purificadas. Estos autores demostraron su naturaleza peptídica y describieron sus 11 aminoácidos.

Tregear et al, (1971) realizó por primera vez su síntesis; otros grupos también realizaron su fabricación con posterioridad, y actualmente distintos laboratorios sintetizan el péptido.

Tras su aislamiento, años más tarde, los autores Lembeck (1953) y Pernow B (1953) sugieren el posible papel de neurotransmisor en el Sistema Nervioso para la SP. Posteriormente, los efectos del neuropéptido fueron estudiados en modelos fisiológicos por Takahashi et al (1974) y Henry (1976). En la década comprendida entre 1975-1985, otros autores realizan estudios de distribución, monitorización y liberación de la SP con técnicas de radioinmunoensayo e inmunohistoquímica y verifican la hipótesis sobre el

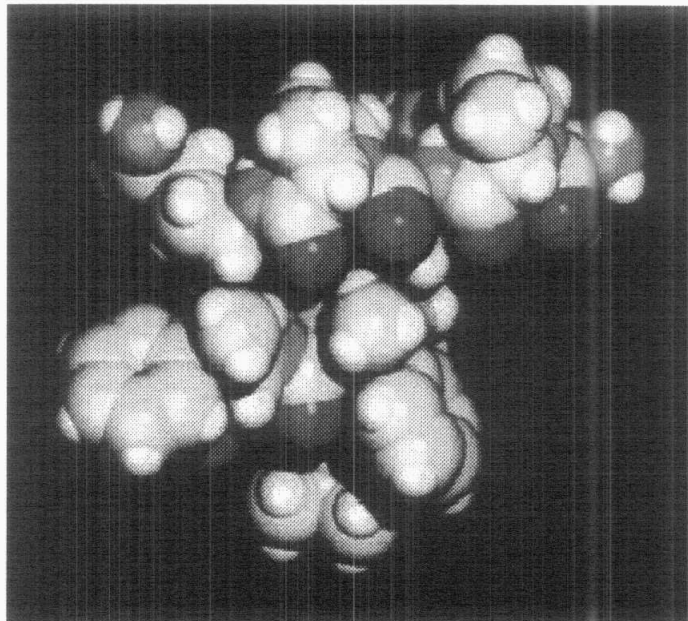
carácter neurotransmisor de la Sustancia P (Olgart et al, 1977; Nicoll et al, 1980; Pernow, 1983; Otsuka y Yoshioka, 1993).

### I.5.2 Estructura y Propiedades químicas

La SP es un péptido de once aminoácidos con peso molecular de 1347,6 y cuya secuencia es (figura 8):



La SP es soluble en agua y alcohol, insoluble en éter y cloroformo. Tolera ebullición a pH entre 1-7 y es rápidamente destruida en medio alcalino. En electroforesis se desvía hacia el cátodo a  $\text{pH} < 10$  y su punto isoeléctrico esta próximo a 9. La actividad biológica de la SP es inactivada por Tripsina y Pepsina, y resiste la acción de las carboxipeptidasas.



**Figura 8. Imagen tridimensional de la molécula SP**

### **I.5.3 Distribución**

La SP se distribuye en el Sistema Nervioso de todas las especies animales vertebradas siendo su concentración inversamente proporcional a la diferenciación de las especies. Predomina en la sustancia gris sobre la sustancia blanca. Estudios de radioinmunoensayo e inmunohistoquímicos han establecido la existencia de SP en la mayoría de las regiones del SNC. Se ha detectado SP en somas celulares de más de treinta regiones cerebrales, que incluyen troncoencéfalo y médula espinal, así como una extensa red de proyecciones axonales.

En corteza cerebral se localiza en las áreas somatomotora, somatosensorial, visual y olfatoria. También hallamos SP en núcleos amigdalares del hipocampo, cápsula interna y septum.

A nivel subcortical es donde se hallan los mayores niveles del péptido; los núcleos caudado y putamen presentan la mayor densidad de somas celulares conteniendo SP con proyecciones de fibras axonales a la sustancia negra, convirtiendo el área estriado-nigral en la principal concentración del péptido.

En troncoencéfalo se distribuye entre los principales núcleos neuronales y, en médula espinal, se localiza preferentemente en las astas posteriores (Tabla 7).

**Tabla 7. Concentraciones regionales de la Sustancia P**

<b>Región cerebral</b>	<b>Sustancia P (PMOL/ G TEJ)</b>
Hipotálamo	133.8+/- 21.3
Núcleo caudado	112+/-12.1
Globus pálido	518+/-151.4
Sustancia negra	921.6+/- 155.9
Corteza cerebelosa	0.3+/- 0.1

En el sistema nervioso periférico se localiza principalmente en las neuronas sensoriales primarias de los ganglios espinales, cadena cervical simpática, así como en los ganglios yugular, nodoso y trigeminal.

En el resto del organismo está ampliamente distribuido, localizándose alrededor de los vasos sanguíneos o como terminales nerviosos en la mayoría de los tejidos y órganos; así, se ubica en piel, glándulas sudoríparas, folículos pilosos, pulpa dentaria, aparato respiratorio, genitourinario, cardiovascular y en los plexos miénterico y submucoso del sistema digestivo, (Pernow,1983).

#### **1.5.4 Cotransmisión**

Las neuronas que poseen SP interactúan o coexisten con grupos neuronales productores de monoaminas, acetilcolina, aminoácidos y otros neuropéptidos. Algunos ejemplos son:

- SP y Catecolaminas, (Glowinski et al, 1980; Cassam et al, 1999).
- SP y Serotonina, (Hökfelt et al, 1980).
- SP y Acetilcolina, (Belcher et al, 1977).
- SP y otros neuropéptidos: NKA (Dalsgaard et al, 1985; Maggi, 2000), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), Glutamato (Xu et al, 1992) y Galanina (Wiesenfeld-Hallin et al, 1984; 1992).

#### **1.5.5 Almacenamiento y Liberación**

Diversos estudios realizados por Von Euler, (1963) sobre los lugares de almacenamiento en tejido neuronal demostraron fracciones granulares conteniendo al péptido.



Técnicas de radioinmunoanálisis e inmunohistoquímica, utilizadas por Schenker et al (1976) y Barber et al (1979), llevaron al conocimiento de la localización sináptica de la SP.

La liberación de la SP ha sido ampliamente estudiada tanto *in vitro* como *in vivo*. La primera evidencia de que la SP ejerce una acción despolarizante sobre las neuronas motoras espinales, fue descrita por Otsuka et al, (1972); dicho autor demuestra por primera vez la liberación de SP desde la médula espinal al realizar electroestimulación en ratas recién nacidas. Los resultados obtenidos dieron pie a la formulación de hipótesis sobre la implicación del péptido en la transmisión de la sensibilidad nociceptiva, (Otsuka y Konishi, 1976).

#### **1.5.6 Metabolismo**

Una vez liberado el péptido, como respuesta a un estímulo despolarizante, es inactivado por el ataque enzimático sin que participen procesos de recaptación por el terminal nervioso.

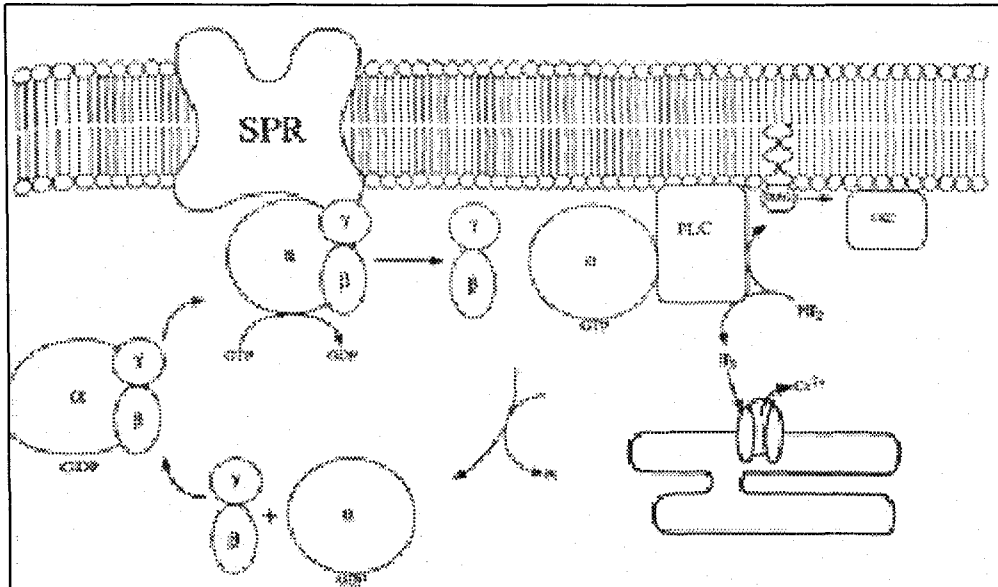
Los autores Benuck y Marks, (1975) describieron una endopeptidasa neutral parcialmente purificada a partir de cerebro de rata con capacidad proteolítica sobre la SP.

La endopeptidasa neutral es un enzima localizado en la superficie de las células que poseen receptores de Taquicininas. Produce la inactivación por tanto de múltiples péptidos, entre ellos la SP. Se ha estudiado la modulación de la actividad de este enzima por diferentes agentes tales como irritantes inhalados (tolueno, humo de tabaco), infección viral respiratoria, que actúan inhibiendo la endopeptidasa mientras que los corticoides, potencian su respuesta, (Nadel, 1990; 1991).

### **I.5.7 Mecanismo de acción**

Desde el punto de vista electrofisiológico la SP presenta características comunes a un transmisor tipo excitador, es decir, su acción conlleva un aumento de la conductancia al ión potasio en la membrana neuronal, que mediada de forma primaria por una proteína G, incrementa la excitabilidad y da origen a la despolarización neuronal, (Flórez et al, 2003). Aplicaciones de SP en el núcleo medial de la amígdala y putamen provocan una fuerte y prolongada aceleración de la descarga espontánea neuronal, que persisten cierto tiempo después de la retirada de la SP.

La SP ejerce su actividad biológica al unirse a su receptor NK1. La unión del péptido al receptor da lugar a la activación del complejo asociado a la proteína G, compuesta por distintas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; ello conlleva un intercambio de GDP (Guanosinbifosfato) a GTP (Guanosintrifosfato) en la subunidad  $G_\alpha$ , la cual activa la fosfolipasa C. Este enzima cataliza la conversión de fosfatidilinositol bifosfato a inositoltrifosfato ( $IP_3$ ) y Diacilglicerol. El  $IP_3$  libera calcio hacia el citosol desde los depósitos intracelulares y el Diacilglicerol activa una Proteína Kinasa C. La actividad de la subunidad  $G_\alpha$  es regulada por una enzima GTPasa, que conlleva nuevamente a la configuración inicial de reposo del complejo proteico G, reuniéndose las tres subunidades (Figura 9). El calcio intracelular activa los canales de cloro y la respuesta celular. La proteinkinasa activa induce la expresión de ARNm y la síntesis proteica. Tras la activación, el receptor es rápidamente desensibilizado (Krause et al, 1992; Vigna, 2001).



**Figura 9. Mecanismo de acción SP**

### **I.5.8 Propiedades de la SP**

La SP está considerada como uno de los neurotransmisores excitadores más potentes que actúan en el SNC además de ejercer otras actividades en el resto del organismo. Destacan las siguientes acciones:

#### *a) Sistema Nervioso Central*

##### **- CórteX cerebral**

A nivel cortical aumenta la actividad neuronal de forma intensa y duradera. Se ha comunicado niveles más bajos de SP en pacientes con Enfermedad de Alzheimer que presentan alteraciones en corteza cerebral (Barker, 1991).

##### **-Sistema Hipotálamo- hipofisario**

La liberación de SP da lugar a la activación del tracto hipotálamo-hipofisario, con un aumento de las hormonas hipofisarias, (Beartschi et al, 1981).

#### -Sistema Estriado-Nigral

Diversos estudios han demostrado la liberación de Dopamina en Sustancia Negra por la SP, (Jessell, 1978). La complejidad de las acciones de la SP en esta localización se deba probablemente a su interacción con otros neurotransmisores, como por ejemplo el GABA; la interacción de los tres sistemas GABA, SP y Dopamina en el área nigro-estrial contribuye al control del tono neuronal de la vía extrapiramidal (Somogyi et al, 1982).

#### -Interacción con distintos grupos neuronales

Actuando como neuromodulador de neuronas conteniendo catecolaminas, Acetilcolina, Serotonina, GABA y otros neuropéptidos, (Ver apartado de Cotransmisión).

#### - Sistema límbico

La presencia de SP en ciertas áreas como la amígdala sugiere su participación en el comportamiento emocional.

#### - Médula espinal

La distribución preferencial en el asta dorsal, en concreto en las láminas I y II, sugirió que la SP estaba involucrada en la transmisión central de modalidades sensoriales específicas. Los estudios llevados a cabo por (Henry et al, 1975; 1976) indicaron que la SP participa en la transmisión de la sensibilidad nociceptiva, ejerciendo el papel de neurotransmisor de la primera neurona sensitiva. Estudios electrofisiológicos, demuestran que tras aplicación por iontoforesis de SP sobre las astas posteriores sólo estimula las neuronas relacionadas con la nocicepción, (Radhakrishnan et al, 1991). Asimismo se ha comprobado que participa de forma importante en la transmisión del estímulo doloroso de alta intensidad así como en el mantenimiento de la hiperalgesia, (Manthy et al, 1995).

### *b) Aparato Digestivo*

En la actualidad el papel y la distribución de las TK en el tracto gastrointestinal son bien conocidos gracias a los trabajos de investigación que diversos autores han venido realizando durante algo más de dos décadas, (Furness y Costa, 1987), (Holzer y Holzer-Petsche, 1997).

Los tres subtipos de receptores de TK se expresan en neuronas entéricas, músculo liso, células epiteliales, sistema inmune y vasos sanguíneos. La SP está implicada junto con las restantes TK en las funciones de secreción de fluidos y electrolitos, motilidad intestinal, vascularización e inmunitaria; se habla incluso de la regulación taquicinérgica intestinal y del probable papel de los receptores de dichas sustancias como dianas terapéuticas.

### *c) Riñón y sistema urinario*

La SP es actualmente reconocida como sustancia natriurética y diurética, actuando a nivel central y localmente, favoreciendo el flujo sanguíneo.

### *d) Aparato respiratorio*

En la década de los 80 se comenzó a implicar a la SP en la regulación de la resistencia de las vías aéreas, tras observar el edema subepitelial y la broncoconstricción inducidos por la estimulación de aferencias vagales que contenían SP (Lundberg et al, 1983). Hoy día se sabe que los pacientes asmáticos presentan un aumento en la expresión del RNK1 en bronquios junto con una hiperrespuesta a la SP (O'Connor et al, 2004).

### *e) Sistema circulatorio*

La SP es uno de los vasodilatadores conocidos más potentes; su capacidad vasodilatadora es 100 veces mayor que la de las Bradicininas. Clásicamente, la

inyección intradérmica de SP en el hombre da lugar a una respuesta tipo histamina, con habón, prurito y enrojecimiento, lo que confirma su capacidad de liberar histamina para mediar algunas de sus acciones vasculares. La SP está implicada en la denominada vasodilatación neurogénica; se trataría de neuronas extrínsecas de tipo sensorial las cuales rodean los vasos sanguíneos adyacentes, (Furness et al, 1982).

*f) Sistema visual*

La SP participa como mediador en la respuesta ocular ante sustancias químicas irritantes. Produce tras su liberación hiperemia y miosis que provoca de forma secundaria hipertensión ocular por bloqueo capilar (Camras y Bito, 1980). Recientemente han sido identificados RNK1 y RNK2 en las arteriolas de la retina (Gaspar et al, 2004).

*g) Cadena ganglionar Simpática*

La SP, según estudios inmunohistoquímicos, formaría parte del arco reflejo no colinérgico intestinal proporcionando así una conexión funcional entre neuronas simpáticas y sensoriales; dotando a éstas de funcionalidad y no como meras transductoras de información (Dun y Jiang, 1982). Otros estudios hablan de una regulación de la actividad simpática en los ganglios por la SP (Kessler y Black, 1982).

## **I.5.9) FISIOPATOLOGIA**

### **- SP y Nocicepción**

La SP está implicada en la percepción del dolor siendo liberada desde las terminaciones sensitivas periféricas y astas posteriores de médula espinal en respuesta a estímulos dolorosos (Hökfelt et al, 1975; y Bowery, 1995). La participación de la SP en la transmisión del estímulo doloroso es un hecho comprobado y admitido desde hace décadas. Son numerosos los trabajos que han ido aportando a lo largo de este tiempo múltiples evidencias: la distribución anatómica en los ganglios espinales, trigeminal y en astas posteriores de médula espinal, con una concentración mayor en las láminas I-II, donde llegan las fibras amielínicas A $\delta$  y C, que transmiten la sensibilidad dolorosa; se ha comprobado liberación del péptido como respuesta a un fenómeno inflamatorio o tras estímulo doloroso (Schaible et al, 1990; Sánchez , 2001; Díaz, 2002; Zamarrigo, 2003), así como un aumento de la expresión del RNK1 en la superficie de las astas posteriores (Krause et al, 1995). Mantyh et al, (1995) concluyen tras su estudio que los fenómenos inflamatorios podrían causar una reorganización de las vías implicadas en la nocicepción, al demostrar que los RNK1 de neuronas de astas posteriores sufren un proceso de endocitosis reversible ante un estímulo nociceptivo.

### **- SP e Inmunidad**

La SP desempeña un papel de neuroinmunomodulador, relacionándose fundamentalmente su actividad con el sistema mononuclear-fagocítico. Posee una regulación autocrina en diversas células, entre las que se hallan los macrófagos, los cuales poseen RNK1 y segregan SP (Lucey et al, 1994). Puede estimular la proliferación de linfocitos T, la diferenciación de linfocitos B, la producción de anticuerpos, la actividad oxidativa de la fagocitosis en los macrófagos, la degranulación de los mastocitos y la quimiotaxis de polimorfonucleares (Scicchitano et al, 1988; McGillis et al, 1990). En monocitos

de sangre periférica estimula la producción de Interleucinas (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12) y TNF- $\alpha$  (Ho et al, 1996b).

TNF- $\alpha$  es una de las principales moléculas que favorecen la expresión del VIH tipo 1 en Linfocitos T y monocitos (Rosenberg et al, 1992). En conexión con lo anterior, se ha sugerido una posible relación entre la SP y la enfermedad por VIH, como lo refrendan los estudios en niños infectados por el virus, los cuales tienen niveles superiores de SP respecto del grupo control, y los estudios in vitro con macrófagos donde se demuestra la modulación de la replicación del virus por el péptido (Lai et al, 2001).

#### - SP e Inflamación

Los neuropéptidos y citoquinas son elementos fundamentales en la intercomunicación de los Sistemas nervioso e inmunitario. La interrelación de la SP con el Sistema inmune ha sido tema de investigación de diversos autores y, se ha comprobado que, en el denominado proceso de inflamación neurogénica, la SP es un elemento clave al favorecer la permeabilidad capilar y la extravasación de los componentes del sistema inmune; así la SP ha sido implicada en la patogénesis de la migraña produciendo extravasación plasmática en la duramadre al ser liberada desde aferencias sensoriales del Trigémino, (Moskowitz et al, 1993).

La SP interviene en el control neurogénico de la inflamación pudiendo iniciar o exacerbar algunas condiciones inflamatorias crónicas fuera y dentro del SNC, tales como Esclerosis Múltiple, Enfermedad de Alzheimer, Psoriasis, Artritis autoinmune o Asma, (Gilbert y Payan, 1991; Ho et al, 1998). Se han hallado niveles elevado de SP, los cuales se han correlacionado con fases de actividad, en distintas enfermedades inflamatorias tales como Colon irritable, Artritis reumatoide y patología inflamatoria respiratoria (asma, sarcoidosis, bronquitis crónica) (O'Connor et al, 2004).



La elevada densidad de receptores para la SP en las células gliales sugiere una participación del péptido en los mecanismos de respuesta de la glia frente a las agresiones al SNC. Se ha podido evidenciar un aumento de la expresión de RNK1 en astrocitos reactivos tras la sección experimental del nervio óptico (Mantyh et al, 1989). En dichas células induce la síntesis de citoquinas, tales como Interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) y TNF- $\alpha$ ; todas ellas relacionadas con procesos inflamatorios del SNC.

#### - SP y Depresión

La SP y su RNK1 están presentes en las áreas cerebrales relacionadas con el control de la respuesta a situaciones de estrés y de la conducta afectiva. En estas áreas coexiste e interacciona con otros neurotransmisores, implicados a su vez en estas funciones, tales como Serotonina y Norepinefrina, actuando probablemente como modulador en ambos sistemas. A partir de estos hechos Kramer y Rupniak han venido desarrollando una línea de investigación en el área del comportamiento ante el estrés y su control farmacológico (Kramer et al, 1998; Rupniak et al, 2000).

#### -SP y Cáncer

Estudios realizados desde hace dos décadas en cultivos celulares de fibroblasto y de SCLC (Rozengurt et al, 1983) demuestran que, al igual que los denominados factores de crecimiento, ciertos neuropéptidos están implicados en el control de la proliferación celular comportándose como tales. Se ha comprobado su capacidad de unión a diferentes receptores y de generar múltiples señales intracelulares las cuales, al interactuar sinérgicamente, iniciarían una respuesta proliferativa (Woll y Rozengurt, 1988).

Destacan los trabajos llevados a cabo sobre líneas celulares de fibroblastos de ratón (Swiss 3T3) y de Cáncer de pulmón de células pequeñas humano (SCLC), las cuales expresan receptores para múltiples neuropéptidos, entre los que se encuentran la SP. Sus receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a la Proteína G, y tienen en común el mecanismo de acción

postreceptor con movilización de los depósitos de Calcio intracelular (Sethi et al, 1992).

Los hallazgos anteriores llevaron a varios autores a sugerir que el crecimiento de dichos tumores pudiera estar regulado por diferentes circuitos autocrinos y paracrinos, (Carney et al, 1987; Zachary et al, 1987; Langdon et al, 1992).

## **I.6 ANTAGONISTAS DE LA SP**

El desarrollo de moléculas con capacidad selectiva para unir específicamente los receptores de la SP y bloquear la acción del mismo ha permitido profundizar en el conocimiento del neuropéptido y su papel en situaciones patológicas. Los primeros pasos en la síntesis de dichas sustancias fueron realizados por Folkers et al, (1981) y posteriormente por Regoli et al, (1984) y otros (Dutta et al, 1986), modificando aminoácidos del extremo C-terminal por residuos D-aminoácidos y otras modificaciones como N-metilación o incorporación de residuos lactámicos obteniendo antagonistas específicos de la SP con ninguna o insignificante actividad agonista.

Las limitaciones que presentaban los antagonistas peptídicos, su menor afinidad al receptor así como su inestabilidad metabólica y una rápida inactivación por peptidasas, motivaron la ampliación de la investigación hacia moléculas no peptídicas con capacidad de unión a los receptores de las Taquicininas.

Snider et al, (1991) informaron sobre el primer antagonista no peptídico NK1, CP96,345; en una revisión de Quartara y Maggi, (1998), el listado de moléculas descritas como Antagonistas no peptídicos con especificidad para el RNK1 humano era de 38. Los antagonistas no peptídicos pueden ser amonios

cuaternarios derivados de la quinuclidina, análogos de la piperazina y los compuestos piperidínicos, entre otras estructuras químicas.

Por otra parte, el avance en el conocimiento de la estructura de los RNK, de sus lugares de unión, e incluso las teorías de diferentes subtipos de RNK1 ha permitido profundizar en el papel fisiológico y en la fisiopatología de la SP. La secuencia del gen del RNK1 ya es conocida y la clonación del receptor ha sido posible; todo ello junto con el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha dado lugar a la formulación de nuevas drogas; se habla de la participación de los distintos tipos de RNK en una misma patología y se están ensayando antagonistas con capacidad de acción sobre NK1 y NK2 (Prasanna et al, 2004).

Entre los principales campos de investigación donde se han estudiado estas moléculas destacan el área del dolor y la inflamación, su participación en las enfermedades con base inmunológica, terapia antitumoral, control de la emesis postquimioterapia, depresión mayor y trastornos relacionados con el control emocional. Se describen los más efectivos en dichas áreas.

### **I.6.1 Clasificación**

#### **- Antagonistas peptídicos**

La serie de antagonistas utilizados es muy extensa y nombramos aquellos de mayor potencia:

- $\alpha$ -D-Arg<sup>1</sup>, D-Trp<sup>5,7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>] SP
- $\alpha$ -D-Arg<sup>1</sup>, D-Pro<sup>2</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>] SP
- $\alpha$ -D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>] SP
- $\alpha$ -Arg<sup>6</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, MePhe<sup>8</sup>] SP (6-11)
- $\alpha$ -D-Pro<sup>2</sup>-Trp<sup>7,9</sup>] SP
- $\alpha$ -D-Arg<sup>1</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>] SP ( Spantide I)
- H-D-Lys(Nicotinoyl)-Pro- $\beta$ -(3-pyridyl)-Ala]-pro-D-Phe<sup>83,4-Cl<sub>2</sub></sup>-Asn-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH<sub>2</sub> (Spantide II)
- $\alpha$ -D-Pro<sup>4</sup>, D-Trp<sup>7,9,10</sup>, Phe<sup>11</sup>] SP (4-11)

- Antagonistas peptídicos de cadena corta: NY 3238, NY 3460, NY 3521

- *Antagonistas no peptídicos*

Desde el punto de vista clínico, debemos destacar el papel que desempeñan los antagonistas selectivos del RNK1, tales como: CP-96345, CP-99994, RP-67580, L-733,060, SR-1400333, GR-203040, RP-67580, MEN-11467, MEN-11149, Vofopitant (GR-205171), CP-122721, Ezlopitant (CJ-11,974), CJ-12,458 y CJ-12,764 (metabolitos activos de Ezlopitant), MK-869 (L-754030), L-758298, L-742694 y L-759274.

### **I.6.2 Acciones**

- En la nocicepción

Los estudios iniciales con animales demostraron efectos analgésicos de los antagonistas, algunos mediados centralmente, (Laird et al, 1993; Rupniak et al, 1996).

Sin embargo algunos trabajos recientes han llegado a resultados contradictorios en cuanto a la capacidad de control del dolor por los antagonistas de RNK en patologías como migraña (Goldstein et al, 1997), neuropatías periféricas (Coudore et al, 1988) y osteoartritis (Rupniak y Hill, 1999).

- En el VIH

CP-96,345 en ensayos in vitro con macrófagos de sangre periférica infectados por el virus VIH ha provocado una intensa inhibición sobre la replicación del virus en estas células; los autores postulan que tal efecto es consecuencia de la unión del antagonista al RNK1 bloqueando el circuito autocrino de la SP en los macrófagos afectados (Lai et al, 2001).

- En la emesis postquimioterapia

Una de las áreas de investigación donde más se han estudiado los antagonistas no peptídicos ha sido el control de la emesis inducida por quimioterapia y tras intervenciones quirúrgicas abdominales. La distribución de la SP en las fibras vagales aferentes gastrointestinales y en las áreas eméticas del troncoencéfalo, y la capacidad inductora del vómito intravenosa, hicieron pensar en un posible papel del péptido en las respuestas eméticas.

Vofopitant (GR-205171), CP-122721, Ezlopitant (CJ-11974), MK-869 (L-754030) y su profármaco L-758298 han sido los cinco antagonistas no peptídicos, con elevada selectividad para el receptor NK1, estudiados inicialmente en humanos. Estos han demostrado ser altamente eficaces en el control de náuseas y vómitos, secundarios al tratamiento quimioterápico, sin provocar efectos adversos importantes en los ensayos clínicos correspondientes (Navari et al, 1999; Diemunsch y Grelot, 2000; Campos et al, 2001).

- Sobre la depresión y los trastornos de ansiedad.

La SP y su RNK1 están presentes en las áreas cerebrales relacionadas con el control de la respuesta a situaciones de estrés y de la conducta afectiva. En estas áreas coexiste e interacciona con otros neurotransmisores, implicados a su vez en estas funciones, tales como Serotonina y Norepinefrina, actuando probablemente como modulador en ambos sistemas.

La investigación llevada a cabo por los autores Kramer y Rupniak demostró la capacidad antidepresiva del antagonista NK1 específico MK-869 y de la implicación de la SP en el control anímico. Un estudio multicéntrico, doble ciego, fue realizado en pacientes con Depresión mayor. El fármaco fue administrado oralmente durante seis semanas, siendo bien tolerado; no mostró diferencias significativas en la aparición de efectos adversos respecto al

placebo. La eficacia del MK-869 fue comparable al antidepresivo paroxetina, inhibidor de la recaptación de Serotonina (Kramer et al, 1998; Rupniak et al, 2000).

Estudios neuroquímicos recientes en animales confirman en ensayos experimentales de conducta el efecto antidepresivo de los siguientes antagonistas no peptídicos utilizados oralmente: MK-869 (10 mg/kg), L-742694 (10 mg/kg), L-733060 (10 mg/kg), CP-99994 (30 mg/kg), y CP-122721 (3-30 mg/kg), (Varty et al, 2003). L-759274, antagonista selectivo del RNK1, ha mostrado ser igualmente eficaz y seguro en el tratamiento oral de la Depresión mayor (Kramer et al, 2004).

#### - Sobre la patología intestinal

En la actualidad se encuentran en ensayo clínico antagonistas no peptídicos en ciertas patologías de origen intestinal donde se ha evidenciado cambios en el sistema de las Taquicininas, como el Síndrome del colon irritable o la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Evangelista, 2001).

Se ha estudiado el efecto de L-733,060 en ratones con lesión hepática provocada por lipopolisácaridos bacterianos y proponen a los antagonistas RNK1 como posibles agentes terapéuticos en la enfermedad inflamatoria hepática, al aumentar la síntesis de interleucinas hepatoprotectoras IL-6 e IL-10 (Bang et al, 2003).

#### - Efecto antitumoral

MEN 11467 y MEN 11149, altamente selectivos para los RNK1 humanos han sido estudiados in vitro e in vivo en cultivos celulares de Astrocitoma humano grado III y en Xenoinjerto del tumor implantado subcutáneamente en ratones atímicos. Los resultados obtenidos fueron de una inhibición duradera

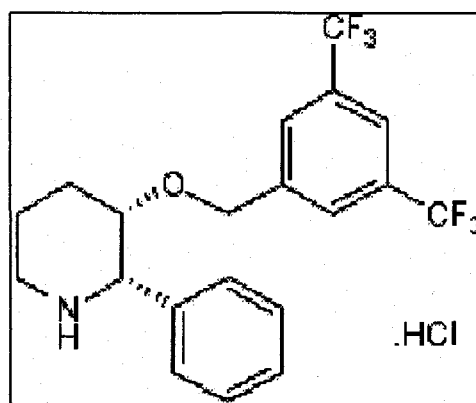
aunque no irreversible del crecimiento celular y del implante tumoral (Palma et al, 2000).

- En el Sistema nervioso central

Estudios con antagonista NK1 específicos han evidenciado la participación de la SP y su receptor NK1 en los efectos y lesiones degenerativas a nivel del cuerpo estriado ocasionadas por el consumo de drogas (ver siguiente apartado).

### 1.6.3 L-733,060

La molécula utilizada en nuestro estudio ha sido (2S, 3S)-3-(3,5-bis(trifluorometil) fenil] methoxi)-2-fenylpiperidina, un potente y selectivo antagonista del receptor de la SP (NK1), cuyo peso molecular es 438.9. La afinidad al receptor NK1 humano es una de las más elevadas,  $K_i: 0.8 \text{ nM}$  (Harrison et al, 1994). Traspasa fácilmente la barrera hematoencefálica, con una acción prolongada en SNC (figura 10).



**Figura 10. Estructura molecular L-733,060**

L-733,060 ha sido utilizado, vía intravenosa en estudios pilotos mostrando una acción analgésica, la cual es mediada a nivel del SNC,

retrasando las conductas tardías, tras estimulación nociceptiva, con una DE (50) de 0.2nM, sugiriéndose un posible papel como analgésico de acción central (Rupniak et al, 1996). Asimismo se ha descrito una acción ansiolítica en ensayos de experimentación animal, suprimiendo las repuestas de comunicación oral en crías de cobayas tras separación materna, a dosis intraperitoneal o subcutánea de 3 mg/kg; posteriormente en estudios pilotos ha sido administrado vía oral, a 10mg/kg, mostrando similares efectos antidepressivos a los fármacos utilizados convencionalmente (Varty et al, 2003).

L-733,060 ha sido estudiado en un modelo animal de hepatitis provocado por lipopolisacáridos bacterianos. Los resultados de la investigación han mostrado una acción preventiva, dosis dependiente, del daño hepático mediado por la SP, procedente de las aferencias nerviosas periportales; el antagonista NK1 humano tras su unión con el RNK1 ha bloqueado la respuesta proinflamatoria de las citoquinas en los hepatocitos y la apoptosis celular hepática, ambas mediadas por la SP. Los resultados obtenidos sugieren un posible uso terapéutico de L-733,060 en las enfermedades hepáticas de base inmune (Bang et al, 2003; 2004).

La SP vía receptor NK1 es uno de los mediadores de los efectos psicoestimulantes de cocaína y anfetaminas (Loonam et al, 2003), y responsable en parte de la degeneración de las terminaciones dopaminérgicas nigroestriatales secundaria al consumo de estas drogas. L-733,060 ha sido una de las moléculas empleadas en el estudio experimental en ratones que confirmó el papel de la SP y su RNK1 en la lesión degenerativa en el área nigroestriada inducida por metanfetamina, la cual aumenta los niveles de SP en el estriado, (Yu et al, 2002). Estos hallazgos abren nuevas vías terapéuticas a enfermedades degenerativas como la Enfermedad de Huntington y el Parkinson, y un nuevo aspecto a considerar en la terapia frente a la adicción a drogas.



## **HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

Los procesos tumorales malignos continúan siendo la primera causa de muerte por enfermedad en el grupo de edad pediátrico. La incidencia de las formas de cáncer invasor se ha visto incrementada en los últimos años a pesar del descenso de las cifras de mortalidad y de la mejora en la supervivencia para la mayoría de los cánceres de la niñez.

En cuanto al Neuroblastoma, se trata del tercer tumor pediátrico más frecuente y el más diagnosticado en lactantes; supone en torno al 35% de las neoplasias malignas neonatales. La tasa de incidencia se sitúa entre el 8-10% de todos los cánceres infantiles. A pesar de los avances en la terapia de estos tumores las cifras de supervivencia en el grupo de alto riesgo, tras tratamientos de rescate, se hallan entre el 20-50% a los 5 años.

La causa del NB sigue siendo desconocida pero algunos estudios han relacionado factores de crecimiento y neuropéptidos en su patogénesis así como en el proceso de maduración y autorregulación.

El papel de ciertos neuropéptidos, entre ellos la SP, como factores mitogénicos es un hecho admitido por numerosos autores. Además en diferentes células normales y tumorales se ha podido demostrar la síntesis de SP y la expresión del RNK1, siendo mayor en estas últimas.

La SP tras la activación de su receptor NK1 (RNK1) favorece el crecimiento tumoral y su progresión en tumores tan distintos como Gliomas, Carcinoma de Mama o Tumor carcinoide. Hoy día sabemos que más de un 90% de las metástasis de NB producen SP.

Por otro lado, el desarrollo de moléculas con acción selectiva sobre los RNK1 ha ampliado los conocimientos respecto al papel de la SP y del RNK1 en la patogénesis de los tumores, en estudio in vitro e in vivo. El antagonista NK1, L-733060, ha sido utilizado en ensayo preclínico para otros fines terapéuticos distintos al cáncer.

Por todo ello, parece probable que la SP desempeña un papel relevante en la carcinogénesis. No obstante no se ha conseguido establecer en la actualidad una estrecha relación entre este importante tumor de la infancia y dicho neurotransmisor.

Como consecuencia de lo expuesto con anterioridad, nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

1. Existe en el NB receptores de la SP.
2. La SP, tras la unión con su receptor NK1, provoca el crecimiento tumoral del NB.
3. La aplicación de un antagonista del receptor NK1 inhibe la proliferación tumoral del NB.
4. El efecto inhibitorio provocado por el antagonista NK1, en el NB, es revertido tras la aplicación de nuevo de la SP.

Basándonos en estas hipótesis, planteamos la realización de un estudio, cuyos objetivos son:

-Determinar la presencia de receptores NK1 en la línea celular humana de NB SK-N-BE (2).

-Valorar la posible mitogénesis de la SP en la línea celular humana de NB SK-N-BE (2).

- Evaluar la posible actividad inhibitoria del Antagonista NK1 específico L-733,060 sobre la línea celular humana de NB SK-N-BE (2).

- Valorar la inhibición del crecimiento celular y establecer su relación con la dosis del antagonista y el tiempo de actuación.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **III.1 CULTIVO CELULAR**

#### **III.1.1 Material**

##### **A) Aparatos y material para cultivo celular**

Para la realización de esta Tesis, se han utilizado los medios técnicos y materiales siguientes:

- Campana de flujo laminar vertical con sistema de luz U.V. (ultravioleta), (Glatt Labortechnik).

- Incubadora de células con atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire, 95% de humedad parcial y una temperatura de 37°C, (Thermoforma 310).

- Microscopio óptico (Nikon AFX-DX, Japan).

- Microscopio invertido Olympus CKX 41 (Olympus optical España, SA. Barcelona Spain).

- Baño termostático.

- Centrifuga SIGMA 4K10.

- Cámara de recuento celular tipo Neubauer (Kova Slide 10 with grids, Hycor Biomedical, CA, USA).

- Frasco de cultivo tipo Costar (Falcon, Heidelberg; Germany).

- Pipetas serológicas (Falcon, Becton Dickinson, France).

- Pipetas digitales (Gilson Medical Electronics, France).

-Pipeto digital.

- Frascos de cultivo de 250 ml (Falcon, Heidelberg; Germany).

- Filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  (Schleicher & Schuell FP030/3).

-Tripsina (0.05% and 0.02% EDTA without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , Sigma-Aldrich Co, LTD, UK).

- Azul Tripán (Sigma- Aldrich Co, LTD, UK).

- Materiales estériles diversos.

## B) Línea celular

En nuestro estudio, se han utilizado células que proceden de una línea celular de neuroblastoma humano denominada *SK-N-BE (2)*; dicha línea fue proporcionada en el Centro de cultivos celulares americano ATCC (American Type Culture Collection) por Biedler JL (1978).

La línea celular *SK-N-BE (2)* fue establecida en 1972 a partir de una metástasis de médula ósea tomada de un niño con neuroblastoma diseminado, tras repetidos ciclos de quimioterapia y radioterapia. Las características de la línea celular quedan recogidas en la tabla 8.

**Tabla 8. Características de la línea celular SK-N-BE (2)**

Código ATCC	CRL-2271
Tejido	Neuroblastoma. Lugar metástasis: médula ósea
Morfología	Neuroblasto
Cariotipo	Número modal de cromosomas:44
Subcultivo	Las células crecen de forma mixta, adheridas a la base del frasco de cultivo y otras formando agregados celulares en flotación; sustituir el medio de cultivo cada 2-3 días
Medio de cultivo	90% Medio esencial de Eagle y medio F12 de Ham en proporción 1:1; 10% Suero bovino fetal
Tiempo de duplicación	30 horas
Medio de congelación	Medio de cultivo, 95%; DMSO, 5%



### C) Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado estaba compuesto por la solución estándar RPMI-1640 (Gibco Lab., Grand Island, NY), enriquecido con suero bovino fetal inactivado al 10% (Gibco Lab., Grand Island, NY), HEPES Buffer 10 mM (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, USA), 2 mM L-glutamina, 100 units/ml Penicilina y 100 µg/ml Estreptomina (Bio Whittaker Europe). Este medio aporta más nutrientes a la célula, y por ello se sustituyó por el medio estándar indicado en la tabla 8.

### III.1.2 Método

El cultivo celular es el mantenimiento de las células in vitro, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

#### - Normas generales de manipulación

La manipulación de las células en cultivo debe seguir unas normas muy estrictas de asepsia. Se trabaja siempre dentro de una campana de flujo laminar vertical, la cual es sometida durante 30 minutos aproximadamente a luz ultravioleta. Normalmente se utiliza una llama de un mechero de alcohol con el que se refuerzan las medidas contra una posible contaminación, además del uso rutinario de guantes estériles.

Los medios de cultivo, las soluciones y todos los materiales que entran en contacto con las células han de estar esterilizados, normalmente por uso de filtros de 0.22 µm de diámetro de poro. Además, estas soluciones se calientan en un baño de agua a 37°C antes de entrar en contacto con las células.

### - Siembra de cultivo

La línea celular fue sembrada en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y 250 ml de capacidad a una concentración de 10<sup>5</sup> cel/ml con 20ml de medio de cultivo. Las células se introducían en incubadora a 37° C de temperatura en una atmósfera humidificada con 95% de aire / 5% de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo era renovado cada 48-72 horas en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo vertical laminar.

### - Preparación de Subcultivos

Tras 6 días de la siembra del cultivo, las células han crecido recubriendo toda la superficie del frasco en monocapa a la vez que han formado agregados celulares en suspensión. A continuación se procede a tripsinizar el cultivo para la realización de subcultivos y proseguir el mantenimiento de la línea celular. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

#### a) Separación celular

Bajo condiciones de esterilidad, se decanta el medio de cultivo del frasco, se añaden 5 ml de Tripsina previamente calentada a 37° C, y se mantiene en incubadora durante 5 minutos. La tripsina actúa disgregando las células y separando la monocapa adherida a la base del frasco de cultivo.

Transcurrido el tiempo en incubadora, se añade al frasco 5 ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Se aspira y expelle con la pipeta, el volumen hasta conseguir una suspensión celular homogénea. A continuación se pasa la suspensión celular a un frasco estéril de cultivo.

## b) Recuento celular

La cámara de Neubauer es una cámara de recuento adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Para determinar la viabilidad celular se utiliza la tinción de las células con azul tripán. Este es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Las células muertas incorporan el colorante ( el citoplasma y el núcleo se tiñen de azul) y las células intactas, y por lo tanto viables, no se tiñen.

Tras el cálculo de la concentración celular en el medio, se inocula a cada nuevo frasco de cultivo  $10^5$  cel/ml y se añaden 20 ml de medio de cultivo. Se transfieren a incubadora a 37 °C con las condiciones de humedad y CO<sub>2</sub> previamente mencionadas.

### - Congelación y descongelación celular

En el procedimiento del mantenimiento de las células, uno de los pasos obligados es la congelación celular. Esta es necesaria para preservar las características originales de la línea celular así como para la obtención de reservas ante cualquier incidencia como por ejemplo la contaminación de los cultivos.

Después de la tripsinización, el total de la suspensión se centrifuga durante 3 minutos a 1500 r.p.m. (revoluciones por minuto) a temperatura ambiente. Se aspira el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 1 ó 2 ml de medio de congelación (mezcla de medio de cultivo con DMSO al 5% v/v). El DMSO actúa como agente crioprotector. Se alicuota rápidamente en uno o dos criotubos que se colocarán en un congelador de viales de células con isopropanol que permite una bajada paulatina de la temperatura a - 80°C. Cuando las células alcanzan una temperatura inferior a -50°C se almacenan en nitrógeno líquido (- 196°C) durante un largo periodo de tiempo (incluso durante varios años).

Para descongelar las células, se sacan los viales del contenedor de nitrógeno líquido y se descongelan rápidamente en un baño de agua 37°C. El DMSO debe retirarse del medio lo antes posible. Por ello, se vierte el contenido del vial recién descongelado en un tubo estéril, se homogeneiza con medio de cultivo fresco y se centrifugan las células 3 minutos a 1500 r.p.m. Se resuspende el tapón de células en medio fresco y ya se puede sembrar.

### **III.2 Detección del receptor NK1 en la línea celular SK-N-BE (2)**

#### **A) Extracción y cuantificación de proteínas del cultivo celular**

- Se procede al cultivo de la línea celular SK-N-BE (2) en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>.
- Se decanta el medio de cultivo y luego se lava con PBS (Buffer salino Fosfato) (Sigma-Aldrich) para retirar el resto de medio que haya podido quedar.
- Se tripsiniza con 1ml de Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) para poder despegar la monocapa adherida a la base del frasco.
- Se neutraliza la tripsina con PBS y se pasa la suspensión a tubos de 10 ml de PBS, centrifugar a 1000-1500 rpm durante 5 minutos; a continuación decantar el sobrenadante.
- Se resuspende el botón celular en 460 µL del tampón Igepal (gel detergente que extrae químicamente las proteínas celulares) y pasarlo, una vez homogeneizado, a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml (Eppendorf), mantener en hielo durante 5 minutos.
  - Preparación del tampón Igepal: Tampón HEN, que contiene 5mM EDTA, 250 mM ClNa, 50mM Hepes pH7.3, al cual se le añade 5mM DTT, Vanadato sódico 1mM y Igepal CA-630 al 0.2% y Cóctel inhibidor de proteasa al 1% (Sigma-Aldrich)
- A continuación se centrifuga a 13000 rpm en una microcentrífuga durante 15 minutos a 4°C. Extraer el sobrenadante (será la muestra problema que contiene las proteínas).

- Preparar tubos de 10ml (Falcon) para determinar la curva patrón. Para ello se utiliza albúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) a distintas concentraciones de 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{L}$ , a cada una de las concentraciones de BSA se añade 10  $\mu\text{L}$  del tampón Hen y luego se completa hasta 100  $\mu\text{L}$  con PBS. Ejemplo:

BSA	Solución HEN	PBS
0	10 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	85 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$
20 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	70 $\mu\text{L}$

- Preparar muestras con tres puntos ó concentraciones de la muestra problema (conteniendo las proteínas de la línea celular de neuroblastoma).

Muestra	Solución HEN	PBS
2 $\mu\text{L}$	8 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{L}$	0 $\mu\text{L}$	90 $\mu\text{L}$

- Añadir 5 ml del líquido de cuantificación de proteínas, diluido 1:5 con agua destilada, (kit protein assay de BIO Rad para el método Bradford) a todos los tubos preparados tanto con la curva estándar de BSA como las muestras. Se dejan reposar durante 15 minutos. A continuación se observa una gradación colorimétrica de menor a mayor intensidad según el número creciente de proteínas y luego pasar a leer para su cuantificación en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm (Beckman).

## **B) Detección de las proteínas por Western Blot**

Esta técnica consiste en la detección indirecta de proteínas mediante la hibridación con anticuerpos específicos de una membrana obtenida por la transferencia de un gel de poliacrilamida. Como control incluimos una línea celular de feocromocitoma de ratas, PC12.

Para cada muestra se utilizaron 50 µg de proteínas de neuroblastoma, las cuales fueron separadas mediante electroforesis con gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (Sigma-Aldrich) y luego transferidas a membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) (Sigma-Aldrich). Las membranas con las proteínas transferidas fueron incubadas con solución bloqueante, compuesta por leche desnatada al 5% y por un detergente no iónico PBS-T al 0.1% (PBS Tween-20, Sigma-Aldrich); seguidamente se incubaron durante toda la noche en el frigorífico (para evitar contaminación con bacterias y levaduras) con el anticuerpo específico (1º anticuerpo) contra el dominio del receptor NK1, correspondiente al extremo C-terminal, a una dilución 1/1000, desarrollado en conejo. A continuación se lava de nuevo con PBS-T y luego se incuba con el 2º anticuerpo (el cual ha sido desarrollado en cabra y reconoce la Inmunoglobulina G del conejo) conjugado con peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente a la dilución 1/10.000. La detección del anticuerpo marcado con peroxidasa se realiza mediante un aumento de reacción de quimioluminiscencia con el Kit de revelado ECL (Amersham Life Science).

### **III.3 Determinación de la proliferación celular**

#### **III.3.1 Material**

Lo referido en el apartado de cultivo celular para la línea SK-N-BE (2) fue necesario en esta parte del estudio además de los siguientes materiales:

1. Lector de microplaca (Tecan Spectra Classic; Tecan Barcelona, España).

2. Placas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark).

3. El neuropéptido SP (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) sal de acetato, peso molecular 1347.6 (Sigma-Aldrich, UK), vial 25mg, pureza 98%. El péptido fue disuelto en agua bidestilada previo a su utilización bajo condiciones de esterilidad.

4. L-733,060, antagonista NK1 de la sustancia P, peso molecular 439.8 (Sigma-Aldrich, UK). El fármaco fue disuelto en agua bidestilada con 0.2% de dimetilsulfóxido (DMSO) previo a la inoculación de las muestras bajo condiciones de esterilidad.

- Preparación de alícuotas:

Se diluyen 5 mg del antagonista en 0.5 ml de DMSO, bajo condiciones de esterilidad. A continuación volvemos a diluir ese volumen en 39.5 ml de agua bidestilada, por lo que tenemos 5 mg en 40 ml. En cada experimento se utilizan alícuotas de 80 µl (0.01 mg) y se diluyen en medio de cultivo hasta obtener un volumen total de 500 µl.

5. *Celltiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay*, (Promega Corporation, Madison, WI, USA), es el reactivo utilizado para la determinación de la proliferación celular. El preparado nos permite determinar proliferación celular.

El preparado incluye un reactivo que contiene un nuevo componente tetrazolium, cuya formulación química es  $\beta$ -(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] sal interna, denominado *MTS tetrazolium*, y además, incluye un reactivo acoplador de electrones

Fenacina metosulfato (PES), el cual está combinado con MTS en una solución única estable.

### III.3.2 Método

#### A) Descripción

El estudio ha sido realizado siguiendo 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 *MTS* es biorreducido por las células hacia un producto coloreado, Formazán, el cual es soluble en medio de cultivo (figura 11). La reducción es llevada a cabo por enzimas deshidrogenasas en aquellas células metabólicamente activas (Berridge et al, 1993).

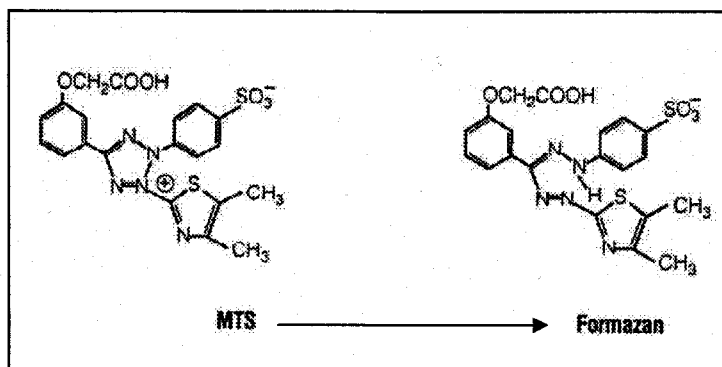


Figura 11. Estructura de tetrazolium MTS y su derivado formazán

La lectura de la absorbancia, emitida por el Formazán, se realiza con un lector de microplaca a una longitud de onda de 492 nm. El valor de absorbancia resultante nos da la cantidad de Formazán producido que es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo (Monzavi-Karbassi et al, 2001).



## B) Protocolo

La línea de actuación seguida fue la recomendada por el laboratorio (*Celltitter 96® AQueous One Solution TB# 245, 1999*):

1. Mantenimiento de la línea celular. Tripsinizar el mismo día del estudio.
2. Centrifugar la suspensión celular obtenida a 300 x g durante 5 minutos.
3. Resuspender el botón celular en medio de cultivo, visualizar al microscopio óptico y realizar recuento celular con la tinción del azul tripán. La concentración celular inoculada a cada uno de los pocillos fue 10.000 cel/100µl.
4. Siembra de las placas. Las placas en nuestro estudio se dividen en placa T<sub>0</sub>, placa T<sub>1</sub> y placa T<sub>2</sub>. Una vez calculado el volumen de la suspensión celular, la cantidad de medio de cultivo para cada pocillo, y concentración del antagonista y/o SP, se comienza a inocular en cada uno de los pocillos aquello que corresponda; siempre por duplicado y en el mismo orden: suspensión celular, medio de cultivo y antagonista.

**-Placa T<sub>0</sub>:** Consta de dos pocillos Blanco y dos pocillos Control.

° BLANCO: con 0 cel/ml, es decir, inoculados únicamente con el medio de cultivo (100 µl) y el reactivo MTS, el cual se añade inmediatamente tras la adición del medio y siempre el mismo volumen (20µl), indicado en el protocolo del laboratorio. La absorbancia de los pocillos Blanco nos dará el nivel de referencia mínimo, será considerado el cero.

° CONTROL: pocillos inoculados con la suspensión celular y medio de cultivo, sin adición exógena de otro factor que modifique el ritmo de proliferación natural de la línea celular. La lectura de estos pocillos obtiene el máximo valor de absorbancia, pues, en teoría, representan la mayor concentración celular.

- **Placas T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>**: Sembradas con dos pocillos Blanco, dos Control y dos Problema (a los que se les añade SP o Antagonista L-733060 ó ambos).

a) Estudio del antagonista L-733,060

Las placas contienen la suspensión celular, el medio de cultivo y la dosis problema del antagonista. El número de pocillos inoculados será igual al número de concentraciones distintas del antagonista. Las concentraciones estudiadas fueron 2.5, 5, 10 y 20 µM. Determinamos la capacidad de inhibición del crecimiento celular con respecto a los pocillos control.

El reactivo (20 µl) es inoculado en la placa T<sub>1</sub> a las 30 horas; este período de tiempo coincide aproximadamente con el tiempo de duplicación de la línea celular estudiada, y en la placa T<sub>2</sub> a las 72 horas, que viene a corresponder con el segundo tiempo de duplicación celular. Los tiempos de duplicación se cuentan una vez finalizada la inoculación del antagonista.

b) Estudio de L-733,060 y SP

Se determina de forma simultánea en la línea celular de NB la capacidad de proliferación celular de la SP, la acción inhibitoria del antagonista y el efecto competitivo entre ambos por el receptor NK1.

Las concentraciones de la SP estudiadas fueron: 5, 10, y 100 nM. Los pocillos problema contenían pues la suspensión celular, el medio de cultivo y la dosis correspondiente de SP.

L-733,060 fue evaluado a una concentración de 10  $\mu$ M, al ser una dosis próxima a la DI (50).

Para determinar si la acción inhibitoria del antagonista L-733,060 ocurría al interaccionar con el RNK1, se realizó un estudio de competición entre ambos. L-733,060 se administró a una dosis de 10  $\mu$ M y tras una hora de incubación de la línea celular con el antagonista, se añadió a los mismo pocillos SP a dosis de 100nM. La lectura se realizó a las 30 horas.

5. Los pocillos no utilizados de las distintas placas se les añade solución de PBS (solución buffer fosfato) para controlar la humedad de la placa.

6. La lectura de cada placa ( $T_0$ ,  $T_1$  y  $T_2$ ) se realiza tras 1 hora y 30 minutos de haber añadido el reactivo. La cuantificación del Formazán producido, medido por absorbancia, es directamente proporcional al número de células en proliferación. Durante el tiempo de espera las placas permanecen en incubadora a 37°C humidificada y con 5% de  $CO_2$ .

### **C) Otros datos de interés**

- Sobre la dosis del Antagonista NK1, L-733,060

El rango de concentración estudiado del antagonista L-733,060 incluye cuatro dosis: 2.5, 5, 10 y 20  $\mu$ M. La dosis de inhibición 50 (DI 50), es decir, aquella que inhibe el crecimiento celular en un 50% respecto al control, ha sido calculada.

- Sobre los ensayos

Han sido realizados cuatro ensayos en los que cada dosis del antagonista, el control y blanco se realizaban por duplicado. Los resultados se expresan como valor medio de los distintos ensayos realizados. Los efectos de la acción del antagonista L-733,060 sobre la línea celular de NB humano SK-N-BE (2) han sido expresados como porcentaje de inhibición celular respecto al control. Los resultados obtenidos del estudio del efecto mitogénico de la SP así como del estudio de competición entre SP y L-733,060 son también calculados en porcentaje respecto al grupo control.

#### **D) Análisis Estadístico**

Una vez procesados todos los datos, éstos fueron sometidos a tratamiento informático mediante un paquete integrado de estadística automática (SPSS para Windows versión 12.0 SPSS Inc.) realizándose tanto estadística descriptiva como inferencial.

- Depuración estadística de los datos

Aunque se realizaron verificaciones de la información previa a la entrada de datos y durante la entrada de los mismos, completamos dicha verificación realizando una exploración estadística de la información, con métodos gráficos y analíticos que nos detectara la posible existencia de observaciones aberrantes.

- Análisis descriptivo

Se determinaron medias y varianzas. Cuando se consideró necesario, ya que contribuía a clarificar los resultados, hemos construido representaciones gráficas.

#### -Comparación de dos o más medias

Se realizaron test de comparación de dos o más medias, T de Student o ANOVA cuando se verificaron las hipótesis de normalidad (previamente estudiadas mediante el test de Shapiro-Wilk) y la igualdad de varianzas (test de Levene); o en su defecto, el test U de Mann-Whitney. Siempre que las medias resultaron diferentes por ANOVA, detectamos qué grupo producía dicha diferencia mediante el test de Bonferroni.

#### - Regresión y Correlación

La relación entre variables de tipo numérico fue estudiada mediante coeficientes de correlación de Pearson. La recta de regresión fue incorporada cuando la relación lineal era válida. La información analítica fue complementada con gráficos de dispersión.

## **RESULTADOS**

## IV. I RESULTADOS GLOBALES

### A. Inhibición de L-733,060 sobre la línea SK-N-BE (2)

- **Primer tiempo de duplicación celular T1 (30 horas)**

Para el primer tiempo de medición los resultados del efecto inhibitorio del antagonista L-733,060 sobre el cultivo celular de NB humano fueron los siguientes (figura12):

- Dosis: 2.5  $\mu$ M

EL antagonista NK1 L-733,060, a una dosis de 2.5  $\mu$ M, ha producido una disminución del crecimiento celular del 0.5% respecto del control.

- Dosis: 5  $\mu$ M

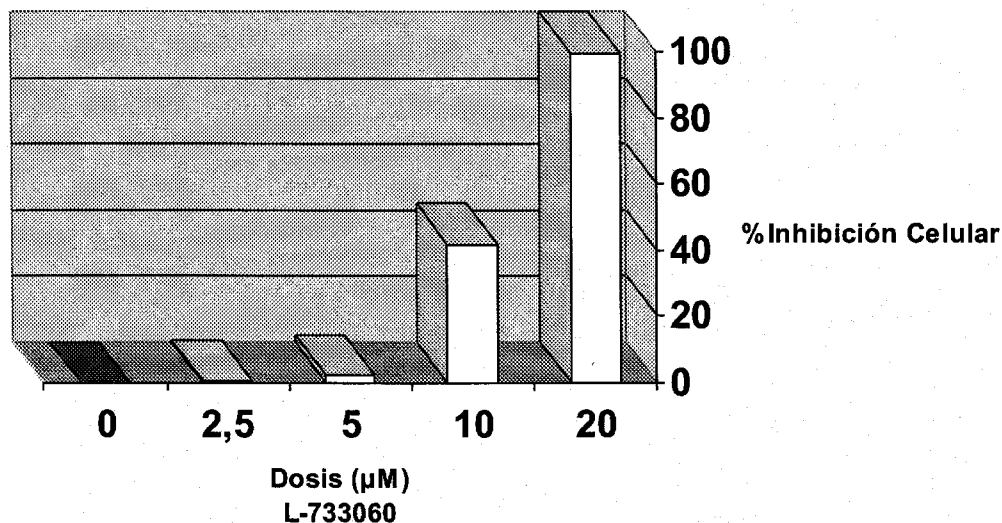
L-733,060 produjo una inhibición media del crecimiento del cultivo de un 2.3%.

- Dosis: 10  $\mu$ M

El crecimiento de la línea celular fue inhibido en un 41.9 % como valor medio respecto del control.

- Dosis: 20  $\mu$ M

L-733,060 a la dosis de 20  $\mu$ M determinó un inhibición media de la proliferación celular del 99.9%.



**Figura 12. Estadística descriptiva: Inhibición del crecimiento celular de L-733,060 en T1 (30 horas). El control viene expresado por el valor cero.**

- **Segundo tiempo de duplicación celular T2 (72 horas)**

En el segundo tiempo de medición (T2) los valores de inhibición del crecimiento celular del antagonista L-733,060 sobre la línea celular de NB humano fueron los siguientes (figura 13):

- Dosis: 2.5 µM

El antagonista no produjo ningún tipo de inhibición a esta dosis.

- Dosis: 5 µM

La inhibición del crecimiento celular fue del 5 % respecto del control.

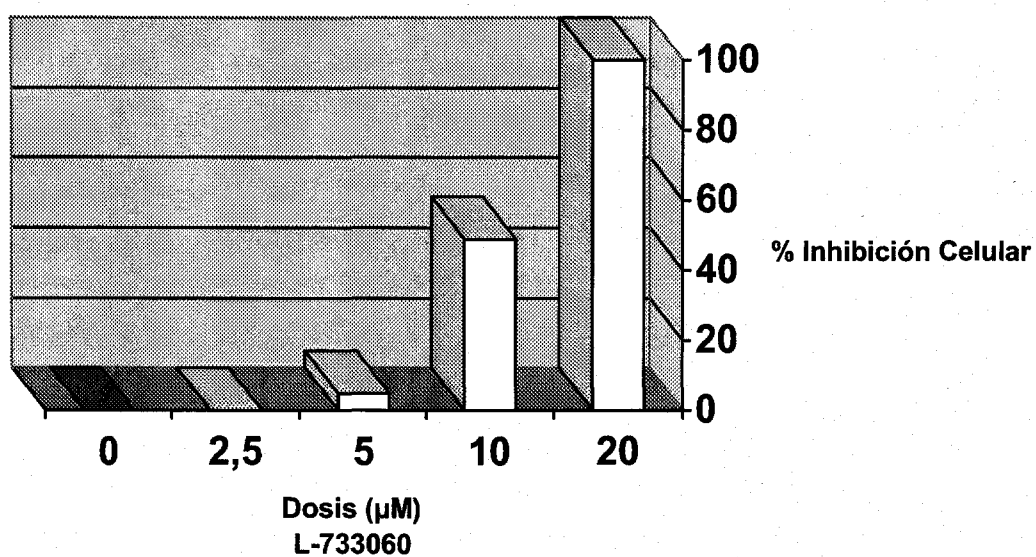


- Dosis: 10  $\mu$ M

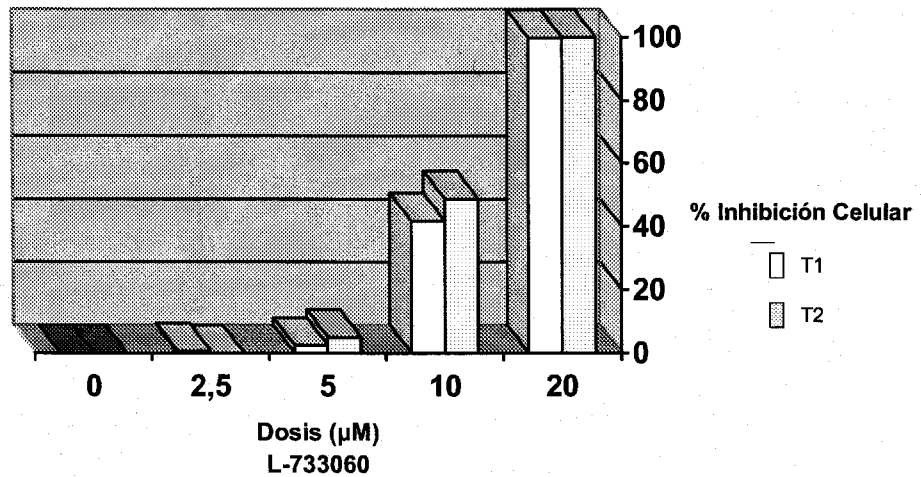
Se obtuvo un valor medio de inhibición del 48,8%.

- Dosis: 20  $\mu$ M

A esta dosis el antagonista consiguió un valor del 100% de inhibición.



**Figura13. Estadística descriptiva: Inhibición del crecimiento celular de L-733,060 en T2 (72 horas). El control viene expresado por el valor cero**



**Figura 14. Estadística descriptiva: Inhibición del crecimiento celular de L-733060 en T1 y T2. El control de T1 y T2 vienen expresados por el valor cero**

### B. Regresión y correlación

Determinamos la relación entre la dosis del antagonista NK1 L-733,060 y el porcentaje de inhibición celular para cada uno de los tiempos de duplicación celular (T1 y T2) mediante los coeficientes de correlación lineal de Pearson (R) y de determinación ( $R^2$ ).

Los coeficiente de determinación ( $R^2$ ) obtenidos para los tiempos T1 y T2 fueron  $R^2=0.95$  y  $R^2=0.96$  respectivamente, con un valor de  $p<0.0005$  en T1 y  $p<0.001$  para T2 (Figuras 15 y 16). Por lo que la capacidad de predicción entre la dosis del antagonista L-733,060 y el porcentaje de inhibición del crecimiento celular fue muy elevada para ambos tiempo de medición.

T1

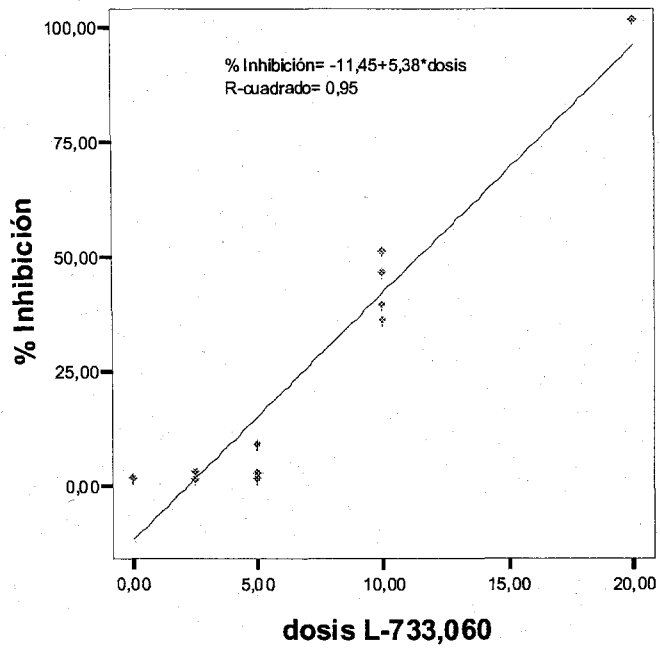


Figura 15. Grafica de dispersión (T1)

T2

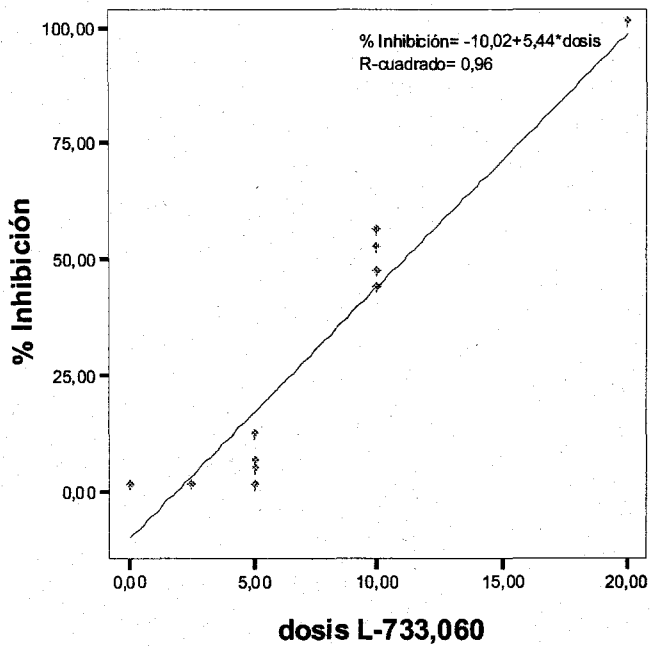


Figura 16. Grafica de dispersión (T2)

## IV. 2 ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DISTINTOS GRUPOS

### A. Inhibición de L-733,060 sobre la línea celular SK-N-BE (2)

Globalmente existen diferencias significativas entre las distintas dosis utilizadas así como con los grupos blanco y control, en ambos tiempos de medición, con un valor de  $p < 0.0005$  en  $T_1$  y  $p = 0.002$  para  $T_2$ . Estas diferencias globales se basan en las diferencias entre las distintas dosis utilizadas en el estudio (Tablas 10 y 11).

**Tabla 9. Estadística Inferencial: Comparación entre las dosis de L-733,060 y con el control en T1**

DOSIS L-733060	CONTROL	20 MM	10 MM	5 MM	2.5 MM
Control					
20 $\mu$ M					
10 $\mu$ M					
5 $\mu$ M					
2.5 $\mu$ M					

■  $p < 0.0005$

■  $p \leq 0.001$

□ No significativo

**Tabla 10. Estadística Inferencial: Comparación entre las dosis de L-733,060 y con el control en T2**

DOSIS L-733060	CONTROL	20 MM	10 MM	5 MM	2.5 MM
Control					
20 $\mu$ M					
10 $\mu$ M					
5 $\mu$ M					
2.5 $\mu$ M					

■ p < 0.05  
 □ No significativo

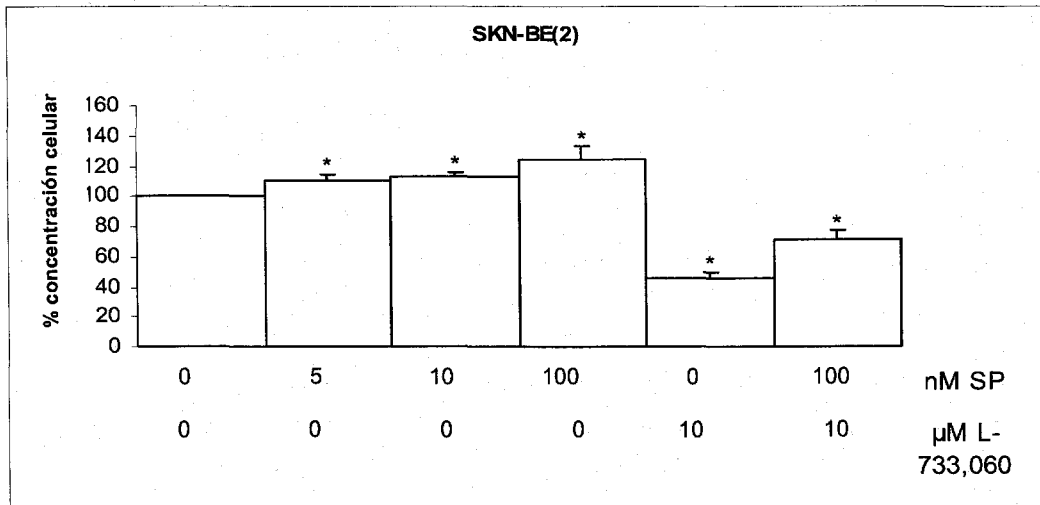
**B. Estudio comparativo del efecto inhibitorio de L-733,060 en T1 y T2**

Observamos si para cada una de las dosis ensayadas del antagonista RNK1 L-733,060 hubo diferencias significativas en cuanto al tiempo. El análisis estadístico determinó diferencias significativas entre T1 y T2 para las dosis de 10 y 20  $\mu$ M con un valor de  $p=0.025$  y  $p=0.002$  respectivamente.

**IV.3 Estudio de competición de la Sustancia P y el antagonista RNK1 L-733,060 en la línea celular SK-N-BE (2)**

La adición de SP al cultivo celular de Neuroblastoma, a dosis nanomolares, produjo un aumento de la proliferación celular con respecto al control. A dosis de 5 nM el efecto mitogénico fue evidente, alcanzando el máximo valor a la dosis de 100nM. El porcentaje de proliferación celular se vio incrementado desde un 15 a 25%, dependiendo de la dosis de SP administrada (figura 17).

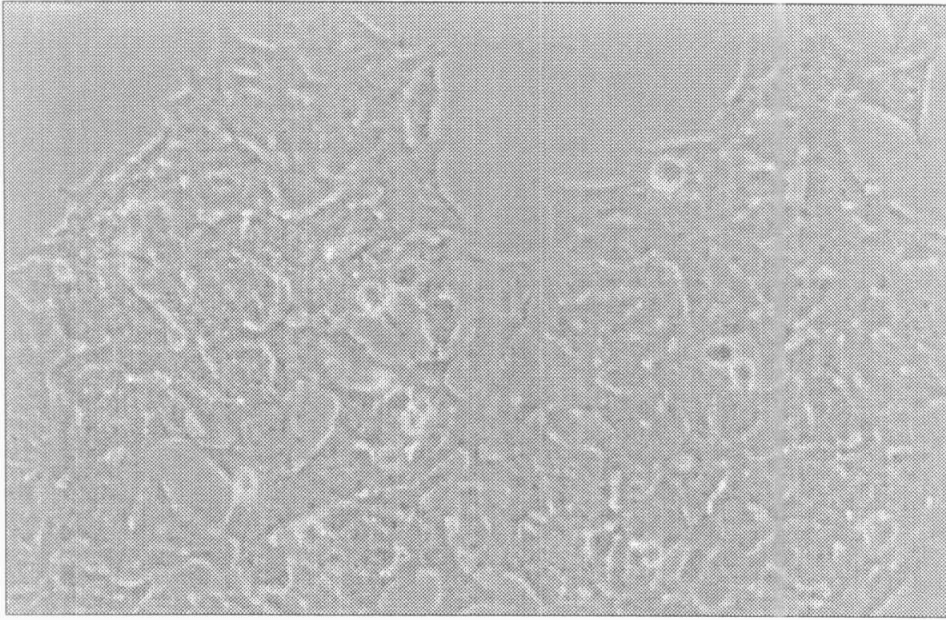
El estudio de competición entre la SP y L-733,060 determinó en los pocillos en los que añadimos L-733,060 (10  $\mu$ M) y SP (100nM) un aumento de la concentración celular del 14.5% con respecto a aquellos tratados únicamente con L-733,060 con un valor de  $p<0.05$  (figura 17).



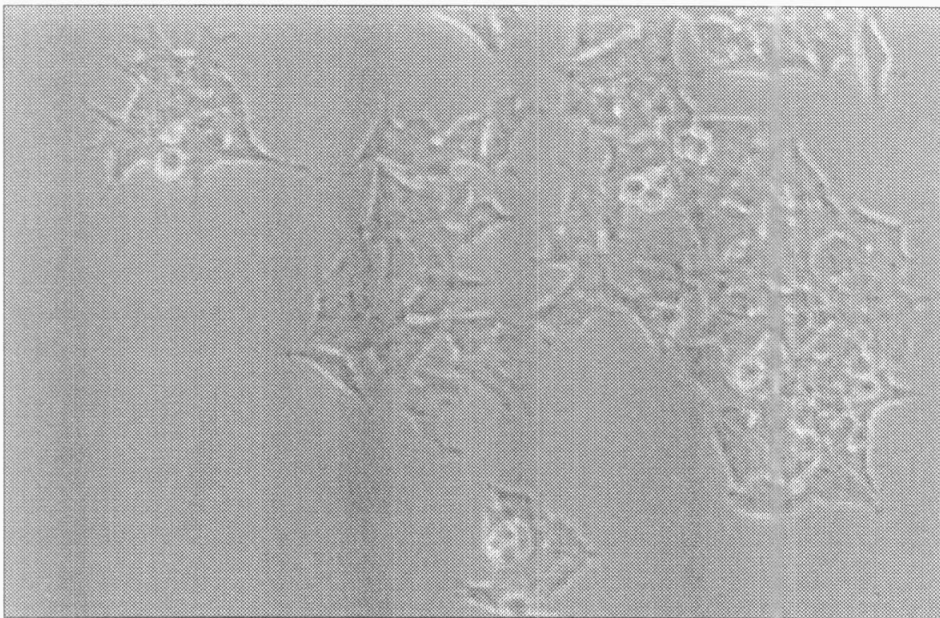
**Figura 17. Efecto mitogénico de la SP y estudio de competición de la SP y L-733,060 en la línea celular de SK-N-BE (2). La SP se administró a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 100 nM) en la línea celular SK-N-BE (2). El antagonista RNK1 fue añadido (10 µM) en presencia (100nM) o ausencia de SP. \* p<0.05**

#### **IV.4 Microscopía óptica del efecto del antagonista RNK1 L-733,060 en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE (2)**

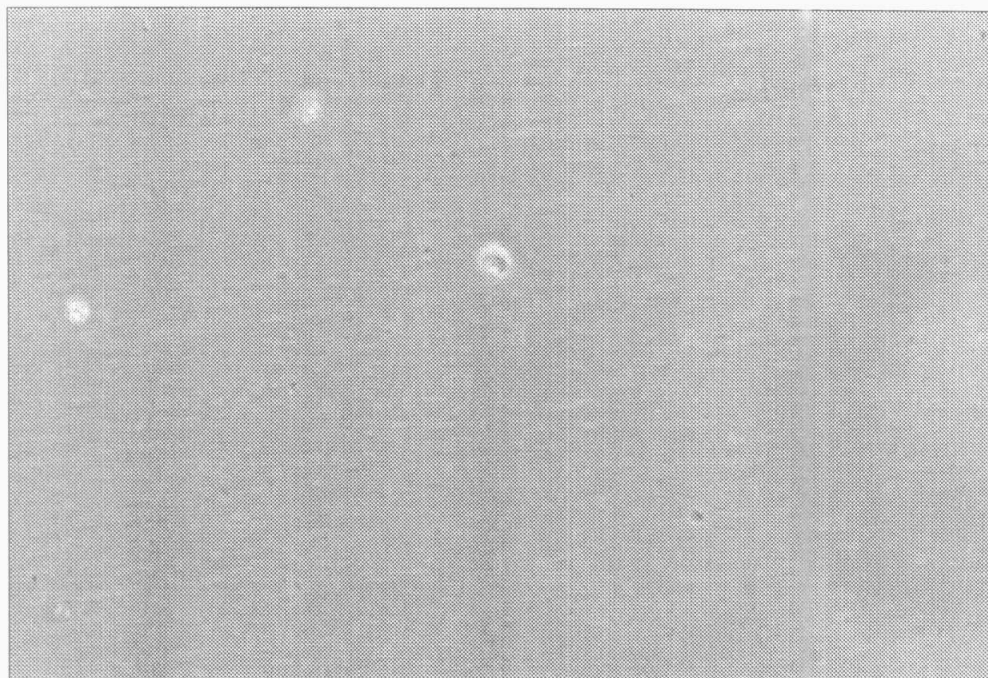
Simultáneamente al estudio cuantitativo, el antagonista L-733,060 fue inoculado a frascos de cultivo de la línea celular SK-N-BE (2) en el rango de dosis previamente referido (2.5 - 20 µM), junto con frascos de cultivo control (no adición del antagonista RNK1), e incubados durante 30 horas (T1), con el objetivo de visualizar el efecto sobre la inhibición del crecimiento celular. Se incluyen fotos de las dosis de 10 µM, 20 µM y del control.



**Figura 18. Crecimiento celular de la línea celular SK-N-BE (2) a las 30 horas (Muestra control). Microscopio óptico invertido con contraste de fase (x 40)**



**Figura 19. Inhibición del crecimiento celular de la línea SK-N-BE (2) a las 30 horas, tras adición de L-733,060 (10 μM). Microscopio óptico invertido con contraste de fase (x 40)**



**Figura 20. Inhibición total del crecimiento celular en la línea SK-N-BE (2) a las 30 horas, tras adición de L-733,060 (20 μM). Microscopio óptico invertido con contraste de fase (x 40)**

#### **IV.5 Determinación de los receptores NK1 en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE (2)**

En la línea celular SK-N-BE (2) han sido detectadas, mediante la técnica de Western Blot, dos isoformas del receptor NK1, de 58 kDa y 33kDa respectivamente (figura 18). La línea celular de feocromocitoma de rata PC12, utilizada como control, mostró varias isoformas del RNK1, siendo la proteína de 46 kDa la más abundante (Figura 21).



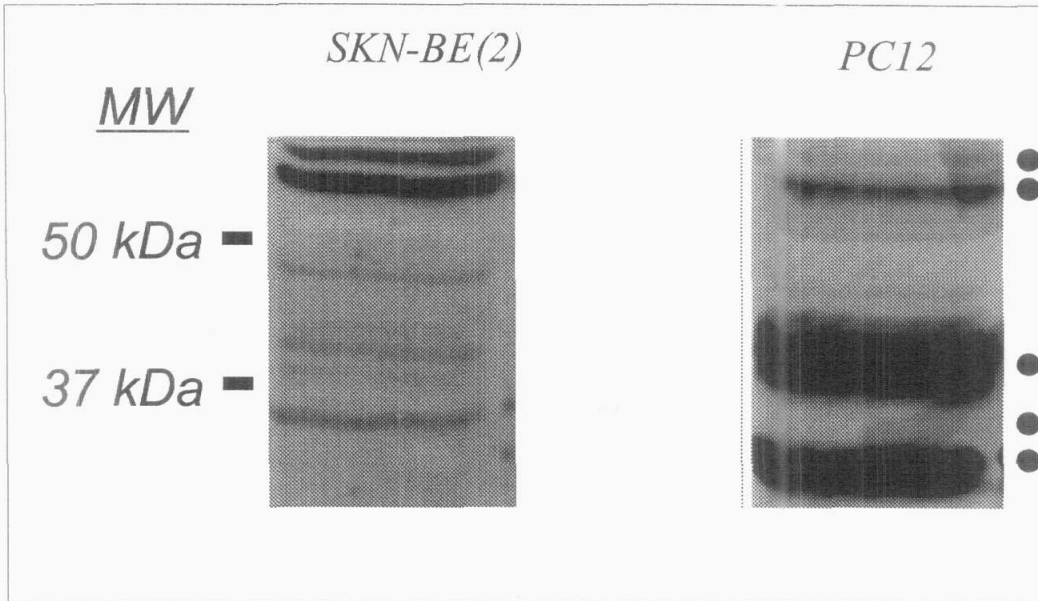


Figura 21. Isoformas del receptor NK1 en la línea celular de neuroblastoma SK-N-BE (2)

## **DISCUSION**

A pesar de los avances en el control de los procesos tumorales, las bases terapéuticas antineoplásicas tienen sus límites de efectividad y eficacia en determinados tipos y estadios tumorales, sin olvidar las complicaciones derivadas del tratamiento y los efectos secundarios posibles, tan importantes en la edad pediátrica.

En las tres últimas décadas, la incidencia de los niños diagnosticados con las formas de cáncer invasor se ha visto incrementada de forma considerable. En cuanto al Neuroblastoma, es el tumor extracraneal más frecuente en la infancia, tras los tumores hematológicos, y el más diagnosticado en lactantes. La tasa de incidencia se sitúa entre el 8-10% de todos los cánceres infantiles y supone algo más de un tercio de las neoplasias malignas neonatales. Y aunque es progresiva la mejora en la terapia de estos tumores, en el grupo de alto riesgo, los diferentes regímenes utilizados obtienen resultados del 35% al 60% de supervivencia libre de enfermedad a los tres años. Estos datos son un referente para continuar en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en uno de los principales tumores de la infancia.

La SP para ejercer sus acciones biológicas ha de unirse a los receptores de TK, siendo el receptor NK1 el de mayor especificidad para el péptido. Es por ello que uno de los objetivos fundamentales en nuestro trabajo era conocer la presencia de tales receptores en nuestra línea de NB.

Nosotros hemos demostrado, por vez primera, que en la membrana celular de la línea de NB humano SK-N-BE (2) se expresa el RNK1. Mediante la técnica de Western Blot hemos detectado dos isoformas del RNK1, una de ellas de 58 kDa (observándose dos bandas) y otra de 33 kDa, siendo la de mayor peso molecular la más importante en cuanto a expresión.

Estos resultados coinciden con estudios previos tanto en tejido humano como en rata, en los que también han sido detectadas distintas isoformas del RNK1. Los estudios en tejido cerebral de rata, describen dos isoformas en el rango de 54 y 46-44 kDa respectivamente, (Nakata et al, 1988; van Ginkel y

Pascual, 1996) mientras que en glándula salival Macdonald et al (1996) identificaron una proteína de 53 kDa como receptor NK1 y en células del páncreas otra isoforma de 58 kDa (Parnet et al, 1991).

En el hombre, una única proteína en la banda de 58 kDa se detectó en células linfocitarias normales (McGillis et al, 1990), mientras que en la línea celular linfoblástica IM-9, se han observado la presencia de varias isoformas del RNK1, con 116, 78, 58, 38, 33 y 16 kDa respectivamente (Payan et al, 1986; McGillis et al, 1987; Organist et al, 1988). Recientemente, Friess et al (2003) informaron de la presencia de una única isoforma con 46 kDa en muestras de tejido pancreático normal y tumoral, sin embargo no pudo detectarse la presencia del RNK1 en líneas celulares de cáncer de páncreas estudiadas. Nosotros pensamos que este hecho pudiera estar en relación con un problema en la técnica de determinación de la proteína más que por la ausencia real del receptor en dichas líneas tumorales, ya que al utilizar otras técnicas (Hibridación in situ o PCR) consiguió demostrar la presencia del RNK1 en dichas líneas celulares. No obstante, se desconoce actualmente el significado funcional de los distintos subtipos del RNK1 en los diferentes sistemas biológicos (Caberlotta et al, 2003).

Otros autores han notificado también la presencia del RNK1, con técnicas de autorradiografía, en otros tipos tumorales; Allen et al, (1985), y Henning et al, (1995) comunicaron la existencia de RNK1, en vasos sanguíneos intratumorales o peritumorales, en biopsias de pacientes con Astrocitomas, Glioblastomas, Carcinoma medular del tiroides, Carcinoma de mama, Ganglioneuroblastomas y Cáncer hepático, y con menor expresión en Cáncer de páncreas y colon; asimismo, Palma et al (1999;2000) en estudios in vitro sobre Astrocitomas y Glioblastomas humanos, informaron sobre la expresión de niveles elevados del RNK1.

Singh et al, (2000) han confirmado la presencia del RNK1 en Cáncer de mama, tanto en muestras de biopsias como en las líneas de cultivo. Sin embargo no llegó a detectar el receptor en células mamarias normales. Este hecho, a nuestro juicio, pudiera estar en relación con la técnica empleada.

En el estudio realizado por Friess et al (2003) sobre Cáncer de páncreas, obtuvieron por diferentes técnicas (RT-PCR, Hibridación in situ, inmunohistoquímica) la cuantificación de la expresión del RNK1, además de utilizar el Western Blot mencionado anteriormente.

Payan et al (1986) describe un aumento en la cifra de RNK1 en las membranas celulares de células linfoblásticas humanas de 2-3 veces las expresadas por linfocitos. Fowler y Brannstrom (1994), comunicaron hasta 40,000 receptores de SP/célula en cultivo de astrocitoma humano. Los resultados de Friess et al (2003) vienen a coincidir con los anteriores autores, ya que revelan un gran incremento ( hasta 36 veces más por RT-PCR) del receptor de la SP en las muestras de cáncer de páncreas y líneas de cultivo con respecto a células epiteliales pancreáticas benignas, las cuales presentaban una débil manifestación respecto al control. A su vez, observaron que en estadios tumorales avanzados, la concentración del RNK1 era mayor, incluso hubo una correlación entre la supervivencia de los pacientes y los niveles del RNK1. Asimismo se observó en Astrocitomas y Glioblastomas una relación entre los fenotipos de mayor malignidad y la concentración del RNK1 (Henning et al, 1995).

Pero además Friess et al (2003), aportan algo que nos parece muy interesante, y es que el RNK1 también se expresaba más en el resto de las células que componían el tumor, como fibroblastos, nervios, vasos sanguíneos, ganglios e incluso algunas células inflamatorias. Estos hechos podrían estar en relación con la estimulación en la síntesis de ADN que conlleva la unión de SP a su receptor, dando lugar así al aumento de la densidad de estos receptores observados tanto en las células neoplásicas como en las células peritumorales.

Todas las observaciones expuestas anteriormente, incluyendo la novedad aportada en la línea humana de NB, sugieren que el RNK1 está involucrado en el control del crecimiento celular tumoral, la regulación vascular y la diseminación metastásica tumoral.

En la actualidad se sabe que determinados tipos tumorales, tales como astrocitomas, glioblastomas, cáncer de mama, melanomas, cáncer de páncreas y de colon sintetizan SP, incluso de forma significativa respecto a células normales (Allen et al, 1985; Khare et al, 1998; Henning et al, 1995; Palma et al, 1999; 2000; Singh et al, 2000).

Los resultados obtenidos sobre la presencia de la SP en líneas de NB han sido contradictorios; Harkins J et al (1978) demostraron en células de NB de ratón la síntesis de SP, y en la línea de neuroblastoma humano NB-1 tras ser estimuladas con determinados ésteres (Kimura N et al, 1992). Sin embargo, McGregor GP et al (1990) tras estudiar por RIA (Radioinmunoensayo) y cromatografía de columna cinco tumores primarios de NB humano informaron de la ausencia completa de SP y de la presencia de NKB en tres de las mismas. Por fin, Shrestha et al, (1994) demuestra la presencia del péptido en células de NB humano de glándula parotídea y recientemente ha sido descrita la presencia del péptido en más del 90% de las metástasis de NB en médula ósea (Nowicki y Miskowiak, 2002).

Una vez detectada la presencia de RNK1 en nuestra línea celular, el paso siguiente en nuestra hipótesis de trabajo era estudiar si la SP, añadida al cultivo, estimulaba la proliferación celular. De esta forma hemos podido demostrar, por primera vez, que la SP actúa estimulando la proliferación celular en la línea de NB humano SK-N-BE (2). Este hecho fue comunicado inicialmente por varios autores, aunque con un grupo de neuropéptidos que incluía fundamentalmente Bombesina y péptidos relacionados, los cuales se añadían a líneas tumorales de cáncer de pulmón y fibroblastos (Rozengurt E et al, 1983; Carney DN et al, 1987). Desde hace tiempo, por tanto, es conocido que diversos tumores pueden sintetizar determinados péptidos; ello dio pie a hipótesis sobre la posibilidad de que estas moléculas actuaran, a través de receptores específicos, en la regulación del crecimiento de los tumores mediante circuitos paracrinós o autocrinós (Zachary et al, 1987; Woll y Rozengurt, 1989a; Woll, 1991; Langdon et al, 1992).

Estudios más recientes son los aportados por Luo et al (1996), Palma et al (1999a; 2000) y Muñoz et al, (2004b), que al igual que en nuestro trabajo, demuestran la actividad proliferativa celular de la SP en líneas humanas de glioblastoma, astrocitoma, ganglioneuroblastoma y melanoma. Además la presencia de RNK1 se ha correlacionado con los efectos de la SP sobre la proliferación celular (Luo et al, 1996; Palma et al, 1999a; Sharif et al, 1996).

Por tanto, la SP es considerada en la actualidad como una molécula inductora de mitogénesis en células normales (linfocitos T, fibroblastos, células musculares lisas perivasculares, células sinoviales) (Payan et al, 1983; Nilsson et al, 1985; Lotz et al, 1987; Ziche et al, 1990) y células tumorales. La SP induce síntesis de ADN tras la unión a su receptor específico NK1. Los mecanismos postreceptor incluyen, entre otros, la activación de las MAPK (mitogen-activated protein kinase), proteínquinas con actividad tirosinkinasa (Luo et al, 1996).

Las dosis de SP empleadas en nuestro estudio para determinar su efecto mitogénico sobre el NB, se sitúan entre 5 a 100 nM. Estas dosis coinciden con las más frecuentemente referenciadas en la literatura y se aproximan a una situación fisiopatológica del péptido ya que los niveles plasmáticos fisiológicos de SP en el hombre varían entre 70-300 pmol/L (Nilsson et al, 1975).

Así, Luo et al (1996) obtuvieron valores máximos de síntesis de ADN a la dosis de 10 nM en células de Astrocitoma humano, sin embargo a dosis de 1  $\mu$ M, el efecto mitogénico de la SP fue menor. En cambio, Eistetter et al, (1992) refiere datos de mitogénesis con dosis en rango  $\mu$ M en líneas de Gliomas humano. Friess et al, (2003) utilizando dos análogos (agonistas) de la SP a dosis de 100nM sobre dos líneas de cáncer de páncreas observó un efecto mitogénico significativo. Por último, Muñoz et al, (2004b) en varias líneas de Melanoma aporta datos similares a los de nuestro estudio inoculando SP en rango nanomolar (5-500nM) con un efecto máximo a 10nM para dos de las líneas ensayadas, y a 500 nM en la tercera línea, la cual mostraba características de mayor malignidad. La dosis de 1  $\mu$ M no produjo mayores efectos proliferativos en ninguna de las tres líneas de melanoma estudiadas.

Nosotros hemos obtenido datos superiores de proliferación celular respecto al control tras inocular SP a concentraciones nanomolares (5,10, 100nM) con un efecto máximo a la dosis de 100nM, a la que obtuvimos un 25% más de crecimiento respecto al control. En uno de nuestros ensayos la SP fue inoculada, accidentalmente, a dosis de 10  $\mu$ M y no observamos efecto mitogénico alguno (datos no mostrados). Este hecho podría estar en relación con una saturación de los RNK1 de la membrana celular, y por tanto la célula no podría responder al estímulo del péptido.

Así pues, la mayoría de los trabajos de mitogénesis de la SP sobre líneas tumorales indican, al igual que en nuestro estudio, que las dosis con mayor capacidad de estimulación proliferativa se establecen en el rango de 10-100 nM. Dosis superiores a éstas no producen, en la mayoría de los casos, un aumento en la división celular in vitro.

Por tanto, la demostración de que la SP a dosis nanomolares estimula la proliferación de células de NB sugiere un nuevo mecanismo local de regulación del crecimiento del mismo a través de las terminaciones nerviosas peritumorales que contengan SP.

Todo lo expuesto anteriormente junto con nuestros hallazgos destacan, de manera sólida, la importancia del binomio SP/ RNK1 en el crecimiento tumoral; sugiriendo que el efecto proliferativo mediado por la SP y su RNK1 en estos tumores, incluido el NB, podría tener un papel destacado en el crecimiento de los mismos.

Un aspecto crucial de nuestro estudio era determinar qué efectos provocaría un antagonista NK1 sobre un cultivo celular de NB.

Hasta la fecha, que sepamos, no se habían realizado estudios de inhibición celular con antagonistas de la SP sobre células de NB. Es la primera vez, por tanto, que un antagonista de los receptores NK1 humano es utilizado en estudio in vitro en una línea celular humana de Neuroblastoma.



La potencia de los antagonistas de los receptores NK1 viene determinada por la afinidad al receptor, midiéndose en unidades nM y denominándose Ki, variando desde 0,2 nM (MK-869) a 230 nM (espantide). Hemos seleccionado como antagonista NK1 a la molécula L-733,060 en base a las características de elevada especificidad y gran potencia (posee una Ki de 0,8 nM) frente al receptor NK1 humano (Harrison, et al, 1994), con acción central, debido a que posee una excelente difusión a través la barrera hematoencefálica, asimismo tiene una acción prolongada debido a su larga vida media.

Hasta la fecha, L-733,060 ha sido investigado en el área nociceptiva mostrando, en estudios pilotos, vía intravenosa, una acción analgésica mediada centralmente con una DE (50) de 0.2nM. (Rupniak et al, 1996). También podría ser útil en el tratamiento de la migraña al inhibir la extravasación plasmática de la duramadre, secundaria a estimulación trigeminal (Seabrook et al, 1996). Por otro lado se ha evidenciado su capacidad sobre trastornos emocionales y de comunicación verbal en animales sometidos a estrés, con efectos ansiolíticos y antidepresivos, utilizando las vías peritoneal y subcutánea (3 mg/kg) (Kramer et al, 1998; Rupniak et al, 1996; 2000). Asimismo, se ha demostrado una acción ansiolítica en animales de experimentación, a dosis de 1-10 mg/kg vía oral (Varty et al, 2002), correlacionándose la ocupación de RNK1 en el cuerpo estriado con dichos efectos (Olsen et al, 2002).

L-733,060 ha sido investigado en patología de base inmune, como por ejemplo en hepatitis provocadas por lipopolisacáridos. El antagonista RNK1 ha resultado ser un potente y eficaz antiinflamatorio al bloquear la síntesis de citoquinas y la apoptosis celular. Ambas acciones sabemos que son derivadas de la unión de la SP al RNK1 (Bang et al, 2003; 2004). Este es uno de los múltiples ejemplos donde se ve la interconexión de los sistemas neurológico e inmunitario como base fisiopatológica responsable de enfermedad, así como la relación con la inflamación.

Nosotros hemos observado que el antagonista RNK1, L-733,060, ha provocado una intensa inhibición del crecimiento de la línea de neuroblastoma humano SK-N-BE (2). A la dosis de 20  $\mu$ M, la acción inhibitoria ha sido del 100% respecto al control, en ambos tiempos de medición, no observándose ninguna célula.

Estudios de diseño similar al realizado por nosotros fueron inicialmente aportados por Zachary y Rozengurt, (1985 a); Woll y Rozengurt, (1988) en líneas celulares de cáncer de pulmón y fibroblastos con antagonistas peptídicos de la SP. Simultáneamente, estas mismas moléculas se evaluaron en estudio in vivo con implantes tumorales de cáncer de pulmón (Sethi T et al, 1992; Langdon S et al, 1992; Seckl MJ et al, 1997). En otras líneas celulares, como por ejemplo Cáncer de pulmón de células escamosas, Carcinoma de ovario y de cérvix también fueron notificados resultados de inhibición importantes (Everard et al, 1992; Reeve y Bleehen, 1994). Hay que resaltar que en ninguno de los casos estudiados se observó signos de toxicidad atribuible al tratamiento.

Otros estudios similares pero con antagonistas no peptídicos, como el utilizado en nuestra investigación, son los llevados a cabo con las moléculas MEN 11467 y MEN 11149, antagonistas de gran potencia y altamente selectivos del RNK1; se han utilizado en cultivos de Astrocitoma humano grado III. Los resultados fueron de una completa inhibición de la síntesis de ADN como del crecimiento del número celular in vitro, in vivo a dosis de 1 $\mu$ M/ kg de RNK1 observaron una disminución del 50% del tamaño del tumor trasplantado, con respecto al grupo control (Palma C et al, 1999; 2000). Singh D et al, (2000) consiguieron en diferentes líneas tumorales de carcinoma ductal de mama una inhibición de la proliferación tumoral in vitro con el uso del antagonista RNK1, CP 96,345. El efecto inhibitorio se duplicó al utilizar en el mismo estudio el antagonista RNK1 referido junto al antagonista RNK2, SR48969. MEN 11467 a dosis de 10<sup>-2</sup> nM - 1 $\mu$ M, ensayado sobre líneas de cáncer de páncreas humano, obtuvo menores porcentajes de inhibición respecto a nuestros datos, creemos que ello fue debido a una selección de dosis relativamente baja del antagonista, sin embargo la potencia del antagonista fue mayor que la obtenida

por nosotros, pues a esa dosis no hemos observado inhibición del crecimiento celular (Friess et al, 2003). Recientemente L-733,060, también ha sido utilizada por vez primera in vitro sobre cultivo celular de Melanoma humano, logrando una completa inhibición del crecimiento celular a las dosis de 20, 30 y 50  $\mu\text{M}$  para tres líneas tumorales con grados crecientes de malignidad, siendo necesaria mayor dosis para las líneas celulares con mayor grado de malignidad (N-myc y metástasis) o dicho de otro modo, el melanoma in situ necesitaba menos dosis para inhibir el 100% de la células de melanoma (Muñoz et al, 2004b).

Son pues, numerosos los resultados que, al igual que nuestro trabajo, hablan de la capacidad, in vitro e in vivo, de estas moléculas como potenciales estrategias antitumorales en tumores de origen histológico, pronóstico y protocolos terapéuticos distintos pero con una diana común, el receptor NK1.

Para la elección de la dosis del antagonista L-733,060 a administrar, nos basamos en los trabajos realizados in vitro en otras líneas celulares y seleccionamos un rango de concentración que incluyera los valores obtenidos de la DI (50) más frecuentes. El rango de concentración utilizado para nuestra línea celular fue de 2,5 - 20  $\mu\text{M}$ .

Nuestros resultados reflejan una disminución del crecimiento celular dosis dependiente, con una inhibición completa del crecimiento del tumor a la dosis de 20  $\mu\text{M}$ , en ambos tiempos de medición (T1 y T2), aunque ya con 10  $\mu\text{M}$  se redujo el crecimiento a casi la mitad de la población celular, con una DI (50): 11.3  $\mu\text{M}$ . El efecto en la interrupción del crecimiento de esta línea celular podría estar relacionado con la unión del antagonista L-733,060 al RNK1 de la membrana celular.

La acción antagonista de L-733,060 sobre el NB se sitúa entre los valores inhibitorios medios conseguidos por otros antagonistas de la SP en estudios in vitro tumorales. Así, en cultivo de SCLC los antagonistas SP de cadena corta (NY3521, NY 3460 y N y 3228) obtuvieron una DI (50): 3-15 $\mu\text{M}$ ; de los antagonistas peptídicos y pseudopéptidos amidas empleados, los más

efectivos alcanzaron una DI (50): 2-20  $\mu$ M (Sethi T et al, 1992; Nyeki O et al, 1998). Otros ensayos con diferentes antagonistas peptídicos de la SP en células de SCLC, alcanzaron DI (50): 2-5  $\mu$ M (Seckl MJ et al, 1997; Jarpe MB et al, 1998). L-733,060 consiguió un intervalo de DI (50):8-33  $\mu$ M en el estudio in vitro de Melanoma antes referido, incluimos en ese intervalo las dosis para las tres líneas utilizadas, las cuales mostraban distinto grado de malignidad y por tanto diferentes DI (50) (Muñoz et al, 2004b).

Por último quisimos averiguar si el efecto antagonista de L-733,060 podía ser revertido por la adición de SP al cultivo celular. Inicialmente el cultivo fue incubado con el antagonista a una dosis de 10 $\mu$ M, como dosis próxima a la DI (50) y, a la hora, añadimos SP a 100  $\mu$ M, como concentración a la que observamos el máximo efecto mitogénico. Los resultados obtenidos demuestran que la SP fue capaz de superar la inhibición del antagonista y estimular el crecimiento del tumor respecto del control. Estos hallazgos sugieren que la SP actúa de forma específica vía RNK1 en las células de NB produciendo mitogénesis en células sometidas previamente a inhibición celular.

Nuestros resultados son similares a los de estudios previos con cultivos de Astrocitoma, aunque ellos comunicaron una mayor estimulación a dosis menores de SP (10 nM) y que este efecto alcanzó su pico máximo entre 1-3 horas después. Este autor además demostró que la SP favorecía la síntesis de la proteína c-myc, la cual es esencial para la progresión del ciclo celular (Luo W et al, 1996).

El estudio competitivo de SP y del antagonista MEN 11467 en ratones implantados con xenoinjerto de Astrocitoma concluyó con una detención significativa del crecimiento del tumor respecto a los ratones tratados únicamente con SP (Palma et al, 2000).

Creemos que más que un efecto tóxico inespecífico, L-733,060 provocaría en la línea de NB, una acción específica al unirse al RNK1, lo que conlleva una detención de la síntesis de ADN y por tanto del crecimiento celular. Asimismo en el estudio de competición entre la SP y el antagonista L-733,060, queda

manifiesta la especificidad de las acciones a través de la unión de ambos al RNK1. En este trabajo hemos demostrado que el tratamiento de la línea SK-N-BE (2) con el antagonista L-733,060 produce inhibición de la división celular, aunque desconocemos actualmente en que fase del ciclo se produce el bloqueo. Lo que podemos afirmar es que dicho bloqueo es reversible pues al añadir al cultivo la SP, la célula es capaz de proseguir el ciclo celular y, por lo tanto, completarlo.

Lo que desconocemos, por el momento, es el mecanismo específico, que a determinada dosis, lleva a la muerte celular; en nuestro estudio sobre la línea humana de NB observamos una desaparición completa de células tras administrar el antagonista L-733,060 a dosis de 20µM. Estudios similares, anteriores al nuestro, coinciden en la idea de una acción citotóxica específica de los antagonistas de la SP. Por ejemplo, en cultivo de SCLC, los antagonistas (peptídicos y pseudopéptidos amidas) ensayados actuaron sobre células en proliferación y no en reposo, lo que viene a indicar que el efecto antiproliferativo no es debido a una simple citotoxicidad (Nyeki O et al, 1998). Además, Singh et al (2000) notificó que el efecto inhibitorio de los antagonista RNK1 y NK2 en cáncer de mama, no conllevaba necrosis celular, al inocular la tinción de azul tripán y comprobar que en las colonias celulares restantes más del 99% eran viables. Por último, el tratamiento con MEN 11467 de ratones implantados con Astrocitoma humano no produjo signos de toxicidad general en ninguno de los casos (Palma et al, 2000).

L-733,060 podría inducir su efecto inhibitorio a través de un mecanismo de apoptosis, como ha sido previamente informado en estudios in vitro sobre cáncer de pulmón (Reeve y Bleehen, 1994). En dicho estudio un antagonista de la SP indujo apoptosis en células de cáncer de pulmón y causó una pérdida de la viabilidad celular de forma dosis dependiente, tal como hemos observado con el antagonista L-733,060, ya que sus efectos sobre la inhibición de células de NB han sido relacionados con la concentración utilizada. Estos datos, por consiguiente, sugieren que la acción antiproliferativa del antagonista NK1, L-733,060 podría implicar la activación de una señal intracelular que condujera a la muerte celular, tras su unión al RNK1.

Lo anteriormente expuesto viene a coincidir con estudios in vitro en cáncer de pulmón (SCLC), que tras ser tratado con antagonistas peptídicos se observó, de forma simultánea, una inhibición de la proliferación celular y un aumento de la tasa natural de apoptosis. La inhibición de la fosforilación de tirosina y de la actividad proteín kinasa, por parte del antagonista, parece estar implicada en un mecanismo diferente de inducción de apoptosis que no interfiere en la cinética del ciclo celular, por lo que sugieren que en este tipo celular la inhibición de la proliferación esta íntimamente unida a la apoptosis (Tallet et al, 1996).

La hipótesis sobre la implicación de la SP y su RNK1 en la progresión tumoral está adquiriendo en los últimos años mayor solidez. En la actualidad son numerosas las evidencias que hablan a favor de ello.

La presencia de RNK1 y de la SP, principalmente en tejido vascular peritumoral e intratumoral (Palma et al, 2000), así como la capacidad de proliferación endotelial y vasodilatadora, propias de la SP, hacen relacionar a dicha molécula y a su receptor con la progresión y desarrollo de metástasis (Ziche et al, 1990; Henning IM, 1995); la neoangiogénesis se ha relacionado, a su vez, con un aumento de la invasión del tejido y nuevamente con la expresión de los receptores NK (Walsh et al, 1996); la SP y NKA son considerados hoy día como moduladores hematopoyéticos facilitando así la integración de las células neoplásicas en médula ósea (Rameshwar et al, 1997). También han sido implicados en otros mecanismos favorecedores de la diseminación tumoral como el aumento de la invasividad celular, de la invasión tisular y la capacidad inmunomoduladora (Reeve y Bleehen, 1994; Rameshwar y Gascón, 1996; Gillespie, 1996; Palma y Manzini, 1998).

La migración celular, necesaria para el desarrollo de metástasis, está regulado por diversos neurotransmisores, entre los que se halla la SP, y se ha demostrado, en carcinoma de mama humano, como el péptido estimula la movilidad de células tumorales hacia órganos específicos a través de la unión a su RNK1 (Lang et al, 2004); además describen que L-733,060 inhibe la

progresión metastásica de las células tumorales que expresan el RNK1 y que el L-733,060 se une de forma específica a los receptores NK1 humanos (Lang et al, 2004). Nuestros resultados corroboran lo anteriormente expuesto, ya que en el estudio de competición llevado a cabo, la adición de SP al cultivo celular de NB humano, tratado previamente con L-733,060, fue capaz de revertir de forma parcial la proliferación celular.

Hoy día sabemos que tumores tan distintos en comportamiento como Melanoma y NB, tienen en común la expresión de SP en sus metástasis, lo cual es otro dato a favor de que la SP forma parte de los mecanismos de diseminación de los tumores (Khare et al, 1998; Nowicki y Miskowiak, 2002).

Por último, podemos añadir que la expresión del RNK1 podría ser considerado como factor pronóstico al ser correlacionado con fenotipos de mayor malignidad, estadios tumorales avanzados y periodos de supervivencia menores en diferentes tipos tumorales (Henning IM et al, 1995; Friess et al, 2003).

Es importante resaltar que es simultáneo el aumento de la síntesis de la SP y de su receptor en las células tumorales estudiadas; esto apoya el papel de ambos en la patogénesis tumoral (Singh et al, 2000). Desconocemos, no obstante cuál o cuales son las señales y las vías que estimulan la producción de la SP y de su RNK1 en las células tumorales.

Hoy día es conocido que la comunicación entre el SN y el sistema inmunitario es directa sin mediar ninguna señal intermediaria entre ambos. La SP es una de las moléculas principales en el control neurogénico de la inflamación actuando como inmunomodulador dentro del SNC y SNP (Lieb et al, 1997; Feistritzer et al, 2003) evidenciando una interconexión neuroinmune; así sabemos que la SP induce la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B implicado en la síntesis de citoquinas y otras sustancias proinflamatorias, a su vez relacionadas con diversas enfermedades neurológicas como Enfermedad

de Alzheimer, Demencia asociada al SIDA, Esclerosis Múltiple, por lo que la SP podría iniciar o exacerbar dichos procesos neurológicos.

Además, se ha demostrado la presencia de terminaciones nerviosas positivas para la SP, en íntima conexión con mastocitos que expresan RNK1, ambos están presentes en procesos inflamatorios de la vía respiratoria y sistema digestivo (Suzuki et al, 1999). Shrikhande et al (2001) notificó un aumento de la expresión de RNK1 en muestras de pancreatitis crónica, principalmente en nervios y ganglios, y dicho aumento se correlacionó con el síndrome doloroso en estos pacientes. Sabemos que el riesgo de padecer cáncer de páncreas es mayor en los sujetos afectados de pancreatitis crónica (Lowenfels et al, 1993); vemos nuevamente la existencia de una interconexión entre la inflamación crónica, el sistema inmune, el sistema nervioso y la aparición de cáncer.

Bang et al (2003; 2004) han demostrado, en estudio con animales de experimentación, que las aferencias neuronales primarias, que contienen SP, son necesarias para producir la lesión hepática de origen inmune. Y que la SP liberada de dichas terminaciones, ocasionaba, al unirse a su RNK1, una respuesta inmune con daño y muerte celular. Asimismo comprobó que el tratamiento con antagonistas RNK1, entre ellos L-733,060 resultó eficaz previniendo la lesión al suprimir la producción de citoquinas inflamatorias y la apoptosis celular. Otro antagonista RNK1, en estudio in vitro, ha demostrado una intensa inhibición sobre la replicación del virus VIH en macrófagos humanos, posiblemente al bloquear el circuito autocrino de la SP en dichas células (Lai et al, 2001). Finalmente, niveles aumentados de SP se han detectado en las fases de actividad en distintas enfermedades inflamatorias tales como Colon irritable, Artritis reumatoide y patología inflamatoria respiratoria (asma, sarcoidosis, bronquitis crónica) (O'Connor et al, 2004).

La SP y su RNK1 están presentes en las áreas cerebrales relacionadas con el control de la respuesta a situaciones de estrés y de la conducta afectiva, En este sentido, se ha indicado la posibilidad de una alteración del sistema SP/RNK1 (basado en una sobreactivación del mismo en la región de la amígdala del hipocampo) en la patogénesis de la depresión y de las alteraciones



emocionales relacionadas con el estrés. Hemos de mencionar el importante trabajo de investigación desarrollado con antagonista RNK1; un grupo de dichas moléculas, entre ellas L-733060, mostraron similar eficacia a los fármacos antidepresivos y ansiolíticos habituales, utilizando tanto la vía peritoneal o subcutánea ( 3 mg/kg) como la vía oral ( 10 mg/kg), (Kramer et al, 1998;Varty et al, 2003).Estos resultados se complementan con el ensayo clínico realizado con el antagonista NK1, MK-869, en pacientes con depresión mayor; siendo administrado a una dosis diaria de 300 mg durante seis semanas, concluyó con unos resultados de eficacia similar al grupo tratado con paroxetina, y sin diferencias significativas en la frecuencia de efectos adversos con respecto al placebo (Kramer et al, 1998; Rupniak et al, 2000). L-759274, antagonista selectivo del RNK1, ha mostrado ser igualmente eficaz y seguro en el tratamiento oral de la Depresión mayor (Kramer et al, 2004).

Todo ello viene a reafirmar el papel fundamental de la SP como modulador de neurotransmisores en la psicopatología relacionada con el estrés.

Por todo lo expuesto, la SP y su RNK1 pudieran ser considerados como un sistema neuroquímico común a la patología inmunitaria-inflamatoria, trastornos depresivos y el cáncer. Hoy sabemos que el estrés está relacionado con el desarrollo de cáncer y sus recidivas. Durante décadas se han relacionado los factores psicosociales con la incidencia y progresión del cáncer, proponiéndose una interconexión psico-neuro-oncológica (Lang et al, 2004), cuya base asienta en los neurotransmisores, entre ellos, la SP (Heffner et al, 2003).

Los antagonistas específicos de los receptores NK1 humanos, que se han mostrado eficaces en enfermedades como depresión y ansiedad, podrían ser evaluados en la patología tumoral con expresión celular del receptor NK1, utilizando dosis adecuadas, que serian mayores en este tipo de patología, debido a la cantidad de RNK1 que expresan las células tumorales, de esta forma estaríamos produciendo no sólo la inhibición del crecimiento tumoral sino que obtendríamos otros efectos como: el antidepresivo y el ansiolítico, que en estos tipos de pacientes siempre están presentes en mayor o menor medida .

Los resultados de este trabajo junto con los aportados por los autores que han estudiado antagonistas de la SP, nos hacen reflexionar sobre el papel del sistema SP/RNK1 así como probablemente otras TK y sus receptores, en patologías aparentemente distantes pero con una fuerte interrelación de sus sistemas, como son Depresión y trastornos relacionados, enfermedades inmunitarias y la patología tumoral.

La eficacia de un número importante de antagonistas de la SP sobre líneas tumorales in vitro, de tan distinta procedencia histológica, nos sugiere que pudiera tratarse de un grupo terapéutico de amplio espectro frente a los tumores. Además, al bloquear el RNK1 actúan sobre todos los pasos del desarrollo neoplásico, es decir, proliferación local, neoangiogénesis, invasión tisular, migración e invasividad celular, metástasis e inmunodepresión. La variabilidad en la expresión de RNK1, la capacidad del tumor de sintetizar SP y la especificidad por el antagonista RNK1 son elementos que van a influir de forma directa en la respuesta al tratamiento con antagonistas RNK1 de cualquier línea tumoral o implante en modelo in vivo.

Son necesarios más estudios que profundicen en los mecanismos de inhibición del crecimiento de las líneas celulares tumorales por los antagonistas RNK1. En este sentido sería interesante conocer si el tratamiento de antagonista RNK1 utilizado en humanos produciría los mismos efectos antitumorales que los observados con L-733,060 in vitro. También se deberían continuar con los estudios in vitro en otras líneas celulares tumorales a las ya estudiadas, así como realizar modelos in vivo de animales con xenoinjertos tumorales.

A pesar de las limitaciones del trabajo, en tanto que hemos utilizado un modelo in vitro y una única línea celular tumoral, creemos que los resultados aportan aspectos novedosos acerca de la patogénesis tumoral y de una posible vía terapéutica alternativa para esta enfermedad.

Todos los hechos anteriores indican que el sistema SP/ RNK1 podría estar implicado de forma sustancial en el desarrollo del cáncer y en la producción de metástasis, y que la SP podría ser considerada como un mitógeno universal en células cancerosas con expresión del RNK1.

El recién iniciado camino en la terapia con antagonistas RNK1, aunque para otras entidades clínicas, podría dar paso a una nueva alternativa para el tratamiento del cáncer. Nuestro trabajo aporta, como elemento original, una aproximación terapéutica poco conocida hasta ahora frente al control del Neuroblastoma.

## **RESUMEN**

Hemos realizado un estudio in vitro sobre la capacidad inhibitoria del crecimiento celular del antagonista NK1 L-733,060 a dosis de 2.5-20  $\mu$ M, en la línea celular de Neuroblastoma humano SK-N-BE (2). El efecto mitogénico de la SP y la expresión de receptores NK1 han sido determinados sobre la misma línea celular.

Para la valoración de los efectos sobre el crecimiento celular hemos utilizado el método colorimétrico que incluye el compuesto MTS tetrazolium. El estudio de los receptores NK1 se realizó con la técnica de Western Blot.

La SP ha estimulado la proliferación celular en la línea SK-N-BE (2) de Neuroblastoma humano a dosis nanomolares (5,10 y 100nM). L-733,060 inhibió el crecimiento de la línea celular de Neuroblastoma a concentraciones micromolares de forma dosis dependiente, con una DI (50) de 11.29  $\mu$ M (30 horas) y de 10.7  $\mu$ M (72 horas); a dosis de 20 $\mu$ M la inhibición de la proliferación celular fue completa, con ausencia de células tumorales. La SP, a una dosis de 100 nM, revirtió parcialmente el efecto inhibitorio del antagonista RNK1, L-733,060 en la línea celular SK-N-BE (2). Ello sugiere que la acción mitogénica del neuropéptido sobre las células tumorales de Neuroblastoma está mediada específicamente por la unión al receptor NK1.

Hemos podido detectar dos isoformas del receptor NK1, de 58 y 33 kDa respectivamente, en la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-BE (2).

Estos hallazgos demuestran que la SP actúa como mitógeno en las células de neuroblastoma humano a través de la unión al RNK1. El control parcial por la SP del efecto inhibitorio del antagonista L-733,060, favoreciendo nuevamente el

crecimiento del tumor refuerza la idea del papel destacado del binomio SP-RNK1 en el desarrollo y progresión del Neuroblastoma. Estos hechos, descritos por primera vez, sugieren que el antagonista RNK1 L-733,060 podría ser una alternativa terapéutica para el control del Neuroblastoma humano.

## **CONCLUSIONES**

1. La línea celular de Neuroblastoma humano SK-N-BE (2) expresa las isoformas de los receptores NK1.
2. El neuropéptido Sustancia P a dosis nanomolares produce un aumento de la mitogénesis en la línea celular de Neuroblastoma humano SK-N-BE (2).
3. El antagonista no peptídico de los receptores NK1 L-733,060 produce inhibición del crecimiento de la línea celular de Neuroblastoma humano SK-N-BE (2).
4. La inhibición del crecimiento observado en la línea celular de Neuroblastoma humano SK-N-BE (2) tras tratamiento con el antagonista no peptídico de los receptores NK1 L-733,060 es dosis dependiente.
5. El antagonista no peptídico de los receptores NK1 L-733,060 a dosis de 20  $\mu$ M produce una inhibición completa del crecimiento celular en la línea celular de Neuroblastoma humano SK-N-BE (2).
6. El efecto inhibitorio del crecimiento celular en la línea celular de Neuroblastoma humano SK-N-BE (2) fue parcialmente revertido tras la administración del neuropéptido Sustancia P.
7. El efecto mitogénico del neuropéptido Sustancia P a dosis nanomolares en la línea celular de Neuroblastoma humano SK-N-BE (2) indica una regulación del crecimiento tumoral por el Sistema nervioso.
8. El receptor NK1 es una nueva diana en el tratamiento del Neuroblastoma humano.
9. El sistema SP/NK1 abre un nuevo horizonte en la terapia antitumoral del Neuroblastoma humano.



## **BIBLIOGRAFIA**

1. Allen JM, Hoyle NR, Yets JC, Gathe MA, Thomas DG, Blom SR. Neuropeptides in neurological tumours. *J Neuro-Oncol.* 1985;3:197-202.
2. Almeida T, Rojo J, Nieto PM. Tachykinins and tachykinin receptor: structure and activity relationships. *Curr Med Chem.* 2004;11:763-771.
3. Bang R, Biburger M, Neuhuber WL, Tiegs G. Neurokinin-1 receptor antagonists protect mice from CD95- and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptotic liver damage. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Mar;308(3):1174-1180.
4. Bang R, Sass G, Kiemer AK, Vollmar AM, Neuhuber WL, Tiegs G. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Apr;305(1):31-39.
5. Barber RP, Vaughn JE, Slemmon JR, Salvaterra PM, Roberts E, Leeman SE. The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord. *J Comp Neurol.* 1979; 184: 331-352.
6. Barker R. Substance P and neurodegenerative disorders: a speculative review. *Neuropeptides.* 1991; 20:73-78.
7. Bartfai T, Iverfeldt K, Fisone G, Serfözö P. Regulation of the release of coexisting neurotransmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1988;28: 285-310.
8. Beartschi AJ, Zingg HH, Dreifuss JJ. Enkephalins, substance P, bradykinin and angiotensin II: differential sites of action on the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Brain Res.* 1981; 220: 107-119.
9. Beattie DT, Bersford IJ, Connor HE, Marshall FH and Ward P. The pharmacology of GR203040, a novel, potent and selective non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 1995 ; 116(8):3149-3157.

10. Belcher G, Ryall RW. Substance P and Renshaw cells: A new concept of inhibitory synaptic interaction. *J Physiol (London)*. 1977; 272: 1105-1119.
11. Benuck M, Marks N. Enzymatic inactivation of substance P by a partially purified enzyme from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975;65:153-160.
12. Berridge MV, Tan A. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303: 474- 480.
13. Betancur C, Azzi M, Rostène W. Nonpeptide antagonists of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. *Trends Physiol Sci*. 1997;18:372-386.
14. Biedler JL. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Research*. 1978;38:3751-3757.
15. Bishop AE, Hamid QA, Adams C, Bretherton-Watt D and Polak JM. Expression of tachykinins by ileal and lung carcinoid tumors assayed by combined in situ hybridization, immunocytochemistry, and radioimmunoassay. *Cancer (Phila)*. 1989; 63:1129-1137.
16. Bower RJ, Adkins JC. Ondine's curse and neurocristopathy. *Clin Pediatr*. 1980; 19:665-668.
17. Brodeur GM, Maris JM. Principles and Practice of Pediatric Oncology, Fourth edition. Pizzo PA and Poplack DG (eds.). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2002; 31:895-937.
18. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F. Revisions in the international criteria of neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993;11:1466-1477.
19. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A. International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1988;6:1874-1881.

20. Brodeur GM, Seeger RC, Schawb M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;224:1121-1124.
21. Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P. Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci*. 2003 May;17(9):1736-1746.
22. Camarda V, Rizzi A, Calo G. Pharmacological profile of hemokinin 1: a novel member of the tachykinin family. *Life Sci*. 2002 Jun 14;71(4):363-370.
23. Campos D, Pereira JR, Reinhardt RR, Carracedo C, Poli S, Vogel C et al. Prevention of cisplatin-induced emesis by the oral neurokinin-1 antagonist, MK-869, in combination with granisetron and dexamethasone or with dexamethasone alone. *J Clin Oncol*. 2001;19(6):1759-1767.
24. Camras CB, Bito LZ. The patophysiological effects of nitrogen mustard on the rabbit eyes. II. The inhibition of the initial hypertensive phase by capsaicin and the apparent role of substance P. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980; 19: 423-428.
25. Carney DN, Cuttita F, Moody TW, Minna JD. Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Cancer Res*. 1987;47: 821-825.
26. Carter MS, Cremins JD, Krause JE: Structure, expression and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K and neuropeptide  $\gamma$ . *J Neurosci*. 1990;10: 2203-2214.
27. Cassam AK, Rogers KA, Weaver LC. Co-localization of substance P and dopamine beta-hydroxylase with growth-associated protein 43 is lost caudal to a spinal cord transection. *Neuroscience*. 1999; 88(4): 1275-88.
28. Castleberry RP. Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatr Clin North Am*. 1997;44(4):919-937.
29. Castro-Obregon S, Del Rio G, Chen SF, Swanson RA, Frankowski H, Rao RV et al. A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic

- form of programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2002;9(8):807-817.
30. Celltiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin TB# 245, Promega Corporation, 1999.
  31. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino acid sequence of substance P. *Nature* 1971;232: 86-87.
  32. Chan-Palay V, Jonsson EY and Palay SL. Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75:582- 586.
  33. Chan-Palay V, Jonsson G, Palay SL. Serotonin and substance P coexist in neurons in the rat's central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75:1582-1586.
  34. Cinatl JJr, Kotchetkov R, Blaheta R, Driever PH, Vogel JU, Cinatl J. Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon-alpha. *Int J Oncol.* 2002;20(1):97-106.
  35. Cirillo R, Astolfi M, Conte B, López G, Parlani M, Terracciano R et al. Pharmacology of the peptidomimetic, MEN 11149, a new potent, selective and orally effective tachykinin NK1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1998;341(2-3):201-209.
  36. Clive S, Webb DJ, MacLellan AJ, Young A, Robson L, Smyth JF et al. Forearm blood flow and local responses to peptide vasodilators: a novel pharmacodynamic measure in the phase I trial of antagonist G, a neuropeptide growth factor antagonist. *Clin Cancer Res.* 2001;7(10):3071-3078.
  37. Costa M, Cuello AC, Furness JB, Franco R. Distribution of enteric neurons showing immunoreactivity for substance P in the guinea-pig ileum. *Neuroscience.* 1980; 5: 323-331.
  38. Coudore CM, Courteix C, Eschalier A and Fialip J. Effect of tachykinin receptor antagonist in experimental neurophatic pain. *Eur J Pharmacol.* 1988;361:175-184.
  39. Cummings J, MacLellan AJ, Jones DA, Langdon SP, Rozengurt E, Ritchie AA, et al. Pharmacokinetics, metabolism, tissue and tumour

- distribution of the neuropeptide growth factor antagonist  $\text{[Arg}^6, \text{D-Trp}^{7,9}, \text{MePhe}^8\text{]} \text{SP (6-11)}$  in nude mice bearing the H69 small-cell lung cancer xenograft. *Ann Oncol.* 1995;6: 595-602.
40. Dale HH. The beginnings and the prospects of neurohumoral transmission. *Pharmacol Rev.* 1954; 6: 7-13.
  41. Dalsgaard C-J, Haegerstrand A, Theodorsson-Norheim E, Brodin E, Hökfelt T. Neurokinin A like immunoreactivity in rat primary sensory neurons: coexistence with substance P. *Histochemistry.* 1985;83:37-40.
  42. Derocq JM, Segui M, Blazy C, Emonds-Alt X, Le Fur G, Brelire JC et al. Effect of substance P on cytokine production by human astrocytic cells and blood mononuclear cells: characterization of novel tachykinin receptor antagonists. *FEBS Lett.* 1996;399(3): 321-325.
  43. Díaz E. Localización y Modificación de la Inmunoreactividad a Sustancia P, en la Medula Espinal Tras Traumatismo Espinal Tratada con Naloxona, 2002, *Farmacología, pediatría y Radiología*
  44. Diemunsch P, Grelot L. Potential of Substance P antagonists as antiemetic. *Drugs.* 2000;60 (3): 533-546.
  45. Dotsch J, Christiansen H, Hanze J, Lampert F, Rascher W. Plasma neuropeptide Y of children with neuroblastoma in relation to stage, age and prognosis, and tissue neuropeptide Y. *Regul Pept* 1998;75-76:185-190.
  46. Dun NJ, Jiang ZG. Non-cholinergic excitatory transmission in inferior mesenteric ganglia of the guinea-pig: Possible mediation by substance P. *J Physiol (Lond).* 1982; 325:145-159.
  47. Dutta AS, Gormley JJ, Graham AS, Briggs I, Growcott JW and Jamieson A. Analogues of substance P. Peptides containing D-amino acid residues in various positions of substance P and displaying agonist or receptor selective antagonist effects. *J Med Chem.* 1986;29:1163-1171.
  48. Eder U, Fischer-Colbrie R, Kogner P. Levels and molecular forms of chromogranins in human childhood neuroblastomas and ganglioneuromas. *Neuroscience Lett.* 1998;253:17-20.

49. Eistetter HR, Mills A, Brewster R, Alouani S, Rambosson C, Kawashima E. Functional characterization of neurokinin-1 receptors on human U373MG astrocytoma cells. *Glia*. 1992; 6:89-95.
50. Emonds-Alt X, Doutremepuich JD, Heaulme M, Neliat G, Santucci V, Steinberg R et al. In vitro and in vivo biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. 1993; 250(3):403-413.
51. Erspamer V. The tachykinins peptide family. *Trends Neurosci*. 1981;4:267-269.
52. Eule US v, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol (Lond.)*. 1931; 72:74-87.
53. Euler, US. V: Substance P, subcellular particles in peripheral nerves. *Ann NY Acad Sci*. 1963; 104:444-461.
54. Evangelista S. Involvement of tachykinins in intestinal inflammation. *Current Pharmaceutical Design*. 2001;71:19-31.
55. Evans AE, D'Angio GJ, Propert K, Anderson J, Hann H-WL. Prognostic factors in neuroblastoma. *Cancer* 1987;59:1853-1859.
56. Everard MJ, Macaulay VM, Miller JL, Smith IE. In vitro effects of substance P analogue  $\alpha$ -D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7,9, Leu11]substance P on human tumour and normal cell growth. *Br J Cancer*. 1992; 65(3):388-392.
57. Feistritzer C, Clausen J, Sturn DH, et al. Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regul Pep*. 2003;116:119-126.
58. Flórez, J, Armijo J.A, Mediavilla A. *Farmacología Humana*; 4ª edición. B Ed. Mason-Salvat, 2003.
59. Folkers K, Hörig J, Rosell S, Björkroth U. Chemical design of antagonists of substance P. *Acta Physiol Scand* 1981;111: 505-506.
60. Fong TM, Huang RC, Stader CD. Localization of agonist and antagonist binding domains of the human neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem*. 1992(a);267:25664-25667.
61. Fowler CJ, Brannstrom G. Substance P enhances forskolin-stimulated cyclic AMP production in human UC11MG astrocytoma cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1994 Jan-Feb;16(1):21-28.

62. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Shailesh V, Shrikhande LW et al. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest.* 2003 May;83(5):731-742.
63. Furness J, Papka RE, Della NG, Costa M, Eskay RL. Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience.* 1982;7:447-459.
64. Furness JB, Costa M. *The Enteric Nervous System.* New York, Churchill Livingstone. 1987.
65. Gaspar MN, Ribeiro CA, Cunha-Vaz JG, Macedo TR. Effects of neuropeptides on the sumatriptan-disturbed circulation in the optic nerve head of rabbits. *Pharmacology,* 2004 Mar;70(3):152-159.
66. Gether U, Johansen TE, Snider RM, Lowe AJ, Nakanishi S, Schwartz TW. Different binding epitope for substance P and the non-peptide antagonist, CP 96,345 on the NK1 receptor. *Nature* 1993;362:345-348.
67. Gilbert MS, Payan DG. Interaction between the nervous and immune systems. *Frontiers neuroendocrinol.* 1991;12:299-322.
68. Gillespie GY (1996). Cytokines as modulators of malignant glioma progression. In: *Cytokines and the CNS,* Ransohoff RM and Benevise EM (eds), pp.269-286. CRC press: Boca raton.
69. Gitter BD, Regoli D, Howbert JJ, Glasebrook AL, Waters DC. Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. *J Neuroimmunol.* 1994; 51:101-108.
70. Glowinski J, Michelot R, Chemary A. Role of striato-nigral Substance P in the regulation of the activity of the nigro-striatal dopaminergic neurons. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1980; 22: 51-62.
71. Goldstein DJ, Wang O, Saper JR, Stoltz R, Silberstein SD, Mathew NT. Ineffectiveness of neurokinin-1 antagonist in acute migraine: a crossover study. *Cephalalgia.* 1997;17:785-790.
72. Harkins J, Roper M, Ham RG, Stewart JM. Biosynthesis of substance P in cultured mouse neuroblastoma and rat glioma cells. *Brain Research.* 1978;147:405-409.



73. Harrison T, Owens AP, Williams BJ, Cascieri MA. Piperidine ether-based hNK1 antagonist 1: determination of the relative and absolute stereochemical requirements. *Biorg Med Chem Lett.* 1994; 4:2545-2549.
74. Heffner KL, Loving TJ, Robles TF, Kiecolt-Glaser JK. Examining psychosocial factors related to cancer incidence and progression: In search of the silver lining. *Brain Behav Immun.* 2003;17:109 –111.
75. Helke CJ, O'Donohue TL, Jacobowitz DM.: Substance P as a baro- and chemoreceptor afferent neurotransmitter: immunocytochemical and neurochemical evidence in the rat. *Petides.* 1980; 1:1-9.
76. Henning IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance P receptors in human primary neoplasm: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer.* 1995; 61: 786-792.
77. Henry JL, Krnjević K, Morris ME. Substance P and spinal neurons. *Can J Physiol Pharmacol.* 1975; 53: 423-432.
78. Henry JL. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res.* 1976; 114: 439-451.
79. Hershey AD, Dykema PE, Krause JE: Organization, structure, and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. *J Biol Chem.* 1991; 226: 4366-4374.
80. Ho WZ, Kaufman D, Uvaydova M, Douglas SD. SP augments interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  release by human cord monocytes and macrophages. *J Neuroimmun.* 1996 b; 96:132-140.
81. Ho WZ, Stavropoulos G, Lai J-P, Douglas SD. Substance P C-terminal octapeptide analogues augment tumor necrosis factor- $\alpha$  release by human blood monocytes and macrophages. *J Neuroimmun.* 1998; 82:126-132.
82. Hökfelt T, Elfvin LG, Elde R, Schultzberg M, Goldstein M, Luft R. Occurrence of somatostatin-like immunoreactivity in some peripheral sympathetic noradrenergic neurons. *Proc. Natl Acad Sci.* 1977; 74: 3587-3591.
83. Hökfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M. Peptidergic neurons. *Nature* 1980; 284: 515-521.

84. Hökfelt T, Kellerth J-O, Nilsson G, Pernow B. Substance P: localisation in the central system and some primary sensory neurons. *Science*. 1975; 190:889-894.
85. Hökfelt T, Lundberg JM, Schultzberg M, Johanson O, Ljungdahl A, Rehfeld JF. Coexistence of peptides and putative transmitters in neurons. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1980; 22:1-23.
86. Hökfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med*. 2001; 249:27-40.
87. Holzer P, Holzer-Petscher U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther*. 1997; 73: 173-217.
88. Holzer P, Holzer-Petscher U. Tachykinins in the gut. Part II. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther*. 1997; 73: 219-63.
89. Jarpe MB, Knall C, Mitchell FM, Buhl AM, Duzic E and Johnson GL. [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>] Substance P acts as a biased agonist toward neuropeptide and chemokine receptors. *J Biol Chem*. 1998; 273(5):3097-3104.
90. Jessell TM. Substance P release from the rat substantia nigra. *Brain Res*. 1978; 151: 469-478.
91. Joshi VV, Cantor AB, Altshuler G, Larkin EW, Neill JS, Shuster JJ, et al. Recommendations for modification of terminology of neuroblastic tumors and prognostic significance of Shimada classification. A clinicopathologic study of 213 cases from the Pediatric Oncology Group. *Cancer*. 1992 Apr 15; 69(8):2183-2196
92. Kage R, McGregor GP, Thim L. Neuropeptide- $\gamma$ . A peptide isolated from rabbit intestine that is derived from  $\gamma$ -Preprotachykinin. *J Neurochem*. 1988; 50:1412-1417.
93. Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983 Jul 29; 114(2):533-40.
94. Katzenstein HM, Bowman LC, Brodenz GM et al. Prognostic significance of age, MYCN oncogen amplification, tumor cell ploidy,

- and histology in 110 infants with neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 1998; 16:2007-2017.
95. Kessler JA, Black IB. Regulation of substance P in adult rat sympathetic ganglia. *Brain Res.* 1982; 234: 182-187.
96. Khan S, Liu YC, Khawaja AM, Manzini S and Rogers DF. Effect of the long-acting tachykinin NK (1) receptor antagonist MEN 11467 on tracheal mucus secretion in allergic ferrets. *Br J Pharmacol.* 2001 Jan; 132(1):189-196.
97. Khare VK, Albino AP, Reed JA. The neuropeptide/mast cell secretagogue substance P is expressed in cutaneous melanocytic lesions. *J Cutan Pathol.* 1998; 25:2-10.
98. Kimura N, Yahamoto H, Okamoto H, Gotoh K, Sone M, Mouri T et al. Detection of multiple hormones and their mRNAs in human neuroblastoma cell line NB-1 using in situ hybridization, immunocytochemistry and radioimmunoassay. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol pathol* 1992; 62(5): 321-327.
99. Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata E. Novel neuropeptides, neurokinins A and B, isolated from porcine spinal cord. *Proc Jpn Acad.* 1983; 56:101-104.
100. Kogner P, Borgstrom P, Bjellerup P, Schilling FH, Refai E, Jonsson C et al. Somatostatin in neuroblastoma and ganglioneuroma. *Eur J Cancer.* 1997; 33: 2804-2809.
101. Kostyk SK, Kowall NW and Hauser SL. SP immunoreactive astrocytes are present in multiple sclerosis plaques. *Brain Res.* 1989; 504:284-288.
102. Kramer MS, Cutler N, Feighner JI. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 1998; 281:1640-1645.
103. Kramer MS, Winokur A, Kelsey J, Preskorn SH, Rothschild AJ, Snavely D et al. Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK1) receptor antagonist in major depression. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29 (2):385-392.

104. Krause JE, DiMaggio DA and McCarson KE. Alterations in neurokinin 1 receptor gene expression in models of pain and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.*1995; 73:854-859.
105. Krause JE, Takeda Y, Hershey AD. Structure, functions and mechanisms of Substance P receptor action. *J Invest Dermatol.*1992; 98 (6Suppl):2S-7S.Review.
106. Kushner BH, Gilbert F and Helson L. Familial neuroblastoma: case reports, literature review, and etiologic considerations.*Cancer* 1986; 57(9):1887-1893.
107. Kushner BH, Hajdu SI and Helson L. Synchronous neuroblastoma and von Recklinghausen's disease : a review of the literature. *J Clin Oncol.*1985; 3: 117-120.
108. Lai JP, Ho WZ, Zhan GX, Yi Y, Collman RG and Douglas SD. Substance P antagonist (CP-96,345) inhibits HIV-1 replication in human mononuclear phagocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98 (7):3970-3975.
109. Laird JM, Hargreaves RJ , Hill RG. Effect of RP 67580 a non peptide neurokinin 1 receptor antagonist on facilitation of a nociceptive spinal reflex in the rat. *Br J Pharmacol.*1993; 109(3):713-718.
110. Langdon S, Sethi T, Ritchie A, Muir M, Smyth J, Rozengurt E. Broad spectrum neuropeptide antagonists inhibit the growth of small cell lung cancer in vivo. *Cancer Research* 1992; 52: 4554- 4557.
111. Lembeck F. Zur frage der zentralen ubertragung afferenter impulse, III. Mitteilung.Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1953; 219: 197-213.
112. Li FP. Fracción heredable del tumor de Wilms unilateral. *Pediatrics (ed esp).* 1988; 25:51-55.
113. Lieb K, Fiebich BL, Berger M, Bauer J, Schulze-Osthoff K. The neuropeptide substance P activates Transcription factor NF- $\kappa$ B and  $\kappa$ B-dependent gene expression in human Astrocytoma cells. *J Immunology.* 1997; 159:4952-4958.

114. Lilling G, Wollman Y, Goldstein MN, Rubinraut S, Fridkin M, Brenneman DE, Gozes I. Inhibition of human neuroblastoma growth by a specific VIP antagonist. *J Mol Neurosci.* 1994-95; 5(4):231-239.
115. Linet MS, Ries LA, Smith MA, et al. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:1051-1058.
116. Lissoni P, Barni S, Tancini G, Fossati V, Frigerio F. Pineal-opioid system interactions in the control of immunoinflammatory responses. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Nov;741:191-196.
117. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, et al. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *New Engl J Med.* 1984;311:231-235.
118. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 1991; 9:581-591.
119. Loonam TM, Noailles PA, Yu J, Zhu JP, Angulo JA. Substance P and cholecystokinin regulate neurochemical responses to cocaine and methamphetamine in the striatum. *Life Sci.* 2003 Jun 27; 73(6):727-739.
120. Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science (Washington DC).* 1987; 235:893-895.
121. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 1993; 328:1433-1437.
122. Lucey DR, Novak JM, Polonis VR, Liu Y, Gartner S. Characterization of substance P binding to human monocytes/macrophages. *Clin Diag Lab Immunol.* 1994; 1:330-335.
123. Lundberg JM, Saria A, Brodin E, Rosell S, Folkers K. A substance P antagonist inhibits vagally induced inflammation and bronchial muscle contraction in the guinea-pig. *Proc Natl Acad Sci.* 1983;80: 1120-1124.

124. Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Research*.1996; 56: 4983-4991.
125. Macdonald SG, Dumas JJ, Boyd ND. Chemical cross-linking of the substance P (NK-1) receptor to the alpha subunits of the G proteins Gq and G11. *Biochemistry*.1996 Mar 5;35 (9):2909-2916.
126. Maggi CA. Principles of tachikinergetic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regul Pept*. 2000 Sep 25; 93(1-3):53-64.
127. Malcangio M, Bowery NG. Effect of the tachykinin NK1 receptor antagonists RP 67580 and SR 140333 on electrically-evoked substance P release from rat spinal cord. *Br J Pharmacol*. 1995; 113:635-640.
128. Mantyh PW, Demaster E, Malhotra A. Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science*.1995; 268: 1629-1632.
129. Mantyh PW, Johnson DJ, Boehmer CG, Catton MD, Vinters HV, Maggio JE, Too HP, Vigna SR. Substance P receptor binding sites are expressed by glia in vivo after neuronal injury. *Proc Natl Acad Sci. USA*.1989; 86:5193-5197.
130. Maris JM, Chatten J, Meadows AT. Familial neuroblastoma: a three generation pedigree and a further association with Hirschsprung disease. *Med Pediatr Oncol*. 1997; 28:1-5.
131. Maris JM, Weiss MJ, Guo C. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression, but not decreased overall survival probability, in neuroblastoma patients: a Children's Cancer group Study. *J Clin Oncol*. 2000; 18:1888-1899.
132. Martin FC, Charles AC, Sanderson MJ and Merrill JE. Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Research*. 1992; 599:13-18.
133. Masu, Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S. cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature*. 1987; 329: 836-838.

134. Matthay KK, Pérez C, Seeger RC. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 1256-1264.
135. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC. Treatment of high risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med.* 1999; 341:1165-1173.
136. McGillis JP, Organist ML, Scriven KH, Payan DG. Purification of the 33,000-dalton ligand binding-protein constituent of the lymphoblast substance P receptor. *J Neurosci Res.* 1987; 18(1):190-194.
137. McGillis MG, Mitsuhashi M and Payan DG. Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann NY Acad Sci.* 1990; 294:85-88.
138. McGregor G, Gaedike G and Voigt K. Neurokinin-immunoreactivity in human neuroblastomas. Evidence for selective expression of the preprotachykinin (PPT) gene. *FEBS Lett.* 1990; 277(1-2):83-87.
139. McLean S, Ganong A, Seymour P and Heym J. Pharmacology of CP99,994; a non-peptide antagonist of the tachykinin NK1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 267:472-476.
140. McLean S, Ganong AH, Seeger TF, Heym J. Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance P (NK1) receptor antagonist. *Science.* 1991; 251:437-439.
141. Miller RW, Young JL, Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer* 1995; 75:395.
142. Monzavi-Karbassi B, Cunto-Amesty G, Luo P, Shamloo S, Blaszyk-Thurin M, Kieber-Emmons T. Immunization with a carbohydrate mimicking peptide augments tumor-specific cellular responses. *International Immunology.* 2001 Nov; 13(11): 1361-1371.
143. Moskowitz MA. Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology.* 1993; 43(Suppl. 3): 16s-19s.
144. Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarrigo C, Rosso R. Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733,060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Research.* 2004; 14:183-188.

145. Nadel JA. Mechanisms of inflammation and potential role in the pathogenesis of asthma. *Allergy Proc.* 1991 Mar-Apr; 12(2):85-88.
146. Nadel JA. Neutral endopeptidase modulation of neurogenic inflammation in airways. *Eur Respir J Suppl.* 1990 Dec;12:645s-651s.
147. Nakagawara A, Arima-Nakarawa M, Scavarda NJ. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *New Engl J Med.* 1993; 328:847-854.
148. Nakanishi S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1991; 14: 123-36.
149. Nakanishi S. Substance P precursor and kininogen: Their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol Rev.* 1987;67:1117-1142.
150. Nakata Y, Hiraoka C, Segawa T. Apparent molecular weight of the substance P binding site in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 1988 Jul 26; 152(1-2):171-4.
151. Nakata Y, Kusaka Y, Segawa T, Yakima H, Kitagawa K. Substance P: regional distribution and specific binding to synaptic membranes in rabbit central nervous system. *Life Sci.* 1978; 22: 259-268.
152. Navari RM, Reinhardt RR, Gralla RJ. Reduction of Ciplatin-induced emesis by a selective neurokinin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med.* 1999; 340:190-195.
153. Nicoll RA, Schenker C, Leeman SE. Substance P as a neurotransmitter candidate. *Annu Rev Neurosci.* 1980; 3: 227-268.
154. Nilsson G, Pernow B, Fisher GH, Folkers K. Presence of substance P-like immunoreactivity in plasma from man and dog. *Acta Physiol Scand.* 1975; 94:542-544.
155. Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature (Lond).* 1985; 315:61-63.



156. Nowicki M, Miskowiak B. Comparison of the cell immunophenotype of metastatic and primary foci in stage IV-S neuroblastoma. *Folia Histochem Cytobiol.* 2002; 40: 297–303.
157. Nyeki O, Rill A, Schon I, Orosz A, Schrett J, Bartha L, Nagy J (1998). Synthesis of peptide and pseudopeptide amides inhibiting the proliferation of small cell and epithelial types of lung carcinoma cells. *J Pept Sci.* 1998; 4(8):486-495.
158. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol.* 2004; Nov; 201(2):167-180.
159. Olgart L, Gazelius B, Brodin E, Nilsson G. Release of Substance P-like immunoreactivity from the dental pulp. *Acta Physiol Scand.* 1977; 101: 510-512.
160. Olsen CK, Hogg S, Lapiz MD. Tonic immobility in guinea pigs: a behavioural response for detecting an anxiolytic-like effect? *Behav Pharmacol.* 2002 Jul; 13(4):261-269.
161. Olshan AF, Bunin GR. Epidemiology of neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T and Tsuchida Y. (eds.) *Neuroblastoma.* Amsterdam: Elsevier Science. 2000:33-39.
162. Organist ML, Harvey JP, McGillis JP, Payan DG. Processing of the human IM-9 lymphoblast substance P receptor. Biosynthetic and degradation studies using a monoclonal anti-receptor antibody. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Feb 29; 151(1):535-41.
163. Orosz A, Schrett J, Nagy J, Bartha L, Schön I. and Nyéki O. New short chain analogs of a substance P antagonist inhibit proliferation of human small-cell lung –cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 1995; 60:82-87.
164. Otsuka M, Konishi S, Takahashi T. A further study of motoneuron-depolarizing peptide extracted from dorsal roots of bovine spinal nerves. *Proc Jpn Acad.* 1972; 48:747-752.
165. Otsuka M, Konishi S. Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of new-born rat. *Nature.* 1976; 264: 83-84.
166. Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev.* 1993; 73: 229-308.

167. Palma C, Bigioni M, Irrisuto C, Nardelli F, Maggi CA and Manzini S. Anti-tumor activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer*. 2000; 82(2):480-487.
168. Palma C, Manzini S. Substance P induces secretion of immunomodulatory cytokines by human astrocytoma cells. *J Neuroimmunol*. 1998; 81:127-137.
169. Palma C, Nardelli F, Manzini S and Maggi CA. Substance P activates responses correlated with tumor growth in human glioma cells line bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer*. 1999 (a) Jan; 79(2):236-243.
170. Parnet P, Mitsuhashi M, Turck CW, Kerdelhue B, Payan DG. Tachykinin receptor cross-talk. Immunological cross-reactivity between the external domains of the substance K and substance P receptors. *Brain Behav Immun*. 1991 Mar;5(1):73-83.
171. Payan DG, McGillis JP, Organist ML. Binding characteristics and affinity labeling of protein constituents of the human IM-9 lymphoblast receptor for substance P. *J Biol Chem*. 1986; 261(30):14321-14329.
172. Pence JC, Shorter NA. The autocrine function of vasoactive intestinal peptide on human neuroblastoma cell growth and differentiation. *Arch Surg*. 1993; 128:591-595.
173. Peris R. Resultados del Registro Nacional de Tumores Infantiles (RNTI). *Anales Españoles de Pediatría* 1997; 46 (supl 2): 170-172.
174. Pernow B. Studies on substance P. Purification, occurrence and biological actions. *Acta Physiol Scand*. 1953; 29:1-90.
175. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev*. 1983 Jun; 35 (2): 85-141.
176. Prasanna D, Sudha S, Evans C, Girjesh G. Substance P: Structure, Function and Therapeutics. *Curr Top Med Chem*. 2004;(4)1:75-103.
177. Qualman SJ, O'Dorisio MS, Fleshman DJ. Neuroblastoma. Correlation of neuropeptide expression in tumor tissue with other prognostic factors. *Cancer*. 1992; 70:2005-2012.

178. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor: Part II. Distribution and pathophysiological role. *Neuropeptides*.1998; 32:1-49.
179. Quesnel S, Malkin D. Genetic predisposition to cancer and familial cancer syndromes. In Link MP, editor. *Pediatric oncology. Pediatric Clinics of North America*, Philadelphia, PA: W.B. Saunders. 1997; vol 44:791-808.
180. Radhakrishnan V, Henry JL. Novel substance P antagonist, CP-99,345, blocks responses of cat spinal dorsal horn neurones to noxious cutaneous stimulation and to substance P. *Neurosci Lett*.1991; 132:39-43.
181. Rameshwar P, Gascón P. Induction of negative hematopoietic regulators by neurokinin-A in bone marrow stroma. *Blood*.1996;88:98-106.
182. Rameshwar P, Poddar A, Gascón P. Hematopoietic regulation mediated by interactions among the neurokinins and cytokines. *Leuk Lymphoma*.1997; 28:,1-10.
183. Ramón y Cajal, S. (1888) Estructura de los centros nerviosos de las aves, *Rev. Trim. Histol. Norm. Pat.*, 1: 1-10.
184. Reeve JG, Bleehen NM.  $\alpha$ -Arg1-D-Phe5, D-Trp7,9, Leu11] Substance P induces apoptosis in lung cancer cell lines in vitro. *Biochem.Biophys. Res. Commun*. 1994; 199:1313-1319.
185. Regoli D, Escher E, Mizrahi J. Substance P-structure activity studies and the development of antagonists. *Pharmacology*.1984; 28:301-320.
186. Ries LA, Percy CL, Bunin GR. Introduction-SEER Pediatric Monograph. IN: Ries L, Smith M, Gurney JG, et al., (eds). *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER program 1975-1995*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER program. NIH (Pub. No.99-4649), 1999:1-15.
187. Rosell S, Björkroth U, Xu JC, Folkers K. The pharmacological profile of a substance P antagonist. Evidence for the existence of subpopulations of SP receptors. *Acta Physiol Scand*.1983; 117:445-449.

188. Rosenberg ZF, Faci AS. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection:cytokine induction of HIV expression. *Immunol Today*.1992; 11:176-180.
189. Rozengurt E, Sinnott-Smith J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.1993; 80:2936-2940.
190. Rupniak NM, Carlson E, Boyce S, Webb JK, Hill RG. Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils. *Pain*. 1996 Sep; 67(1):189-195.
191. Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalization in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacol*. 2000; 39:1413-1421.
192. Rupniak NM, Hill RG. In: *Novel aspects of pain management: Opioids and beyond*. Sawynok J and Cowan A. Eds: John Wiley Press.1999, pp 135-155.
193. Sachon E, Girault-Lagrange S, Chassaing G, Lavielle S, Sagan S. Analogs of substance P modified at the C-terminus wich are both agonist and antagonist of the NK1 Receptor depending on the second messenger pathway. *J Pept Res*. 2002; 59:232-240.
194. Salvador L, Sabanes F, Bueno FA. Mensajeros neuronales y transmisión sináptica. *Medicine*. 1986; 67: 2777-2790.
195. Sánchez E. Localización y Modificación de Inmurreactivo a Sustancias P Tras Un Traumatismo Medular Experimental Tratado con Altas Dosis de Dexametaxona, 2001, Farmacología, Pediatría y Radiología.
196. Sandberg BE, Lee C-M, Hanley MR, Iversen LL.: Synthesis and biological properties of enzyme-resistant analogues of substance P. *Eur J Biochem*. 1981; 114:329-337.
197. Sasai Y and Nakanishi S. Molecular characterization of rat substance K receptor and its mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*.1990; 165:699-702.

198. Saylor RL, Stine KC, Sullivan J, Kepner JL, Wall DA and Bernstein ML. Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 1; 19(15):3463-3469.
199. Schaible H-G, Jarrott B, Hope PJ, Duggan AW. Release of immunoreactive substance P in the spinal cord during development of acute arthritis in the knee joint of the cat: a study with antibody microprobes. *Brain Res* 1990; 529:214-223.
200. Schenker C, Mroz EA, Leeman SE. Release of substance P from isolated nerve endings. *Nature (London)*. 1976; 264: 790-792.
201. Scicchitano R, Biennenstock J, Stanisz AM. In vivo immunomodulation by the neuropeptide substance P. *Immunology*. 1988; 63:733-735.
202. Seabrook GR, Shephard SL, Williamson DJ, Tyrer P, Rigby M, Cascieri MA et al. L-733,060, a novel tachykinin NK1 receptor antagonist; effects in  $[Ca^{2+}]_i$  mobilisation, cardiovascular and dural extravasation assays. *Eur J Pharmacol*. 1996; 317:129-135.
203. Seckl M J, Higgins T, Widmer F, Rozengurt E.  $\alpha$ -D-Arg<sup>1</sup>, D-Trp<sup>5,7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>] Substance P: A novel potent inhibitor of signal transduction and growth in vitro and in vivo in small cell lung cancer cells. *Cancer Research*. 1997; 57: 51- 54.
204. Sethi T, Langdon S, Smyth J, Rozengurt E. Growth of small cell lung cancer cells: Stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists in vitro and in vivo. *Cancer Research*. 1992; 52S: 2737s-2742s.
205. Sharif M. Mitogenic signaling by substance P and Bombesin-like neuropeptide receptors in astrocytic / glial brain tumor-derived cell lines. *Int J Oncol*. 1998; 12:273-286.
206. Sherrington, CS. (1906) *Integrated Action of the Nervous System*. Cambridge University Press: Cambridge, UK.
207. Shigemoto R, Yokota Y, Tsuchida K, Nakanishi S. Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *J Biol Chem*. 1990; 265:623-628.

208. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*. 1999;86: 364-372.
209. Shimada H, Chatten J, Newton WA. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst*. 1984; 73: 405-413.
210. Shrestha P, Yang L, Liu B, Namba M, Takagi H, Hosaka M et al. Neuroblastoma of parotid gland: report of a case and immunohistochemical characteristics. *Eur J Cancer B: Oral Oncol*. 1994. 30; 356-361.
211. Shrikhande SV, Friess H, di Mola FF, Tempia-Caliera A, Conejo-Garcia JR, Zhu ZW et al. NK-1 receptor gene expression is related to pain in chronic pancreatitis. *Pain*. 200; 191:209-217.
212. Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascón P, Maloof PB et al. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:388-393.
213. Snider RM, Constantine JW, Lowwe IJ. A potent nonpeptide antagonist of the substance P(NK1) receptor. *Science*. 1991; 251: 435-437.
214. Somogyi P, Prietsley J, Cuello AC, Smith AD, Bolam JP. Synaptic connections of substance P-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra of the rat. *Cell Tissue Res*. 1982; 223:469-486.
215. Suzuki R, Furuno T, Mckay DM, Wolvers D, Teshima R, Nakanishi M. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P. *J Immunol*. 1999; 163(5): 2410-2415.
216. Takahashi T, Konishi S, Powell D, Leeman SE, Otsuka M. Identification of motoneuron -depolarizing peptides in bovine dorsal root as hypothalamic substance P. *Brain Res* 1974; 73: 59-69.
217. Tallet A, Chilvers ER, Hannah S, Dransfield I, Lawson MF, Haslett C et al. Inhibition of neuropeptide-stimulated tyrosine

- phosphorylation and tyrosine kinase activity stimulate apoptosis in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1996 Sep 15;56(18):4255-4263.
218. Tatemoto K, Lundberg JM, Jörnvall H. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Comm.* 1985; 128:947-953.
219. Treager GW, Niall HD, Potts JT, Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nature New Biol.* 1971;232: 87-89.
220. van Ginkel FW, Pascual DW. Recognition of neurokinin 1 receptor (NK1-R): an antibody to a peptide sequence from the third extracellular region binds to brain NK1-R. *J Neuroimmunol.* 1996 Jun; 67(1):49-58.
221. Varty GB, Cohen-Williams ME, Hunter JC. The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. *Behav Pharmacol.* 2003 Feb; 14(1):87-95.
222. Varty GB, Cohen-Williams ME, Morgan CA, Pylak U, Duffy RA, Lachowicz JE et al. The gerbil elevated plus-maze II: anxiolytic-like effects of selective neurokinin NK1 receptor antagonists. *Neuropsychopharmacology.* 2002 Sep; 27(3):371-379.
223. Vigna SR. The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. *Neuropeptides.* 2001; 35:24-31.
224. Walsh DA, Hu EE, Mapp PI, Polar JM, Blake DR, Fan TP. Innervation and neurokinin receptors during angiogenesis in the rat sponge granuloma. *Histochem. J.* 1996; 28:759-769.
225. Weiss MJ, Guo C, Shusterman S. Localization of hereditary neuroblastoma predisposition gene to 16p12-p13. *Med Pediatr Oncol.* 2000; 35:526-530.
226. Wiesenfeld-Hallin Z, Bartfai T, Hökfelt T. Galanin in sensory neurons in the spinal cord. *Front Neuroendocrinol.* 1992;13:319-343.
227. Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt T, Lundberg JM. Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behaviour responses of the rat. *Neurosci Lett.* 1984;52:199-204.

228. Woll PJ, Rozengurt E. Bombesin and bombesin antagonists: Studies in Swiss 3T3 cells and human small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1988; 57: 579-586.
229. Woll PJ. Neuropeptide growth factors and cancer. *Br J cancer*. 1991; 63:469-475.
230. Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, Robison LL, Bernstein M, Weitzman S. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2002 Apr 4; 346(14):1041-1046.
231. Woods WG, Tuchman M, Robison LL. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. *Lancet*. 1996; 348: 1682-1687.
232. Xu X-J, Dalsgaard C-J, Wiesenfeld-Hallin Z. Spinal substance P and N-methyl-aspartate receptors are coactivated in the induction of central sensitization of the nociceptive flexor reflex. *Neurosci*. 1992; 44:483-490.
233. Yu J, Cadet JL, Angulo JA. Neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonists abrogate methamphetamine-induced striatal dopaminergic neurotoxicity in the murine brain. *J Neurochem*. 2002 Nov; 83(3):613-622.
234. Zachary I, Rozengurt E. High-affinity receptors for peptides of the bombesin family in Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1985 (a); 82: 616-619.
235. Zachary I, Woll PJ, Rozengurt E (1987 b). A role for neuropeptides in the control of cell proliferation. *Devel Biol*. 1987(b); 124:295-299.
236. Zamarrigo C. Localización y Modificación de Inmunoreactividad a MET-Encefalina en la Medula del Gato Tras Tratamiento con Dexametasona en el T.M.E., 2003, Farmacología, Pediatría y Radiología
237. Zhang Y, Lu L, Furlonger C. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol*. 2000 Nov;1(5):392-7.
238. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularisation in vivo and



proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res.*1990;  
40:264-278.

• ELENA MA CASTRO MENDOZA

Actividad antitumoral del antagonista de los receptores  
MKI, Li-733,060 en la línea celular del neuroblastoma humano  
Sobrevivió en la serie por un periodo de  
siete octubre de dos mil cinco

~~Rafael Cuevas~~

~~JOSE A. ACIRRE G.~~

~~Presidente~~

~~Sholl~~  
~~Castro~~