

# REVISIONES EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ANTONIA DE LOS ÁNGELES ÁLVAREZ DÍAZ  
ENRIQUE HILARIO RODRÍGUEZ  
(eds.)

ARGITALPEN ZERBITZUA  
SERVICIO EDITORIAL

[www.argitalpenak.ehu.es](http://www.argitalpenak.ehu.es)

ISBN: 978-84-9860-347-7

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# Revisiones en biología celular y molecular

*Antonia de los Angeles Álvarez Díaz  
Enrique Hilario Rodríguez  
(editores)*



Universidad Euskal Herriko  
del País Vasco Unibertsitatea

ARGITALPEN  
ZERBITZUA  
SERVICIO EDITORIAL

Imagen de la portada: Cortes seriados de embriones de ratón. Maitane Aurrekoetxea Campo.

© Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitateko Argitalpen Zerbitzua  
ISBN: 978-84-9860-347-7  
Bilbao, febrero, 2010  
[www.argitalpenak.ehu.es](http://www.argitalpenak.ehu.es)

A todos los que nos han animado en la elaboración de este libro,  
y especialmente a nuestras sufridas familias.



## Prólogo

Desde la perspectiva de este año 2010, el presente libro podría ser considerado como una segunda etapa del camino emprendido por los editores en el bienio 1999-2000. Por aquel entonces propusimos a los alumnos de nuestro curso de doctorado “Bases y mecanismos de la Diferenciación”, un enfoque por aquel entonces novedoso a la hora de desarrollar la docencia de tercer ciclo. La novedad propuesta a los alumnos consistió en la adaptación de los tradicionales trabajos de los cursos de doctorado a la redacción de un capítulo de libro, destinado a cubrir el vacío que existía en el mercado editorial por aquella época en cuanto a libros de Diferenciación se refería.

Pero con este enfoque de la docencia teníamos previsto algo más complejo. No pretendíamos tan solo implicar a los alumnos en profundizar en un tema de su interés relacionado con la diferenciación, sino también ayudarles y guiarles en la redacción de un documento científico con los conocimientos adquiridos, iniciándoles en las búsquedas bibliográficas, la selección de textos, la corrección de estilo, etc. En definitiva, implicarles de alguna manera más activa en su docencia, y que su papel no fuese meramente pasivo de “oyentes de conferencias”. En aquellos momentos se empezaba a hablar del espíritu reformador de “Bolonia”, y quisimos experimentar algunos de los aspectos que en el se propugnaban con un número reducido de alumnos muy bien preparados.

Evidentemente la recompensa a este esfuerzo suplementario por parte de los alumnos, tendría que estar a la altura, por eso, y gracias a la labor del Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, en el año 2001 se publicó el Libro titulado “Revisiones en Diferenciación”, que fue el resultado de los trabajos realizados durante ese curso. Aunque se nos criticó la inexperiencia de los autores a la hora de redactar los textos, esta fue suplida por mucha dedicación, trabajo y entusiasmo con la idea, tanto por nuestra parte como por la de ellos. Con el éxito conseguido en esa ocasión, decidimos mantener este tipo de docencia, y aunque no se hayan publicado los trabajos durante este tiempo, los alumnos han sido fieles a la idea y han trabajado activamente con mejor o peor resultado, pero siempre de forma positiva.

Este bienio 2008-2010, ha sido para nuestro Departamento el último en el que se han dado los cursos de doctorado, para pasar a proporcionar la formación de tercer ciclo en forma de Master en Investigación. Por suerte para nosotros, los alumnos del Programa de doctorado de este último curso, han mostrado tanto entusiasmo, dedicación y constancia como los de hace 10 años, y al proponerles repetir la experiencia respondieron afirmativamente. Algunos de los que comenzaron la aventura con nosotros como alumnos de doctorado y tercer ciclo en el bienio 99-2000, hoy se han sumado a esta nueva iniciativa como doctores, con la perspectiva de los 10 años transcurridos. Todo esto ha hecho que de los 16 capítulos que formaban el primer “Revisiones” este tenga 23, y que de la media de 10 páginas que tenía el primero hoy sean casi 25 páginas por capítulo. Evidentemente, con el aumento de capítulos y la diversificación de los temas tratados por los autores, y por eso lo hemos titulado “Revisiones en

Biología Celular y Molecular”, que refleja mucho mejor el espíritu de los temas revisados.

Como dijimos ya en la anterior la experiencia, el llevar adelante esta iniciativa ha sido muy laborioso, pero también creemos que muy positivo. Esperamos que este nuevo “Revisión” sirva como el anterior de soporte bibliográfico para otros cursos, así como para la lectura y el estudio tanto de docentes, como de investigadores a los que les interesen los temas que en el tratamos.

Los editores.

**Capítulo 1: MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES.**

Alejandro Díez-Torre.

1.- INTRODUCCIÓN.....	16
2.- MIGRACIÓN DE PGCS EN DROSOPHILA.....	16
3.- MIGRACIÓN DE PGCS EN RATÓN.....	19
4.- MIGRACIÓN DE PGCS EN POLLO.....	24
5.- MIGRACIÓN DE PGCS EN PEZ CEBRA.....	26
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	29

**Capítulo 2: FOLICULOGÉNESIS Y OVOGÉNESIS.**

Elixabete López Sánchez-Sarachaga y María Díaz Núñez.

1. DESARROLLO Y FUNCIÓN OVÁRICA.....	34
1.1. Desarrollo de la gónada embrionaria.....	34
1.2. Ensamblaje folicular.....	34
1.3 Transición de folículo primordial a folículo primario.....	36
1.4 Desarrollo de los folículos preantrales o secundarios.....	38
1.5 Desarrollo de los folículos antrales o terciarios.....	39
1.6. Selección folicular.....	40
1.7 Ovulación y fase lútea.....	41
2. MOLÉCULAS QUE AFECTAN AL DESARROLLO FOLICULAR Y OVOCITARIO.....	43
2.1 Hormonas sexuales esteroideas.....	43
2.1.1 Progestágenos o progestinas.....	43
2.1.2 Andrógenos.....	45
2.1.3 Estrógenos.....	47
2.2 Otras hormonas.....	49
2.2.1 Hormona del crecimiento o somatotropina (GH).....	49
2.2.2 Insulina.....	49
2.2.3 Sistema IGF.....	49
2.2.4 Leptina.....	50
2.2.5 3, 3', 5-triyodotironina (T3):.....	50
2.3 Factores locales.....	50
2.3.1 Hormona antimulleriana (AMH) o sustancia inhibidora mulleriana (MIS).....	50
2.3.2 Sistema inhibina-activina.....	51
2.3.3 Kit y ligando Kit (KitL).....	53
2.3.4 Factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9):.....	54
2.3.5 Proteína morfogenética de hueso 15 (BMP15).....	55
2.3.6 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	57
2.3.7 Proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4).....	57
2.3.8 Proteína morfogenética de hueso 7 (BMP7).....	57
2.3.9 Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ).....	58
2.3.10 Factor de crecimiento de queratinocitos o de fibroblastos 7 (KGF7 o FGF7).....	58
2.3.11 Factor de crecimiento de queratinocitos o de fibroblastos 2 o básico (KGF2, FGF2 o bFGF).....	58
2.3.12 Neurotrofinas.....	59
2.3.13 Interleucina 6 (IL-6).....	59
2.3.14 Factor inhibitorio de la leucemia (LIF).....	60
2.3.15 Sistema HGF.....	60
2.4 Sustancias que afectan al cultivo folicular.....	61
2.4.1 Vitamina C o ácido ascórbico.....	61
2.4.2 Transferrina.....	61
2.4.3 Selenio.....	62
3. MANTENIMIENTO DE LA DETENCIÓN DURANTE LA MEIÓISIS Y MADURACIÓN OVOCITARIA.....	62
4. PROCESOS TRANZONALES (TZPS) Y UNIONES GAP.....	65
5. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EXPRESADOS EN EL OVARIO.....	66
6.- BIBLIOGRAFIA.....	68

**Capítulo 3: REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS.**

Galder Valbuena Angulo, Francisco José Sáez Crespo.

1.- REGULACIÓN EN MAMÍFEROS. ....	94
1.1.- Regulación hormonal.....	94
1.2.-Regulación paracrina.....	97
2.- REGULACIÓN EN URODELOS. ....	100
2.1.-Regulación hormonal.....	100
2.2.-Regulación paracrina.....	102
2.3.-Punto de control. ....	103
3.- REGULACIÓN EN ANUROS. ....	104
4.- CONCLUSIONES. ....	105
5.- BIBLIOGRAFÍA. ....	106

**Capítulo 4: ONTOGÉNESIS DENTAL Y CÉLULAS MADRE**

Maitane Aurrekoetxea Campo, Idoia Ortega Martínez

1.- INTRODUCCIÓN .....	115
2.- ORGANOGÉNESIS: INTERACCIONES ENTRE CÉLULAS EPITELIALES Y MESENQUIMALES.....	115
3.- DESARROLLO ANATÓMICO DEL DIENTE .....	116
4.- FACTORES DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION .....	118
5.- MODELO ANIMAL Y REGENERACION DENTAL .....	119
6.- EL POTENCIAL DE LAS CÉLULAS MADRE.....	121
7.- NICHOS DE CELULAS MADRE .....	122
8.- CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL .....	122
9.- CÉLULAS MADRE DEL EPITELIO DENTAL .....	124
10.- CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO DENTAL .....	126
11.- CONCLUSIÓN .....	127
12.- BIBLIOGRAFÍA .....	128

**Capítulo 5: DIENTE Y GLÁNDULA MAMARIA COMO MODELOS DE ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN DE ÓRGANOS ECTODÉRMICOS.**

Lucía Jiménez-Rojo y Unai Silván.

1. INTRODUCCIÓN. ....	132
2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DENTAL Y MAMARIO. ....	133
3. FAMILIAS DE FACTORES DE SEÑALIZACIÓN.....	135
3.1. Familia Fgf. ....	135
3.2. Familia Wnt. ....	136
3.3. Superfamilia Tgf $\beta$ .....	136
4. DIENTE. ....	137
4.1. Desarrollo dental.....	137
4.1.1. Inicio de la odontogénesis.....	138
4.1.2. Estadio de caperuza.....	138
4.1.3. Estadio de campana.....	139
4.1.4. Estadio de diferenciación.....	140
4.2. Ingeniería de tejidos dentales.....	142
5. GLÁNDULA MAMARIA. ....	143
5.1. Desarrollo embrionario. ....	143
5.1.1. Inicio del desarrollo mamario. ....	144
5.1.2. Placoda mamaria.....	144
5.1.3. Brote mamario. ....	145
5.1.4. Yema mamaria y formación del árbol ductal.....	145
5.2. Desarrollo postnatal.....	146
5.2.1. Elongación ductal.....	146
5.2.2. Formación de las ramificaciones laterales y morfogénesis alveolar.....	148
5.2.3. Diferenciación alveolar, lactogénesis e involución.....	148
5.3. Cáncer de mama y diferenciación.....	149
6. BIBLIOGRAFÍA.....	151



**Capítulo 6: DIFERENCIACIÓN A HEPATOCITOS.**

Eider Azkona Uribelarrea, Eluska Iruarizaga Ovejas, Ines Marrodan Ciordia y Xabier Mielgo Rubio.

1.- INTRODUCCIÓN .....	158
2.- HÍGADO .....	159
2.2.- Poblaciones celulares:.....	159
3.- CÉLULAS MADRE ADULTAS .....	160
3.1.- Tipos de células madre: .....	162
3.1.2.- No derivadas de la médula ósea.....	164
3.2.- Versatilidad, fusión celular y células madre adultas .....	165
4.- TRASPLANTE DE HEPATOCITOS HUMANOS .....	166
4.1.- Fisiología .....	167
4.2.- Criopreservación de hepatocitos humanos .....	168
4.3.- Estado actual del Tx de hepatocitos humanos.....	168
5.- CÉLULAS PROGENITORAS INTRAHEPÁTICAS .....	169
5.1.- Células ovasales .....	170
5.2.- Identificación de las células progenitoras hepáticas .....	170
6.- CÉLULAS PROGENITORAS DE LA MÉDULA OSEA .....	171
7.- CÉLULAS HEPÁTICAS FETALES .....	173
8.- CÉLULAS PROGENITORAS EMBRIONARIAS .....	174
8.1.- Células hepáticas embrionarias como modelo para diferenciarse en hepatocitos y células ductales .....	174
8.1.1.- H-CFU-Cs.....	175
8.1.2.- Rhe .....	176
8.1.3.- HBC-3.....	176
8.1.4.- BMEL.....	176
8.1.5.- MMH (Met murine hepatocito) palmate cells .....	177
8.1.6.- Células hepática bipotenciales fetales de primate.....	177
9.- STEM CELL HEPÁTICAS Y CANCER .....	178
10.- BIBLIOGRAFÍA .....	179

**Capítulo 7: TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES EN LA DIÁLISIS PERITONEAL. METÁSTASIS PERITONEAL DE TUMORES.**

Fermín Aspichueta Vivanco.

1.- DIÁLISIS PERITONEAL:.....	183
1.1.- Introducción .....	183
1.2.- Antecedentes históricos de la diálisis peritoneal:.....	183
1.3.- Relación entre la diálisis peritoneal y la transición epitelial-mesenquimal.....	185
2.- TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL Y CÁNCER .....	186
2.1.- Cambios moleculares en la transición epitelial-mesenquimal.....	187
2.2.- Extravasación tisular y formación de la metástasis.....	189
2.3.- Células Mesoteliales.....	190
3.- CONCLUSIÓN .....	191
4.- BIBLIOGRAFÍA .....	193

**Capítulo 8: DIFERENCIACIÓN Y TUMORES.**

Enrique Hilario, Jaione Lacalle, Daniel Alonso-Alconada y Antonia Alvarez.

1.- DIFERENCIACION, MADURACION Y REPARACION TISULAR .....	196
1.1.- Renovación, maduración y adquisición del fenotipo diferenciado de los tejidos. ....	196
2.- REPARACIÓN TISULAR, METAPLASIA, DISPLASIA Y ANAPLASIA. ....	196
2.1.- Reparación .....	196
2.2.- Metaplasia vs transdiferenciación. ....	197
2.3.- Displasia .....	197
2.4.- Diferenciación y Anaplasia. ....	198
3.- TEORÍA DEL CÁNCER COMO UNA DETENCIÓN EN LA MADURACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS STEM .....	199
3.1.- Introducción .....	199

3.2.- Origen celular del cáncer.....	200
3.2.1.- Teoría embrionaria del cáncer .....	200
3.2.2.- Desdiferenciación y cáncer .....	200
3.2.3.- Diferenciación y desarrollo embrionario.....	201
3.2.4.- Detención de la maduración / bloqueo ontogenético.....	201
4.- TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS .....	202
4.1.- Células de carcinoma embrionario.....	202
4.2.- Células de carcinoma embrionario y células madre embrionarias.....	203
4.3.- Células de carcinoma embrionario y diferenciación.....	203
4.4.- Cuerpos embrioides .....	204
5.- OTROS TIPOS DE CARCINOMAS .....	205
5.1.- Células basales epidérmicas.....	205
5.2.- Células basales endo y exocervicales .....	205
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	207

**Capítulo 9: NEOPLASIAS DE CÉLULAS GERMINALES: TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS.**  
Jaione Lacalle, Enrique Hilario, y Antonia Alvarez.

1.- INTRODUCCIÓN .....	211
2. HISTOGÉNESIS Y CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES GERMINALES .....	211
2.1. Tumores testiculares .....	211
2.2. Tumores ováricos .....	212
3. RASGOS HISTOLÓGICOS BÁSICOS DE LOS TUMORES GERMINALES .....	213
4. TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS .....	214
4.1. Teratomas y teratocarcinomas en la investigación .....	215
4.1.1. Teratomas y teratocarcinomas espontáneos .....	215
4.1.2. Teratomas y teratocarcinomas inducidos experimentalmente.....	217
4.2. Líneas celulares derivadas de teratocarcinomas .....	218
4.3. Determinantes de la teratocarcinogénesis .....	220
4.3.1. Determinantes genéticos.....	220
4.3.2. Determinantes epigenéticos.....	221
5.- BIBLIOGRAFÍA .....	223

**Capítulo 10: DESARROLLO Y TRANSFORMACIÓN TUMORAL DE LOS MELANOCITOS.**  
Idoia Ortega Martínez, Maitane Aurrekoetxea Campo.

1.- INTRODUCCIÓN .....	228
2.- EL MELANOCITO Y SU ORIGEN .....	228
3.- INTERACCIÓN SCF - c-kit DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS .....	230
4.- PROTEÍNAS Wingless (Wnt) EN EL DESARROLLO DE LOS MELANOCITOS .....	232
4.1.- Familia de las proteínas Wnt.....	232
4.2.- Receptores de Wnt.....	233
4.3.- Ruta de señalización Wnt / $\beta$ -catenina.....	233
4.4.- Proteínas Wnt y la cresta neural .....	235
4.5.- Señalización Wnt en el desarrollo y progresión del melanoma .....	236
5.- MITF .....	237
5.1.- Regulación de MITF .....	238
5.2.- MITF y cáncer.....	239
6.- MELANOGÉNESIS .....	239
6.1.- Maduración de los melanosomas.....	240
6.2.- Bioquímica de la melanogénesis.....	241
7.- BIBLIOGRAFÍA: .....	243

## Capítulo 11: IMPLICACIÓN DEL MICROAMBIENTE Y EL CAMBIO DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA PROGRESIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO HUMANO.

Yoana Arroyo Berdugo.

1. INTRODUCCIÓN .....	250
2. MELANOMA MALIGNO HUMANO .....	250
2.1. Etapas en la progresión del melanoma .....	251
3. INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE EN EL DESTINO DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA... 251	
3.1. Respuesta celular en un microambiente hipóxico .....	252
3.2. Acidificación del microambiente tumoral .....	254
3.3. Pérdida de adhesión celular en la progresión tumoral .....	254
4. INTEGRINAS.....	255
4.1. Activación de las integrinas .....	255
4.2. Vías de señalización de las integrinas .....	257
4.2.1. Activación del complejo FAK-Src .....	259
4.2.2. Activación del complejo Grb2-SOS .....	261
4.2.3. Activación del complejo IPP .....	262
4.3. Implicación de FAK en la progresión tumoral .....	263
4.3.1. Proliferación.....	263
4.3.2. Supervivencia .....	264
4.3.3. Migración .....	265
4.3.4. Invasión .....	266
4.3.5. Angiogénesis .....	266
4.4. Implicación de ILK en la progresión tumoral .....	266
4.5. Relación entre integrinas y receptores de factores de crecimiento.....	267
5. SEÑALIZACIÓN DE INTEGRINAS EN EL MELANOMA.....	268
5.1. Detección de subunidades de integrinas en melanoma.....	269
5.2. Detección de integrinas heterodiméricas en melanoma .....	269
6. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE CADHERINAS.....	270
7. SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS .....	272
8. METALOPROTEASAS.....	273
8.1. Regulación de la expresión y la activación de MMPs .....	274
8.1.1. Activación post-traduccional de MMP-2.....	275
8.2. Efecto de MEC sobre la actividad de las MMPs en la invasión tumoral .....	276
8.3. MMPs en la progresión del melanoma .....	277
8.4. Interacción de MMPs con moléculas de adhesión en el melanoma cutáneo humano .....	278
9. CONCLUSIONES.....	279
10. BIBLIOGRAFÍA .....	280

## Capítulo 12: DIAGNOSTICO DEL CANCER COLORRECTAL.

Ana Freije León y Felipe Goñi de Cerio.

1.- CÁNCER COLORRECTAL .....	284
1.1.- Epidemiología y Etiología .....	284
1.2.- Tipos de Cáncer Colorrectal.....	285
1.3.- Progresión tumoral del Cáncer Colorrectal Esporádico .....	287
1.4.- Estadíaje.....	289
1.5.- Marcadores Tumoraes.....	292
1.5.1.- Marcadores de suero .....	293
1.5.2.- Marcadores detectados en heces .....	294
1.5.3.- Marcadores tumorales de tejido.....	294
1.5.4.- Diagnóstico del cancer colorrectal .....	295
2.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HELIX-LOOP-HELIX: PROTEÍNAS ID.....	296
2.1 Proteína ID1 y Cáncer .....	298
3.- BIBLIOGRAFÍA .....	300

### Capítulo 13: DIFERENCIACIÓN ENDOTELIAL EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO DEL HEPATOCARCINOMA.

Joana Marquez Clavijo.

1.- INTRODUCCIÓN .....	308
2.- EL ENDOTELIO Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES .....	308
3.- DEFINICIÓN Y ANGIOGENESIS EN GENERAL .....	309
4.- ANGIOGENESIS TUMORAL DEL HEPATOCARCINOMA .....	311
4.1.- El hígado.....	311
4.2.- Hepatocarcinoma .....	313
5.- DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES EN EL HCC.....	314
6.- CONCLUSIONES .....	316
7.- BIBLIOGRAFIA .....	318

### Capítulo 14: DESDIFERENCIACIÓN: UNA ALTERNATIVA PARA FUTURAS TERAPIAS.

Iker Badiola Etxaburu.

1.- INTRODUCCIÓN .....	321
2.- CÉLULAS MADRE .....	321
3.- CÉLULAS MADRE EN LA INVESTIGACIÓN .....	322
4.- ¿CÓMO SE DESDIFERENCIA UNA CÉLULA SOMÁTICA? .....	323
4.1.- c-Myc .....	324
4.2.- Klf4.....	326
4.3.- Oct3/4 – Sox 2 .....	327
4.4.- Combinación de los diferentes factores de transcripción.....	328
5.- PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	329
6.- BIBLIOGRAFÍA: .....	330

### Capítulo 15: HISTAMINA Y ANTIHISTAMÍNICOS EN LA BIOLOGÍA TUMORAL. APLICACIÓN TERAPÉUTICA.

Nicolau-Galmés F, Asumendi A, Pérez-Yarza G, Andollo N, Jangi Sh-M, Boyano MD.

1.- INTRODUCCIÓN .....	333
2.- RECEPTORES DE HISTAMINA Y MECANISMOS INTRACELULARES ACTIVADOS POR LA HISTAMINA .....	334
3.- PAPEL DE LA HISTAMINA EN LA RESPUESTA INMUNE .....	335
4.- ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR H1 DE LA HISTAMINA .....	336
5.- PAPEL DE LA HISTAMINA Y DE LOS ANTIHISTAMÍNICOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. APLICACIÓN TERAPÉUTICA .....	337
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	343

### Capítulo 16: SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: DESARROLLO Y PLASTICIDAD.

Idoia Lara Celador.

1.- INTRODUCCIÓN .....	349
2.- SINAPSIS: Características y clasificación .....	349
3.- FORMACIÓN DE SINAPSIS: Factores difusibles .....	351
4.- DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	351
4.1.- Proliferación neuroblástica .....	352
4.2.- Migración y diferenciación de neuroblastos .....	353
4.3.- Formación de conexiones interneuronales .....	354
4.4.- Diferenciación celular .....	354
4.5.- Sinaptogénesis .....	355
5.- PLASTICIDAD.....	357
5.1.- Tipos de neuroplasticidad .....	357
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	359



**Capítulo 17: LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL EN PREMATUROS.**

Felipe Goñi de Cerio, Enrique Hilario, Antonia Álvarez.

1.- CONCEPTO DE LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA .....	361
2.- ANTECEDENTES DE LA HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL .....	361
3.- BASES CELULARES DEL DAÑO HIPÓXICO-ISQUÉMICO.....	362
3.1.- Excitotoxicidad.....	363
3.2.- Deficiencias en el Suministro Energético.....	364
3.3.- Estrés Oxidativo .....	365
3.4.- Pérdida de la Homeostasis de Calcio .....	366
3.5.- Muerte Neuronal por Apoptosis o Necrosis.....	367
4.- CONSIDERACIONES PATOLÓGICAS .....	368
4.1.- Hemorragias en prematuros.....	369
4.2.- Edema Cerebral .....	370
4.3.- Leucomalacia Periventricular o Infarto Periventricular .....	371
4.4.- Lesiones de la Sustancia Gris.....	372
5.- ENSAYOS TERAPÉUTICOS.....	373
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	376

**Capítulo 18: RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL.**

Daniel Alonso Alconada, Enrique Hilario, Antonia Alvarez.

1.- INTRODUCCIÓN .....	383
2.- LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL .....	384
2.1.- Incidencia.....	384
2.2.- Bases celulares de la lesión hipóxico-isquémica cerebral.....	384
3.- MEDIADORES INFLAMATORIOS .....	385
3.1.- Citoquinas.....	385
3.2.- Quimiocinas.....	387
3.3.- Metabolitos del Ácido Araquidónico .....	387
3.4.- Óxido Nítrico.....	388
3.5.- Especies Reactivas del Oxígeno.....	388
3.6.- Metaloproteinasas de la matriz .....	389
4.- MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y RECONOCIMIENTO CELULAR .....	390
4.1.- Selectinas .....	390
4.1.1.- Rodamiento y adhesión laxa.....	390
4.1.2.- Activación de los leucocitos .....	391
4.2.- Superfamilia de las Inmunoglobulinas.....	392
4.2.1.- Adhesión firme .....	392
4.3.- Integrinas .....	393
4.3.1.- Transmigración endotelial y quimiotaxis .....	394
5.- BIBLIOGRAFÍA .....	395

**Capítulo 19: EFECTOS DE LA HIPOXIA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y TUMORAL.**

Unai Silván y Lucía Jiménez Rojo.

1.- INTRODUCCIÓN.....	403
2.- RESPUESTA CELULAR FRENTE A LA HIPOXIA.....	403
3.- LA HIPOXIA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	406
3.1.- Formación del sistema vascular del embrión.....	407
3.2.- Desarrollo placentario.....	409
3.3.- Desarrollo del riñón y regulación de la eritropoyésis.....	410
4.- HIPOXIA Y CÁNCER.....	411
4.1.- Supervivencia celular.....	412
4.2.- Invasión de tejidos adyacentes.....	412
4.3.- Vascularización tumoral.....	413
4.3.1.- Angiogénesis.....	414

4.3.2.- Incorporación de vasos del huésped.....	414
4.3.3.- Vasculogénesis.....	414
4.3.4.- Mimetismo vascular.....	415
4.4.- Agentes anti-angiogénicos como tratamiento del cáncer.....	415
5.- CONCLUSIONES Y FUTURO.....	416
6.- BIBLIOGRAFIA.....	417

## Capítulo 20: ¿QUÉ ES UNA CITOCINA?

María Luz Cañavate Escribano.

1.- CONCEPTO HISTÓRICO Y DEFINICIÓN.....	425
2.- CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES GENERALES.....	426
3.- FAMILIAS DE CITOCINAS. CLASIFICACIÓN.....	427
4.- ESTRUCTURA DE CITOCINAS.....	429
5.- GENES Y EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOCINAS.....	430
6.- MECANISMOS DE COMUNICACIÓN. RECEPTORES Y SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN.....	431
7.- REDES BIOLÓGICAS DE CITOCINAS, PROPIEDADES: ACTUACIÓN EN CASCADA, PLEIOTROPÍA Y REDUNDANCIA. SINERGISMO Y ANTAGONISMO.....	437
8.- TOXICIDAD Y PATOLOGÍA ASOCIADA.....	440
9.- BIBLIOGRAFÍA.....	442

## Capítulo 21: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN PROCESOS CELULARES Y PATOLÓGICOS.

Aintzane Apraiz García.

1.- ESTRÉS OXIDATIVO: DEFINICIÓN.....	447
1.1.- Componentes.....	447
1.2.- Origen de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	448
2.- SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES.....	449
2.1.- Sistema antioxidante enzimático.....	449
2.2.- Antioxidantes no enzimáticos: ¿más que antioxidantes?.....	450
3.- IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PROCESOS CELULARES.....	452
3.1.- Cuando ROS es inductor primario de apoptosis.....	452
3.2.- ROS en la regulación del ciclo celular: efecto en la proliferación y diferenciación.....	454
3.3.- Estrés oxidativo en la senescencia celular y envejecimiento.....	455
3.4.- Estrés oxidativo en autofagia: al límite del bien y del mal.....	457
3.5.- ROS en la respuesta inmune.....	459
4.- PRODUCCIÓN ABERRANTE DE ROS: IMPLICACIÓN EN PROCESOS PATOLÓGICOS.....	461
4.1.- ¿Puede el estrés (oxidativo) inducir cáncer?.....	461
4.2.- Cuando no hay adaptación al estrés (oxidativo) continuado: enfermedades (neuro)degenerativas.....	463
5.- MODULACIÓN DEL ESTADO REDOX COMO TERAPIA.....	465
5.1.- Aumento del microambiente oxidativo contra el cáncer.....	465
5.2.- Potenciación de la capacidad antioxidante contra enfermedades neurodegenerativas.....	466
6.- CONCLUSIONES FINALES.....	467
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	468

## Capítulo 22: EL ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y EL RIÑÓN.

Lourdes Castro Ortega; Santos Blanco Ruiz; Juan Ángel Pedrosa Raya; M<sup>a</sup> Ángeles Peinado Herreros.

1.- INTRODUCCIÓN.....	473
2.- SÍNTESIS, FUNCIÓN DEL NO E INTERACCIÓN CON OTRAS SUSTANCIAS.....	473
3.- LOCALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS (NOS) EN RIÑÓN.....	477
3.1.- Expresión de la endotelial óxido nítrico sintasa (eNOS) en riñón.....	478
3.2.- Expresión de la neuronal óxido nítrico sintasa (nNOS) en riñón.....	478
3.3.- Expresión de la inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) en riñón.....	479
4.- FISIOLÓGIA RENAL Y SISTEMA NO/NOS.....	479
4.1.- Funciones del NO en el riñón.....	480

4.2.- Fisiología renal y eNOS .....	481
4.3.- Fisiología renal y nNOS .....	482
4.4.- Fisiología renal e iNOS .....	483
5.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS NOS .....	483
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	486

### **Capítulo 23: APOPTOSIS: CARACTERIZACIÓN Y MECANISMOS MOLECULARES.**

Asumendi Aintzane, Boyano Maria Dolores, Apraiz Aintzane, Pérez-Yarza Gorka.

1.- INTRODUCCIÓN .....	495
2.- APROXIMACIÓN HISTÓRICA: MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y APOPTOSIS .....	495
3.- FUNCIONES DE LA APOPTOSIS .....	496
3.1.- Desarrollo embrionario .....	497
3.2.- Homeostasis .....	497
3.3.- Mecanismos de selección .....	497
4.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA APOPTOSIS .....	498
5.- ALTERACIONES BIOQUÍMICAS ASOCIADAS A LA APOPTOSIS .....	500
5.1.- Fragmentación del DNA .....	500
5.2.- Activación de caspasas .....	501
5.3.- Externalización de señales "eat me" .....	501
5.4.- Alteraciones en la fisiología mitocondrial .....	501
5.4.1.- Disipación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	502
5.4.2.- Aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y liberación de proteínas proapoptóticas al citoplasma .....	502
5.4.3.- Proteínas apoptogénicas mitocondriales .....	503
6.- FAMILIAS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PROCESO APOPTÓTICO .....	504
6.1.- Proteínas adaptadoras .....	505
6.2.- Las caspasas .....	505
6.2.1.- Caspasas iniciadoras .....	505
6.2.2.- Caspasas efectoras .....	506
6.2.3.- Proteínas reguladoras de las caspasas: IAPs .....	506
6.3.- Proteínas de la familia Bcl-2 .....	507
6.3.1.- Proteínas antiapoptóticas .....	507
6.3.2.- Proteínas proapoptóticas .....	507
7.- RUTAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA .....	508
7.1.- Ruta extrínseca o mediada por receptores .....	509
7.2.- Ruta intrínseca o mitocondrial .....	510
8.- ADDENDUM .....	513
9.- BIBLIOGRAFÍA .....	515

### **Capítulo 1: MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES.**

**Alejandro Díez Torre**

Doctor en Ciencias Biológicas. Servicios Generales de la Universidad del País Vasco/EHU.

---

### **Capítulo 2: FOLICULOGÉNESIS Y OVOGÉNESIS.**

**Elixabete López Sánchez-Sarachaga.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**María Díaz Núñez.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

### **Capítulo 3: REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS.**

**Galder Valvuenza Angulo.**

Doctor en Bioquímica. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**Francisco José Sáez Crespo.**

Doctor en Ciencias Biológicas. Catedrático de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la UPV/EHU.

---

### **Capítulo 4: ONTOGÉNESIS DENTAL Y CÉLULAS MADRE.**

**Idoia Ortega Martínez.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**Maitane Aurrekoetxea Campo.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

### **Capítulo 5: DIENTE Y GLÁNDULA MAMARIA COMO MODELOS DE ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN DE ÓRGANOS ECTODÉRMICOS.**

**Lucia Jiménez-Rojo.**

Doctor en Bioquímica. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**Unai Silvan de Pedro.**

Doctor en Bioquímica. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---



## **Capítulo 6: DIFERENCIACIÓN A HEPATOCITOS.**

### **Eider Azkona Uribelarrea.**

Licenciado en Medicina, Alumno de tercer ciclo. Servicio de Oncología Médica del Hospital de Cruces.

### **Eluska Iruarrizaga Ovejas.**

Licenciada en Medicina, Servicio de Oncología Médica del Hospital de Cruces.

### **Inés Marrodan Ciordia.**

Licenciado en Medicina. Servicio de Oncología Médica del Hospital de Cruces.

### **Xabier Mielgo Rubio.**

Licenciado en Medicina. Servicio de Oncología Médica del Hospital de Cruces.

---

## **Capítulo 7: TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES EN LA DIÁLISIS PERITONEAL. METÁSTASIS PERITONEAL DE TUMORES.**

### **Fermín Aspichueta Vivanco.**

Licenciado en Medicina. Alumno de tercer ciclo. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

## **Capítulo 8: DIFERENCIACIÓN Y TUMORES.**

### **Enrique Hilario Rodríguez.**

Profesor Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Jaione Lacalle Prieto.**

Profesora Contratada de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Daniel Alonso Alconada.**

Licenciado en Ciencias Biológicas. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Antonia de los Ángeles Alvarez Díaz.**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

## **Capítulo 9: NEOPLASIAS DE CÉLULAS GERMINALES: TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS.**

### **Jaione Lacalle Prieto.**

Profesora Contratada de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Enrique Hilario Rodríguez.**

Profesor Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Antonia de los Ángeles Alvarez Díaz.**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

## **Capítulo 10: DESARROLLO Y TRANSFORMACIÓN TUMORAL DE LOS MELANOCITOS.**

### **Idoia Ortega Martínez.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Maitane Aurrekoetxea Campo.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

## **Capítulo 11: IMPLICACIÓN DEL MICROAMBIENTE Y EL CAMBIO DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA PROGRESIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO HUMANO.**

### **Yoana Arroyo Berdugo.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

## **Capítulo 12: DIAGNOSTICO DEL CANCER COLORRECTAL.**

### **Ana Freije León.**

Doctora en Bioquímica y Biología Molecular. Gaiker–IK4.

### **Felipe Goñi de Cerio.**

Doctor en Bioquímica. Gaiker–IK4.

---

## **Capítulo 13: DIFERENCIACIÓN ENDOTELIAL EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO DEL HEPATOCARCINOMA.**

### **Joana Marquez Clavijo.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

## **Capítulo 14: DESDIFERENCIACIÓN: UNA ALTERNATIVA PARA FUTURAS TERAPIAS.**

### **Iker Badiola Etxaburu.**

Doctor en Ciencias. INNOPROT S.L

---

## **Capítulo 15: HISTAMINA Y ANTIHISTAMÍNICOS EN LA BIOLOGÍA TUMORAL. APLICACIÓN TERAPÉUTICA.**

### **Francesca Nicolau Galmés.**

Licenciada en Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Aintzane Asumendi Mallea.**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Noelia Andollo Victoriano.**

Profesor agregado. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Jangi Shawkat Muhialdin.**

Doctor en Medicina. Alumno de tercer ciclo. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **María Dolores Boyano López**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

**Capítulo 16: SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: DESARROLLO Y PLASTICIDAD.**

**Idoia Lara Celador.**

Licenciada en Ciencias Bioquímica. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

**Capítulo 17: LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL EN PREMATUROS.**

**Felipe Goñi de Cerio.**

Doctor en Bioquímica. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**Enrique Hilario Rodríguez.**

Profesor Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**Antonia de los Ángeles Alvarez Díaz.**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

**Capítulo 18: RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL.**

**Daniel Alonso Alconada.**

Licenciado en Ciencias Biológicas. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**Enrique Hilario Rodríguez.**

Profesor Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**Antonia de los Ángeles Alvarez Díaz.**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

**Capítulo 19: EFECTOS DE LA HIPOXIA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y TUMORAL.**

**Unai Silvan de Pedro.**

Doctor en Bioquímica. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

**Lucia Jiménez-Rojo.**

Doctor en Bioquímica. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

**Capítulo 20: ¿QUÉ ES UNA CITOCINA?.**

**María Luz Cañavate Escribano.**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

## **Capítulo 21: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN PROCESOS CELULARES Y PATOLÓGICOS.**

### **Aintzane Apraiz García.**

Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---

## **Capítulo 22: EL ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y EL RIÑÓN.**

### **Lourdes Castro Ortega.**

Doctora en Ciencias Biológicas. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Santos Blanco Ruiz.**

Doctor en Biología. Personal Investigador Contratado por la Universidad de Jaén. Universidad de Jaén

### **Juan Ángel Pedrosa Raya.**

Licenciado en Medicina. Doctor en Biología. Titular de Universidad de Jaén

### **M<sup>a</sup> Ángeles Peinado Herreros.**

Doctor en Biología. Catedrático de Universidad. Departamento de Biología Experimental. Universidad de Jaén

---

## **Capítulo 23: APOPTOSIS: CARACTERIZACIÓN Y MECANISMOS MOLECULARES.**

### **Aintzane Asumendi Mallea.**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **María Dolores Boyano López.**

Profesora Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Aintzane Apraiz García.**

Licenciada en Ciencias Biológicas. Doctorando. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

### **Gorka Pérez-Yarza Pérez-Irezábal.**

Profesor Titular de Universidad. Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad del País Vasco /EHU.

---



## CAPÍTULO 1:

### MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

Alejandro Díez-Torre.

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN.....	16
2.- MIGRACIÓN DE PGCS EN <i>DROSOPHILA</i> .....	16
3.- MIGRACIÓN DE PGCS EN RATÓN.....	19
4.- MIGRACIÓN DE PGCS EN POLLO.....	24
5.- MIGRACIÓN DE PGCS EN PEZ CEBRA.....	26
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	29

## 1.- INTRODUCCIÓN.

El desarrollo y la función de los órganos dependen de la cooperación entre distintos tipos celulares. En muchos casos, las células que van a formar parte de un órgano se originan a cierta distancia del lugar donde este se va a desarrollar. La comprensión de los mecanismos que permiten que estas células migren hasta alcanzar su ubicación definitiva es, por lo tanto, de gran importancia para el estudio de la organogénesis y de situaciones patológicas derivadas de una migración aberrante durante el desarrollo.

Las gónadas, el órgano donde se generan los gametos, están compuestas de dos poblaciones principales, las células somáticas y las germinales. Las células somáticas de las gónadas son fundamentales para el correcto desarrollo de las células germinales, el linaje que da lugar a los gametos. Resulta interesante que en la mayoría de los organismos, incluyendo todos los vertebrados, las células germinales se originan en posiciones distintas a aquellas donde se desarrollan las gónadas. Por lo tanto, las células germinales primordiales (PGCs), que son los precursores de los gametos, deben migrar a través del embrión hasta colonizar las gónadas en desarrollo. Los análisis de la migración de las PGCs en diferentes modelos apoyan la idea de que las PGCs son guiadas hacia las crestas gonadales mediante rastros facilitados por las células somáticas a lo largo de su ruta de migración. A lo largo de los últimos años se han identificado varias moléculas implicadas en este proceso, tanto para mantener la supervivencia de las PGCs como para orientar su migración hasta las futuras gónadas.

El estudio del proceso migratorio de las PGCs, principalmente en mamíferos, adquiere especial relevancia si tenemos en cuenta que la alteración de este proceso puede conducir a situaciones de infertilidad o a la aparición de tumores germinales asociados a una ubicación ectópica de PGCs en el adulto (Diez-Torre y cols., 2004). Es por ello que la migración y la supervivencia de las PGCs durante el desarrollo embrionario son procesos altamente regulados.

A continuación se explican los mecanismos empleados por las PGCs para alcanzar las gónadas en distintos modelos animales, concretamente en *Drosophila*, ratón, pollo y pez cebra. Cada uno de estos modelos presenta características propias pero, en general, se observa que la migración de las PGCs es un proceso altamente conservado evolutivamente.

## 2.- MIGRACIÓN DE PGCS EN *DROSOPHILA*.

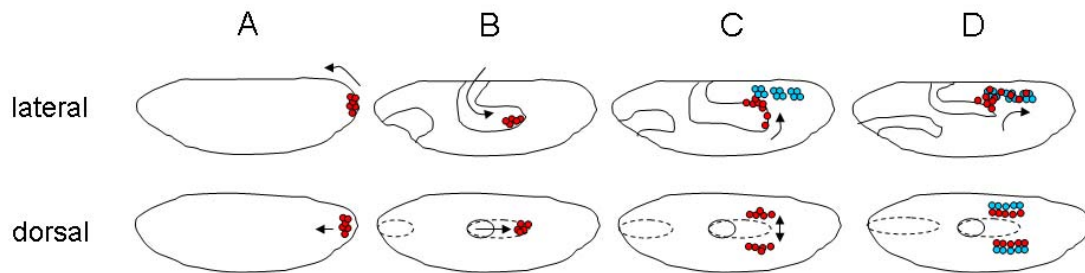
Las PGCs de *Drosophila*, o células polares, aparecen en el embrión antes de la formación de los precursores somáticos de las gónadas y en un lugar distinto a estos últimos, concretamente en el extremo posterior del embrión (Fig 1. A), ya que la determinación de la línea germinal en *Drosophila* es controlada por componentes maternos localizados precisamente en el polo posterior del embrión (Suyama y cols., 2009).

Inicialmente, las células polares tienen una morfología esférica característica de células no migratorias. Existe cierta confusión sobre cuando las PGCs comienzan a moverse de forma activa en este modelo. Si nos basamos en la morfología de las PGCs marcadas con anticuerpos anti-vasa, un marcador específico para las PGCs, podemos suponer que las PGCs son incorporadas pasivamente al interior del embrión arrastradas en el proceso de invaginación que dará lugar al intestino medio posterior y que inician su migración activa entre los estadios 10 y 11, cuando abandonan el intestino atravesando su epitelio en la región dorsal para alcanzar el mesodermo (Warrior, 1994). Este proceso parece no requerir de señales provenientes del mesodermo ni de las gónadas (Warrior, 1994), sino que es iniciado por cambios en el epitelio del intestino, dado que las mutaciones que perturban la formación del intestino medio evitan que las PGCs adquieran su fenotipo migratorio (Callaini y cols., 1995). Se ha observado también que las PGCs derivadas de células polares transplantadas a posiciones extraembrionarias adquieren una morfología migratoria mucho antes que las PGCs localizadas en el intestino, lo que sugiere que el ambiente embrionario temprano puede tener una influencia represiva en la movilidad de las PGCs (Jaglarz y Howard, 1995). En apoyo de esta teoría, se ha observado que explantes de células polares, no migratorias, adquieren el fenotipo migratorio al ponerlas en cultivo (Jaglarz y Howard, 1995).

Li y cols., (2003) demostraron que uno de los factores implicados en la adquisición del fenotipo migratorio por parte de las células polares es Torso. Torso es un transcrito que se hereda por vía materna y codifica un receptor tirosina quinasa implicado en el establecimiento del patrón dorso ventral del embrión de *Drosophila* (Duffy y Perrimon, 1994). La señalización vía Torso es necesaria para la activación de las rutas Jak/Stat y Ras en las PGCs (Li y cols., 2003). La hiperactivación de estas rutas resulta en un incremento del número de células polares y de una activación prematura de la migración. Del mismo modo, una pérdida en la señal de Torso resulta en una reducción del número de células polares así como una migración más lenta de las PGCs y una pobre internalización de las mismas. Por lo tanto, la migración de las PGCs hacia la invaginación del intestino podría realizarse de un modo activo, a pesar de la morfología esférica de las células polares (Li y cols., 2003). Esta función de torso en *Drosophila* podría ser análoga a la del receptor c-kit en las PGCs de ratón que se explica mas adelante.

En resumen, la migración de las PGCs en *Drosophila* se puede dividir en cuatro fases:

1. La internalización de las células polares por medio de la invaginación del intestino medio posterior.
2. La migración de las PGCs a través de la cara dorsal del intestino.
3. La división de dos grupos de PGCs y su migración lateral.
4. La asociación con los precursores somáticos de las gónadas (SGPs).



**Fig. 1. Migración de las PGCs en *Drosophila*.** (A) Las células polares se desplazan desde la región posterior del embrión hasta el lugar donde se producirá la invaginación del endodermo. (B) Las PGCs penetran en el embrión asociadas al endodermo que dará lugar al intestino medio. (C) Las PGCs migran hacia los precursores somáticos de las gónadas en dos grupos a ambos lados de la línea media del embrión. (D) Las PGCs se adhieren a las células somáticas de las gónadas para formar grupos compactos en el parasegmento 10 del embrión.

Recientemente se ha observado que desde la salida de las PGCs por la parte dorsal del intestino hasta su asociación con los precursores somáticos de las gónadas se produce un descenso de alrededor del 50% en el número de PGCs. Este fenómeno es debido a procesos apoptóticos mediados por p53 y que tienen como objetivo mantener la integridad de la línea germinal eliminando aquellas PGCs que presenten alguna anomalía o se encuentren en lugares ectópicos, evitando así la colonización de regiones extragonadales (Yamada y cols., 2008).

Como se ha dicho anteriormente, la actividad de Torso es necesaria para la incorporación eficaz de las células polares en la invaginación del intestino posterior. Una vez en el intestino, las PGCs adquieren una morfología propia de células en migración activa, si bien, para que puedan alcanzar el mesodermo dorsal es necesaria la pérdida de contactos intercelulares entre las células del epitelio intestinal para permitir a las PGCs atravesarlo (Callaini y cols., 1995; Jaglarz y Howard, 1995). Se ha demostrado que esta migración activa de las PGCs a través del epitelio del intestino depende de la función del gen *Tre-1* (*trapped in endoderm-1*). Este gen se expresa en las PGCs y codifica un receptor con 7 dominios transmembrana relacionado con los receptores de quimiocinas. Teniendo en cuenta que también se ha demostrado la implicación de esta familia de receptores, principalmente del CXCR4, en la migración de las PGCs de ratón, pollo y pez cebra, la señalización a través de estos receptores podría constituir un mecanismo para la orientación de la migración de las PGCs muy conservado evolutivamente (Kunwar y cols., 2003). También se ha observado la participación de la GTPasa Rho1 en esta fase de la migración de las PGCs, su función sería facilitar la reorganización del citoesqueleto de actina, necesaria en los procesos de migración activa (Kunwar y cols., 2003).

Parece ser que la salida de las PGCs del intestino, en lugar de deberse a la atracción por parte de señales provenientes del mesodermo, se debe a señales repulsivas mediadas por *Wunen/Wunen2* que forzarían a las PGCs a alejarse del intestino hacia el mesodermo circundante (Starz-Gaiano y cols., 2001). *Wunen* y *Wunen2* son genes de *Drosophila* homólogos a las fosfohidrolasas de lípidos fosfato (LPPs) de mamíferos, también llamadas Fosfatasa de ácidos

fosfatídicos (PAPs). Hay tres homólogos en el ratón (LPP1/Pap2a, LPP2/Pap2c y LPP3/ Pap2b), de los cuales solo se ha eliminado el LPP2 en ratones mutantes, en los que no se observan defectos significativos en el desarrollo de los PGCs. Por lo que sigue sin estar claro si las LPPs conservan en mamíferos su papel en el desarrollo de las PGCs. Wunen/Wunen2 y las LPPs son responsables, en *Drosophila* y ratón respectivamente, de la renovación de pequeños lípidos implicados en la quimiotaxis y la supervivencia celular. Por lo tanto, su actividad repulsiva podría estar mediada directamente por la generación de productos de origen lipídico que actuarían como repelentes de las PGCs o indirectamente mediante la degradación de lípidos atrayentes de las mismas.

Una vez que las PGCs alcanzan el mesodermo se dividen en dos grupos que migran lateralmente hacia los precursores somáticos de las gónadas. En esta fase las PGCs podrían ser atraídas por lípidos generados por la actividad de la HMG-CoA reductasa, ya que la ausencia de este enzima evita la colonización de las gónadas por parte de las PGCs, mientras que la expresión ectópica de la HMG-CoA reductasa es capaz de atraer a las PGCs hacia lugares distantes de su ruta natural (Van Doren y cols., 1998). La migración de las PGCs podría estar también controlada por atrayentes lipídicos en el ratón. Esta suposición se basa en la expresión de *Edg2*, un transcrito que codifica para un receptor de ácido lisofosfatídico, detectada en las PGCs migratorias (Molyneaux y cols., 2004). Otros factores que podrían estar implicados en esta fase de la migración en *Drosophila* son *hedgehog* (Deshpande y cols., 2001) y *unpaired* (Li y cols., 2003). La ausencia de alguno de estos factores conduce a una colonización deficiente de las gónadas por parte de las PGCs.

La asociación de las PGCs con los precursores somáticos de las gónadas (SGPs) es el último paso en la migración de las PGCs en *Drosophila*. Durante este proceso, las PGCs y los SGPs forman grupos compactos de células en el parasegmento 10 del embrión. Se cree que este proceso de coalescencia está mediado por señales procedentes de los SGPs y que la activación de la ruta de señalización JAK/STAT en las PGCs es necesaria para su correcta migración en esta fase (Brown y cols., 2006). La mutación de la E-cadherina y de *Foi*, un miembro de la familia FICL, bloquea la coalescencia de las gónadas (Van Doren y cols., 2003). FICL (llamada así por sus primeros miembros identificados *Foi*, *Iar1*, *Catsup* y *Livi*) comprende una familia de proteínas de membrana que comparten una leve homología con la familia ZIP de transportadores de metales. La expresión de *Foi* en los SGPs podría controlar la expresión de E-cadherina necesaria para la adhesión con las PGCs (Van Doren y cols., 2003)

### 3.- MIGRACIÓN DE PGCS EN RATÓN.

A pesar de que presentan diferencias anatómicas y que la determinación de la línea germinal se produce de distinto modo, la migración de las PGCs en ratón presenta grandes similitudes con el mismo proceso en *Drosophila*. En ambos casos las PGCs se introducen en el embrión durante la invaginación del

endodermo que formará el intestino, las PGCs comienzan a migrar de forma activa en el intestino y salen del mismo desplazándose lateralmente en dos grupos de un modo dirigido hacia las futuras gónadas.

Las PGCs de ratón aparecen en una región extraembrionaria, el epiblasto proximal, determinadas por la expresión de los factores BMP4 y BMP8b, entre otros (Lawson y cols., 1999; Ying y cols., 2001). Poco después de su formación las PGCs se desplazan por la zona posterior de la línea primitiva hasta ocupar el endodermo y estructuras extraembrionarias en la región posterior del embrión. En este estadio las PGCs ya presentan una morfología polarizada y emiten procesos característicos de una migración activa (Anderson y cols., 2000).

Los mecanismos implicados en el comienzo del fenotipo migratorio de las PGCs aún no están claros pero se han identificado varios genes que podrían jugar un importante papel en la formación de estas células en el ratón. El gen *fragilis*, que fue identificado en librerías de cDNA obtenidas a partir de PGCs tempranas (Saitou y cols., 2002, Tanaka y Matsui, 2002), forma parte de una familia de genes inducibles por interferón (familia *Ifitm*) implicados en la adhesión intercelular homotípica y en el control del ciclo celular. En el embrión de ratón de E7,25 la región con una mayor expresión de *fragilis* coincide ampliamente con la zona de formación de las PGCs en el epiblasto posterior. En esta fase, las PGCs se encuentran estrechamente agrupadas y parecen carecer de movilidad. 24 horas más tarde la expresión de *fragilis* se ha reducido significativamente y las PGCs se han dispersado y desplazado hacia el endodermo (Saitou y cols., 2002). Esto sugiere que la regulación de la adhesión homotípica en las PGCs puede estar implicada en el comienzo del fenotipo migratorio. Sin embargo, se ha observado que las PGCs tempranas expresan otros genes de la familia *fragilis* (*fragilis 2* y *3*) y que la expresión de *fragilis 2* se mantiene en las PGCs durante la migración (Lange y cols., 2003). Por lo tanto, la relación entre la adhesión mediada por *fragilis* y la movilidad de las PGCs no está clara. De hecho, trabajos recientes han demostrado que la delección del gen *fragilis* o incluso de todo el grupo de genes de la familia *Ifitm* no tiene ningún efecto significativo en la migración de las PGCs ni en el desarrollo posterior del embrión, lo que sugiere que esta familia de genes podría tener una función redundante durante el desarrollo embrionario que puede ser suplida por otros factores (Lange y cols., 2008). La adhesión intercelular puede jugar también un papel importante en la formación de las PGCs. Se ha demostrado, por ejemplo, que el bloqueo mediante anticuerpos de la E-cadherina puede evitar la formación de PGCs en modelos *in vitro* (Okamura y cols., 2003).

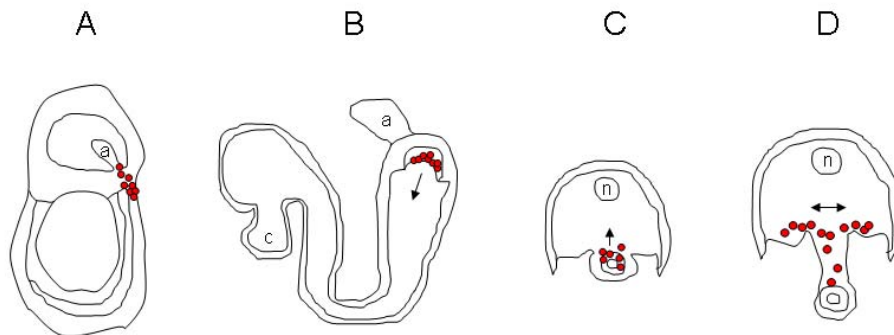
*Brachyury* es otro de los genes cuya expresión se ha observado en las PGCs recién formadas (Saitou y cols., 2002) y la expresión de este factor de transcripción se mantiene hasta el estadio E10,5 pero disminuye una vez que las PGCs pierden su fenotipo migratorio (E12,5) (Molyneaux y cols., 2004). *Brachyury* es necesario para la formación del mesodermo y puede regular positiva (Viebahn y cols., 2002) o negativamente (Kwan y Kirschner, 2003) la reorganización celular durante la gastrulación. Es posible que la movilidad de las PGCs esté controlada por la expresión de *Brachyury* de forma que las PGCs

mantengan las características de movilidad de las células en gastrulación días después de que el proceso de gastrulación haya finalizado.

La migración de las PGCs en el embrión de ratón podría dividirse en seis etapas:

1. La invasión del endodermo.
2. La migración hasta el intestino posterior.
3. La migración aleatoria en las paredes del intestino.
4. La migración desde el intestino hacia las crestas gonadales.
5. La muerte de las células que permanecen a lo largo de la línea media.
6. La colonización de las crestas gonadales.

Como ya hemos dicho, en E7,5 las PGCs migran a través de la línea primitiva y el endodermo. Algunas de estas PGCs acaban en estructuras extraembrionarias como el alantoides o el endodermo parietal, el destino de estas células sigue sin estar claro, pero se ha demostrado que aquellas que se sitúan en el endodermo definitivo son incorporadas en el intestino primitivo posterior en E9,0. (Molyneaux y cols., 2001). Los movimientos propios de la morfogénesis del embrión entre E7,5 y E8,5 hacen difícil observar el comportamiento de las PGCs durante la formación del intestino primitivo, por lo tanto, sigue sin estar claro si la colonización del intestino posterior por parte de las PGCs se produce de un modo pasivo o activo. Sin embargo, las PGCs situadas en la entrada de intestino posterior en E8,5 presentan una morfología redondeada propia de células sin movilidad, lo que sugiere una incorporación pasiva de las PGCs al intestino, donde más tarde recuperarían su movilidad.



**Fig. 2. Migración de las PGCs en ratón.** (A) La formación de las PGCs es inducida en el epiblasto proximal. (B) Las PGCs se incorporan al embrión mediante la invaginación del endodermo que dará lugar al intestino posterior (C) Las PGCs migran de forma activa y aparentemente aleatoria entre las células epiteliales del intestino posterior (D) Las PGCs abandonan el intestino por su lado dorsal y migran lateralmente hasta colonizar las crestas gonadales. (a, alantoides; c, corazón; n, tubo neural. C y D representan secciones transversales de la zona media del embrión)

Al menos dos proteínas regulan el comportamiento de las PGCs en el intestino, la E-cadherina y factor Steel. Las células del epitelio del intestino posterior expresan la proteína de adhesión dependiente de calcio E-cadherina, mientras que las PGCs situadas en el intestino no lo hacen (Bendel-Stenzel y cols., 2000). La ausencia de interacciones fuertes de adhesión homotípica puede

permitir a las PGCs moverse libremente en las paredes del intestino posterior. Las PGCs vuelven a expresar E-cadherina una vez que abandonan el intestino, por lo que esta transición podría estar relacionada con el proceso de migración. La interacción entre el ligando Steel y su receptor c-kit es necesaria para que las PGCs sobrevivan y migren en las paredes del intestino. La mutación en el receptor tirosina quinasa c-Kit o en su ligando Steel asociado a la membrana causa una dramática reducción en el número de PGCs en E9,5 (Besmer y cols., 1993). Por otro lado, las PGCs que se encuentran en embriones mutantes para c-Kit se encuentran deslocalizadas. En E9,0 las PGCs se encuentran de forma dispersa alrededor de todo el intestino. Sin embargo, en los embriones mutantes para c-kit la presencia de PGCs se limita a la cara ventral del intestino y muchas pueden encontrarse en el alantoides y la arteria vitelina (Buehr y cols., 1993). Las PGCs expresan c-kit y las células del intestino expresan el factor Steel, esta interacción puede ser necesaria para la movilidad y supervivencia de las PGCs en este ambiente.

Entre E9,0 y E9,5, las PGC salen del intestino por su cara dorsal y se dividen en dos grupos que migran lateralmente hacia las crestas gonadales en formación. Basándose en filmaciones de PGCs de E9,5 migrando en tejidos cultivados en medio suplementado con suero bovino fetal se propuso que la migración de las PGCs en esta fase no es direccional (Molyneaux y cols., 2001). Posteriormente se descubrió que la migración direccional se producía en este estadio si se utilizaba medio de cultivo sin suero (Molyneaux y cols., 2003), lo que sugiere que el suero contiene factores que inhiben la migración dirigida. Esta migración dirigida de las PGCs parece ser controlada por factores secretados por las crestas gonadales. Godin y cols. (1990) demostraron que medios condicionados por crestas gonadales pueden atraer a las PGCs en cultivo y que el TGF- $\beta$  produce un efecto similar (Godin y cols., 1991), aunque sigue sin estar claro que papel juega el TGF- $\beta$  en el desarrollo de la línea germinal in vivo.

Tanto los datos in Vitro como los obtenidos in vivo sugieren que el factor SDF-1 actúa como el principal atrayente para las PGCs en las crestas gonadales (Molyneaux y cols., 2003). La adición de SDF-1 en el medio de cultivo para secciones embrionarias bloquea el movimiento direccional de las PGCs y la implantación de esferas cubiertas con SDF-1 en secciones embrionarias similares causa la acumulación de PGCs a su alrededor. Además, mutaciones en SDF-1 y su receptor CXCR4 causan una reducción en el número de PGCs que alcanzan las crestas gonadales (Ara y cols., 2003; Molyneaux y cols., 2003). Sin embargo, basándose en datos de hibridación in situ e inmunohistoquímica, SDF-1 se expresa en una amplia variedad de tejidos en los embriones de ratón de E9,5 por lo que sigue sin estar claro el modo en el que este factor controla la posición de las PGCs in vivo. Una posibilidad es que algún mecanismo de contención evite que las PGCs migren hacia otros tejidos productores de SDF-1 distintos a las crestas gonadales. Puede que algunas regiones de la matriz extracelular no sean permeables al paso de las PGCs y esto limite la presencia de estas células a una ruta definida. El hecho de que en los embriones deficientes para SDF-1 un reducido número de PGCs alcancen las gónadas hace pensar en la existencia de mecanismos de señalización



alternativos. Mattiske y cols. (2006) apoyan esta idea mediante el estudio de mutantes para el factor de transcripción *Foxc1*, que presentan un fenotipo similar a los knockouts para *SDF-1*, a pesar de que los mutantes *foxc1*<sup>-/-</sup> presentan niveles normales de *SDF-1*.

Una prueba de que la interacción entre las PGCs y la matriz extracelular es fundamental para la correcta migración de las PGCs es que las PGCs que carecen de integrina  $\beta 1$  no son capaces de colonizar las crestas gonadales (Anderson y cols., 1999). Sin embargo, experimentos consistentes en el trasplante de PGCs normales en lugares ectópicos del embrión han mostrado que desde estas posiciones siguen siendo capaces de alcanzar las crestas gonadales, lo que sugiere que una amplia región dorsal del embrión es adecuada para la migración dirigida de las PGCs (Molyneaux y cols., 2004).

La interacción entre las PGCs también puede ser importante en el proceso de migración hasta las gónadas. Las PGCs salen del intestino de forma individual, pero durante la migración comienzan a interactuar unas con otras a través de largos y estrechos procesos que dan lugar a una red de células en migración (Gomperts y cols., 1994). Cerca del final de la migración las PGCs se van aproximando unas a otras hasta formar grupos de células. Esta agregación de las PGCs puede ser bloqueada *in vitro* mediante la adición de anticuerpos bloqueantes de la E-cadherina (Bendel-Stenzel y cols., 2000). De un modo similar, las células de la cresta neural migran como una red de células. Se cree que las uniones entre estas células de la cresta neural, mediadas por la conexina 43 (Cx43), permiten una comunicación intercelular necesaria para una correcta migración de las células de la cresta neural (Xu y cols., 2001). Existen varios resultados que confirman que Cx43 controla elementos importantes implicados en la supervivencia y migración de las PGCs en el ratón. Se ha demostrado que las PGCs expresan Cx43 durante el proceso migratorio pero su expresión es inhibida una vez que alcanzan las crestas gonadales (Molyneaux y cols., 2004). Los embriones knockouts para Cx43 presentan un número reducido de PGCs en sus crestas gonadales en E11,5 debido a la apoptosis inducida por una activación anormal de p53, además de una disminución en su movilidad a lo largo de todo el desarrollo, entre otras causas por una funcionalidad deficiente de la integrina  $\beta 1$  (Francis y Lo, 2006).

Recientemente, Ding y cols. (2008) han demostrado que las crestas gonadales de ratón presentan altos niveles de colesterol y que el colesterol es necesario para la supervivencia y la correcta migración de las PGCs en ratón. En sus experimentos demostraron que la reducción de los niveles de colesterol producida mediante la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGCR) conduce a un aumento de la apoptosis y a una reducción de la movilidad de las PGCs en cultivo. La supervivencia de las PGCs deficientes para HMGCR podía recuperarse mediante la adición al medio de colesterol con farnesol o colesterol con geranilgeraniol, si bien, solo la segunda combinación promovía la recuperación de la movilidad celular. En el mismo trabajo se demostró que los embriones de ratón privados de las dos últimas enzimas necesarias para la biosíntesis del colesterol no presentan, sin embargo, déficit de colesterol hasta estadios tardíos del desarrollo, lo que

sugiere que el colesterol necesario en las fases tempranas, incluyendo la migración de las PGCs, se obtiene a partir de un aporte de colesterol materno (Ding y cols., 2008)

El control de la supervivencia de las PGCs también parece ser un factor importante en la determinación de su posición en el embrión. Factores de supervivencia localizados podrían controlar la posición de las PGCs durante el proceso migratorio. Son varios los factores de crecimiento implicados en la supervivencia y proliferación de las PGCs en cultivo (Eguizabal y cols., 2007), tales como el LIF o el c-kit (Donovan y De Miguel, 2003). La adición de estos factores junto con el Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y el factor Steel al medio de cultivo puede dar lugar a líneas inmortalizadas de PGCs denominadas células germinales embrionarias (células EG) (Matsui y cols., 1992). La implicación del FGF en el mantenimiento de la supervivencia de las PGCs *in vivo* fue demostrada por Takeuchi y cols. (2005) al observar la expresión de los receptores *Fgfr1-IIIc* y *Fgfr2-IIIb* en PGCs de E10,5 y como la pérdida de función de esta ruta de señalización conducía a una mayor apoptosis entre las PGCs.

En momento en el que se produce el mayor índice de apoptosis se corresponde con la fase en la que las PGCs migran desde el intestino hacia las crestas gonadales (E10,5). Durante este proceso, las PGCs que quedan más alejadas de las crestas o no consiguen migrar hacia ellas acaban por fragmentarse y morir (Molyneaux y cols., 2001). La muerte de estas células podría deberse a que el rápido crecimiento del embrión en estos estadios provoca que en la zona media del mismo se reduzcan sensiblemente los niveles de factores de supervivencia producidos por las crestas gonadales, principalmente el factor Steel (Runyan y cols., 2006). Se sabe que la disminución en los niveles del factor Steel desencadena la activación de rutas apoptóticas mediadas por Bax, un miembro de la familia del Bcl2, y se ha demostrado que es precisamente este mecanismo el causante de la muerte por apoptosis de las PGCs que permanecen en la zona media del embrión en E10,5, ya que en mutantes *Bax<sup>-/-</sup>* se siguen localizando PGCs en lugares ectópicos del embrión hasta al menos E18,5 mientras que en los embriones *Bax<sup>+/+</sup>* todas las PGCs ectópicas han desaparecido en E15,5. Si bien, este aumento de la supervivencia debido a la ausencia de Bax parece ser un efecto a corto plazo limitado a los estadios E10,5-E14,5, ya que en los embriones *Bax<sup>-/-</sup>* el número de PGCs ectópicas disminuye a partir de E14,5 hasta haber desaparecido completamente en el momento del nacimiento mediante mecanismos independientes de Bax (Stallock y cols., 2003).

#### 4.- MIGRACIÓN DE PGCS EN POLLO.

El mecanismo empleado por las PGC para alcanzar las gónadas en aves y reptiles posee la particularidad con respecto al resto de grupos animales de que las PGCs se introducen en el torrente sanguíneo y lo utilizan para desplazarse hasta la zona de formación de las gónadas, donde reciben las señales necesarias para abandonar los vasos.

En el caso del pollo, los precursores de las PGCs se localizan en la zona central del área pelúcida (Yamamoto y cols., 2007), en la superficie ventral del epiblasto en el estadio X (según el sistema de estadios definido por Eyal-Giladi y Kochav, 1976). Estas células se desplazan gradualmente al hipoblasto durante las fases XI y XIV (Karagenc y cols., 1996). Después de la formación de la línea primitiva, las PGCs son transportadas hacia la zona frontal del embrión hasta la región creciente germinal (Ginsburg y Eyal-Giladi, 1986), desde donde entran en la circulación embrionaria asociada a la formación del sistema vascular sanguíneo. Posteriormente las PGCs dejan los capilares mediante migración activa cerca del epitelio germinal y migran a lo largo del mesenterio dorsal hasta el primordio gonadal (Kuwana y Rogulska, 1999).

Las PGCs de pollo fueron identificadas originalmente usando criterios morfológicos, como su tamaño considerablemente grande, su núcleo grande y esférico y la presencia de lípidos refractarios en el citoplasma (Zhao y Kuwana, 2003), junto con el uso de marcadores histoquímicos como el PAS (Periodic Acid-Schiff), que tiñe el glucógeno, o anticuerpos anti-SSEA-1 (Stage-specific embryonic antigen-1) o anti-EMA-1 (Embryonic Mouse Antigen-1). Sin embargo, el marcaje con PAS detecta las PGCs solamente después del estadio 4 (sistema de estadios de Hamburger y Hamilton, 1951). Además, el epitopo del SSEA-1, galactosa-N-acetilglucosamina-fucosa, se expresa en la masa celular interna, las células del epiblasto y en PGCs migratorias de ratón, por lo que no es específico de la línea germinal. El anticuerpo anti-EMA-1 reconoce grupos fucosilados de polilactosamina y fue obtenido frente a células de carcinoma embrionario de ratón. Anti-EMA-1 no solo marca las PGCs de ratón, sino también las de pollo. Sin embargo, solo entre un tercio y un quinto de las células positivas para PAS son marcadas con anti-EMA-1 en el pollo (Urven y cols., 1988), indicando que anti-EMA-1 no es adecuado para definir el linaje de las células germinales. Por lo tanto, ni los parámetros morfológicos ni los marcajes para PAS, SSEA-1 o EMA-1 son suficientemente específicos como para permitir un estudio de la segregación de la línea germinal del pollo. Recientemente, el gen *vasa* ha recibido una considerable atención como un marcador molecular apropiado para trazar el origen de la línea germinal. El gen *vasa* fue descubierto originalmente en *Drosophila* (Lasko y Ashburner, 1988), y genes homólogos a *vasa* han sido ya identificados en varias especies, incluyendo *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, pez cebra, ratón, humanos, trucha y rata. Tsunekawa y cols. (2000) aislaron el gen homólogo de *vasa* en pollo (CVH) y demostraron la expresión específica en la línea germinal de la proteína CVH, principalmente en secciones de embriones, y demostraron que esta proteína podría ser utilizada como uno de los marcadores apropiados para investigar el linaje de la línea germinal en aves. Aunque varios estudios han investigado las características de las PGCs de pollo, apenas hay estudios sobre la proliferación y la migración de las PGCs desde el área pelúcida en el estadio X hasta la región donde se formarán las gónadas.

Como ya hemos dicho, Las PGCs de pollo utilizan el sistema vascular como vehículo para desplazarse a la región de las futuras gónadas. Pero no se conocen los detalles sobre cuando y donde se produce el paso desde la región

extraembrionaria al sistema vascular y desde el torrente sanguíneo a la región gonadal. Para elucidar estos detalles se ha realizado un seguimiento de las PGCs marcadas con anti-CVH en embriones de pollo desde los estadios X y 2 al 17, así como muestras de sangre embrionaria tomada durante los estadios del 12 al 17.

A continuación se resume el proceso de migración de las PGCs en el pollo, que puede dividirse en tres fases principales:

1. Migración desde la región extraembrionaria hasta el región cefálica del embrión.
2. Incorporación al sistema circulatorio.
3. Extravasación de los vasos sanguíneos y colonización de las crestas gonadales.

Durante el estadio X las PGCs aparecen dispersas en el área pelúcida (Tsunekawa y cols., 2000), especialmente en la zona central del blastodermo, principalmente en la superficie ventral del epiblasto y en menor medida en su superficie dorsal. En el estadio 9 las PGCs continúan ampliamente dispersas en la región extraembrionaria anterior pero comienzan a acumularse en la región cefálica en el estadio 10, donde continúan proliferando y agregándose hasta el estadio 11. Aún no se sabe que señales dirigen la migración producida desde la región extraembrionaria hasta la región cefálica y la posterior entrada en el sistema circulatorio, si bien, Stebler y cols. (2004) descartan que el SDF-1 participe en este proceso.

Varios estudios coinciden en que la entrada de las PGCs en los vasos sanguíneos se produce entre los estadios 10 y 11 (Kuwana y Fujimoto, 1984; Nakamura y cols., 2007). Sin embargo, no está claro si esta entrada se produce mediante una incorporación pasiva de las PGCs a los capilares presentes en la región extraembrionaria en el estadio 10 o mediante la migración activa de las PGCs que se concentran en la región cefálica (Nakamura y cols., 2007). La concentración de PGCs en sangre alcanza su pico máximo en el estadio 14 (Tajima y cols., 1999). Según Stebler y cols. (2004) el SDF-1 constituiría la señal principal para que las PGCs abandonen el sistema circulatorio a partir del estadio 15 y comiencen a migrar por el mesenterio dorsal hasta colonizar las gónadas.

## 5.- MIGRACIÓN DE PGCS EN PEZ CEBRA.

Entre los modelos mencionados en este trabajo, el proceso de migración de las PGCs en el pez cebra es uno de los que presentan mayor complejidad. Al contrario de lo que ocurre en *Drosophila*, ratón o pollo, donde la migración de las PGCs comienza en una región concreta del embrión, las PGCs del pez cebra aparecen en cuatro posiciones orientadas de forma aleatoria respecto al eje del embrión. A pesar de ello, la práctica totalidad de estas células alcanzan su objetivo durante el primer día del desarrollo. Este particular sentido de la orientación de las PGCs del pez cebra quedó claramente demostrado en

experimentos en los cuales incluso las PGCs que fueron transplantadas a regiones del embrión destinadas a formar estructuras cefálicas consiguieron migrar hasta las gónadas (Ciruna y cols., 2002)

Como se ha mencionado, Las células germinales de pez cebra alcanzan las gónadas a partir de posiciones iniciales diversas. Este complejo proceso de migración requiere varios objetivos intermedios (Weidinger y cols., 2002). En este modelo la migración de las PGCs puede dividirse en cuatro fases:

1. Migración dorsal durante la gastrulación.
2. Agrupamiento en el mesodermo situado entre la cabeza y el tronco.
3. Migración hacia un objetivo intermedio en el mesodermo lateral.
4. Migración desde la posición intermedia hacia la región posterior del embrión para colonizar las gónadas.

La movilidad de las PGCs comienza 4 horas después de la fertilización. Durante la gastrulación, los cuatro clusters de PGCs, situados en el blastodermo interno, se desplazan dorsalmente. El bloqueo de la traducción del gen *dead end* (Weidinger y cols., 2003), que codifica para una proteína de unión al RNA, bloquea estos pasos iniciales de la migración. En embriones de pez cebra deficientes para el gen *dead end* las PGCs ya no se encuentran en el blastodermo interno, sino en lugares ectópicos de la capa superficial del embrión. Estas células en posiciones superficiales nunca adquieren un fenotipo migratorio y permanecen estrechamente adheridas unas a otras hasta que finalmente mueren. Homólogos de *dead end* han sido identificados en PGCs de *Xenopus*, pollo y ratón. Sin embargo, en el ratón, *dead end* es expresado por las PGCs después de los estadios migratorios, por lo que su función en el desarrollo de las PGCs podría no estar totalmente conservada.

A pesar de la complejidad del proceso de migración, la posición de las PGCs en el pez cebra parece estar controlada por un mecanismo molecular muy simple. Las PGCs son atraídas hacia sus posiciones intermedias y finales por el factor SDF-1 (Blaser y cols., 2005). La expresión de SDF-1 en pez cebra presenta una mayor correspondencia con la posición de las PGCs que en el ratón. SDF-1 se expresa en una banda entre el mesodermo de la cabeza y el tronco en el momento en que las PGCs se concentran en este punto. Posteriormente, la expresión de SDF-1 se eleva en el mesodermo lateral alrededor de las posiciones intermedias de las PGCs. Finalmente su expresión se desplaza hacia posiciones más caudales a medida que las PGCs migran hacia las gónadas. El bloqueo de la traducción de SDF-1 o de su receptor, CXCR4, mediante el uso de oligos antisentido Morpholino produce en ambos casos una perturbación de la migración de las PGCs. Por otro lado, experimentos consistentes en la expresión ectópica de SDF-1 demostraron que estos nuevos focos de expresión de SDF-1 eran capaces de desviar la migración de las PGCs lejos de su ruta natural. Recientemente se ha demostrado que los cambios morfológicos inducidos por el SDF-1 en las PGCs migratorias, consistentes en la aparición de protrusiones en la membrana, se deben a contracciones mediadas por miosina en respuesta a un aumento del calcio intracelular (Blaser y cols., 2006).

Recientemente se ha demostrado que el IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) está relacionado con el sistema de señalización SDF-1/CXCR4 y por lo tanto con la migración de las PGCs en el pez cebra. Los embriones de pez cebra expresan dos receptores para el IGF-1, IGF1Ra e IGFR1b. El estudio de embriones deficientes para cada uno de los receptores permitió observar que la ausencia del receptor IGFR1b conducía a una migración deficiente de las PGCs y por lo tanto a un menor número de las mismas en las gónadas en desarrollo, mientras que la inhibición del IGF1Ra no afectaba significativamente a la capacidad migratoria de las PGCs (Schlueter y cols., 2007). Por otro lado, se ha demostrado que la disminución en los niveles de ambos receptores produce una alteración en el sistema de señalización SDF-1/CXCR4, concretamente, los embriones deficientes para el receptor b presentan una sobreexpresión de SDF-1 mientras que la ausencia del receptor a conduce a una disminución en los niveles de CXCR4, si bien, la forma en la que esta alteración del sistema SDF-1/CXCR4 afecta a la migración de las PGCs sigue sin estar clara (Schlueter y cols., 2007). Más recientemente, Sang y cols. (2008) han demostrado que el sistema IGF no solo afecta a la migración de las PGCs mediante la alteración del eje SDF-1/CXCR4, sino que puede actuar directamente como una señal direccional de la migración, concretamente se ha observado que el patrón de expresión del ligando IGF-2b se corresponde estrechamente con la ruta de migración de las PGCs, y que la alteración en los niveles de expresión de este factor altera la capacidad migratoria de las mismas in vivo.

## 6.- Bibliografía.

Anderson R, Copeland TK, Scholer H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev* 2000; 91: 61-68.

Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 1999; 126: 1655-1664.

Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T, Matsui Y, Nagasawa T. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5319-5323.

Bendel-Stenzel MR, Gomperts M, Erson R, Heasman J, Wylie C. The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech Dev* 2000; 91: 143-152.

Besmer P, Manova K, Duttlinger R, Huang EJ, Packer A, Gyssler C, Bachvarova RF. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl* 1993, 125-137.

Blaser H, Eisenbeiss S, Neumann M, Reichman-Fried M, Thisse B, Thisse C, Raz E. Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. *J Cell Sci.* 2005; 118: 4027-4038.

Blaser H, Reichman-Fried M, Castanon I, Dumstrei K, Marlow FL, Kawakami K, Solnica-Krezel L, Heisenberg CP, Raz E. Migration of zebrafish primordial germ cells: a role for myosin contraction and cytoplasmic flow. *Dev Cell* 2006; 11: 613-627.

Brown S, Zeidler MP, Hombría JE. JAK/STAT Signalling in *Drosophila* controls cell motility during germ cell migration. *Dev Dyn.* 2006; 235: 958-966.

Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S. Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. *Dev Dyn* 1993; 198: 182-189.

Callaini G, Riparbelli MG, Dallai R. Pole cell migration through the gut wall of the *Drosophila* embryo: analysis of cell interactions. *Dev Biol* 1995; 170: 365-375.

Ciruna B, Weidinger G, Knaut H, Thisse B, Thisse C, Raz E, Schier AF. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:14919-14924.

Deshpande G, Swanhart L, Chiang P, Schedl P. Hedgehog signaling in germ cell migration. *Cell* 2001; 106: 759-769.

Díez-Torre A, Silván U, De Wever O, Bruyneel E, Mareel M, Aréchaga J. Germinal tumor invasion and the role of the testicular stroma. *Int J Dev Biol.* 2004; 48: 545-557.

Ding J, Jiang D, Kurczyk M, Nalepka J, Dudley B, Merkel EI, Porter FD, Ewing AG, Winograd N, Burgess J, Molyneaux K. Inhibition of HMG CoA reductase reveals an unexpected role for cholesterol during PGC migration in the mouse. *BMC Dev Biol* 2008; 8: 120.

Donovan PJ, De Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13: 463-471.

Duffy JB, Perrimon N. The torso pathway in *Drosophila*: lessons on receptor tyrosine kinase signaling and pattern formation. *Dev Biol* 1994; 166: 380-395.

Eguizabal C, Boyano MD, Díez-Torre A, Andrade R, Andollo N, De Felici M, Aréchaga J. Interleukin-2 induces the proliferation of mouse primordial germ cells in vitro. *Int J Dev Biol.* 2007; 51:731-738.

Eyal-Giladi H, Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chicken I. *General morphology.* *Dev Biol* 1976; 49: 321–337.

Francis RJB, Lo CW. Primordial germ cell deficiency in the connexin 43 knockout mouse arises from apoptosis associated with abnormal p53 activation. *Development* 2006; 133: 3451-3460.

Ginsburg M, Eyal-Giladi H. Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1986; 95: 53–71.

Godin I, Wylie C, Heasman J. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 1990; 108: 357-363.

Godin I, Wylie C. TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 1991; 113: 1451-1457.

Gomperts M, García-Castro M, Wylie C, Heasman J. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 1994; 120: 135-141.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 1951; 88: 49–92.

Jaglarz MK, Howard KR. The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* 1995; 121: 3495-3503.

Karagenc L, Cinnamon Y, Ginsburg M, Petite JN. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet.* 1996; 19: 290–301.

Kunwar PS, Starz-Gaiano M, Bainton RJ, Heberlein U, Lehmann R. Tre1, a G-protein-coupled receptor, directs transepithelial migration of *Drosophila* germ cells. *PLoS Biol* 2003, 1:E80.

Kuwana T, Fujimoto T. Locomotion and scanning electron microscopic observations of primordial germ cells from the early embryonic chick blood in vitro. *Anat Rec* 1984; 209: 337–343.

Kuwana T, Rogulska T. Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. *Cell. Mol. Biol.* 1999; 45: 725-736.

Kwan K, Kirschner M. Xbra functions as a switch between cell migration and convergent extension in the *Xenopus* gastrula. *Development* 2003; 130: 1961-1972.

Lange UC, Adams DJ, Lee C, Barton S, Schneider R, Bradley A, Surani MA. Normal Germ Line Establishment in Mice Carrying a Deletion of the *Ifitm/Fragilis* Gene Family Cluster. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 4688–4696.

Lange UC, Saitou M, Western PS, Barton SC, Surani MA. The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev. Biol.* 2003; 3: 1-11.

Lasko PF, Ashburner M. The product of the *Drosophila* gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 1988; 335: 611–617.



- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13: 424-436.
- Li J, Xia F, Li WX. Coactivation of STAT and Ras is required for germ cell proliferation and invasive migration in *Drosophila*. *Dev Cell* 2003; 5: 787-798.
- Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70: 841-847.
- Mattiske D, Kume T, Hogan BLM. The mouse forkhead gene *Foxc1* is required for primordial germ cell migration and antral follicle development. *Dev Biol* 2006; 290: 447-458.
- Molyneaux KA, Stallock J, Schaible K, Wylie C. Timelapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol* 2001; 240: 488-498.
- Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 2003; 130: 4279-4286.
- Molyneaux KA, Wang Y, Schaible K, Wylie C. Transcriptional profiling identifies genes differentially expressed during and after migration in murine primordial germ cells. *Mech. Dev. GEPR* 2004; 4: 167-181.
- Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko AR, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult Sci* 2007; 86: 2182-2193.
- Okamura D, Kimura T, Nakano T, Matsui Y. Cadherin-mediated cell interaction regulates germ cell determination in mice. *Development* 2003; 130: 6423-6430.
- Runyan C, Schaible K, Molyneaux K, Wang Z, Levin L, Wylie C. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. *Development* 2006; 133: 4861-4869.
- Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 2002; 418: 293-300.
- Sang X, Curran MS, Wood AW. Paracrine insulin-like growth factor signaling influences primordial germ cell migration: in vivo evidence from the zebrafish model. *Endocrinology* 2008; 149: 5035-5042.
- Schlueter PJ, Sang X, Duan C, Wood AW. Insulin-like growth factor receptor 1b is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Dev Biol* 2007; 305: 377-387.
- Stallock J, Molyneaux K, Schaible K, Knudson CM, Wylie C. The pro-apoptotic gene *Bax* is required for the death of ectopic primordial germ cells during their migration in the mouse embryo. *Development* 2003; 130: 6589-6597.
- Stebler J, Spieler D, Slanchev K, Molyneaux KA, Richter U, Cojocaru V, Tarabykin V, Wylie C, Kessel M, Raz E. Primordial germ cell migration in the chicken and mouse embryo: The role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev Biol* 2004; 272: 351-361.
- Suyama R, Jenny A, Curado S, Pellis-van Berkel W, Ephrussi A. The actin-binding protein *Lasp* promotes Oskar accumulation at the posterior pole of the *Drosophila* embryo. *Development* 2009; 136: 95-105.

- Tajima A, Hayashi H, Kamizumi A, Ogura J, Kuwana T, Chikamune T. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J Exp Zool* 1999; 284: 759–764.
- Takeuchi Y, Molyneaux K, Runyan C, Schaible K, Wylie C. The roles of FGF signaling in germ cell migration in the mouse. *Development* 2005; 132: 5399-5409.
- Tanaka SS, Matsui Y. Developmentally regulated expression of mil-1 and mil-2, mouse interferon-induced transmembrane protein like genes, during formation and differentiation of primordial germ cells. *Gene Expr Patterns* 2002; 2: 297-303.
- Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T, Noce T. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 2000; 127: 2741–2750.
- Urven LE, Erickson CA, Abbott UK, McCarrey JR. Analysis of germline development in the chick using anti-mouse EC cells antibody. *Development* 1988; 103: 299–304.
- Van Doren M, Broihier HT, Moore LA, Lehmann R. HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. *Nature* 1998; 396: 466-469.
- Van Doren M, Mathews WR, Samuels M, Moore LA, Broihier HT, Lehmann R. Fear of intimacy encodes a novel transmembrane protein required for gonad morphogenesis in *Drosophila*. *Development* 2003; 130: 2355-2364.
- Viebahn C, Stortz C, Mitchell SA, Blum M. Low proliferative and high migratory activity in the area of Brachyury expressing mesoderm progenitor cells in the gastrulating rabbit embryo. *Development* 2002; 129: 2355-2365.
- Warrior R. Primordial germ cell migration and the assembly of the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev Biol* 1994; 166: 180-194.
- Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, Dumstrei K, Wise C, Lovell-Badge R, Thisse C, Thisse B, Raz E. Dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol* 2003; 13: 1429-1434.
- Weidinger G, Wolke U, Kopranner M, Thisse C, Thisse B, Raz E. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. *Development* 2002; 129: 25-36.
- Xu X, Li WE, Huang GY, Meyer R, Chen T, Luo Y, Thomas MP, Radice GL, Lo CW. Modulation of mouse neural crest cell motility by N-cadherin and connexin 43 gap junctions. *J Cell Biol* 2001; 154: 217-230.
- Yamada Y, Davis KD, Coffman CR. Programmed cell death of primordial germ cells in *Drosophila* is regulated by p53 and the Outsiders monocarboxylate transporter. *Development* 2008; 135: 207-216.
- Yamamoto Y, Ono T, Kagami H. Dynamic analysis of the developmental fate of cells in the center of the area pellucida of the blastoderm in chicken. *J. Poult. Sci.* 2007; 44: 85–91.
- Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7858-7862.
- Zhao DF, Kuwana T. Purification of avian circulating primordial germ cells by Nycodenz density gradient centrifugation. *Br. Poult. Sci.* 2003; 44: 30–35.

## CAPÍTULO 2:

### FOLICULOGÉNESIS Y OVOGÉNESIS.

Elixabete López Sánchez-Sarachaga y María Díaz Núñez.

#### Índice

1. DESARROLLO Y FUNCIÓN OVÁRICA.....	34
1.1. Desarrollo de la gónada embrionaria.....	34
1.2. Ensamblaje folicular.....	34
1.3. Transición de folículo primordial a folículo primario.....	36
1.4. Desarrollo de los folículos preantrales o secundarios.....	38
1.5. Desarrollo de los folículos antrales o terciarios.....	39
1.6. Selección folicular.....	40
1.7. Ovulación y fase lútea.....	41
2. MOLÉCULAS QUE AFECTAN AL DESARROLLO FOLICULAR Y OVOCITARIO.....	43
2.1. Hormonas sexuales esteroideas.....	43
2.1.1. Progestágenos o progestinas.....	43
2.1.2. Andrógenos.....	45
2.1.3. Estrógenos.....	47
2.2. Otras hormonas.....	49
2.2.1. Hormona del crecimiento o somatotropina (GH).....	49
2.2.2. Insulina.....	49
2.2.3. Sistema IGF.....	49
2.2.4. Leptina.....	50
2.2.5. 3, 3', 5-triyodotironina (T <sub>3</sub> ):.....	50
2.3. Factores locales.....	50
2.3.1. Hormona antimulleriana (AMH) o sustancia inhibidora mulleriana (MIS).....	50
2.3.2. Sistema inhibina-activina.....	51
2.3.3. Kit y ligando Kit (KitL).....	53
2.3.4. Factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9):.....	54
2.3.5. Proteína morfogenética de hueso 15 (BMP15).....	55
2.3.6. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	57
2.3.7. Proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4).....	57
2.3.8. Proteína morfogenética de hueso 7 (BMP7).....	57
2.3.9. Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ).....	58
2.3.10. Factor de crecimiento de queratinocitos o de fibroblastos 7 (KGF7 o FGF7).....	58
2.3.11. Factor de crecimiento de queratinocitos o de fibroblastos 2 o básico (KGF2, FGF2 o bFGF).....	58
2.3.12. Neurotrofinas.....	59
2.3.13. Interleucina 6 (IL-6).....	59
2.3.14. Factor inhibitorio de la leucemia (LIF).....	60
2.3.15. Sistema HGF.....	60
2.4. Sustancias que afectan al cultivo folicular.....	61
2.4.1. Vitamina C o ácido ascórbico.....	61
2.4.2. Transferrina.....	61
2.4.3. Selenio.....	62
3. MANTENIMIENTO DE LA DETENCIÓN DURANTE LA MEIÓISIS Y MADURACIÓN OVOCITARIA.....	62
4. PROCESOS TRANZONALES (TZPS) Y UNIONES GAP.....	65
5. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EXPRESADOS EN EL OVARIO.....	66
6.- BIBLIOGRAFIA.....	68

## 1. DESARROLLO Y FUNCIÓN OVÁRICA.

### 1.1. Desarrollo de la gónada embrionaria.

Los ovarios de mamífero están constituidos por dos poblaciones celulares bien diferenciadas: las células somáticas y las células germinales.

Las células somáticas derivan de la cresta genital embrionaria, en cambio, las células germinales se originan en el epiblasto proximal (ectodermo embrionario), a través de la diferenciación de las células germinales primordiales (PGCs), tienen, por tanto, un origen extragonadal. En el caso del ratón, una población fundadora de 45 PGCs en el día E7.5 da lugar al linaje de células germinales (Lawson y Hage, 1994; Mc Clellan y cols., 2003).

Las PGCs, migran a la cresta urogenital, la región correspondiente a la gónada aún indiferenciada y allí, se dividen activamente mediante mitosis acompañadas de citocinesis incompletas. Esto hace que se formen agrupamientos conectados entre sí, que se denominan *nidos ovocitarios*, *cistos ovocitarios* o *sincitios ovocitarios*. En el ratón, este proceso de migración y formación de los nidos ovocitarios, ocurre entre los días E9.5 y E11.5 (Wyllie, 1999; Pepling y Spradling, 2001).

En día E13.5 las células dejan de dividirse por mitosis y entran en meiosis, quedando detenidas en el diploteno temprano de la profase I hasta el momento de la ovulación.

### 1.2. Ensamblaje folicular.

El ensamblaje folicular es un proceso poco conocido en el que los nidos ovocitarios son destruidos para que se produzca el ensamblaje de los folículos primordiales. En ratón, este proceso comienza tras el nacimiento: En primer lugar, se produce un importante descenso en el número de células germinales, aparentemente por apoptosis (Coucouvani y cols., 1993; Pepling y Spradling, 2001) y, a continuación, los agrupamientos ovocitarios son separados por la aparición de pre-células de la granulosa, de manera que cada folículo primordial queda formado por un ovocito y una capa de pre-células de la granulosa escamosas planas.

Se ha podido observar, que los folículos primordiales recién formados, ocupan la región periférica del ovario murino. Para el séptimo día posnatal (7 pnd) la inmensa mayoría de los ovocitos se encuentran ya localizados en los folículos primordiales.

Los ratones deficientes en Hormona foliculoestimulante  $\beta$  (FSH $\beta$ ), FSHR y hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) poseen folículos en estadios más avanzados que el estadio primario, de lo que se deduce que estos eventos suceden sin la acción de las gonadotropinas (Abel y cols., 2000; Cattanach y cols., 1977; Dierich y cols., 1998; Kendall y cols., 1995; Kendall y cols., 1991; Kumar y cols., 1997)

En cualquier caso, se puede afirmar que es el ovocito quien dirige el ensamblaje folicular, ya que en ausencia de ovocitos no tiene lugar, a pesar de que se forman estructuras similares a los nidos ovocitarios (Merchant, 1975).

Este estadio es crítico en el desarrollo ovárico ya que, se inicia la transcripción de numerosos genes específicos del ovocito que son importantes para la foliculogénesis y de genes de efecto materno que afectan al embrión de dos células.

Un factor específico del ovocito crítico para el ensamblaje folicular es el factor en la línea germinal  $\alpha$  (FIG $\alpha$ ) también llamado Figla. FIG $\alpha$  es un factor de transcripción básico hélice-lazo-hélice, que regula la transcripción de los genes de la zona pelúcida en ratón y parece que también en los seres humanos (Bayne y cols., 2004). Los estudios con ratones *knockout* muestran que en las hembras carentes de ese factor no tiene lugar el ensamblaje folicular (Soyal y cols., 2000). Este hecho hace pensar que también controla la producción de uno o más factores necesarios para la organización inicial de los folículos primordiales.

Además, hay varios factores de crecimiento y citoquinas, incluyendo el factor alfa de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), neurotrofinas (NT), inhibinas y el factor 9 de crecimiento y diferenciación (GDF9), que controlan el ensamblaje folicular.

Las hormonas esteroideas también desempeñan un importante papel en este proceso:

- La progesterona impide el ensamblaje folicular en la rata (Kezele y Skinner, 2003). Esto parece ser debido al efecto inhibitorio de la apoptosis en los ovocitos dependiente de progesterona, un evento relacionado con el ensamblaje folicular (Kezele y Skinner, 2003).

- El 17 $\beta$ -estradiol también tiene un efecto inhibitorio en el ensamblaje folicular tanto en rata (Kezele y Skinner, 2003) como algo más marcado en ratón (Chen y Pepling, 2006). Los ratones *knockout* para la aromatasa tienen un reducido número de folículos primarios y secundarios (Brito y cols., 2004). Los ovarios fetales de babuinos carentes de estradiol muestran un aumento en el número de nidos ovocitarios y un descenso de los folículos primordiales (Billiar y cols., 2003; Zachos y cols., 2002).

Como ya ha sido mencionado, el número de ovocitos desciende tras el nacimiento, aunque existe controversia sobre el momento de inicio de este proceso, debatiéndose si comienza en el desarrollo embrionario o tras el nacimiento (Mc Clellan y cols., 2003; Pepling y Spradling, 2001).

En cualquier caso, se cree que no todos los ovocitos de los nidos ovocitarios se convierten en ovocitos de folículos primordiales. Hasta ahora se ha aceptado que los ovarios están dotados de un número finito de ovocitos que se encuentran en los folículos primordiales detenidos, hasta que son reclutados para desarrollarse. La mayor parte de los ovocitos mueren durante el reclutamiento y su agotamiento conduce a la menopausia.

Sin embargo, los datos preliminares sugieren que existen células madre de la línea germinal en el ovario (Johnson y cols., 2005; Johnson y cols., 2004) aunque su localización no está clara y hacen falta realizar más estudios para demostrar su existencia y su relevancia fisiológica.

### 1.3 Transición de folículo primordial a folículo primario.

Una vez ensamblados, la mayor parte de los folículos primordiales permanecen quiescentes y son gradualmente reclutados pasando a formar parte del grupo de folículos en crecimiento a lo largo de la vida reproductiva.

No se conocen los mecanismos mediante los cuales se produce la selección y activación de los folículos primordiales que van a formar parte de la cohorte de folículos en desarrollo. Lo que sí se sabe es que el ovocito juega un papel clave en el desarrollo más allá de estadio primario (Eppig, 2001).

Una vez iniciado, el crecimiento folicular, finaliza de dos posibles formas: la ovulación o la muerte por atresia folicular.

Tras el reclutamiento de una cohorte de folículos primarios, el diámetro ovocitario aumenta y las células de la granulosa sufren un proceso de morfogénesis, cambiando de forma escamosa a cuboidal.

Más adelante, durante el crecimiento folicular preantral tardío, el folículo recluta una capa de células de la teca (Hirshfield, 1991a) aunque se ha propuesto que en algunas especies existe una población de pre-células de la teca en el inicio del crecimiento folicular (Hirshfield, 1991b).

Nobox es un factor de transcripción ovocitario que permite la transición de folículo primordial a folículo primario. Los ratones knockout para Nobox, forman lo que parecen histológicamente folículos primordiales, pero los ovocitos raramente crecen más allá de los 20  $\mu\text{m}$  y el número de células somáticas que rodean a cada ovocito no suele ser mayor de siete (Rajkovic y cols., 2004). Además, está implicado directa o indirectamente en la inducción de la expresión del ARNm de Pou5f1, Gdf9, Bmp15, Rfp14, H1oo, Zar1 y Mos (Rajkovic y cols., 2004).

El factor de transcripción Foxl2 expresado en las pre-células de la granulosa de folículos primordiales, también es importante para la formación de folículos primarios ya que su expresión permite que se dé la morfogénesis y la rápida proliferación de estas células (Schmidt y cols., 2004; Uda y cols., 2004). También se ha visto que favorece la síntesis de activina  $\beta\text{A}$  y de la hormona antimulleriana (Amh) de forma directa o indirecta, y se creó que reprime la transcripción del gen regulador agudo esteroideogénico (Star), responsable de la movilización y reparto de precursores de colesterol en la membrana interna mitocondrial.

Las células de la granulosa expresan el ligando Kit (KitL) mientras que los ovocitos y las células de la teca expresan Kit, el receptor de KitL, también denominado c-kit.

Los ovocitos, en respuesta a la estimulación por kitL, producen factores como el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) y la proteína morfogenética de hueso 15 (BMP15), mientras que las células tecales secretan el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que ejercen varios efectos regulatorios dentro de los folículos en crecimiento (Skinner, 2005).

El GDF9 producido por los ovocitos estimula la proliferación de las células de la granulosa y la diferenciación esteroidogénica (Dong y cols., 1996).

Además de KitL y GDF9, hay otros factores involucrados, como las neurotrofinas y sus receptores que se expresan en el ovario (Dissen y cols., 1995; Dissen y cols., 2002), bFGF y su receptor FGFR2IIIb (Nilsson y cols., 2001; Berisha y cols., 2004) el factor inhibitorio de la leucemia. LIF y sus receptores LIFR- $\beta$  y gp130 (van Eijk y cols., 1996; Nilsson y cols., 2002), BMP4 y sus receptores BMPR-IA, -IB y II (Erickson y Shimasaki, 2003; Nilsson y Skinner, 2003).

La hormona antimülleriana (AMH), también llamada sustancia inhibidora Mülleriana (MIS), tiene un papel inhibitorio en la transición de folículo primordial a primario (Durlinger y cols., 1999). Parece que los folículos grandes (antrales) producen AMH para que disminuya el número de folículos reclutados en cada ciclo (Durlinger y cols., 2002).

Las hormonas esteroideas ejercen una acción a dos niveles, por un lado de forma intraovárica y por otro retroalimentación positiva y negativa en el eje hipotálamo-hipófisis. En concreto, la progesterona inhibe el ensamblaje folicular y la transición de primordial a primario en ratas (Kezele y Skinner, 2002), mientras que el estradiol intraovárico promueve el crecimiento folicular y la diferenciación (Strauss y cols., 2004).

En cuanto a los receptores de estrógeno tipo  $\beta$  (ER $\beta$ ) son los que promueven la maduración desde estadio antral temprano hasta estadios preovulatorios (Emmem y cols., 2005).

Durante el desarrollo ovárico embrionario, parece que el estradiol afecta negativamente a la transición de folículo primordial a folículo primario (Ikeda y cols., 2001) sin embargo, sólo lo hace en la primera oleada, en el periodo posnatal no se observa ningún efecto (Kezele y Skinner, 2003). Los estudios realizados con ratones knockout para la aromatasa, han demostrado que el estradiol no es necesario para la maduración del ovocito (Huynh y cols., 2004).

La administración exógena de testosterona o dihidrotestosterona en el mono rhesus induce un aumento en el número de folículos primarios de forma tiempo-dependiente (Vendola y cols., 1999). Por otro lado, los andrógenos pueden impedir los últimos estadios del desarrollo folicular, lo cual va asociado a la inducción de la atresia folicular (Hutz y cols., 1990) y a la acumulación de folículos primarios y secundarios (Maciel y cols., 2004). Aunque de todas formas, los andrógenos no parecen ser necesarios para la fertilidad femenina, ya que en los ratones con testículos feminizados (ratones Tfm), en los que el receptor de andrógenos es disfuncional, son únicamente subfértiles (Lyon y Glenister, 1980). De forma similar,

los ratones nulos para el receptor de andrógenos alcanzan la senescencia reproductiva antes que los controles (Shiina y cols., 2006).

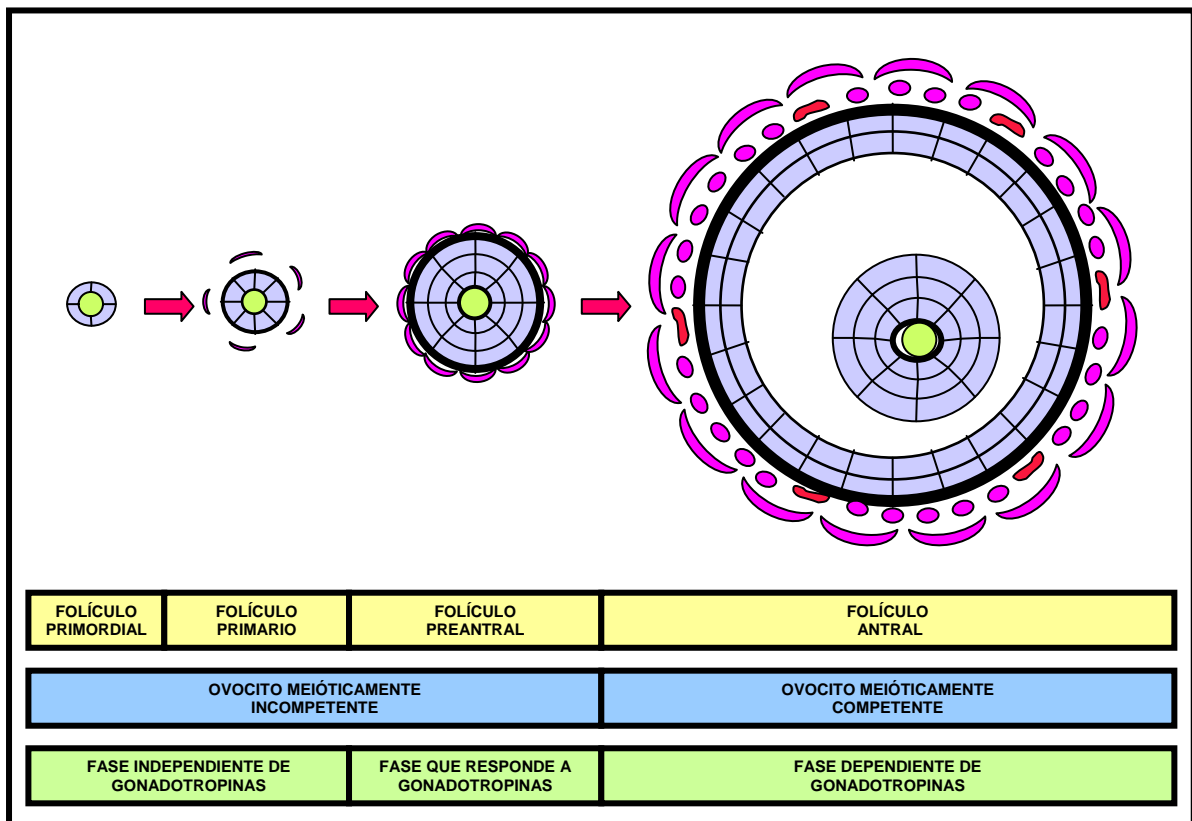


Figura 1: Etapas del desarrollo folicular

#### 1.4 Desarrollo de los folículos preantrales o secundarios.

En rata se ha observado que la primera ola de crecimiento folicular, coincide con los niveles aumentados de FSH (Ojeda y Ramírez, 1972). De hecho, los receptores para LH y FSH aparecen por primera vez en el ovario de rata coincidiendo con la aparición de los primeros folículos secundarios (Sokka y Huhtaniemi, 1990). Esto sugiere que las gonadotropinas estimulan el crecimiento y diferenciación de los folículos preantrales, pero los folículos pueden desarrollarse hasta el estadio antral en ausencia de gonadotropinas (Kumar, 2005). Sin embargo, más allá del estadio secundario tardío se necesitan LH y FSH para la maduración.

En respuesta a los niveles de FSH y LH, las cohortes de folículos más jóvenes continúan creciendo y diferenciándose. Probablemente el crecimiento cesa durante las fases lúteas media-tardía pero continúa de nuevo durante la nueva fase folicular. Este patrón de crecimiento y maduración de arresto y reanudación de una determinada cohorte, continúa hasta que el folículo dominante es ovulado y los demás folículos hermanos sufren atresia (McGee y Hsueh, 2000).



## 1.5 Desarrollo de los folículos antrales o terciarios.

La formación de la cavidad antral o antro, da lugar a la definición de dos poblaciones de células de la granulosa que se pueden distinguir morfológica y bioquímicamente: las células murales asociadas a la pared folicular y las del cúmulo asociadas al ovocito.

Las células del cúmulo expresan pocos receptores de LH (LHR), si es que expresan alguno. En cambio, las murales si que lo expresan, sobre todo, aquellas que están cerca de la lámina basal, de hecho, esta aumenta la expresión de LHR inducida por gonadotropinas (Furman y cols., 1986; Eppig y cols., 1997a). En cuanto al patrón de expresión de KitL se mantiene sin variaciones en esta etapa (Manova y cols., 1993; Motro and Bernstein, 1993, Joyce y cols., 1999).

Los ovocitos de folículos antrales secretan factores paracrinos que suprimen la expresión del receptor de LH/coriogonadotropina (Lhcgr) y KitL en las células del cúmulo y la expresión de Lhcgr en las células murales. (Eppig y cols., 1997a; Joyce y cols., 1999). Estos ovocitos, evitan el aumento en la producción del ARNm de Lhcgr inducido por FSH *in vitro*, tras el aislamiento de folículos antrales pequeños.

Los estudios de expresión de KitL producen resultados similares. Sin embargo, los ovocitos son menos capaces de suprimir la expresión de KitL en células de la granulosa de ratón estimuladas por testosterona y FSH, que de lo que son capaces de suprimir la expresión de Lhcgr (Joyce y cols., 1999).

El GDF9 ejerce el mismo efecto sobre la expresión del ARNm de Lhcgr y KitL que los ovocitos de folículos antrales por lo que podría ser el factor paracrino secretado por éstos (Elvin y cols., 1999a; Joyce y cols., 2000). Sin embargo, paradójicamente, los ovocitos de folículos preantrales tienen poca habilidad o ninguna para suprimir la expresión del ARNm de Lhcgr o KitL en las células de la granulosa a pesar de la expresión de tanto el ARNm como de la proteína GDF9 en estos ovocitos.

Dentro de las células de la granulosa, la FSH estimula la transducción de la señal dependiente de AMPc que es el mecanismo principal para estimular la expresión de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR), la enzima que escinde la cadena lateral en citocromo P450 (CYP11A), la deshidrogenasa de 3 $\beta$ -hidroxiesteroides tipo 1 (3 $\beta$ -HSD) y la aromataasa de P450 (CYP19). Esta ruta de transducción de señales promueve la conversión paso a paso del colesterol en progesterona, así como la aromatización de androstendiona y testosterona en estrógenos, principalmente estradiol (Lohan y cols., 2002). Los niveles de StAR y de las enzimas para la biosíntesis de esteroides anteriormente mencionados, están altamente reguladas no sólo por la señalización dependiente de AMPc sino también por interacciones intra y extraováricas entre hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (Skinner, 1991; Terranova y Rice, 1997).

La aparición de células de la teca morfológicamente distintas parece requerir LH y tiene lugar de forma simultánea a la vascularización folicular. Sin embargo, las células de la granulosa favorecen el crecimiento y diferenciación de las células tecales antes de la expresión del LHR; por tanto, estos efectos probablemente se

deban a factores de crecimiento derivados de las células de la granulosa (Gelety y Magoffin, 1997). Las células de la teca responden a la LH produciendo andrógenos (androstendiona y testosterona) (Erickson y cols., 1985). Los andrógenos derivados de la teca difunden a las células de la granulosa donde los andrógenos se usan como sustrato para la producción de estradiol.

La cooperación entre las células de la teca y las de la granulosa provoca el aumento sustancial de la producción de estradiol en los folículos más maduros (antrales).

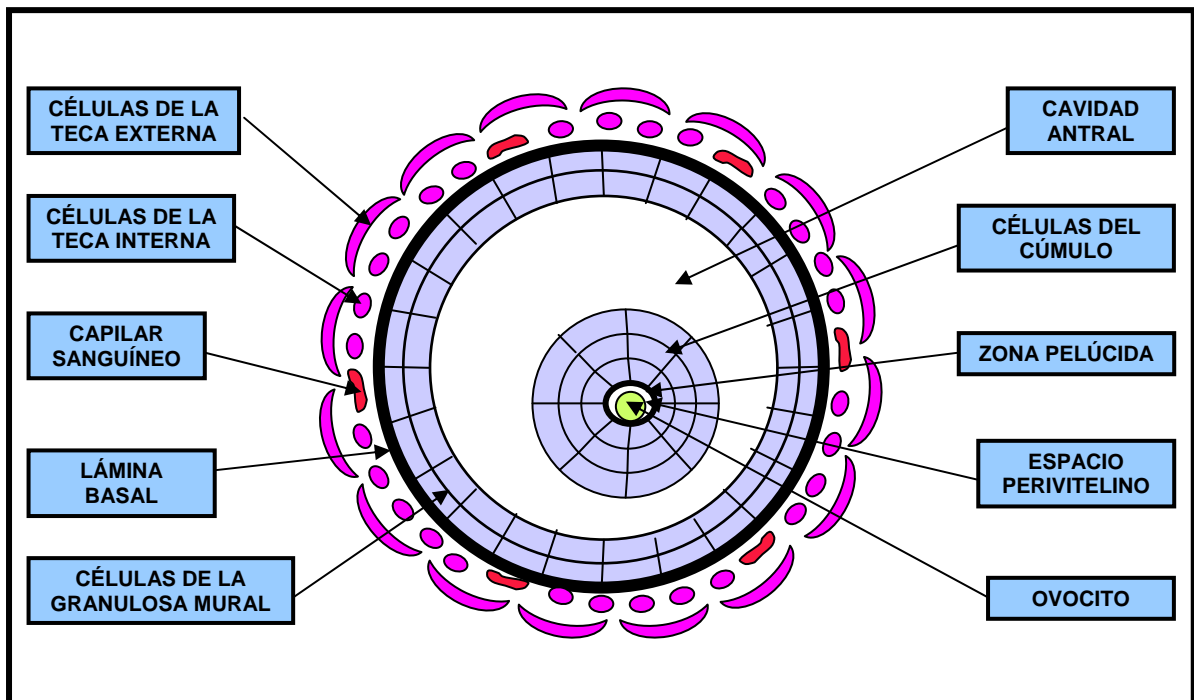


Figura. 2: Componentes de un folículo antral

### 1.6. Selección folicular.

Se cree que en algún momento entorno al estadio terciario/antral, un folículo (en las especies monoovuladoras) y varios (en las especies poliovuladoras) dentro de la cohorte reclutada, es o son seleccionados para completar la foliculogénesis hasta la ovulación y luteogénesis.

Los mecanismos bioquímicos y moleculares subyacentes al proceso de selección folicular continúan siendo un enigma, sobretodo en las especies poliovuladoras (McGee y Hsueh, 2000).

Los grandes folículos antrales contienen más células de la granulosa y por tanto, mayor cantidad de FSHR y mayor capacidad para producir inhibina, que a su vez, bloquea la secreción de FSH y LH por parte de la hipófisis. Las teorías sugieren que el folículo seleccionado permanece sensible a FSH (Xu y cols., 1995) mientras que los folículos hermanos no seleccionados no son sensibles porque tienen menos FSHR disponibles (diZerega y Hodgen, 1981). Esta circunstancia, favorece la

apoptosis de las células de la granulosa que conduce en último término a la atresia de los folículos no seleccionados. Los mecanismos básicos para la selección folicular en especies poliovuladoras son similares, la razón por la que son varios los folículos seleccionados se cree que es la menor secreción de inhibina (McGee y Hsueh, 2000).

A medida que el folículo seleccionado crece, su antro se va llenando de líquido folicular y, tanto las células de la teca como las de la granulosa, proliferan.

Llega un momento en el desarrollo antral avanzado, en el que la producción de estradiol por parte del folículo seleccionado es marcadamente elevado y éste en el suero ejerce una retroalimentación positiva en la secreción de gonadotropinas. El folículo seleccionado, además, secreta activina que a su vez estimula la secreción de FSH. El aumento en la FSH y la LH durante la fase folicular tardía no puede rescatar los folículos no seleccionados moribundos (atrésicos) pero permite lo siguiente:

- (1) Un mayor crecimiento y diferenciación de los folículos previamente reclutados (más jóvenes).
- (2) Un aumento significativo en la esteroidogénesis en el folículo seleccionado.
- (3) La luteinización inicial del folículo seleccionado. La dinámica de retroalimentación entre el folículo seleccionado y el eje hipotálamo-hipófisis continúa y culmina con el pico de gonadotropinas preovulatorio que estimula la ovulación.

## 1.7 Ovulación y fase lútea.

La ovulación es un proceso dependiente del pico de gonadotropinas. Las gonadotropinas estimulan la diferenciación final de las células de gran parte del folículo preovulatorio donde éstas pasan de producir casi exclusivamente estradiol a producir tanto estradiol como progesterona (luteinización).

Tras la ovulación, los remanentes de lo que era el folículo preovulatorio seleccionado (células de la granulosa y células de la teca) son estimulados por la LH para diferenciarse a cuerpo lúteo. Éste es esencial para permitir los estadios iniciales del embarazo. Se cree que el ovocito produce un factor anti-luteinizante que previene la diferenciación terminal (luteinización) antes de tiempo (El-Fouly y cols., 1970; Nekola y Nalvandov, 1971). Esta idea viene avalada por el hecho de que los ovocitos suprimen la producción de progesterona antes del pico de LH.

En ausencia del ovocito, la FSH estimula la producción de progesterona en las células del cúmulo procedentes de folículos antrales, no obstante, esta producción es suprimida por factores secretados por los propios ovocitos (Vanderhyden y cols., 1993; Coskun y cols. 1995; Vanderhyden y Tonary, 1995; Li y cols., 2000). Además de la supresión de progesterona, los ovocitos de ratón promueven la producción de estrógenos. Estas dos acciones de los ovocitos en la

esteroidogénesis parecen ser independientes y ocurren a raíz de la estimulación de la síntesis de AMPc por parte de la FSH (Vanderhyden y Tonary, 1995).

El factor que suprime la producción de progesterona se produce en ovocitos en todos los estadios testados, desde los folículos preantrales a los ya ovulados. En cambio, la diferenciación inducida por gonadotropinas en las células del cúmulo, hace que estas células sean refractarias a los factores derivados del ovocito (Vanderhyden y Macdonald, 1998). Por tanto, aunque los factores ovocitarios pueden evitar la luteinización precoz, una vez iniciada, estos serían superfluos.

La identidad de estos factores reguladores de la esteroidogénesis es desconocida, aunque se sabe que tienen bajo peso molecular y que son estables al calor (Vanderhyden, 1996) por lo que no se cree que sean el GDF9 ni el BMP15.

Las gonadotropinas promueven la producción de ácido hialurónico por parte de las células del cúmulo, un glicosaminglicano no sulfatado que se une a ellas, y se expande por los espacios entre células, embebiéndolas en una matriz mucilaginosa. La inhibición de la síntesis de ácido hialurónico o la unión a las células del cúmulo *in vivo*, disminuye la tasa de ovulación (Chen y cols., 1993; Hess y cols., 1999). Cuando los ovocitos adquieren la competencia meiótica (estadio antral) secretan el factor que permite la expansión del cúmulo (CEEF), que posibilita la respuesta de las células de la granulosa a FSH para producir ácido hialurónico. La ovocitectomía en complejos ovocito-células del cúmulo de folículos antrales evita la expansión del cúmulo en ratón, en cambio, no lo evita en rata, cerdo y vaca (Prochazka y cols., 1991; Vanderhyden, 1993; Ralph y cols., 1995). Estas especies producen CEEF pero parece que es innecesario para promover la expansión. Presumiblemente, el CEEF de rata, cerdo y vaca se necesita para promover alguna otra función distinta de la producción de ácido hialurónico en las células de la granulosa. De hecho, los ovocitos de cerdo secretan un factor que promueve la unión del ácido hialurónico al complejo (Nagyova y cols., 2000). Es más, las células del cúmulo fabrican un factor con actividad similar a la del CEEF producido por el ovocito pero no se ha determinado si es el mismo que promueve la expansión en complejos ovocitectomizados estimulados por FSH (Prochazka et al., 1998).

Por otra parte, se ha visto que el GDF9 recombinante estimula la expansión en complejos ovocitectomizados e induce la expresión de la sintasa 2 de hialuronano (Has2) en células de la granulosa no estimuladas por FSH (Elvin y cols., 1999a). Tanto el CEEF como el GDF9, podrían ser la misma molécula, aunque de ser así, no está claro porque el GDF9 que se expresa desde estadios anteriores, no induce antes la expresión de Has2. En todo este proceso, puede que haya otros factores que medien la respuesta de GDF9 antes o después del pico de gonadotropinas..

Los ovocitos afectan a las funciones de las células de la granulosa de forma esencial para la ovulación, promoviendo la producción de prostaglandinas y la expansión del cúmulo.

La producción de las prostaglandinas es necesaria para una ovulación normal, por lo que el ovocito favorece la expresión del gen de la sintasa de endoperóxidos de prostaglandina 2 (Ptgs2 o Cox2). El patrón de expresión de prostaglandinas en las células de la granulosa murales en folículos preovulatorios, parece multifásico tras

el pico de gonadotropinas, primero aumentan, luego descienden y de nuevo aumentan (Joyce y cols., 2001). In vitro, el segundo aumento no se ha observado (Joyce y cols., 2001), por lo que parece que este patrón de expresión complejo en el período preovulatorio está orquestado por factores no ovocitarios, posiblemente derivados de la teca aunque las concentraciones son incrementadas por los ovocitos.

El GDF9 recombinante estimula in vitro, tanto la expresión de Ptgs2 en células de la granulosa (Elvin y cols., 1999a) como también la de Ptgerep2, el receptor EP2 de PGE2 (Elvin y cols., 2000a), con lo que podemos decir que, GDF9 induce la expresión de Has2, Ptgs2 y Ptgerep2 en las células del cúmulo antes del pico de LH y además promueve la ovulación normal, es clave en la expresión del fenotipo de las células del cúmulo en el periodo periovulatorio.

Entre los múltiples papeles que ejercen los ovocitos, esta también la participación en el desensamblaje de los complejos ovocito-células del cúmulo, al suprimir antes del pico de LH la activación del activador del plasminógeno de uroquinasa (uPA o Plau). Este enzima es una proteasa de serina que participa en el remodelado tisular (Canipari y cols., 1995). Tras la ovulación, este enzima participa en la degradación de la matriz del cúmulo ya que estas, se vuelven insensibles a la inhibición de la expresión del uPa (D'Alessandris y cols., 2001).

## 2. MOLÉCULAS QUE AFECTAN AL DESARROLLO FOLICULAR Y OVOCITARIO.

### 2.1 Hormonas sexuales esteroideas.

Las hormonas sexuales esteroideas, son sintetizadas en el ovario como consecuencia de la estimulación con gonadotropinas hipofisarias. Se sintetizan a partir del colesterol y tienen, por tanto, naturaleza lipídica. Esto permite que difundan a través de la membrana, y se unan a su receptor citoplasmático formando un complejo con él, así alcanzan el núcleo donde activan o reprimen la transcripción de ciertos genes.

. Existen tres grupos básicos de hormonas sexuales esteroideas:

#### 2.1.1 Progestágenos o progestinas.

El progestágeno principal es la progesterona, cuyas funciones principales son la ovulación, la implantación y el mantenimiento del embarazo (Graham y Clarke, 1997).

El receptor de progesterona (PR), se ha localizado inmunohistoquímicamente en las células de la teca de folículos antrales pequeños y en células de la granulosa de folículos preovulatorios que han sido expuestos a LH o gonadotropina coriónica

humana (hCG), o bien, que se encuentran fase de luteinización tanto en primate como en conejo (Hild-Petito y cols., 1988; Iwai y cols., 1991).

Existen dos isoformas de PR PR-A y PR-B (Spelsberg y cols., 1972; Kastner y cols 1990) que provienen del mismo gen. Cada isoforma posee diferentes funciones, ya que en respuesta a la progesterona actúan sobre distintos grupos de genes en función del tipo celular y del promotor al que se unan (Kastner y cols., 1990; Vegeto y cols., 1993; Tora y cols., 1988; Meyer y cols., 1992). En rata, se ha demostrado experimentalmente *in vitro* que la isoforma PR-A es la más abundante (Natraj y Richards, 1993). También se ha podido observar tanto *in vivo* (Park y Mayo, 1991) como *in vitro* (Iwai y cols., 1991; Natraj y Richards, 1993) que en las células de la granulosa la LH y la hCG inducen la expresión del ARNm de PR.

Las progestinas poseen mecanismos retroalimentación positiva, aumentando la producción de progesterona y de otras progestinas estimuladas por gonadotropinas (Ruiz de Galarreta y cols., 1985; Fanjul y cols., 1983). A su vez, la progesterona favorece la sensibilidad a FSH provocando el aumento de la concentración de AMPc en células de la granulosa de rata (Goff y cols., 1979). Otros estudios en rata muestran que inhibe la producción de estradiol estimulada por la FSH en células de la granulosa, (Schreiber y cols., 1980, 1981; Fortune y Vincent, 1983), la transición de folículo primordial a folículo primario exclusivamente en la ola de reclutamiento inicial (Kezele y Skinner, 2003), y, se ha descrito que inhibe el ensamblaje de los folículos primordiales (Kezele y Skinner, 2003).

Las evidencias muestran que también inhibe la mitosis dependiente de insulina en células de la granulosa (Luciano y Peluso, 1995; Peluso y cols., 1995), la apoptosis en células de la granulosa grandes aisladas de ovario inmaduro de rata (Peluso y Pappalardo, 1994) y la apoptosis ovocitaria necesaria para el ensamblaje de los folículos primordiales (Kezele y Skinner, 2003). Se ha propuesto que algunas acciones de la progesterona como la inhibición de la apoptosis y de la mitosis dependiente de insulina, sean mediadas por mecanismos no genómicos (Peluso, 2003; Bramley, 2003). De hecho, se ha identificado una proteína de unión a progesterona (P<sub>4</sub>BP) de 60 kDa en el ovario y en lisados de células de la granulosa (Peluso y Pappalardo, 1998) y receptores de membrana en los cuerpos lúteos de rata (Cai y Stocco, 2005).

Tanto en rata como en ratón la inhibición de la síntesis de progesterona, bloquea la ovulación inducida por la LH (Lipner y Greep, 1971; Loutradis y cols., 1991; Tanaka y cols., 1992; Uilenbroek y cols., 1992). Es posible que esto sea debido a que la progesterona aumenta la producción de enzimas proteolíticos importantes para la ruptura de los folículos en la ovulación (Iwamasa y cols., 1992) y hace crecer la producción endometrial de relaxina (Yki-Jarvinen y cols., 1985) que, a su vez, estimula la liberación de proteasas por parte de las células de la granulosa (Too y cols., 1984). En los estudios con ratones knockout para PR, se observa la inhibición de dos metaloproteinasas, ADAMTS-1 y cathepsina-1. Estas enzimas parecen ser necesarias para la ovulación en las células de la granulosa de folículos anovulatorios (Robker y cols., 2000).

En cuanto al papel del PR en la formación del cuerpo lúteo, existen estudios contradictorios. El desarrollo de *knockouts* para PR-A y para PR-B ha revelado que

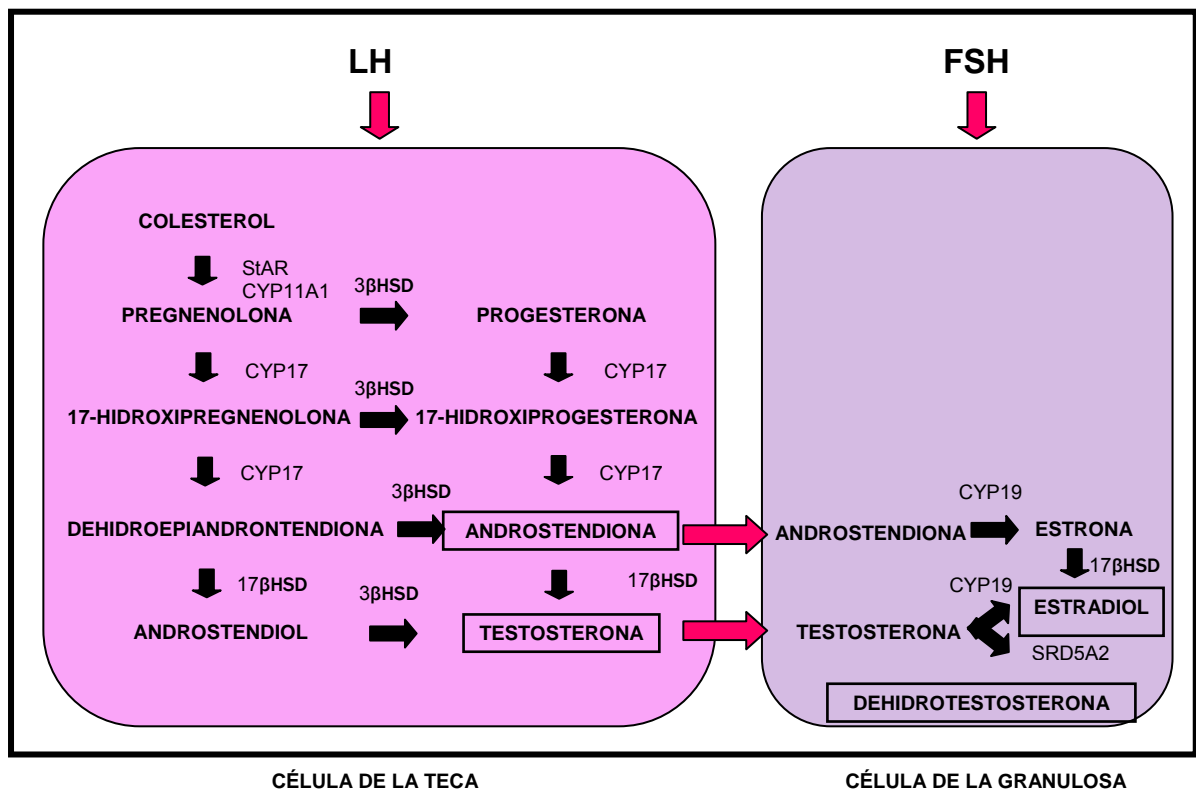
PR-A es necesario para la ovulación mientras que PR-B no lo es (Mulac-Jericevic y cols., 2000; Mulac-Jericevic y cols., 2003).

### 2.1.2 Andrógenos.

Los andrógenos, principalmente la androstendiona y la testosterona, son producidos en las células de la teca en respuesta a la LH.

Uno de los papeles más importantes de los andrógenos en el ovario es la síntesis de estrógenos sirviendo como sustratos para la aromatasa de P450 que media la conversión a estrógenos en las células de la granulosa (Dorrington y cols., 1975).

Los andrógenos actúan a través de sus receptores (AR), localizados en las células de la granulosa (Schreiber y Ross, 1976; Iría y cols., 1994; Tetsuka y cols., 1995), en células humanas de la teca (Horie y cols., 1992) y en ovocitos de rata, cerdo y ratón (Szoltys y Slomczynska, 2000; Cárdenas y cols., 2002; Gill y cols., 2004).



**Figura. 3:** Biosíntesis ovárica de esteroides. StAR, proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, CYP11A1, enzima de escisión de las cadenas laterales de colesterol, CYP17, 17 $\alpha$ -hidroxilasa, CYP19, aromatasa, 3 $\beta$ HSD, 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 17 $\beta$ HSD, 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y SRD5A2, 5 $\alpha$ -reductasa de esteroides,

Las células diana predominantes son las células de la granulosa, donde se sabe que inician distintas respuestas en función del estadio del desarrollo y de la

especie. Durante el desarrollo preovulatorio tardío, AR disminuye en la mayor parte de los animales excepto en el ser humano (Hillier y Tetsuka, 1997).

La expresión de AR podría verse influida por factores expresados en el ovocito, como es el caso de los folículos grandes de rata donde la expresión de la proteína disminuye en forma de gradiente centrífugo hacia las capas externas del folículo (Tetsuka y cols., 1995). En ovejas, el tratamiento prenatal con andrógenos provoca un aumento del número de folículos reclutados (Steckler y cols., 2005). En ratón, estudios similares con folículos preantrales (Wang y cols., 2001) y antrales (Murray y cols., 1998) obtuvieron también la expansión de las células de la granulosa. En otras especies como los primates o el cerdo se ha demostrado también que los andrógenos estimulan el desarrollo folicular. En esta última especie, en células de la granulosa se ha visto que los andrógenos potencian los efectos mitogénicos de factores ovocitarios, probablemente de GDF9 (Hickey y cols., 2005).

Los andrógenos también favorecen la diferenciación de las células de la granulosa, estimulando la expresión del ARNm del FSHR en folículos preovulatorios de cerdo (Cárdenas y cols., 2002) y en folículos primarios de primate (Weil y cols., 1999). De esta forma, las células de la granulosa responden mejor a FSH y aumenta la síntesis de progestinas (Nimrod, 1977; Hillier y cols., 1977; Hillier y De Zwart, 1981).

Se ha descrito que en primates, otros ARNm como el de IGF-I y de su receptor aumentan con la exposición a andrógenos (Vendola y cols., 1999a; Vendola y cols., 1999b), por lo que si unimos esto a la amplia distribución de estos ARNm de IGF-I y su receptor tanto en células de la granulosa, células de la teca, ovocitos y células intersticiales,, esto nos sugiere un amplio rango de funciones para los andrógenos en el ovario.

Los andrógenos inhiben la expresión del receptor de LH estimulada por FSH en las células de la granulosa de rata (Farookhi, 1980; Jia y cols., 1985) y favoreciendo su apoptosis (Billig y cols., 1993). Por el contrario en el mono *rhesus* se ha visto que sus efectos en la apoptosis de las células de la granulosa es muy reducido (Balén, 2004). Su papel en la apoptosis puede verse reflejado en que los andrógenos impiden el desarrollo folicular favoreciendo la atresia folicular en ratas inmaduras tratadas con PMSG (Bangel y cols., 1982; Conway y cols., 1990) y en ratas inmaduras hipofisectomizadas tratadas con estrógenos (Hillier y Ross, 1979).

En cuanto a su implicación en los mecanismos de fertilidad: Los estudios en ratones feminizados con testículos (ratones Tmf), que no poseen un receptor de andrógenos funcional, indican que los RA no son esenciales para la fertilidad aunque estos individuos son subfértiles y se reduce la duración de la vida reproductiva (Lyon y Glenister, 1980). Los ratones *knockout* condicionales hembra para el RA, tienen ciclos estrales más largos y reducida fertilidad (menos camadas y menos numerosas). Los folículos antrales tienen menos células de la granulosa y menos cuerpos lúteos (Hu y cols., 2004).



### 2.1.3 Estrógenos.

Los folículos comienzan a sintetizar estrógenos en estadio preantral tardío, cuando ya poseen células de la teca con receptores para LH y células de la granulosa con receptores para la FSH (Carson y cols., 1981). A partir de etapa antral temprana las células tecales sintetizan andrógenos aromatizables que son empleados por las células de la granulosa para transformarlos en estrógenos.

En los folículos preovulatorios se registran los niveles más elevados de estradiol, principalmente porque tienen un mayor número de células de la granulosa, y por tanto, mayor capacidad para aromatizar andrógenos (Hillier, 1981; McNatty, 1982).

Existen dos formas distintas de receptores de estrógenos (ER), ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Green y cols., 1986; Green y cols., 1986; Kuiper y cols., 1996; Chu y Fuller, 1997; Petersen y cols., 1998), siendo el segundo la isoforma mayoritaria en el ovario (Byers y cols., 1997; Drummond y cols., 1999) Se han identificado cinco variantes de corte y empalme alternativo de ER $\beta$  en el ser humano cuyos ARNm se expresan en el ovario. El significado funcional de estas variantes sigue siendo desconocido. Durante el desarrollo posnatal, la expresión del ARNm de ER $\beta$  va aumentando a medida que proliferan las células de la granulosa. En cambio, el ARNm de ER $\alpha$  permanece constante (Drummond y cols., 1999).

Estudios recientes en los que se han empleado agonistas de los receptores de estrógenos isotipo-selectivos, muestran que ER $\alpha$  y ER $\beta$  tienen distintos papeles en la reproducción femenina (Hegele-Hartung, 2004): ER $\alpha$  inhibe la ovulación probablemente ejerciendo su acción en el eje hipotálamo-hipófisis y el crecimiento uterino. ER $\beta$ , en cambio, estimula el crecimiento folicular, provoca el descenso del número de folículos atrésicos, induce la expresión de genes específicos y aumenta la tasa de ovulación.

El estrógeno es un potente agente mitógeno de las células de la granulosa de roedor in vitro, pero, in vivo carece de esa capacidad. Esto podría ser debido a la presencia de factores de crecimiento intrafoliculares, algunos de origen tecal, que podrían estar involucrados en las acciones mitogénicas del estrógeno (Carson y cols., 1989). Se ha visto, que una combinación de estrógenos y FSH o andrógenos (quizás aromatizados in vitro a estrógenos) y FSH, puede estimular la proliferación de las células de la granulosa in vitro y este efecto es amplificado por la insulina o IGF-I (Bley y cols., 1997). No está claro qué genes induce el estrógeno en estas células pero, la ciclina D<sub>2</sub> (Wu y cols., 1993), la inhibina  $\alpha$  y la inhibina  $\beta$ B (Charpentier y cols., 2000) son posibles candidatos. Los estrógenos también facilitan la diferenciación de las células de la granulosa, induciendo los sistemas de receptores para FSH, LH y prolactina, y mecanismos corriente abajo a los receptores (Drummond, 2006).

El estradiol, junto con la FSH y la LH estimula la acumulación de AMPc (Richards y cols., 1979) y aumenta el número de lugares de unión a éste, en las células de la granulosa (Richards y Rolfes, 1980). Ahora existe la evidencia de que la FSH y los estrógenos aumentan la transcripción de ciertos miembros de la familia de factores de transcripción "forkhead" (FOX) entre ellos, el homólogo "forkhead" de

rabdomiosarcoma (FKHR) mediante la vía IGF-I/quinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K)/quinasa 1 dependiente fosfatidilinositol (PDK1) en las células de la granulosa (Richards y cols., 2002), aunque su función es aun desconocida parece relacionada con la proliferación.

Se han obtenido tres *knockout* para el receptor de estrógenos: ERKO que carece de ER $\alpha$ , BERKO que carece de ER $\beta$ , y por último  $\alpha\beta$ ERKO, el doble knockout que carece de las dos clases de receptores. Los dos primeros tienen capacidad para transducir la señal mediada por los estrógenos a través del otro subtipo de receptores.

ERKO tiene niveles elevados de LH en suero (Couse y Korach, 1999; Schomberg y cols., 1999). El tratamiento de las hembras prepúberes con gonadotropinas permite que ovulen aunque la tasa de ovulación es menor que en el fenotipo salvaje (Rosenfeld y cols., 2000). Parece que la foliculogénesis, ovulación y formación del cuerpo lúteo pueden ocurrir en ausencia de ER $\alpha$  aunque de forma subóptima.

BERKO tiene niveles séricos normales de gonadotropinas. Parece que ER $\beta$  tiene un papel esencial en la diferenciación de las células de la granulosa inducida por gonadotropinas ya que, en su ausencia la maduración folicular y la ovulación se ven impedidas. También se sobreexpresa AR en folículos antrales tardíos y atrésicos (Wu y cols., 1993), lo cual, favorece la atresia prematura de los folículos.

$\alpha\beta$ ERKO tiene en los ovarios unas estructuras similares a túbulos que contienen células similares a las de Sertoli. Los pocos ovocitos que posee degeneran. Los niveles de LH en sangre son elevados. Este fenotipo indica que ambos tipos de ER tienen un papel en el mantenimiento de la fertilidad, aunque ER $\beta$  es esencial para el desarrollo y maduración folicular.

En experimentación, también se han empleado ratones mutantes con aromatasa no funcional (Fisher y cols., 1998) y ratones ARKO (Fisher y cols., 1998; Britt y cols., 2000; Britt y cols., 2001). Estos últimos, tienen niveles indetectables de aromatasa y estrógenos pero altos niveles de gonadotropinas y testosterona en suero. Sus ovarios son histológicamente similares a los de  $\alpha\beta$ ERKO aunque en el tejido intersticial se observan además, células similares a las de Leydig. Esto indica que las células gonadales tienen cierta plasticidad. Por otro lado, se ha localizado la expresión de genes masculinos como Sox9 y AMH, lo que indica que el estrógeno es necesario para mantener el fenotipo femenino de las células somáticas ováricas.

El fenotipo de  $\alpha\beta$ ERKO y ARKO no es exactamente el mismo. Los ratones  $\alpha\beta$ ERKO no están completamente libres de estrógenos, de hecho se cree que existe otro tipo de ER como el ER $\gamma$  identificado en peces (Hawkins y cols., 2000). Otra explicación podría ser que el estrógeno tuviese capacidad de actuar de forma no genómica (Drummond, 2006). La presencia de células similares a las testiculares de Sertoli y de Leydig en ratones ARKO con una dieta libre de fitoestrógenos, indica que estas células sólo se desarrollan en ausencia completa de estrógenos, y, por tanto, que el estrógeno es necesario para una foliculogénesis normal de estadio antral en adelante. No obstante, el papel del ovocito en la trans/rediferenciación de las células de la granulosa no está claro.

## 2.2 Otras hormonas.

### 2.2.1 Hormona del crecimiento o somatotropina (GH).

La GH aumenta la concentración periférica de insulina y/o IGF-I alterando el desarrollo folicular en novillas (Gong y cols., 1997). Por tanto, la GH actúa en el ovario a través de otras hormonas metabólicas como insulina e IGF-I.

### 2.2.2 Insulina.

*In vivo*, la insulina varía a lo largo del ciclo estral, haciéndose máxima durante el periodo preovulatorio (McCann y Hansel, 1986; Armstrong y cols., 2001). Además, se ha observado en varias especies que los estrógenos aumentan la expresión del ARNm de la insulina y su secreción pancreática (Morimoto y cols., 2001). Armstrong y cols. (2002) han correlacionado el aumento de la concentración de insulina con el incremento de la producción de estradiol en folículos antrales tempranos *in vitro*. Así mismo, otros estudios *in vitro*, han demostrado que la insulina no afecta ni al desarrollo folicular ni a la maduración ovocitaria (Eppig y cols., 1998<sup>a</sup>; Demeestere y cols., 2004; Mitchell y cols.; 2002). Eppig y cols. (1998a) llegaron a la conclusión de que la combinación de insulina con FSH en el medio de cultivo tenía un efecto deletéreo mientras que Liu y cols. (2002) observaron que estimulaba la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, así como la adquisición de la competencia meiótica en folículos preantrales. Estos resultados antagónicos en cuanto al papel de la insulina durante el cultivo folicular, podrían ser debidos a la presencia de otros factores de supervivencia como selenio o transferrina o diferencias interespecíficas.

### 2.2.3 Sistema IGF.

IGF-I es producido principalmente por el hígado y llega al ovario a través de la circulación sistémica, mientras que su forma IGF-II intraovárica es producida principalmente por el propio ovario.

La producción y secreción de IGF-I está regulada por GH (Etherton y Barman, 1998) y por una serie de hormonas que interactúan con GH, entre ellas la insulina (Molento y cols., 2002) y el estradiol (Grigsby y Trenkle, 1986) haciendo aumentar los niveles séricos de IGF-I (Simpson y cols., 1997).

La adición de IGF y FSH estimula el crecimiento de folículos preantrales en varias especies (Zhou y cols., 1991; Gutiérrez y cols., 2000; Louhio y cols., 2000; Zhao y cols., 2001b). En rata, IGF-I añadido al cultivo de folículos preantrales estimula el crecimiento, promueve la supervivencia y en ratón, además, estimula la esteroidogénesis.

La biodisponibilidad y tasa de aclaramiento de las proteínas IGF depende de las proteínas de unión a IGF (IGFBPs) (Thissen y cols., 1994). Se cree que en vaca un

aumento en la ingesta hace disminuir los ARNm de IGFBP-2 e IGFBP-4 en folículos antrales pequeños, lo cual hace aumentar la biodisponibilidad del IGF-II producido localmente en el folículo y el IGF-I derivado sistémicamente (Webb y cols., 2003; Armstrong y cols., 2003). Se cree que las IGFBPs participan en el proceso de dominancia y atresia folicular (Fortune y cols., 2004) de forma que el ARNm de IGFBP-4 aumenta durante la atresia y disminuye en presencia de FSH en rata *in vitro*.

La afinidad de las IGFBPs es modulada por fosforilación y proteólisis. La proteasa de IGFBP-4, la proteína A asociada al embarazo (PAPP-A), se expresa en células de la granulosa de folículos seleccionados estimulada por gonadotropinas (Hourvitz y cols., 2002) y es inhibida por BMP-15 (Matsui y cols., 2004).

## 2.2.4 Leptina.

Es la hormona del gen de la obesidad producida por los adipositos y para la cual hay receptores en las células de la granulosa, en las células de la teca y en las células intersticiales.

La leptina, inhibe la producción de esteroides y la proliferación celular durante el crecimiento folicular dependiente de FSH (Kikuchi y cols., 2001). En concreto, inhibe la síntesis de estradiol en las células de la granulosa y la de la androstendiona en las células de la teca (Armstrong y cols., 2003) bloqueando la acción de la insulina (Spicer y Francisco, 1997; Spicer y cols., 2001).

En cultivo se ha visto que bloquea el efecto de la GH y de IGF-I en la proliferación de las células de la granulosa de folículos preantrales y la esteroidogénesis en presencia de IGF-I y FSH (Zachow y Magoffin, 1997; Agarwal y cols., 1999).

## 2.2.5 3, 3', 5-triyodotironina (T<sub>3</sub>):

La disfunción tiroidea está frecuentemente involucrada en la infertilidad. En presencia de FSH, la T<sub>3</sub> inhibe la habilidad del folículo preantral en cultivo para formar una cavidad antral, reduce la liberación de estradiol y afecta a la competencia meiótica ovocitaria (Cecconi y cols., 2004).

## 2.3 Factores locales.

### 2.3.1 Hormona antimulleriana (AMH) o sustancia inhibidora mulleriana (MIS).

Esta hormona inhibe el reclutamiento cíclico de los folículos preantrales, evitando el crecimiento de los folículos primordiales durmientes (Durlinger y cols., 2002b) y, por tanto el agotamiento prematuro de la reserva ovárica (Durlinger y cols., 1999). Su expresión es muy variable entre las diferentes especies animales, así en ratón se expresa en las células de la granulosa desde estadio primario hasta estadio antral

temprano, sin embargo en humanos hasta el estadio antral medio y en especie ovinas hasta el preovulatorio (Durlinger y cols., 2002 ab, Visser y temen, 2005).

La expresión del receptor de AMH de tipo II no se conoce pero parece más probable que se localice en las (pre)células de la granulosa que en el ovocito.

En los experimentos *in vitro* se han obtenido resultados contradictorios en cuanto al efecto de la AMH sobre la FSH. En los cultivos de folículos preantrales de ratón, se ha hallado que la AMH suprime los efectos estimuladores de la FSH (Durlinger y cols., 2001). En cambio, en folículos preantrales de rata se ha observado que la AMH potencia el efecto estimulador de la FSH (McGee y cols., 2001). Estos resultados podrían ser explicados por factores séricos que afectasen a la acción de la AMH.

AMH recombinante inhibe el crecimiento folicular en ratón en la fase dependiente de FSH (Durlinger y cols., 2001) y en la fase no dependiente pero sensible a FSH, por tanto, podría tener un papel negativo en el reclutamiento cíclico de folículos y en el proceso de selección folicular (Durlinger y cols., 2002ab; Visser y Temen, 2005).

### 2.3.2 Sistema inhibina-activina.

**La inhibina** es un heterodímero formado por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ , pudiendo ser ésta última de dos tipos:  $\beta A$  o  $\beta B$ . Existen dos inhibinas distintas, la inhibina A compuesta por la subunidad  $\alpha$  y por la subunidad  $\beta A$  y la inhibina B formada por la subunidad  $\alpha$  y por la subunidad  $\beta B$ .

**La activina** es un homodímero formado por dos subunidades  $\beta$  de la inhibina, de manera que existen tres activinas diferentes: la activina A formada por dos subunidades  $\beta A$ , la activina B formada por dos subunidades  $\beta B$  y la activina AB, compuesta por una subunidad  $\beta A$  y otra subunidad  $\beta B$ .

La expresión de las subunidades de activina  $\beta A$  y  $\beta B$ , de los receptores de activina tipo I y tipo II y de folistatina (proteína de unión a activina) se ha detectado en folículos desde estadio primario o secundario, según la especie (Rabinovici, 1991; McNatty y cols., 2000; Pangas y cols., 2002; Drummond y cols., 2002). Las subunidades de activina  $\beta A$  y  $\beta B$  y la folistatina se expresan principalmente en las células de la granulosa mientras que los receptores de activina tipo I y tipo II se expresan en las células de la teca, de la granulosa y el ovocito. Hay muy poca información acerca de las potenciales funciones individuales y las bioactividades de las tres isoformas activas, la mayor parte de los experimentos se han limitado a estudiar la activina A.

Los folículos preantrales de roedor secretan activina A (Smitz y Cortvrindt, 1998) y ésta mejora el crecimiento folicular y la proliferación de las células de la granulosa (Li y cols., 1995; Smitz y cols., 1998; Liu y cols., 1999; Zhao y cols., 2001). Los ratones *knockout* para la subunidad  $\alpha$  de la inhibina, sobreproducen activina, lo cual parece explicar la proliferación descontrolada de las células de la granulosa y el desarrollo de un tumor ovárico observado frecuentemente en estos animales (Matzuk y cols., 1992). En cambio, en mutantes deficientes para el receptor de

activina tipo IIB, el desarrollo folicular cesa en estadio antral temprano lo que sugiere que la activina promueve la proliferación/diferenciación de las células de la granulosa (Matzuk y cols., 1996).

Las células de la granulosa tienen la capacidad de sintetizar tanto inhibinas como activinas, desde etapas tempranas del desarrollo folicular (McNatty y cols., 2000; Montgomery y cols., 2001), aunque existe la evidencia de que los folículos más pequeños producen más activina que inhibina, mientras que los más grandes, secretan proporcionalmente más inhibina que activina (Schwall y cols., 1990; Yamoto y cols., 1992; Glister y cols., 2006).

En folículos preantrales pequeños de ratón la activina A inhibe el efecto estimulador de la FSH y de la GH (Mizunuma y cols., 1999). Según estos autores, la activina A es el factor secretado por los folículos secundarios responsables del mantenimiento de folículos preantrales pequeños en un estado durmiente. Sin embargo, Spears y cols. (2002) no identificaron este factor como factor inhibitorio secretado por los folículos dominantes en ratón. No obstante, la concentración de activina A aumenta de forma considerable con respecto a la de inhibina A y folistatina en los folículos antrales bovinos cuando alcanzan el tamaño en el que opera el mecanismo de selección folicular dependiente de AMH (Glister y cols., 2006). Hasta ahora, no hay datos acerca de las concentraciones de otros ligandos intrafoliculares que también están implicados en la regulación autocrina/paracrina de la función de las células de la granulosa y de las de la teca en folículos antrales. Sin embargo si se conoce que la activina A puede atenuar la producción de andrógenos dependiente de LH en las células de la teca de folículos antrales pequeños y medianos (Hsueh y cols., 1987; Hillier y Miro, 1993; Wrathall y Knight, 1995) y que reduce de la fragmentación de ADN debida a la apoptosis en folículos antrales (Chun y Hsueh, 1998).

La inhibina A producida en cantidades crecientes por los folículos antrales seleccionados que se aproximan a un estadio preovulatorio, puede superar la acción inhibitoria de la activina A, lo que conduce a una producción de andrógenos mayor (Hsueh y cols., 1987; Hillier y Miro, 1993; Wrathall y Knight, 1995; Campbell y Baird, 2001). De esta forma, las células de la granulosa son capaces de mantener un aporte suficiente de andrógenos tecaes requeridos para la síntesis aumentada de estrógenos durante la fase preovulatoria.

Las activinas también podrían tener un papel en el desarrollo ovocitario dentro del folículo antral en crecimiento. Las células del cúmulo que rodean al ovocito, expresan las tres subunidades de inhibina/activina ( $\alpha$ ,  $\beta$ A y  $\beta$ B) y folistatina (Roberts y cols., 1993; Sidis y cols., 1998; Izadyar y cols., 1998; Silva y cols., 2003), mientras que el ovocito expresa los receptores de tipo I y de tipo II para activinas (Cameron y cols., 1994; Izadyar y cols., 1998; Sidis y cols., 1998). Tanto en roedores como en primates, la activina A acelera la maduración ovocitaria (Sadatsuki y cols., 1993; Alak y cols., 1996, 1998) y en bovino, mejora la competencia del desarrollo ovocitario (Silva y Knight, 1998). En cambio, la inhibina A o su subunidad libre  $\alpha$  tiene un efecto negativo tanto en la maduración ovocitaria (O y cols., 1989) como en la competencia del desarrollo (Silva y cols., 1999).

Existe controversia acerca del posible papel autocrino de la inhibina en las células de la granulosa. Hay estudios *in vivo* con ovejas e *in vitro* con folículos bovinos en los que la adición de inhibina A produce un descenso en la secreción de estradiol (Campbell y Scaramuzi, 1996, Jiménez-Krassel y cols., 2003). En cambio, Campbell y Baird (2001) observaron el efecto contrario en células de la granulosa ovina y Hutchinson y cols., (1987) publicaron que la inhibina A bovina no afectaba a la producción de esteroides en células de la granulosa de rata.

Tras la ovulación y durante la formación del cuerpo lúteo, la expresión de las subunidades de inhibina/activina está inhibida en la mayoría de especies excepto en los primates, donde se mantiene la expresión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta A$  pero no  $\beta B$  (Yamoto y cols., 1991; Roberts y cols., 1993). En el ser humano, el cuerpo lúteo produce inhibina A, alcanzándose la concentración máxima hacia la mitad de la fase luteínica (Muttukrishna y cols., 1994).

La activina podría retrasar la luteinización y/o la atresia de las células de la granulosa y podría provocar un descenso en la producción basal y la inducida por hCG de progesterona en células de la granulosa-lúteas, tanto humanas como de mono (Rabinovici y cols., 1990; Brannian y cols., 1992; Di Simone y cols., 1994; Cataldo y cols., 1994). También se ha descrito como la hCG estimula la expresión de folistatina en las células lúteas de la granulosa (Tuuri y cols., 1994).

### 2.3.3 Kit y ligando Kit (KitL).

A KitL también se le conoce como factor de las células madres (SCF) y factor de crecimiento multipotente. Existen dos isoformas de KitL obtenidas por corte y empalme alternativos, que se expresan en las células de la granulosa. La isoforma KitL-1 posee una región de escisión proteolítica que la hace soluble, mientras que KitL-2, permanece unida a membrana al carecer de esa secuencia aminoacídica (Huang y cols., 1992).

Parece que la regulación de las dos isoformas es distinta ya que el cociente de sus concentraciones varía no sólo en función del tejido (Huang y cols., 1992), sino que también dentro del ovario varía con la edad (Manova y cols., 1993) y con el momento del ciclo ovulatorio (Ismael y cols., 1997). Estos cambios en la abundancia relativa de cada isoforma, podrían permitir distintas acciones dentro de cada fase del desarrollo. Se ha visto, que KitL provoca un aumento en los niveles del ARNm de KGF y HGF en las células de la teca y que éstos, junto con las gonadotropinas, incrementan la expresión de KitL (Skinner, 2005)

Los ratones mutantes que producen sólo KitL-1 son estériles por una deficiencia en las células germinales (Flanagan y cols., 1991), sin embargo, los que sólo producen KitL-2 son fértiles, lo que sugiere que esta última es la isoforma principal requerida para el desarrollo del ovocito (Thomas y Vanderhyden, 2005).

El receptor Kit, se expresa tanto en ovocitos, como también en células estromáticas intersticiales y células de la teca (Manova y cols., 1990; Kang y cols., 2003) aunque a niveles más bajos.

En ratón y oveja, que son las dos especies en las que más se ha estudiado la función ovárica, se ha visto que tanto el ligando como el receptor se expresan durante todo el proceso de formación gonadal y desarrollo folicular, excepto la fase temprana de la meiosis I, antes de la formación de los folículos primordiales (Driancourt y cols., 2000; Matsui y cols., 1990; Tisdall y cols., 1999).

En las gónadas fetales de ratón, se ha demostrado un efecto antiapoptótico de Kit/KitL en las células germinales primordiales, ovogonias y ovocitos (Driancourt y cols., 2000). El inicio del crecimiento de los folículos primordiales y su progresión a folículo primario parece que implica interacciones Kit-KitL en esta especie, (Parrot y Skinner, 1999; Yoshida y cols., 1997). Sin embargo, la mutación “steel panda” en el gen que codifica para KitL, provoca un fenotipo en el que existe un número normal de folículos primordiales y primarios aunque el desarrollo no prosigue más allá presumiblemente por la deficiencia de KitL (Huang y cols., 1993; Bedell y cols., 1995). Esto, sugiere que hay factores adicionales que compensan la falta de KitL durante la transición de folículo primordial a folículo primario.

El KitL producido por las células de la granulosa, actúa en el ovocito para estimular su crecimiento e iniciar su desarrollo (Parrot y Skinner, 1999; Kezele y Skinner, 2003), estimulando también el crecimiento de las células estromáticas y de la teca, y la esteroidogénesis en las células tecales aunque no lo hace en las estromáticas (Parrot y Skinner, 2000).

Existe una evidencia creciente de la importancia de la actividad Kit-KitL para el crecimiento ovocitario durante el desarrollo de los folículos preantrales, aunque existen estudios en los que se afirma lo contrario aunque se reconoce que promueve la supervivencia ovocitaria y la maduración citoplasmática (Reynaud y cols., 2000). Se ha observado, que en animales tratados con anticuerpos contra KitL hay crecimiento ovocitario aunque el desarrollo folicular se ve afectado (Yoshida y cols., 1997). Es muy posible que estos efectos en el desarrollo folicular sean mediados por las células intersticiales.

#### 2.3.4 Factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9):

GDF9 es un factor que se expresa en ovocitos de varias especies incluyendo ratón, vaca, oveja, rata y humano (McGrath y cols., 1995; Laitinen y cols., 1998; Aaltonen y cols., 1999; Bodensteiner y cols., 1999). En todas las especies estudiadas se expresa desde el estadio de folículo primordial hasta el momento de la ovulación, excepto en ratón que comienza en folículos primarios.

Se cree que tendría un papel autocrino en la regulación del desarrollo y maduración ovocitaria y/o funcionar como factor paracrino en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (Dong y cols., 1996; Elvin y cols., 1999).

Hasta ahora se ha dicho GDF9 estimula el crecimiento de los folículos primarios pero no afecta a la transición de folículo primordial a folículos primario, sino que promueve el reclutamiento inicial. Las evidencias recientes sugieren que si participa en la transición de folículo primordial a primario (Ethier y cols., 2005). En los ratones



*gdf9* -/- el desarrollo folicular cesa en estadio primario (Dong y cols., 1996) aunque el ovocito continúa creciendo de forma acelerada y su morfología es anormal (Carabatsos y cols., 1998).

En el ser humano, GDF9 recombinante, promueve el desarrollo de folículos primordiales en cultivo hasta estadio secundario y mejora la supervivencia del folículo (Hreinsson y cols., 2002).

Se ha visto que en las células de la granulosa aisladas tanto de folículos preantrales como antrales, GDF9 recombinante suprime la expresión de KitL pero cuando estas células se co-cultivan con ovocitos tanto de folículos preantrales como antrales, sólo los procedentes de folículos antrales son capaces de suprimir la expresión de KitL en cualquiera de los grupos de células de la granulosa (Joyce y cols., 2000). Por otro lado, los ratones nulos para GDF9 sobreproducen el mRNA de KitL (Elvin y cols., 1999b) pero además, tienen concentraciones de FSH mayores de lo normal (Dong y cols., 1996) y se ha visto, que la FSH sólo promueve la expresión de KitL en células de la granulosa preantrales pero no en las de folículos antrales (Joyce y cols., 1999).

A día de hoy no se sabe si el GDF9 sintetizado por ovocitos de folículos antrales suprime la expresión de KitL en las células del cúmulo y si KitL promueve el crecimiento ovocitario. Asumiendo que ambas cosas fueran ciertas se podría postular un bucle regulatorio entre el ovocito y las células de la granulosa que afecte al crecimiento ovocitario. Según este modelo, el KitL producido por las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales tempranos promovería el crecimiento ovocitario hasta que se alcanza el tamaño especie-específico. En este momento, GDF9 secretado por los ovocitos suprimiría la expresión de KitL en las células del cúmulo (Eppig, 2001). Lo que aun no sabemos es por qué el GDF9 producido por ovocitos de folículos preantrales no suprime la expresión de KitL.

La FSH estimula de forma marcada la expresión de KitL en células de la granulosa de folículos preantrales, aun así los ovocitos crecen en ausencia de FSH. Es mas, parece que los ovocitos crecen en animales tratados con anticuerpos contra KitL (Yoshida y cols., 1997).

### 2.3.5 Proteína morfogenética de hueso 15 (BMP15).

BMP15 es un homólogo de GDF9 específico del ovocito, al que también se le conoce como GDF9b. En ratón tiene un patrón de expresión similar al de GDF9 (Dube y cols., 1998; Jaatinen y cols., 1999; Elvin y cols., 2000; Otsuka y cols., 2000), aunque en otras especies se observa un patrón de expresión distinto al de GDF9, expresándose por primera vez en ovocitos de folículos primarios (Galloway y cols., 2000; Bodensteiner y cols., 1999; Aaltonen y cols., 1999).

Las ovejas homocigotas para una mutación inactivadora de *Bmp15*, inmunizadas contra GDF9 o BMP15 (Juengel y cols., 2002), tienen detenido el desarrollo folicular en estadio primario y, por tanto, no ovulan (Davis y cols., 1992; Galloway y cols., 2000), teniendo los ratones *knockout* para *Gdf9* tienen un fenotipo similar (Dong y cols., 1996). Sin embargo, el ratón *knockout* para *Bmp15* presenta un fenotipo

distinto (Yan y cols., 2001). En las ovejas heterocigotas para la mutación inactivadora del gen *Bmp15*, en las que supuestamente se produce la mitad de la cantidad normal de BMP15, ovulan un número mayor de folículos (Davis y cols., 2001), ocurriendo lo mismo para las heterocigotas para mutaciones en *Gdf9*, con lo que podemos concluir que los estudios con anticuerpos contra BMP15 y GDF9 muestran que ambos son necesarios para el desarrollo folicular normal y el control del número de folículos ovulados por ciclo estral en oveja (McNatty y cols., 2005).

Los mecanismos involucrados en el aumento del desarrollo folicular y ovulación debido a una supuesta hipo-producción de BMP15, no se conocen. Una explicación podría ser que el mecanismo de retroalimentación entre el ovario y la hipófisis se vean afectados por la expresión reducida de BMP15, lo que resultaría en un aumento de la señalización mediada por las gonadotropinas, y, por tanto, un aumento del desarrollo folicular (Galloway y cols., 2000). En ratón, es necesaria la sinergia de BMP15 y GDF9 para el desarrollo folicular y ovocitario normal, como muestran los experimentos realizados con el doble *knockout* (Yan y cols., 2001). En consecuencia, es posible que el papel de ambos sea similar en el desarrollo folicular temprano, pero BMP15 podría ser más importante en oveja que en ratón.

En roedores, BMP15 promueve la proliferación de las células de la granulosa *in vitro* (Hayashi y cols., 1999; Otsuka y cols., 2000; BIT y cols., 2000). En rata, BMP15 inhibe la producción de progesterona en células de la granulosa (Otsuka y cols., 2000) y la luteinización (Shimasaki y cols., 2004)

#### Interacciones entre KitL, GDF9 y BMP15 y FSH:

A pesar de que las funciones de KitL, GDF9 y BMP15 podrían ser distintas, está claro que hay interacciones significativas entre ellos (Thomas y cols., 2005; Joyce y cols., 2000; Otsuka y Shimasaki, 2002).

El GDF9 recombinante inhibe la expresión del ARNm de KitL en células de la granulosa preantrales (Joyce y cols., 2000), mientras que BMP15 promueve la expresión de KitL en células de la granulosa de folículos antrales tempranos de rata (Otsuka y Shimasaki, 2002). Por otro lado, se ha visto que FSH regula la expresión de BMP15 vía señalización Kit (Thomas y cols., 2005).

Los ovocitos de ovarios de ratón deficientes en *gdf9* crecen más de lo normal, sin embargo, no adquieren la competencia del desarrollo completa (Elvin y cols., 1999). Además, tienen niveles elevados de KitL-1 y -2, lo que sugiere que GDF9 regula su expresión. Los mecanismos de regulación de cada isoforma de KitL no se conocen, es probable que sean específicos de célula, ya que la hCG afecta a la expresión de las isoformas de KitL de distinta forma en células de la granulosa murales y del cúmulo (Ismail y cols., 1997).

La FSH inhibe la expresión de KitL en las células de la granulosa murinas de folículos preantrales (Joyce y cols., 1999) y antrales de pacientes sometidas a FIV (Laitinen y cols., 1995). La inhibición de la expresión de KitL-2 ocurre durante la formación de folículos antrales tempranos, coincidiendo con el cese del crecimiento ovocitario (Thomas y cols., 2005). En ratones tanto homocigotos como heterocigotos para una mutación inactivadora en el gen *FSHR*, disminuye el

crecimiento ovocitario además de la concentración de Kit, KitL y BMP15 (Yang y cols., 2003). Por tanto, si se bloquea la señalización inducida por la FSH, la comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa se ven afectadas y el desarrollo ovocitario cesa (Yang y cols., 2003).

### 2.3.6 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

Este factor, promueve la apoptosis en el desarrollo folicular *in vitro* (Chun y Hsueh, 1998) y suprime el efecto antiapoptótico de la FSH en folículos antrales tempranos de rata (Kaipia y cols., 1996).

### 2.3.7 Proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4).

Se ha localizado en células de la teca de rata de folículos primarios en adelante (Erickson y Shimasaki, 2003). A partir de la etapa de folículo secundario, BMP4 se expresa en una población de células de la teca interna mas externa y por tanto diferente de la población de células de la teca interna que expresan BMP7 (Erickson y Shimasaki, 2003).

El efecto de BMP-4 es aumentar el número de folículos preantrales en crecimiento en ovarios neonatales de rata en cultivo (Nilsson y Skinner, 2003). También se ha observado en folículos antrales de rata, que BMP4 atenúa la síntesis de progesterona inducida por FSH mientras que aumenta la secreción de estradiol, también inducida por FSH, sin afectar a la proliferación (Shimasaki y cols, 1999; Lee y cols., 2001). En células de la granulosa de vaca, BMP4 aumenta la secreción basal y también la inducida por IGF (pero no la inducida por FSH) de estradiol, inhibina A, activina A y folistatina, además de la proliferación celular, e, inhibe la secreción de progesterona (Glister y cols., 2004).

En células de la granulosa de ovino, BMP4 redujo la secreción de progesterona inducida por FSH, a la vez que disminuyó la expresión de Star y de P450scc (Pierre y cols., 2004). También se ha visto que BMP4 inhibe la actividad del factor de transcripción SF-1.

### 2.3.8 Proteína morfogenética de hueso 7 (BMP7).

Se expresa en las células de la teca de rata a partir de estadio primario (Erickson y Shimasaki, 2003), ejerce una acción paracrina favoreciendo la proliferación de las células de la granulosa y la transición de folículo primordial a primario (Lee y cols., 2004). Estimula la síntesis de ADN (efecto mitótico) en células de la granulosa de rata (Lee y cols., 2001) y se sabe que inhibe la apoptosis en muchos tejidos (Dudley y cols., 1995; Luo y cols., 1995), por lo que se cree que también lo hace en las células de la granulosa, promoviendo por tanto, la supervivencia folicular (Shimasaki y cols., 2004)

En folículos antrales de rata, BMP7 ejerce el mismo efecto que BMP-4 en cuanto a la síntesis de estrógenos dependiente de gonadotropinas (Shimasaki y cols, 1999; Lee y cols., 2001).

En células de la granulosa de bovino BMP7 aumenta la secreción basal y también la inducida por IGF (pero no la inducida por FSH) de estradiol, inhibina A, activina A y folistatina, además de la proliferación celular, e inhibe la secreción de progesterona (Glister y cols., 2004).

### 2.3.9 Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ).

Los receptores para EGF y para TGF- $\alpha$ , análogo de EGF, se expresan en el ovario y son regulados positivamente por las gonadotropinas (Fuginaga y cols., 1994). Sin embargo, tanto EGF como TGF- $\alpha$  han sido descritos como potentes inhibidores de la aromatización en células de la granulosa humanas y de ratón (Steinkampf y cols., 1988; Boland y Gosden, 1994).

La concentración fisiológica de EGF a la que se exponen los folículos de ratón es aproximadamente 1 ng/ml. Una concentración de 1 a 20 ng/ml en el medio de cultivo de folículos preantrales induce un descenso en la producción de estradiol proporcional a la concentración de EGF (Boland y Gosden, 1994). Concentraciones superiores a 5 ng/ml hacen que descienda el número de folículos que alcanzan el estadio antral.

El tratamiento de las células de la granulosa y de folículos preovulatorios con EGF, inhibe en un 40-60% la fragmentación del ADN por apoptosis en cultivo. En cambio, EGF no afecta a la supresión de la apoptosis en folículos preantrales (McGee y cols., 1997).

### 2.3.10 Factor de crecimiento de queratinocitos o de fibroblastos 7 (KGF7 o FGF7)

FGF7 es producido por las células mesenquimáticas (pre-células de la teca) que rodean a los folículos primordiales y que actúan en las pre-células de la granulosa y/o en las células de la granulosa para aumentar la expresión de kitL y por tanto, amplificar sus efectos en el crecimiento ovocitario y en la proliferación de las precélulas de la teca y/o células de la teca (Kezele y cols., 2005).

### 2.3.11 Factor de crecimiento de queratinocitos o de fibroblastos 2 o básico (KGF2, FGF2 o bFGF).

Se expresa en ovocitos desde estadio primordial y aumenta la expresión de kitL en las pre-células de la granulosa y promueven la transición de folículo primordial a primario en ovario neonatal de rata en cultivo (Nilsson y Skinner, 2004).

### 2.3.12 Neurotrofinas.

Las neurotrofinas y sus receptores tienen una función esencial en la diferenciación y supervivencia de las neuronas del sistema nervioso central y periférico. Además, se ha visto que se expresan en tejidos distintos del nervioso donde ejercen otras funciones.

En el ovario se expresan 4 de las 5 neurotrofinas conocidas, el factor de crecimiento de nervio (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4/5 (NT4/5) (Berkemeier y cols., 1991; Dissen y cols., 1995, 1996; Ernfors y cols., 1990; Hallböök y cols., 1991; Lara y cols., 1990a). También se expresan sus receptores: p75NTR, trkA, trkB y trkC (Dissen y cols., 1991, 1995; Klein y cols., 1989; Lamballe y cols., 1991).

La señalización mediada por NGF-TrkA es necesaria para la proliferación de las células mesenquimáticas (Dissen y cols., 2001), para el desarrollo de los folículos primordiales (Dissen y cols., 2001) y la inducción la síntesis de FSHR durante el crecimiento temprano de los folículos (Romero y cols., 2002).

En el momento de la ovulación, el pico de LH provoca el aumento de la síntesis de interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) que a su vez induce un aumento de la expresión de NGF y Taka, esto desencadena a su vez el aumento de la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub> (Dissen y cols 1996). El sistema NGF-TrkA también induce la mitosis en las células de la teca (Dissen y cols., 2000b) y la fosforilación de la conexina 43 que conduce a la disrupción de las uniones entre las células de la teca (Mayerhofer y cols., 1996) favoreciendo la ruptura de la pared folicular.

La respuesta generada por NT4/5 y BDNF a través de su receptor TrkB permite la proliferación de las células de la granulosa durante la vida posnatal temprana (Dissen y cols., 2002).

### 2.3.13 Interleucina 6 (IL-6).

Parece que participa en el desarrollo folicular inhibiendo los efectos de la FSH en las células de la granulosa (Machelon y cols., 1994). Además de ser producida por linfocitos y macrófagos, es sintetizada por las células del epitelio ovárico en humanos (Lidor y cols., 1993) y por las células de la teca en conejo (Breard y cols., 1998).

Se ha visto que afecta de forma negativa a la estimulación de la tasa de ovulación favorecida por IL-1 $\beta$  y por LH, que inhibe parcialmente la producción de AMPc y la síntesis de progesterona dependiente de gonadotropinas (Van der Hoek y cols., 1998; Breard y cols., 1998) y que promueve la apoptosis en cultivos foliculares (Chun y Hsueh, 1998).

### 2.3.14 Factor inhibitorio de la leucemia (LIF).

LIF es un inductor de la diferenciación de las células madres de distintos tejidos (Abe y cols., 1991), que actúa a través de un receptor específico GP130 que transduce una señal por la vía JAK-STAT (Gadient y Patterson, 1999) y que afecta a varios sistemas del desarrollo (Abe y cols., 1991; Taupin y cols., 1998). Aún no se ha hecho un análisis detallado de los ovarios del *knockout*, pero se sabe que pueden ovular. Este factor, es secretado al líquido folicular y su concentración aumenta a medida que avanza el desarrollo folicular (Coskun y cols., 1998; Ozornek y cols., 1999). También afecta a las PGCs tanto *in vitro* como *in vivo* (Morita y cols., 1999), pero su papel en el desarrollo ovocitario aún no se ha dilucidado (Shim y Anderson, 1998).

El tratamiento de los folículos primordiales de rata con LIF hace incrementar el número de folículos que inician su crecimiento (transición de folículo primordial a folículo primario), mientras que el anticuerpo neutralizador de LIF inhibe parcialmente el desarrollo folicular espontáneo. Estos datos son similares a los observados con los anticuerpos neutralizadores de KitL. (Nilsson y cols., 2002). Se visto que la insulina mejora las acciones de LIF en los folículos primordiales (Nilsson y cols., 2002).

### 2.3.15 Sistema HGF.

El HGF intraovárico es un regulador autocrino/paracrino del crecimiento y esteroidogénesis de las células de la teca y de la granulosa (Zachow y cols., 1997, 2000; Lail-Trecker y cols., 1998; Parrott y Skinner, 1998b, Zachow y Woolery, 2002).

El sistema HGF consta del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), su receptor (c-met), el activador de HGF (HGFA) y el inhibidor del activador (HAI). Estos dos últimos, regulan localmente la bioactividad de HGF.

Se ha estudiado la expresión de HGF y de c-met en las células de la granulosa y de la teca de varias especies de mamífero, comprobándose que el grado de expresión depende tanto de la etapa del desarrollo folicular como de la especie estudiada, (Liu y cols., 1994; Parrott y cols., 1994; Parrott y Skinner, 1998a; Otsuga y cols., 1999; Shimizu y cols., 2003).

Los experimentos de Uzumcu y cols. (2006) en ovario de rata, muestran que la expresión de HGF y c-met en las células de la granulosa, disminuye con la maduración folicular, y que en folículos antrales grandes ni siquiera se localiza expresión de HGFA. En cambio, en las células tecales de folículos preovulatorios, aumenta la expresión de HGF, HGFA y c-met.

En las células de la teca de ovario inmaduro de rata, HGF evita la secreción de androsterona, bloqueando la expresión de la aromatasa y estimulando la producción de progesterona (Zachow y cols., 1997). La producción de HGF en células de la teca en vaca (Parrott y Skinner, 1998b), es estimulada por la hCG. El HGF secretado por las células de la teca promueve la liberación de KitL por parte

de las células de la granulosa, que su vez, hace que aumente la producción de HGF en las células de la teca e induce la proliferación de éstas (Parrott y Skinner, 1998b, 2000), demostrándose que en el ser humano funciona el mismo mecanismo (Ito y cols., 2001).

En células de la granulosa de rata inmadura, el HGF, bloquea la aromatización de la androstendiona (Zachow y Woolery, 2002), provocando el descenso de la expresión y actividad de la aromataasa, así como la disminución del nivel del ARNm de 17 $\beta$  HSD (Parrott y Skinner, 1998a; Zachow y cols., 2000). Otros trabajos también han demostrado como la HGF bloquea la apoptosis de las células de la granulosa inmaduras en rata (Uzumcu y cols., 2006).

En las mujeres, HGF suprime la producción de estradiol en las células de la granulosa de folículos preantrales pequeños aunque no lo hace en las células de la granulosa de folículos antrales mayores (Zachow, no publicado). Esto hace pensar que las concentraciones elevadas de FSH impiden que HGF atenúe la producción de estradiol dependiente de FSH. Podría ser debido a que los niveles de c-met disminuyen en presencia de FSH, HGF y eCG (Zachow y cols., 2000; Uzumcu y cols., 2006).

En el desarrollo folicular temprano, la HGF inhibe la producción de andrógenos y estradiol pero, en folículos antrales más maduros, el descenso en los niveles de c-met, por efecto de las gonadotropinas, permite la síntesis de andrógenos y de estradiol que estaba impedida hasta ese momento, para que tenga lugar la ovulación (Zachow y Uzumcu, 2007)

## 2.4 Sustancias que afectan al cultivo folicular.

### 2.4.1 Vitamina C o ácido ascórbico.

La vitamina C reduce la apoptosis durante el crecimiento *in vitro* de los complejos ovocitos-células de la granulosa y folículos preantrales de ratón (Eppig y cols., 2000; Murray y cols., 2001).

En otras experiencias en las que se cultivaron folículos preantrales bovinos en un sistema tridimensional, se observó un aumento del porcentaje de folículos que mantenían la integridad de la membrana basal. Por lo que se demostró la importancia del ácido ascórbico durante la foliculogénesis tanto en roedores como en otras especies domésticas (Murray y cols., 2001; Thomas y cols., 2001).

### 2.4.2 Transferrina.

Las células que se encuentran en proliferación necesitan entre otros oligoelementos el hierro. Este es transportado y suministrado por una glicoproteína que se une a metales llamada transferrina. Las células de la granulosa tanto humanas como de rata, expresan receptores para la transferrina de forma creciente y acorde a la maduración folicular (Aleshire y cols., 1989).

### 2.4.3 Selenio.

Otro de los oligoelementos necesarios en todos estos procesos es el Selenio. La adición de selenito sódico al medio de cultivo, activa enzimas involucradas en la detoxificación metabólica y la eliminación de radicales libres. Sin embargo, su ausencia no hace que disminuya significativamente la viabilidad de los folículos preantrales (Demeestere y cols., 2004).

## 3. MANTENIMIENTO DE LA DETENCIÓN DURANTE LA MEIÓISIS Y MADURACIÓN OVOCITARIA.

La adquisición de la competencia meiótica ocurre alrededor del momento de formación del antro (Erikson y Sorensen, 1974; Sorensen y Wassarman, 1976; Mehlmann y cols., 2004) y se corresponde con el momento en el que el ovocito alcanza un nivel umbral de proteínas promotoras de la maduración como la quinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1) y la ciclina (de Vantèry y cols., 1996, 1997; Kanatsu-Shinohara y cols., 2000).

A pesar de tener la capacidad para madurar, el ovocito permanece detenido en profase I hasta el momento del pico de LH preovulatorio que es regulado por los niveles intracelulares de AMPc (Conti y cols., 2002; Eppig y cols., 2004). Es más, si se aísla el ovocito del folículo, tiene lugar la maduración espontánea y disminuyen los niveles de AMPc (Törnell y cols., 1990). Por el contrario, la reanudación de la meiosis puede evitarse con análogos de AMPc permeables a la membrana o inhibidores de la fosfodiesterasa de AMPc (Cho y cols., 1974; Dekel y Beers, 1978; Conti y cols., 2002).

La homeostasis intracelular de AMPc es regulada por dos grupos de enzimas; las adenilato ciclasas (AC) que generan AMPc, y las fosfodiesterasas (PDE) que lo metabolizan. La mayor parte de las AC están reguladas por proteínas G que potencian ( $G_s$ ) o inhiben ( $G_i$ ) la actividad del AMPc (Freissmuth y cols., 1989). Los mecanismos que controlan las PDE son menos conocidos pero podrían involucrar una activación a corto plazo en respuesta a la fosforilación mediada por PKA y a largo plazo en el ARNm y la expresión proteica (Mehats y cols., 2002).

Un factor inductor de la meiosis podría afectar a dianas “corriente abajo” del AMPc aunque parece más probable que lo haga “corriente arriba”, ya que, los niveles de AMPc caen rápidamente en la maduración (Schultz y cols., 1983a; Törnell y cols., 1990; Conti y cols., 2002). Existen distintas posibles dianas: GPR3,  $G_s$ ,  $G_i$ , calcio y PDE (reviewed by Mehlmann, 2005). Todavía no se han esclarecido en su totalidad el mecanismo de regulación corriente abajo que permite a los niveles de AMPc evitar la maduración. En último término, los niveles de AMPc afectan al complejo CDK/ciclina B (CYB), también llamado factor promotor de la meiosis (MPF). Los niveles de AMPc altos en el ovocito, resultan en la fosforilación de la Tyr14 y Tyr 15 de la CDK1, inactivándola (Duckworth y cols., 2002). Un descenso en el nivel de AMPc conduce a la desfosforilación de esas Tyr en CDK1 y el complejo MPF se activa para reanudar la meiosis. Los pasos intermedios entre AMPc y MPF no se conocen. Se cree que la proteína quinasa A (PKA) a través de una serie de pasos



indeterminados, regula la actividad de la fosfatasa CDC25b y la quinasa WEE/MYT1 (Eppig y cols., 2004). CDC25b defosforila CDK1 mientras que WEE/MYT1 la fosforila.

El origen del AMPc puede ser desde el propio ovocito o de las células del cúmulo que lo rodean, y que podrían transferirlo al ovocito a través de las conexiones gap existentes entre ambos tipos celulares (Anderson y Albertini, 1976; Bornslaeger y Schultz, 1985; Piontkewich y Dekel, 1993; Webb y cols., 2002b). De hecho, se ha observado que en los ratones en los que se ha provocado la disrupción del gen para conexina 37, (única forma sintetizada por el ovocito y, por tanto necesaria para las uniones gap entre las células del cúmulo y el ovocito), el ovocito alcanza el 74% de su tamaño normal (Carabatsos y cols., 2000) y sin embargo, no alcanza la competencia meiótica del todo (Kidder y Mhawi, 2002).

Otra hipótesis alternativa es que el ovocito fabrique su propio AMPc a través de un receptor acoplado a proteína G de su membrana plasmática (GPR3), que estimule a la proteína  $G_s$  y subsiguientemente, a la adenilato ciclasa (AC). Existen múltiples evidencias que apoyan esta hipótesis:

- 1) Los ovocitos de ratón contienen GPR3 (Mehlmann y cols., 2004),  $G_s$  (Mehlmann y cols., 2002) y AC (Horner y cols., 2003).
- 2) La estimulación de la AC hace aumentar los niveles de AMPc y retrasa la reanudación de la meiosis (Olsiewski y Beers, 1983; Schultz y cols., 1983a; Urner y cols., 1983; Bornslaeger y Schultz, 1985).
- 3) La microinyección de análogos no hidrolizables de AMPc en ovocitos aislados de ratón, activa  $G_s$  y mantiene la parada meiótica de forma transitoria y dependiente de dosis (Downs y cols., 1992).
- 4) El AMPc aumenta en ovocitos aislados mantenidos en parada meiótica, y tratados con inhibidores de la fosfodiesterasa (Bornslaeger y Schultz, 1985; Webb y cols., 2002b)
- 5) La toxina colérica, un activador irreversible de  $G_s$  (De Haan y Hirst, 2004) retrasa la maduración en ovocitos aislados (Dekel y Beers, 1978; Schultz y cols., 1983b; Urner y cols., 1983; Vivarelli y cols., 1983; Downs y cols., 1992; Grøndahl y cols., 2000a).
- 6) La microinyección de un anticuerpo que bloquee la función de  $G_s$  o de una forma dominante negativa de la subunidad  $\alpha$  de  $G_s$  en ovocitos dentro de folículos, mantiene parada meiótica (Mehlmann y cols., 2002; Kalinowski y cols., 2004).
- 7) La inhibición de  $G_s$  en ovocitos aislados, mantenidos en parada meiótica, estimula la maduración (Mehlmann y cols., 2002; Kalinowski y cols., 2004), lo que indica que el receptor tiene cierta actividad constitutiva. De hecho su ARN se encuentra una concentración catorce veces superior en el ovocito que en las células de la granulosa.
- 8) Los ratones sin el gen *Gpr3* sufren maduración espontánea en sus ovocitos en folículos intactos y se revierte inyectando ARN de *Gpr3* (Mehlman y cols., 2004).

No se sabe si la actividad constitutiva del receptor es suficiente para mantener la parada, si las células foliculares de alrededor producen algún ligando, o si es

activado por algún lípido de la membrana. También podría ser que las células foliculares inhiban la fosfodiesterasa (Conti y cols., 2002).

La exposición de los folículos a la LH conduce a la maduración ovocitaria, pero ni el ovocito ni las células de la granulosa del cúmulo, poseen receptores de LH, sólo las células de la teca y las células de la granulosa murales los tienen. Esto implica que tiene que tener lugar la secreción de factores paracrinos para promover la expansión del cúmulo y la maduración ovocitaria (Peng y cols., 1991). La LH podría inactivar una sustancia inhibidora de la maduración o activar una sustancia promotora de la maduración.

Se ha visto que las células de la granulosa murales, empiezan a expresar el ARN de unas proteínas similares a EGF de 1 a 3 horas después de la estimulación del receptor de LH (Park y cols., 2004; Ashkenazi y cols., 2005), y estas proteínas, en particular la anfirregulina y la epirregulina, causan en ovocitos (tanto rodeados de células del cúmulo como dentro de un folículo), la reanudación de la meiosis con la misma eficacia que lo hace la LH, pero con mayor rapidez, sin embargo esto no ocurre en ovocitos aislados. La inhibición del receptor EGF en folículos cultivados inhibe completamente la maduración ovocitaria inducida por LH (Park y cols., 2004) lo que concuerda con otros estudios en los que se vio que EGF promovería la maduración en complejos ovocito-células del cúmulo (Das y cols., 1991; De La Fuente y cols., 1999; Cotichio y cols., 2004). A pesar de todos estos conocimientos, la ruta de señalización entre las células del cúmulo y el ovocito, sigue siendo un enigma.

Park y cols. (2004) proponen que los factores liberados por las células de la teca o de la granulosa murales promueven la expansión de las células del cúmulo, lo que hace que se rompan los contactos entre éstas células y el ovocito. Esto a su vez podría producir la maduración ovocitaria y la eventual ovulación. De hecho, el tratamiento con EGF de las células de la granulosa, activa a la quinasa de la proteína activada por mitógeno (MAPK), que a su vez fosforila la conexina 43 impidiendo la comunicación a través de las uniones gap (Lampe y Pau, 2004).

Uno de los factores que podría ser liberado por las células de la granulosa del cúmulo para promover la maduración, podría ser el esteroide activador de la meiosis del fluido folicular (FF-MAS). Éste, es un intermediario de la biosíntesis del colesterol que se ha visto que promueve la maduración en ovocitos aislados mantenidos en arresto o cultivados con las células del cúmulo (Xia y cols., 1994; Byskov y cols., 1997). En cualquier caso, existe controversia acerca de su papel en la maduración ovocitaria, ya que aunque la inhibición de su producción o su metabolismo reduce y aumenta, respectivamente, la maduración de complejos ovocito-células del cúmulo *in vitro* (Byskov y cols., 1995; Lu y cols., 2000; Xie y cols., 2004) el lapso de tiempo en el que activa a la MAPK es diferente del que requiere la maduración espontánea o la maduración inducida por gonadotropinas (Gross y cols., 1993; Tsafiriri y cols., 1998; Tsafiriri y cols., 2002; Downs y cols., 2001; Yamashita y cols., 1995; Faerge y cols., 2001) y las concentraciones necesarias son del orden de micromolar, lo que implica efectos inespecíficos en las membranas (Vaknin y cols., 2001).

A pesar de la controversia, un trabajo reciente, ha demostrado que FF-MAS, además de promover la progresión de metafase I a metafase II en el ovocito, podría participar en el mantenimiento de la parada en metafase II, hasta el momento de la fecundación (Cavilla y cols., 2001; Marin Bivens y cols., 2004).

Por otro lado, se sabe que los esteroides promueven la maduración ovocitaria en vertebrados inferiores. *Xenopus laevis* constituye un modelo bien caracterizado, en el que se sabe que son varios los esteroides que promueven la maduración: progestinas, glucocorticoides y andrógenos, siendo éstos últimos los más potentes (Smith y cols., 1971; Lutz y cols., 2001; Le Goascogne y cols., 1985). Gill y cols. (2004) han publicado un estudio en el que examinan la maduración promovida por esteroides en ovocitos de ratón mantenidos en arresto meiótico con un inhibidor de PDE. En él, demuestran varios aspectos entre los que destacan los siguientes:

- Concentraciones nanomolares de testosterona o estradiol disparan la maduración sin afectar la transcripción.
- La maduración iba acompañada de la activación de MAPK y CDK1.
- Las señales mediadas por los esteroides eran inhibidas con antagonistas de sus receptores.
- El receptor de andrógenos se expresa en el ovocito.
- Los moduladores selectivos del receptor de andrógenos eran los mismos que en *X. laevis*.

Aunque este estudio demuestra que los esteroides disparan la maduración ovocitaria en mamíferos de una forma muy similar a la de vertebrados inferiores, no descarta la acción de otras sustancias.

#### 4. PROCESOS TRANSZONALES (TZPS) Y UNIONES GAP

El transporte efectivo de sustancias desde y hacia el ovocito en es imprescindible para la coordinación de la ovogénesis y la foliculogénesis, y está influenciada por las características de la interfaz ovocito-células de la granulosa (Albertini y cols., 2001).

Las células de la granulosa que rodean al ovocito, poseen unas extensiones que atraviesan la zona pelúcida y terminan en la superficie ovocitaria. Estas extensiones se denominan procesos transzonales (TZPs), y sufren alteraciones dinámicas en cuanto a la forma y el número a lo largo del desarrollo folicular (Motta y cols., 1994). En estadio preantral, es cuando són más numerosos, formando uniones adhesivas y gap con el oolema. Durante los picos de crecimiento ovocitario, los TZPs, entran como invaginaciones alcanzando incluso la vesícula germinal (Motta y cols., 1994). Recientemente, se ha visto que la FSH regula la habilidad de las células de la granulosa para establecer conexiones con el ovocito (Combelles y cols., 2004): el tratamiento con FSH de ratones prepúberes knockout para FSH $\beta$  disminuye la densidad de TZPs, lo que coincide con cambios en el remodelado de la cromatina y adquisición de competencia meiótica (Combelles y cols., 2004).

KitL induce el crecimiento *in vitro* de ovocitos fetales de ratón aislados en ausencia de uniones gap (Klinger y De Felici, 2002). Sin embargo, estos ovocitos no

consiguen progresar hasta los últimos estadios de crecimiento y se observa una asincronía entre la maduración nuclear y citoplasmática, características similares a las de ratones deficientes en *conexina-43*, Gittens y cols. (2005), sugieren que las células de la granulosa tienen que tener uniones gap formadas por *conexina-43* entre ellas para responder óptimamente a GDF9. Mientras que estos folículos deficientes en la *conexina 43*, se desarrollan hasta la etapa preantral los de los ratones deficientes en *conexina-37*, se desarrollan hasta estadio antral temprano (Simon y Goodenough, 1997; Juneja y cols., 1999). Por ello se cree que la transición de preantral a antral requiere la diferenciación coordinada de ovocitos y células de la granulosa (Klinger y De Felici, 2002), para lo cual es necesario el mantenimiento de una adecuada comunicación.

## 5. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EXPRESADOS EN EL OVARIO.

Figla	Factor alfa en la línea germinal	Soyal y cols. (2000)	Función	FIGLA se une a un promotor llamado E-boz que afecta a la transcripción de los genes de la zona pelúcida (Zp1, Zp2 y Zp3) e interacciona con el factor de transcripción E-12.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: infertilidad. Ausencia de folículos primordiales. Se pierden todos los ovocitos para el día posnatal 2.
			Expresión	Embrión: ovario de ratón a partir de día E13.5. Adulto: ovocitos de los nidos ovocitarios y de los folículos de todos los estadios del desarrollo. También en testículo.
Nobox	<i>Homeobox</i> de ovario de recién nacido	Rajkovic y cols. (2004)	Función	Reprime la expresión de ciertos genes ovocitarios como Gdf9, Bmp15, Mos y Oct aunque no se sabe si es de forma directa o indirecta.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: infertilidad. Se pierden todos los ovocitos para el día posnatal 14. No se forman folículos primarios.
			Expresión	Embrión: Desde E13.5 aunque aumenta a partir del día E15.5. Adulto: ovocitos de los nidos ovocitarios y de todos los estadios de la foliculogénesis.
Oct4/Pou5f1	Factor de transcripción 1, clase 5, con dominio POU	Kehler y cols. (2004)	Función	Mantenimiento de las células germinales. Acumulación de transcritos durante el desarrollo folicular
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: desarrollo embrionario bloqueado en blastocisto. Condicional: Apoptosis prematura de las PGC.
			Expresión	Adulto: ovocitos de todos los estadios.
Nr6a1/Gcnf	Factor nuclear de las células germinales	Lan y cols. (2003)	Función	Reprime la expresión de Pou5f1 y regula la expresión de otros genes durante la embriogénesis temprana. No se conoce su función posnatal.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: desarrollo embrionario bloqueado en E10.5. Condicional: Subfertilidad femenina. Prolongación del diestro.
			Expresión	Embrión preimplantatorio. Ovocitos de folículos primarios en adelante.
Taf4b/TAFII105	Factor 4b asociado a la proteína de unión a la caja TATA	Freiman y cols. (2001)	Función	Parece implicado en el sistema inmune.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: Infertilidad femenina. Ausencia de folículos antrales y más avanzados.
			Expresión	No se sabe su inicio.

## FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EXPRESADOS EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA Y CÉLULAS SOMÁTICAS DEL OVARIO:

Foxo3a	Caja <i>forkhead</i> O3a	Castrillón y cols. (2003); Hosaka y cols. (2004)	Función	La familia a la que pertenece está implicada en el arresto celular, apoptosis y embriogénesis.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: LH y FSH elevadas, Activación y atresia folicular generalizada en hembras prepúberes. Infertilidad a las 15 semanas. Esterilidad a las 18 semanas.
			Expresión	No se sabe su inicio.
Foxl2	Caja <i>forkhead</i> L2	Schmidt y cols. (2004); Uda y cols., (2004)	Función	En el ovario induce la expresión de la aromatasa y reprime la de Star. En la hipófisis activa la expresión de GnrHR-
			Fenotipo <i>ko</i>	Fallo ovárico precoz. Las células de la granulosa de folículos primordiales no pueden transformarse en células cúbicas, lo que conduce a la atresia folicular.
			Expresión	Embrión: constituye el marcador de diferenciación ovárica más temprano. También se expresa en mesénquima de párpado. Adulto: Células somáticas de ovario.
Sox3	Gen 3 que contiene la caja Sry	Weiss y cols. (2003)	Función	Interviene en el desarrollo ovocitario y en la diferenciación y gametogénesis en testículo. En cerebro no se sabe.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: Crecimiento variable y desarrollo de los dientes anormal. Hembras prepúberes con numerosos folículos pequeños atrésicos. Ovulación de ovocitos defectuosos. LH y FSH normales. Subfertilidad femenina.
			Expresión	Embrión: desde E6.5 en gonada indiferenciada y sistema nervioso central y cerebro en desarrollo. Adulto: RNA en células de la granulosa y ovocito. Proteína en células de Sertoli y pituitaria.
Sf1/Nr5a1	Miembro 1 del grupo A de la subfamilia 5 de receptores nucleares	Ingraham y cols. (1994); Zhao y cols. (2004)	Función	Regula la transcripción de los genes esteroideogénicos.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: En E12.5 pierde los ovarios. Condicional: infertilidad. Tiene folículos antrales pero tiene quistes hemorrágicos y no hay cuerpo lúteo.
			Expresión	Embrión: en células somáticas de gónada indiferenciada en adelante. Adulto: ovario (células de la teca, células de la granulosa y cuerpo lúteo), testículo (células de Leydig y células de Sertoli) corteza suprarrenal, hipófisis, hipotálamo y bazo.
Lrh-1/Nr5a2	Miembro 2 del grupo A de la subfamilia 5 de receptores nucleares	Pare y cols. (2004)	Función	Promueve la expresión de <i>Cyp11a1</i> , <i>Cyp17</i> y <i>Star</i>
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: mueren para E6.5-7.5.
			Expresión	Adulto: células de la granulosa y cuerpo lúteo y en muchos otros tejidos.
Wt1	Homólogo del tumor de Wilms	Kreidberg y cols. (1993)	Función	Se asocia a Sf1 para promover la expresión de <i>Amh</i>
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: los ovarios degeneran para E12.5.
			Expresión	Embrión: células somáticas de gónada indiferenciada. Adulto: células de la granulosa.
Lhx9	Proteína 9 con <i>homeobox</i> LIM	Birk y cols. (2000)	Función	Interviene en la proliferación de las PGCs.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: agenesia gonadal, machos con sexo revertido.
			Expresión	Embrión: gónada indiferenciada y otros tejidos. Adulto: epitelio superficial del ovario.
Emx2	Homólogo 2 de espiráculos vacíos.	Miyamoto y cols. (1997)	Función	Desarrollo del córtex cerebral y del epitelio del sistema urogenital en el embrión.
			Fenotipo <i>ko</i>	Convencional: mueren tras el nacimiento, carecen de riñones, uréteres y gónadas. La migración de las PGCs ocurre con normalidad.
			Expresión	Embrión: a partir de E.8.75 en la cresta urogenital.

## 6.- BIBLIOGRAFIA

Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 2744-2750.

Abe T, Ohno M, Sato T, Murakami M, Kajiki M, Kodaira R. "Differentiation induction" culture of human leukemic myeloid cells stimulates high production of macrophage differentiation inducing factor. *Cytotechnology* 1991; 5(Suppl. 2): S75-S93.

Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 1072-1076.

Alak BM, Coskun S, Friedman CI, Kennard EA, Kim MH, Seifer DB. Activin A stimulates meiotic maturation of human oocyte and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Fertility and Sterility* 1998; 70: 1126-1130.

Alak BM, Smith GD, Woodruff TK, Stouffer RL, Wolf DP. Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization in vitro by inhibin A and activin A. *Fertility and Sterility* 1996; 66: 646-653.

Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001; 121: 647-653.

Aleshire SL, Osteen KG, Maxson WS, Etman SS, Bradley CA, Parl FF. Localization of transferrin and its receptor in ovarian follicular cells: morphologic studies in relation to follicular development. *Fertility and Sterility* 1989; 51: 444-449.

Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *Journal of Cell Biology* 1976; 71: 680-686.

Armstrong DG, Gong JG, Gardner JO, Baxter G, Hogg CO, Webb R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. *Reproduction* 2002b; 123: 371-378.

Armstrong DG, Gong JG, Webb R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: Physiological, cellular and molecular mechanisms. *Reproduction Suppl* 2003; 61: 403-414.

Armstrong DG, McEvoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad KJ, Webb R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod* 2001; 64: 1624-1632.

Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafirri A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 2005; 146: 77-84.

Bagnell CA, Mills TM, Costoff A, Mahesh VB. A model for the study of androgen effects on follicular atresia and ovulation. *Biol Reprod* 1982; 27: 903-914.

Balen A. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome: trying to understand PCOS, its endocrinology. *Best Prac & Res Clin Obstet & Gynaec* 2004; 18: 685-706.

Bayne RA, Martins da Silva SJ, Anderson RA. Increased expression of the FIGLA transcription factor is associated with primordial follicle formation in the human fetal ovary. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 373-381.

Berisha B, Sinowartz F, Schams D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev* 2004; 67: 162-71.

- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolicks K, Goeddel DV, Rosenthal A. Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates *trk* and *trkB*. *Neuron* 1991; 7: 857-866.
- Billiar RB, Zachos NC, Burch MG, Albrecht ED, Pepe GJ. Up-regulation of alpha-inhibin expression in the fetal ovary of estrogen-suppressed baboons is associated with impaired fetal ovarian folliculogenesis. *Biol Reprod* 2003; 68: 1989-96.
- Billig H, Furata I, Hsueh AJW. Oestrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 1993; 133: 2204-2212.
- Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL et al. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* 2000; 403: 909-913.
- Bley MA, Saragueta PE, Baranao JL. Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. *J Ster Biochem Mol Biol* 1997; 62: 11-19.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction* 1990a; 43: 543-547.
- Boland NI, Gosden RG. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation on cultured mouse ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994; 10: 369-374.
- Bornslaeger EA, Schultz RM. Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biology of Reproduction* 1985; 33: 698-704. Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, et al. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 1995; 374: 559-562.
- Bornstein SR, Rutkowsky H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 135-141.
- Bramley T. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 2003; 125: 3-15.
- Brannian J, Woodruff T, Mather J, Stouffer RL. Activin-A inhibits progesterone production by macaque luteal cells in culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1992; 75: 756-761.
- Bréard E, Benhaim A, Féral C, Leymarie P. Rabbit ovarian production of interleukin-6 and its potential effects on gonadotropin-induced progesterone secretion in granulosa and theca cells. *Journal of Endocrinology* 1998; 159: 479-487.
- Britt K, Kerr J, O'Donnell L, Jones M, Drummond A, Findlay J, Simpson ER. Defining the roles of sex steroid hormones in the control of differentiation in somatic cells of mammalian gonads. *Proc USA Endocr Soc* 2001. Abstract OR39-2.
- Britt KL, Drummond AE, Cox AV, Dyson M, Wreford NG, Jones MEE, Simpson ER, Findlay JK. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the *Cyp 19* (aromatase) gene. *Endocrinology* 2000; 141: 2614-2623.
- Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, Misso ML, Simpson ER, Findlay JK. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod* 2004; 71: 1712-23.
- Byers M, Kuiper GM, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. Oestrogen receptor- $\beta$  mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Molec Endocrinology* 1997; 11: 172-182.
- Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, et al. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. *Nature* 1995; 374: 559-562.

- Byskov AG, Yding Andersen C, Hossaini A, Guoliang X. Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Mol Reprod Dev* 1997; 46: 296-305.
- Cai Z, Stocco C. Expression and regulation of progesterin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 2005 in press.
- Cameron VA, Nishimura E, Mathews LS, Lewis KA, Sawchenko PE, Vale WW. Hybridization histochemical localization of activin receptor subtypes in rat brain, pituitary, ovary, and testis. *Endocrinology* 1994; 134: 799-808.
- Campbell BK, Baird DT. Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive maker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. *Journal of Endocrinology* 2001; 169: 333-345.
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ. The effect of ovarian arterial infusion of human recombinant inhibin and bovine follicular fluid on ovarian hormone secretion by ewes with an autotransplanted ovary. *Journal of Endocrinology* 1996; 149: 531-540.
- Canipari R, Epifano O, Siracusa G, Salustri A. Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Developmental Biology* 1995; 167: 371-378.
- Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology* 1998; 204: 373-384.
- Cardenas H, Herrich JR, Pope WF. Increased ovulation rate in gilts treated with dihydrotestosterone. *Reproduction* 2002; 123: 527-533.
- Carson RS, Richards JS, Kahn LE. Functional and morphological differentiation of theca and granulosa cells during pregnancy in the rat: dependence on increased basal luteinising hormone activity. *Endocrinology* 1981; 109: 1433-1441.
- Carson RS, Zhang Z, Hutchinson LA, Herrington AC, Findlay JK. Growth factors in ovarian function. *J Reprod Fert* 1989; 85: 735-746.
- Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003; 301: 215-218.
- Cataldo NA, Rabinovici J, Fujimoto VY, Jaffe RB. Follistatin antagonizes the effects of activin-A on steroidogenesis in human luteinizing granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 79: 272-277.
- Cavilla JL, Kennedy CR, Baltzen M, Klentzeris LD, Byskov AG, Hartshorne GM. The effects of meiosis activating sterol on in-vitro maturation and fertilization of human oocytes from stimulated and unstimulated ovaries. *Hum Reprod* 2001; 16: 547-555.
- Cecconi S, Rossi G, Coticchio G, Macchiarelli G, Borini A, Canipari R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development in vitro. *Fertility and Sterility* 2004; 81: 919-924.
- Combelles CM, Carabatsos MJ, Kumar TR, Matzuk MM, Albertini DF. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 347-355.
- Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Homer K, Jin C, Tsafiri A. Role of cycling nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 187: 153-159.
- Conway BA, Mahesh VB, Mills TM. Effect of dihydrotestosterone on the growth and function of ovarian follicles in intact immature females primed with PMSG. *J Reprod Fert* 1990; 90: 267-277.



Coucouvani EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG, Jones PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 1993; 209: 238-47.

Couse JF, Korach KS. Oestrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Rev* 1999; 20: 358-417.

Coskun S, Uzumcu M, Jaroudi K, Hollanders JM, Parhar RS, al-Sedaire ST. Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin-12 in human follicular fluid during follicular growth. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40: 13-18.

Coskun S, Uzumcu M, Lin YC, Friedman CI, Alak BM. Regulation of cumulus cell steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s). *Biology of Reproduction* 1995; 53: 670-675.

Coticchio G, Rossi G, Borini A, Grondahl C, Macchiarelli G, Flamigni C, Fleming S, Cecconi S. Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. *Human Reproduction* 2004; 19: 2913-2918.

Charpentier AH, Bednarek AK, Daniel RL, Hawkins KA, Laflin KJ, Gaddis S, MacLeod MC, Aldaz CM. Effects of oestrogen on global gene expression: identification of novel targets of oestrogen action. *Cancer Res* 2000; 60: 5977-5983.

Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development*. 1993; 34: 87-93.

Chen Y, Pepling M. Estradiol inhibits cyst breakdown in neonatal mouse ovary organ culture. *Biol Reprod* 2006; 95.

Cheng G, Weihua Z, Makinen S, Makela S, Saji S, Warner M, Gustaffsson J-A, Hovatta O. A role for the androgen receptor in follicular atresia of oestrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol Reprod* 2002; 66: 77-84.

Cho WK, Stern S, Biggers JD. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 1974; 187: 383-386.

Choi Y, Rajkovic A. Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 579-590.

Chu S, Fuller PJ. Identification of a splice variant of the rat oestrogen receptor  $\beta$  gene. *Molec Cell Endocrinol* 1997; 132: 95-99.

Chun SY, Hsueh AJ. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *Journal of Reproductive Immunology* 1998; 39: 63-75.

D'Alessandris C, Canipari R, Di Giacomo M, Epifano O, Camaioni A, Siracusa G, Salustri A. Control of mouse cumulus cell-oocyte complex integrity before and after ovulation: plasminogen activator synthesis and matrix degradation. *Endocrinology* 2001; 142: 3033-3040.

Das K, Stout L, Hansleigh H, Tagatz G, Phipps W, Leung B. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertility and Sterility* 1991; 55: 1000-1004.

Davis GH, McEwan JC, Fennessy PF, Dodds KG, McNatty KP, O W-S. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecX1 FecX1) for the inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. *Biology of Reproduction* 1992; 46: 636-640.

De Haan L, Hirst TR. Cholera toxin: a paradigm for multifunctional engagement of cellular mechanisms. *Molecular Membrane Biology* 2004; 21: 77-92.

- Dekel N, Beers WH. Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. PNAS 1978; 75: 4369-4373.
- De la Fuente R, O'Brien MJ, Eppig JJ. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. Human Reproduction. 1999; 14: 3060-3068.
- Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodent. Reproduction 2005; 130: 147-156.
- Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. Biology of Reproduction 2004; 70: 1664-1669.
- Di Simone ND, Ronsisvalle E, Lanzone A, Caruso A, Petraglia F, Mancuso S. Effect of activin A on progesterone synthesis in human luteal cells. Fertility and Sterility 1994; 62: 1157-1161.
- Dissen GS, Hill DF, Costa ME, Dees WL, Lara HE, Ojeda SR. A role for *trkA* nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. Endocrinology 1996; 137: 198-209.
- Dissen GS, Hill DF, Costa ME, Ma YJ, Ojeda SR. Nerve growth factor receptors in the peripubertal rat ovary. Mol Endocrinol 1991; 5: 1642-1650.
- Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. Endocrinology 1995; 136: 4681-92.
- Dissen GA, Parrot JA, Skinner MK, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR. Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. Endocrinology 2000b; 141: 4736-4750.
- Dissen GA, Romero C, Newman Hirsfield A, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. Endocrinology 2001; 142: 2078-2086.
- Dissen GA, Romero C, Paredes A, Ojeda SR. Neurotrophic control of ovarian development. Microsc Res Tech 2002; 59(6): 509-15.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu NF, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. Nature 1996; 383: 531-535.
- Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT. Oestradiol-17  $\beta$  biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomised immature rats: stimulation by follicle-stimulating hormone. Endocrinology 1975; 97: 1328-1331.
- Downs SM, Buccione R, Eppig JJ. Modulation of meiotic arrest in mouse oocytes by guanyl nucleotides and modifiers of G-proteins. Journal of Experimental Zoology 1992; 262: 391-404.
- Downs SM, Ruan M, Schropfer GJ Jr. Meiosis activating sterol and the maturation of isolated mouse oocytes. Biol Reprod 2001; 64: 80-89.
- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of Kit and Kit Ligand in ovarian function. Rev Reprod 2000; 5: 143-152.
- Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. Reproductive Biology and Endocrinology 2006; 4: 16-27.
- Drummond AE, Baillie AJ, Findlay JK. Ovarian oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA expression: impact of development and oestrogen. Molec Cell Endocrinol 1999; 149: 153-161.
- Drummond AE, Le MT, Ethier JF, Dyson M, Findlay JK. Expression and localization of activin receptors, Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary. Endocrinology 2002; 143: 1423-1433.

- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology* 1998; 12: 1809-1817.
- Duckworth BC, Weaver JS, Ruderman JV. G<sub>2</sub> arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *PNAS* 2002; 99: 16794-16799.
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 1995; 9: 2795-2807.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, Rose UM, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 4891-4899.
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002a; 143: 1076-1084.
- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 5789-5796.
- Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 2002b; 124: 601-609.
- van Eijk MJ, Mandelbaum J, Salat-Baroux J, et al. Expression of leukaemia inhibitory factor receptor subunits LIFR beta and gp130 in human oocytes and preimplantation embryos. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 355-60.
- El-Fouly MA, Cook B, Nekola M, Nalbandov AV. Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 1970; 87: 288-293.
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology* 1999a; 13: 1035-1048.
- Elvin JA, Yan CN, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E-2/EP2 receptor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000a; 97: 10288-10293.
- Elvin JA, Yan CN, Matzuk MM. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000b; 159: 1-5.
- Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM. Molecular characterization of the follicular defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1018-1034.
- Emmen JM, Couse JF, Elmore SA, Yates MM, Kissling GE, Korach KS. In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and ER  $\beta$  null mice indicate a role for ER  $\beta$  in follicular maturation. *Endocrinology* 2005; 146: 2817-26.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122: 829-838.
- Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000; 163: 109-116.
- Eppig JJ, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle-stimulating hormone and insulin, *Biology of Reproduction* 1998a; 59: 1445-1453.

Eppig JJ, Vivieros MM, Marin-Bivens C, De la Fuente R. Regulation of mammalian oocyte maturation. In *The Ovary*. 2004: 113-129. Eds PCK Leung, EY Adashi. Amsterdam: Elsevier Academic Press.

Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL, Hirao Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction* 1997a; 56: 976-984.

Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 1990; 5: 511-526.

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 1985; 6: 371-99.

Erickson GF, Shimasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003; 1: 9-29.

Erickson GF, Sorensen RA. In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late, middle, and pre-antral graafian follicles. *Journal of Experimental Zoology* 1974; 190: 123-127.

Etherton TD, Bauman DE. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol Rev* 1998; 78: 745-761.

Ethier JF, Thomas FH, Vanderhyden BC. Initiation of oocyte growth in growth and differentiation factor-9 (GDF9) deficient mice precedes both initiation of follicle development and the increase in Kit ligand (KL) mRNA expression. *Biol Reprod* 2005. Abstract 420.

Faerge I, Terry B, Kalous J, et al. Resumption of meiosis induced by meiosis-activating sterol has a different signal transduction pathway than spontaneous resumption of meiosis in denuded mouse oocytes cultured in vitro. *Biol Reprod* 2001; 65: 1751-1758.

Fanjul LF, Ruiz de Galarreta CM, Hsueh AJ. Progestin augmentation of gonadotrophin-stimulated progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1983; 112: 405-407.

Farookhi R. Effects of androgen on induction of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated adenosine 3', 5'-monophosphate production in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1980; 106: 1216-1223.

Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1998; 95: 6965-6970.

Flanagan JG, Chan DC, Leder. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* 1991; 64: 1025-1035.

Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular developmental: the role of follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science* 2004; 82-83: 109-126.

Fortune JE, Vicent SE. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* 1983; 28: 1078-1089.

Freiman RN, Albright SR, Zheng S, Sha WC, Hammer RE, Tjian R. Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science* 2001; 293: 2084-2087.

Freissmuth M, Casey PJ, Gilman AG. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J* 1989; 3: 2125-2131.

Fujinaga H, Yamoto M, Shikone T, Nakano R. FSH and LH up-regulate epidermal growth factors receptors in rat granulosa cells. *Journal of Endocrinology* 1994; 140: 171-177.

Furman A, Rotmensch S, Kohen F, Mashiach S, Amsterdam A. Regulation of rat granulosa cell differentiation by extracellular matrix produced by bovine corneal endothelial cells. *Endocrinology* 1986; 118: 1878-1885.

Gadient RA, Patterson PH. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 1999; 17: 127-137.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics* 2000; 25: 279-283.

Gelety TJ, Magoffin DA. Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol Reprod* 1997; 56: 938-45.

Gill A, Jamnongjit M, Hammes SR. Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 97-104.

Gittens JE, Barr KJ, Vanderhyden BC, Kidder GM. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci* 2005; 118: 113-122.

Glister C, Groome NP, Knight PG. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *Journal of Endocrinology* 2006; 188: 215-225.

Glister C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 2004; 127: 239-254.

Goff AK, Leung PCK, Armstrong DT. Stimulatory action of follicle-stimulating hormone and androgen on the responsiveness of rat granulosa cells to gonadotrophin in vitro. *Endocrinology* 1979; 104: 1124-1129.

Gong JG, Baxter G, Bramley TA, Webb R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: A dose response study. *J Reprod Fertil* 1997; 110: 91-97.

Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Rev* 1997; 18: 502-519.

Green GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human oestrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986; 231: 1150-1154.

Green S, Walter P, Kumar W, Krust A, Bornet J-M, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986; 320: 134-139.

Grigsby ME, Trenkle A. Plasma growth hormone, insulin, glucocorticoids and thyroid hormones in large, medium and small breeds of steers with and without an estradiol implant. *Domest Anim Endocrinol* 1986; 3: 261-267.

Grondahl C, Lessl M, Faerge I, Hegele-Hartung C, Wasserman K, Ottesen JL. Meiosis-activating sterol-mediated resumption of meiosis in mouse oocytes in vitro is influenced by protein synthesis inhibition and cholera toxin. *Biology of Reproduction* 2000a; 62: 775-780.

Gross MD, Gosnell M, Tsarbopoulos A, Hunziker W. A functional and degenerate pair of EF hands contains the very high affinity calcium-binding site of calbindin-D28K. *J Biol Chem* 1993; 268: 20917-20922.

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 1322-1328.

Hallböök F, Ibañez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in xenopus ovary. *Neuron* 1991; 6: 845-858.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powel R, Galloway SM. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction* 2004; 70: 900-909.

Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P. Identification of a third distinct oestrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2000; 97: 10751-10756.

Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 1999; 140: 1236-1244.

Hegele-Hartung C, Seibel P, Peters O, Kosemund D, Muller G, Hillisch A, Walter A, Kraetzschmar J, Fritzeimer K-H. Impact of isotype-selective oestrogen receptor agonist on ovarian function. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2004; 101: 5129-5134.

Hess KA, Chen L, Larsen WJ. Inter- $\alpha$ -inhibitor binding to hyaluronan in the cumulus extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biology of Reproduction* 1999; 61: 436-443.

Hickey TE, Marrocco DL, Amato F, Ritter LJ, Norman RJ, Gilchrist RB, Armstrong DT. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 2005; 73: 825-832.

Hild-Petito S, Stouffer RL, Brener RM. Immunocytochemical localisation of oestradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 1988; 123: 2896-2905.

Hillier SG. Regulation of follicular oestrogen biosynthesis: a survey of current concepts. *J Endo Supp* 1981: 3P-18P.

Hillier SG, De Zwart FA. Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro. *Endocrinology* 1981; 109: 1303-1305.

Hillier SG, Knazek RA, Ross GT. Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: further in vitro studies using replicate cell cultures. *Endocrinology* 1977; 100: 1539-1549.

Hillier SG, Miro F. Inhibin, activin and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. *Annals of the New York Academy of Science* 1993; 687: 29-38.

Hillier SG, Ross GT. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in oestrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Biol Reprod* 1979; 20: 261-268.

Hillier SG, Tetsuka M. Role of androgens in follicle maturation and atresia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1997; 11: 249-260.

Hirai M, Hirata S, Osada T, Hagihara K, Kato J. Androgen receptor mRNA in the rat ovary and uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 49: 1-7.

Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991a; 124: 43-101.

- Hirshfield AN. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biol Reprod* 1991b; 44: 1157-62.
- Horie K, Takakura K, Fujiwara H, Suginami H, Liao S, Mori T. Immunohistochemical localisation of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to oestrogen and progesterone receptor expression. *Hum Reprod* 1992; 7: 184-190.
- Horner K, Livera G, Hinckley M, Trinh K, Storm D, Conti M. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology* 2003; 258: 385-396.
- Hosaka T, Biggs WH 3<sup>rd</sup>, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2975-2980.
- Hourvitz A, Kuwahara A, Hennebold JD, Tavares AB, Negishi H, Lee TH, Erickson GF, Adashi EY. The regulated expression of the pregnancy-associated plasma protein-A in the rodent ovary: a proposed role in the development of dominant follicles and of corpora lutea. *Endocrinology* 2002; 143: 1833-1844.
- Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 316-321.
- Hsueh AJ, Dahl KD, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin CW, Vale W. Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *PNAS* 1987; 84: 5082-5086.
- Hu Y-C, Wang P-H, Yeh S, Wang R-S, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao H-T, Tsai M-Y, Chang C. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2004; 101: 11209-11214.
- Huang EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the Kit-Ligand: KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 349-362.
- Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1987; 146: 1405-1412.
- Hutz RJ, Dierschke DJ, Wolf RC. Role of estradiol in regulating ovarian follicular atresia in rhesus monkeys: a review. *J Med Primatol* 1990; 19: 553-71.
- Huynh K, Jones G, Thouas G, Britt KL, Simpson ER, Jones ME. Estrogen is not directly required for oocyte developmental competence. *Biol reprod* 2004; 70: 1263-9.
- Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S. Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing rat ovary. *Dev Dyn* 2001; 221: 443-53.
- Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 1994; 8: 2302-2312.
- Ismail RS, Dube M, Vanderhyden BC. Hormonally regulated expression and alternative splicing of Kit Ligand may regulate Kit-induced inhibition of meiosis in rat oocytes. *Dev Biol* 1997; 184: 333-342.
- Ito M, Harada T, Tanikawa M, Fuji A, Shiota G, Terakawa N. Hepatocyte growth factor and stem cell factor involvement in paracrine interplays of theca and granulosa cells in the human ovary. *Fertility and Sterility* 2001; 75: 973-979.
- Iwai T, Fuji S, Nanbu Y, Nonogaki H, Konishi I, Mori T, Okamura H. Effect of human chorionic gonadotrophin on the expression of progesterone receptors and oestrogen receptors in rabbit ovarian granulosa cells and the uterus. *Endocrinology* 1991; 129: 1840-1848.

Iwai T, Yasuda K, Fukuoka M, Iwai T, Takakura K, Taii S, Nakanishi S, Mori T. Luteinising hormone induces progesterone receptor gene expression in cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 1991; 129: 1621-1627.

Iwamasa J, Shibata S, Tanaka N, Matsuura K, Okamura H. The relationship between ovarian progesterone and proteolytic enzyme activity during ovulation in the gonadotrophin-treated immature rat. *Biol Reprod* 1992; 46: 309-313.

Izadyar F, Dijkstra G, Van Tol HT, Van den Eijnden-van Raaij AJ, Van den Hurk R, Colenbrander B. Immunohistochemical localization and mRNA expression of activin, inhibin, follistatin, and activin receptor in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development* 1998; 49: 186-195.

Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, Lehtonen E, Ritvos O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1999; 156: 189-193.

Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: The coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med* 2005; 23(3): 234-241.

Jia XC, Kessel B, Welsh TH Jr, Hsueh AJW. Androgen inhibition of follicular-stimulating hormone stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1985; 117: 13-22.

Jimenez-Krassel F, Winn ME, Burns D, Ireland JL, Ireland JJ. Evidence for a negative intrafollicular role for inhibin in regulation of estradiol production by granulosa cells. *Endocrinology* 2003; 144: 1876-1886.

Joyce IM, Clack AT, Pendola FL, Eppig JJ. Comparison of GDF-9 and oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 1669-1675.

Joyce IM, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Regulation of prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (COX-2) mRNA expression in mouse granulosa cells during ovulation. *Endocrinology* 2001; 142: 3187-3197.

Joyce IM, Pendola FL, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Developmental Biology* 1999; 214: 342-353.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL, Lawrence SB, O'Connell AR, Laitinen MP, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O, McNatty KP. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 2002; 67: 1777-1789.

Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 1999; 60: 1263-1270.

Kaipia A, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Tumor necrosis factor-alpha and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 1996; 137: 4864-4870.

Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TL, Ross LF, Jaffe LA, Mehlmann LM. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a G protein-mediated pathway. *Developmental Biology* 2004; 267: 1-13.

Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34<sup>cdc2</sup>, cyclin B1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 1610-1616.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct oestrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone forms A and B. *Embo J* 1990; 9: 1603-1614.



Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomeli H, Nagy A, McLaughlin KJ, Scholer HR et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* 2004; 5: 1078-1083.

Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biology of Reproduction* 2005; 73: 967-973.

Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by oestrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 2003; 144: 3329-3337.

Kidder GM, Mhawi. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 2002; 123: 613-620.

Kikuchi N, Andoh K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 66-71.

Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M. *trk- $\beta$*  a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBOJ* 1989; 8: 3701-3709.

Klinger FG, De Felici M. In vitro development of growing oocytes from fetal mouse oocytes: stage-specific regulation by stem cell factor and granulosa cells *Dev Biol* 2002; 244: 85-95.

Knight PG, Glistler C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132: 191-206.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; 74: 679-691.

Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 5430-5925.

Lail-Trecker M, Gulati R, Peluso JJ. A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in regulating normal and neoplastic cells of reproductive tissues. *Journal of the Society for Gynecologic Investigations* 1998; 5: 114-121.

Laitinen M, Rutanen EM, Ritvos O. Expresión of c-kit ligand messenger ribonucleic acids in human ovaries and regulation of their steady state levels by gonadotropins in cultured granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1995; 136: 4407-4414.

Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M, Ritvos O. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanisms of Development* 1998; 78: 135-140.

Lamballe F, Klein R, Barbacid M. *trkC* a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 1991; 66: 967-979.

Lampe PD, Lau AF. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1171-1186. [PubMed: 15109565].

Lan ZJ, Gu P, Xu X, Cooney AJ. Expression of the orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor, in mouse gonads and preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2003a; 68: 282-289.

Lan ZJ, Gu P, Xu X, Jackson KJ, DeMayo FJ, O'Malley BW, Cooney AJ. GDNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *Embo J* 2003b; 22: 4070-4081.

Lara HE, Hill DF, Katz KH, Ojeda SR. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 1990a; 126: 357-363.

- Le Goascogne C, Sananes N, Gouezoe M, Baulieu EE. Testosterone-induced meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes: evidence of an early effect in the synergistic action of insulin. *Dev Biol* 1985; 109: 9-14.
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. The effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 994-999.
- Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SH, Shimasaki S, Lee S, Lee KA. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Molecular and Reproductive Development* 2004; 69: 159-163.
- Li R, Norman RJ, Armstrong DT, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 839-845.
- Li R, Phillips DM, Mather JP. Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology* 1995; 136: 849-856.
- Lidor YJ, Xu FJ, Martínez-Maza O, Olt GJ, Marks JR, Berchuck A, Ranmakrishnan S, Berek JS, Bast RCJ. Constructive production of macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 by human ovarian surface epithelial cells. *Experimental Cell Research* 1993; 207: 332-339.
- Lipner H, Greep RO. Inhibition of steroidogenesis at various sites in the biosynthetic pathway in relation to induced ovulation. *Endocrinology* 1971; 88: 602-607.
- Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. In vitro culture and in vitro maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertility and Sterility* 2002; 77: 373-383.
- Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology* 1999; 140: 2480-2485.
- Liu Y, Lin L, Zarnegar R. Modulation of hepatocyte growth factor gene expression by estrogen in mouse ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1994; 104: 173-181.
- Logan KA, Juengel JL, McNatty KP. Onset of steroidogenic enzyme gene expression during ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 2002; 66: 906-16.
- Louhio H, Hovatta O, Sjoberg J, Tuuri T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Molecular Human Reproduction* 2000; 6: 694-698.
- Loutradis D, Bletsas R, Aravantinos L, Kalliandis K, Michalas S, Phychoyos A. Preovulatory effects of the progesterone antagonist mifepristone (RU486) in mice. *Hum Reprod* 1991; 6: 1238-1240.
- Luciano AM, Peluso JJ. Effect of in vivo gonadotrophin treatment on the ability of progesterone, oestrogen and cyclic adenosine 5'-monophosphate to inhibit insulin-dependent granulosa cell mitosis in vitro. *Biol Reprod* 1995; 53: 664-669.
- Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sokocki M, Bradley A, Karsenty G. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 1995; 9: 2808-2820.
- Lutz LB, Cole LM, Grupta MK, Kwist KW, Auchus RJ, Hammes SR. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13728-13733.
- Luz Z, Xia G, Byskov AG, Andersen CY. Effects of amphotericin B and ketoconazole on mouse oocyte maturation: implications on the role of meiosis-activating sterol. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 164: 191-196.

Lyon MF, Glenister PH. Reduced reproductive performance in androgen-resistant Tfm/Tfm female mice. *Proc R Soc Land B Biol Sci* 1980; 208: 1-12.

Machelon V, Nome F, Salesse R. Comparative IL-6 effects on FSH and hCG-induced functions in porcine granulosa cell cultures. *Cellular and Molecular Biology* 1994; 40: 373-380.

Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5321-7.

Manova K, Huang EJ, Angeles M, DeLeon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer SM, Bachvarova RF. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Developmental Biology* 1993; 157: 85-99.

Marin Bivens CL, Grondahl C, Murray A, Blume T, Su YQ, Eppig JJ. Meiosis-activating sterol promotes the metaphase I to metaphase II transition and preimplantation developmental competence of mouse oocytes maturing in vitro. *Biol Reprod* 2004; 70: 1458-1464.

Matsui M, Sonntag B, Soo Hwang S, Byerly T, Hourvitz A, Adashi EY, Shimasaki S, Erickson GF. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) production in rat granulosa cells: stimulation by follicle stimulating hormone and inhibition by the oocyte-derived bone morphogenetic protein-15. *Endocrinology* 2004; 145: 3686-3695.

Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* 1990; 347: 667-669.

Matzuk MM, Krumar TR, Shou W, Coerver KA, Lau AL, Behringer RR, Finegold MJ. Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. *Recent Progress in Hormone Research* 1996; 51: 123-154.

Mayerhofer A, Dissen GA, Parrot JA, Hill DF, Mayerhofer D, Garfield RE, Costa ME, Skinner MK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: *TrkA* receptor activation inhibits gap-junctional communication between thecal cells. *Endocrinology* 1996; 137: 5662-5670.

Meyer ME, Quirin-Stricker C, Lerouge T, Bocquel MT, Gronemeyer H. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. *J Biol Chem* 1992; 267: 10882-10887.

McCann JP, Hansel W. Relationship between insulin and glucose metabolism and pituitary-ovarian function in fasted heifers. *Biol Reprod* 1986; 34: 630-641.

McGee E, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1997; 138: 2417-2424.

McGee EA, Chun SY, Lai S, He Y, Hsueh AJ. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. *Fertility and Sterility* 1999; 71: 732-738.

McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-14.

McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 2001; 64: 293-298.

McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology* 1995; 9: 131-136.

McNatty KP, Galloway SM, Wilson T, Smith P, Hudson NL, O'Connell A, Bibby AH, Heath DA, Davis GH, Hanrahan JP, Juengel JL. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* 2005; 37(Suppl I): S25-S38.

McNatty KP. Ovarian follicular development from the onset of luteal regression in humans and sheep. In *Follicular maturation and ovulation* Edited by: Rolland R, van Hall EV, Hillier SG, McNatty KP, Shoemaker J. Amsterdam, Excerpta Medica 1982: 1-18.

McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, Oconnell A, Tiddall DJ. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000; 163: 11-20.

Mehats C, Andersen CB, Filopanti M, Jin SL, Conti M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 29-35. [PubMed: 11750860].

Mehlmann LM. Stop and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005; 130: 791-799.

Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a G<sub>s</sub> protein in the oocyte. *Science* 2002; 297: 1343-1345.

Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Epping JJ, Jaffe LA. The G<sub>s</sub>-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 2004; 306: 1947-1950.

Merchant H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol* 1975; 44: 1-21.

Mitchell LM, Kennedy CR, Hartshorne GM. Effects of varying gonadotrophin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles in vitro. *Human Reproduction* 2002; 17: 1181-1188.

Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 1997; 124: 1653-1664.

Mizunuma H, Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Yokota H, Ibuki Y, Hasegawa Y. Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology* 1999; 140: 37-42.

Molento CF, Block ME, Cue RI, Peticlerc D. Effects of insulin, recombinant bovine somatotropin and their interaction on insulin-like growth factor-I secretion and milk production in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002; 85: 738-747.

Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH, McNatty KP. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 2001; 121: 843-852.

Morimoto S, Fernandez-Mejia C, Romerro-Navarro G, Morales-Peza N, Diaz-Sanchez V. Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in rats. *Endocrinology* 2001; 142: 1442-1447.

Morita Y, Manganaro TF, Tao XJ, Martimbeau S, Donahoe PK, Tilly JL. Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokinemediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology* 1999; 140: 941-949.

Morohashi KI. Gonadal and extragonadal functions of Ad4BP/SF-1: developmental aspects. *TEM* 1999; 10(5): 169-173.

Motro B, Bernstein A. Dynamic changes in ovarian c-kit and Steel expression during the estrous reproductive cycle. *Developmental Dynamics* 1993; 197: 69-79.

Motta PM, Makabe S, Naguro T, Correr S. Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy. *Arch Histol Cytol* 1994; 57: 369-394.

Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci (Usa)* 2003; 100: 9744-9749.

Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 2000; 289: 1751-1754.

Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J Reprod Fert* 1998; 113: 27-33.

Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction* 2001; 121: 89-96.

Muttukrishna S, Fowler PA, Groome NP, Mitchell GG, Robertson WR, Knight PG. Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Human Reproduction* 1994; 9: 1634-1642.

Nagyova E, Vanderhyden BC, Prochazka R. Secretion of paracrine factors enabling expansion of cumulus cells is developmentally regulated in pig oocytes. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 1149-1156.

Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocrine-Related Cancer* 1999; 6: 93-107.

Natraj U, Richards JS. Hormonal regulation, localisation and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 1993; 133: 761-769.

Nekola MV, Nalbandov AV. Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. *Biology of Reproduction* 1971; 4: 154-160.

Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188: 65-73.

Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 175: 123-30.

Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology of Reproduction* 2003; 69: 1265-1272.

Nilsson EE, Skinner MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 214: 19-25.

Nimrod A. Studies on the synergistic effect of androgen on the stimulation of progesterone secretion by FSH in cultured rat granulosa cells: progesterone metabolism of action. *Mol Cell Endocrinol* 1977; 8: 189-199.

Ojeda SR, Ramirez VD. Plasma level of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology* 1972; 90: 466-72.

Olsiewski PJ, Beers WH. cAMP synthesis in the rat oocyte. *Developmental Biology* 1983; 100: 287-293.

Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Okagaki R, Matsumi H, Hiroi H, Suenaga A, Yamo T, Taketami Y. Evidence for the presence of hepatocyte growth factor expression in human ovarian follicles. *Molecular Human Reproduction* 1999; 5: 703-707.

Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell Kit Ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8060-8065.

Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 39523-39528.

O WS, Robertson DM, de Kretser DM. Inhibin as an oocyte meiotic inhibitor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1989; 62: 307-311.

Ozornek MH, Bielfeld P, Krussel JS, Hirchenhain J, Jeyendran RS, Koldovsky U. Epidermal growth factor and leukemial inhibitory factor levels in follicular fluid. Association with *in vitro* fertilization outcome. *J Reprod Med* 1999; 44: 367-369.

Pangas SA, Rajkovic A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Human Reproduction Update* 2006; 12(1): 65-76.

Pangas SA, Rademaker AW, Fishman DA, Woodruff TK. Localization of the activin signal transduction components in normal human ovarian follicles: implications for autocrine and paracrine signaling in the ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 2644-2657.

Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pépin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E. Foxl2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *Journal of Molecular Endocrinology* 2008; 36: 399-413.

Pare JF, Malenfant D, Courtemanche C, Jacob-Wagner M, Roy S, Allard D, Belanger L. The fetoprotein transcription factor (FTF) gene is essential to embryogenesis and cholesterol homeostasis and is regulated by a DR4 element. *J Biol Chem* 2004; 279: 21206-21216.

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004; 303: 682-684.

Park OK, Mayo KE. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 967-978.

Parrot JA, Skinner MK. Developmental and hormonal regulation of keratinocyte growth factor expression and action in the ovarian follicle. *Endocrinology* 1998; 139: 228-235.

Parrot JA, Skinner MK. Developmental and hormonal regulation of hepatocyte growth factor expression and action in the bovine ovarian follicle. *Biology of Reproduction* 1998a; 59: 553-560.

Parrot JA, Skinner MK. Theca cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology* 1998b; 139: 2240-2245.

Parrot JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 1999; 140: 4262-4271.

Parrot JA, Skinner MK. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects theca cell recruitment and steroid production. *Molecular Reproduction and Development* 2000; 55: 55-64.

Parrot JA, Vigne JL, Chu BZ, Skinner MK. Mesenchymal epithelial interactions within the ovarian follicle involve keratinocyte and hepatocyte growth factor, production by theca cells and their action on granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 135: 569-575.

- Peluso JJ. Progesterone as a regulator of granulosa cell viability. *J Steroid Biochem Molec Biol* 2003; 167-173.
- Peluso JJ, Luciano AM, Pappalardo A, White BW. Cellular and molecular mechanism that mediate insulin-dependent rat granulosa mitosis. *Biol Reprod* 1995; 52: 124-130.
- Peluso JJ, Pappalardo A. Progesterone and cell-cell adhesion interact to regulate rat granulosa cell apoptosis. *Biochem Cell Biol* 1994; 72: 547-551.
- Peluso JJ, Pappalardo A. Progesterone mediates its anti-mitogenic and anti-apoptotic actions in rat granulosa cells through a progesterone binding protein with GABAA receptor like features. *Biol Reprod* 1998; 58: 1131-1137.
- Pellegrini M, Pantano S, Lucchini F, Fumi M, Forabasco A. Emx2 developmental expression in the primordial of the reproductive and excretory systems. *Anat Embryol* 1997; 196: 427-433.
- Peng XR, Hsueh AJ, LaPolit PS, Bjersing L, Ny T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology* 1991; 129: 3200-3207.
- Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol* 2001; 234: 339-51.
- Petersen DN, Tkalecivic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA. Identification of oestrogen receptor  $\beta_2$ , a functional variant of estrogen receptor  $\beta$  expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 1998; 139: 1082-1092.
- Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Mandon-Pepin B, Monniaux D, Monget P, Fabre S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 2004; 33: 805-817.
- Piontkewitz Y, Dekel N. Heptanol, an alkanol that blocks gap junctions, induces oocyte maturation. *Endocrine Journal* 1993; 1: 365-372.
- Prochazka R, Nagyova E, Brem G, Schellander K, Motlik J. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEf) in porcine follicles. *Molecular Reproduction and Development* 1998; 49: 141-149.
- Prochazka R, Nagyova E, Rimkevicova Z, Nagai T, Kikuchi K, Motlik J. Lack of effect of oocyectomy on expansion of the porcine cumulus. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991; 93: 569-576.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004; 305: 1157-1159.
- Rabinovici J, Goldsmith PC, Roberts VJ, Vaughan J, Vale W, Jaffe RB. Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 73: 1141-1149.
- Rabinovici J, Spencer S, Jaffe R. Recombinant human activin-A promotes proliferation of human luteinized preovulatory granulosa cells in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990; 71: 1396-1398.
- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004; 305: 1157-1159.
- Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I. Bovine cumulus cell expansion does not depend on the presence of an oocyte secreted factor. *Molecular Reproduction and Development* 1995; 42: 248-253.
- Reynaud K, Cortvrindt R, Smits J, Driancourt MA. Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development* 2000; 56: 483-494.

Richards JS, Jonassen JA, Rolfes AI, Kersey K, Reichert LE Jr. Adenosine 3', 5'-monophosphate, LH receptor and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of oestradiol and FSH. *Endocrinology* 1979; 104: 765-773.

Richards JS, Rolfes AI. Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles. *J Biol Chem* 1980; 225: 5481-5489.

Richards JS, Sharma SC, Falender AE, Lo YH. Expression of FKHR, FKHLI and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, oestrogen and the gonadotrophins. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 580-599.

Roberts VJ, Barth S, el-Roeiy A, Yen SS. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993; 77: 1402-1410.

Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci (Usa)* 2000; 97: 4689-4694.

Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat/ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1485-1494.

Rosenfeld CS, Murray AA, Simmer G, Hufford MG, Smith MF, Spears N, Lubahn DB. Gonadotrophin induction of ovulation and corpus luteum formation in young oestrogen receptor- $\alpha$  knockout mice. *Biol Reprod* 2000; 62: 599-605.

Ruiz de Galarreta CM, Fanjul LF, Hsueh AJ. Progesterin regulation of progesterone biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 1985; 46: 987-1002.

Sadatsuki M, Tsutsumi O, Yamada R, Muramatsu M, Taketani Y. Local regulatory effects of activin A and follistatin on meiotic maturation of rat oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993; 196: 388-395.

Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M. The murine winged-helix transcription factor Fox12 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 2004; 131: 933-942.

Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF. Progestins inhibit FSH-stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1980; 19: 165-173.

Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF. Progestins inhibit FSH-stimulated granulosa oestrogen production at a post-cAMP site. *Mol Cell Endocrinol* 1981; 21: 161-170.

Schreiber JR, Ross GT. Further characterisation of a rat ovarian testosterone receptor with evidence for nuclear translocation. *Endocrinology* 1976; 99: 590-596.

Schultz RM, Montgomery RR, Belanoff JR. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Developmental Biology* 1983a; 97: 264-273.

Schultz RM, Montgomery RR, Ward-Bailey PF, Eppig JJ. Regulation of oocyte maturation in the mouse: possible roles of intercellular communication, cAMP, and testosterone. *Developmental Biology* 1983b; 95: 294-304.

Schwall RH, Mason AJ, Wilcox JN, Basset SG, Zeleznik AJ. Localization of inhibin/activin subunit mRNAs within the primate ovary. *Molecular Endocrinology* 1990; 4: 75-79.

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, et al. Premature ovarian failure androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 224-9.



- Shim H, Anderson GB. *In vitro* survival and proliferation of porcine primordial germ cells. *Theriogenology* 1998; 49: 521-528.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 72-101.
- Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *PNAS* 1999; 96: 7282-7287.
- Shimizu T, Iijima K, Sasada H, Sato E. Messenger ribonucleic acid expressions of hepatocyte growth factor angiopoietins and their receptors during follicular development in gilts. *Journal of Reproduction and Development* 2003; 49: 203-211.
- Shomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, Korach KS. Targeted disruption of the oestrogen receptor-alpha gene in female mice: characterisation of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology* 1999; 140: 2733-44.
- Sidis Y, Fujiwara T, Leykin L, Isaacson K, Toth T, Schneyer AL. Characterization of inhibin/activin subunit, activin receptor, and follistatin messenger ribonucleic acid in human and mouse oocytes: evidence for activin's paracrine signaling from granulosa cells to oocytes. *Biology of Reproduction* 1998; 59: 807-812.
- Silva CC, Groome NP, Knight PG. Demonstration of a suppressive effect of inhibin alpha-subunit on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999; 115: 381-388.
- Silva CC, Groome NP, Knight PG. Immunohistochemical localization of inhibin/activin  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunits and follistatin in bovine oocytes during in vitro maturation and fertilization. *Reproduction* 2003; 125: 33-42.
- Silva CC, Knight PG. Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 1998; 58: 558-565.
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; 385: 525-529.
- Simpson RB, Chase CC, Spicer LJ, Carroll JA, Hammond AC, Welsh TH. Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein activity, and metabolites in ovariectomized Angus and Brahman cows. *Domest Anim Endocrinol* 1997; 14: 367-380.
- Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005; 11(5): 461-71.
- Smith J, Cortvrind R. Inhibin A and B secretion in mouse preantral follicle culture. *Human Reproduction* 1998; 13: 927-935.
- Smith J, Cortvrind R, Hu Y, Vanderstichele H. Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles. *Molecular and Reproductive Development* 1998; 50: 294-304.
- Smith LD, Ecker RE. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol* 1971; 25: 232-247.
- Sokka T, Huhtaniemi I. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production in the neonatal rat ovary. *J Endocrinol* 1990; 127: 297-303.
- Sorensen RA, Wassarman PM. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* 1976; 50: 531-536.

Törnell J, Billig H, Hillensjo T. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3', 5' -cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Acta Physiologica Scandinavica* 1990; 139: 511-517.

Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIGalpha a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 2000; 127: 4645-4654.

Spears N, Baker S, Srsen V, Lapping R, Mullan J, Nelson R, Allison V. Mouse ovarian follicles secrete factors affecting the growth and the development of like-sized ovarian follicles in vitro. *Biology of Reproduction* 2002; 67: 1726-1733.

Spelsberg TC, Steggles AW, Chytil F, O'Malley BW. Progesterone-binding components of chick oviduct. Exchange of progesterone-binding capacity from target to nontarget tissue chromatin. *J Biol Chem* 1972; 247: 1368-1374.

Spicer LJ, Chamberlain GL, Morgan GL. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during preovulatory follicular development in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 21: 1-15.

Spicer LJ, Francisco CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 1997; 138: 3373-3379.

Steckler T, Wang J, Bartol FF, Roy SK, Padmanabhan V. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 2005; 3: 3185-3193.

Steinkampf MP, Mendelson CR, Simpson ER. Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1988; 59: 93-99.

Strauss JF, Williams CJ. The Ovarian Life Cycle. In: Strauss JF, Barbieri RL, editors. *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia: Elsevier Saunders 2004: 213-253.

Szoltys M, Slomczynska M. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: 228-234.

Tanaka N, Espey LL, Stacy S, Okamura H. Epostane and indomethacin actions on ovarian kallikrein and plasminogen activator activities during ovulation in the gonadotrophin-primed immature rat. *Biol Reprod* 1992; 46: 665-670.

Taupin JL, Pitard V, Dechanet J, Miossec V, Gualde N, Moreau JF. Leukemia inhibitory factor: part of a large ingathering family. *Int Rev Immunol* 1998; 16: 397-426.

Terranova PF, Rice VM. Review: cytokine involvement in ovarian processes. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37: 50-63.

Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremmer WJ, Millar MR, Smyth CD, Hillier SG. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol* 1995; 145: 535-543.

Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth-factors. *Endocr Rev* 1994; 15: 80-101.

Thomas FH, Ethier JF, Shimasaki S, Vanderhyden BC. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. *Endocrinology* 2005; 146: 941-949.

Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction* 2001; 122: 487-495.

Thomas FH, Vanderhyden BC. KL-2 is the principal KL isoform for the promotion of murine oocyte growth and maintenance of meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod* 2005. Abstract 76.

Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006; 4: 19-26.

Tisdall DJ, Fidler AE, Smith P, Quirke LD, Stent VC, Heath DA, McNatty KP. Stem cell factor and c-kit gene expression and protein localization in the sheep ovary during fetal development. *J Reprod Fertil* 1999; 116: 277-291.

Too CK, Bryant-Greenwood GD, Greenwood FC. Relaxin increases the release of plasminogen activator, collagenase and proteoglycanase from rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology* 1984; 115: 1043-1050.

Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 1988; 333: 185-188.

Tsafriri A, Cao X, Vaknin KM, Popliker M. Is meiosis activating sterol (MAS) an obligatory mediator of meiotic resumption in mammals. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 197-204.

Tsafriri A, Popliker M, Nahum R, Beyth Y. Effects of ketoconazole on ovulatory changes in the rat: implications on the role of a meiosis-activating sterol. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 483-489.

Tuuri T, Eramaa M, Hildren K, Ritvos O. Activin-binding protein follistatin messenger ribonucleic acid and secreted protein levels are induced by chorionic gonadotropin in cultured human granulosaluteal cells. *Endocrinology* 1994; 135: 2196-2203.

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G. Fox12 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1171-1181.

Uilenbroek JThJ, Sanchez-Criado JE, Karels B. Decreased luteinizing hormone-stimulated progesterone secretion by preovulatory follicles from cyclic rats treated with the progesterone antagonist RU486. *Biol Reprod* 1992; 47: 368-373.

Urner F, Herrmann WL, Baulieu EE, Schorderet-Slatkine S. Inhibition of denuded mouse oocyte meiotic maturation by forskolin, an activator of adenylate cyclase. *Endocrinology* 1983; 113: 1170-1172.

Uzumcu M, Pan Z, Chu Y, Khun PE, Zachow RJ. Immunolocalization of the hepatocyte growth factor (HGF) system in the rat ovary and the antiapoptotic effect of HGF in rat ovarian granulosa cells *in vitro*. *Reproduction* 2006; 132: 291-299.

Uzumcu M, Zadrow R. Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reprod Toxicol* 2007; 23(3): 337-352.

Vaknin KM, Lazar S, Popliker M, Tsafriri A. Role of meiosis-activating sterols in rat oocyte maturation: effects of specific inhibitors and changes in the expression of lanosterol 14-alpha-demethylase during the preovulatory period. *Biol Reprod* 2001; 64: 299-309.

Van der Hoek KH, Woodhouse CM, Brannstrom M, Norman RJ. Effects of interleukin (IL)-6 on luteinizing hormone and IL-1  $\beta$ -induced ovulation and steroidogenesis in the rat ovary. *Biol Reprod* 1998; 58(5): 1266-1271.

Vanderhyden BC. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 98: 219-227.

Vanderhyden BC. Oocyte-secreted factors regulate granulosa cell steroidogenesis. *Zygote* 1996; 4: 317-321.

Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993; 133: 423-426.

Vanderhyden BC, Tonary AM. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte. *Biology of Reproduction* 1995; 53: 1243-1250.

de Vantéry C, Gavin AC, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. An accumulation of p34<sup>cdc2</sup> at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Developmental Biology* 1996; 174: 335-344.

de Vantéry C, Stutz A, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental Biology* 1997; 187: 43-54.

Vegeto E, Shabaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1244-1255.

Vendola KA, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Androgens promote insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Human Reprod* 1999b; 14: 2328-2332.

Vendola KA, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M, Bondy CA. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol Reprod* 1999a; 61: 353-357.

Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005; 234: 81-86.

Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 2000; 62: 370-377.

Vivarelli E, Conti M, De Felici M, Siracusa G. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differentiation* 1983; 12: 271-276.

Wang H, Andoh K, Hagiwara H, Xiaowei L, Kikuchi N, Abe Y, Yamada K, Fatima R, Mizunuma H. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. *Endocrinology* 2001; 142: 4930-4936.

Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction in Domestic Ruminants V. Reproduction Suppl* 2003; 61:71-90.

Webb RJ, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 2004; 82(Suppl): 63-74.

Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Developmental Biology* 2002b; 246: 441-454.

Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2951-2956.

Weiss J, Meeks JJ, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson JL. Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol* 2003; 23(22): 8084-8091.

Wrathall JH, Knight PG. Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. *Journal of Endocrinology* 1995; 145: 491-500.

Wu TC, Wang L, Wan YJ. Detection of oestrogen receptor messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus-oocyte complexes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Fert Steril* 1993; 59: 54-59.

- Xia G, Byskov AG, Andersen CY. Cumulus cells secrete a meiosis-inducing substance by stimulation with forskolin and dibutyric cyclic adenosine monophosphate. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 17-24.
- Xie H, Xia G, Byskov AG, Andersen CY, Bo S, Tao Y. Roles of gonadotropins and meiosis-activating sterols in meiotic resumption of cultured follicle-enclosed mouse oocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 218: 155-163.
- Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod* 1995; 53: 951-7.
- Yamashita M, Kajiura H, Tanaka T, Onoe S, Nagahama Y. Molecular mechanisms of the activation of maturation-promoting factor during goldfish oocyte maturation. *Dev Biol* 1995; 168: 62-75.
- Yamoto M, Minami S, Nakano R. Immunohistochemical localization of inhibin subunits in human corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 73: 470-477.
- Yamoto M, Minami S, Nakano R, Kobayashi M. Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1992; 74: 989-993.
- Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology* 2001; 15: 854-866.
- Yang Y, Balla A, Danilovich N, Sairam MR. Developmental and molecular aberrations associated with deterioration of oogenesis during complete or partial follicle-stimulating hormone receptor deficiency in mice. *Biol Reprod* 2003; 69: 1294-1302.
- Yki-Jarvinen H, Wahlstrom T, Seppala M. Human endometrium contains relaxin that is progesterone-dependent. *Acta Obstet Gynaecol Scand* 1985; 64: 663-665.
- Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* 1997; 184: 122-137.
- Zachos NC, Billiar RB, Albrecht ED, Pepe GJ. Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. *Biol Reprod* 2002; 67: 1148-56.
- Zachow RJ, Magoffin DA. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1997; 138: 847-850.
- Zachow RJ, Ramski BE, Lee H. Modulation of estrogen production and 17  $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase-type 1, cytochrome P450 aromatase, c-Met and protein kinase  $\beta\alpha$  messenger ribonucleic content in rat ovarian granulosa cells by hepatocyte growth factor and follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 1851-1857.
- Zachow RJ, Uzumcu M. The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 2007; 195: 359-371.
- Zachow RJ, Weitsman SR, Maggoffin DA. Hepatocyte growth factor regulates ovarian theca-interstitial cell differentiation and androgen production. *Endocrinology* 1997; 138: 691-697.
- Zachow RJ, Woolery JK. The effect on hepatocyte growth factor on cyclic nucleotide-dependent signaling and steroidogenesis in rat granulosa cells *in vitro*. *Biology of Reproduction* 2002; 67: 454-459.

diZerega GS, Hodgen GD. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr Rev* 1981; 2: 27-49.

Zhao J, Taverne MA, Van Der Weijden GC, Bevers MM, Van Den Hurk R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 967-977

Zhao J, Taverne MA, Van Der Weijden GC, Bevers MM, Van Den Hurk R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Molecular Reproduction and Development* 2001b; 58: 287-296.

Zhao L, Bakke M, Hanley NA, Majdic G, Stallings NR, Jeyasuria P, Parker KL. Tissue-specific knockouts of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 215: 89-94.

Zhou J, Chin E, Bondy C. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* 1991; 129: 3281-3288.

## **CAPÍTULO 3:**

### **REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS.**

Galder Valbuena Angulo, Francisco José Sáez Crespo.

#### Índice

1.- REGULACIÓN EN MAMÍFEROS. ....	94
1.1.- Regulación hormonal.....	94
1.2.-Regulación paracrina.....	97
2.- REGULACIÓN EN URODELOS. ....	100
2.1.-Regulación hormonal.....	100
2.2.-Regulación paracrina.....	102
2.3.-Punto de control.....	103
3.- REGULACIÓN EN ANUROS.....	104
4.- CONCLUSIONES. ....	105
5.- BIBLIOGRAFÍA. ....	106

La espermatogénesis es un modelo de diferenciación celular a través del cual se va a originar una célula muy especializada, la célula sexual masculina o espermatozoide. Los tipos celulares en los que se transforma la célula germinal primordial, célula madre del proceso espermatogénico, hasta llegar a formar el espermatozoide son comunes en todos los vertebrados. El proceso comienza a partir de esta célula germinal primordial, que se va a dividir para originar una del mismo tipo y una espermatogonia primaria. Esta espermatogonia primaria tras varias divisiones mitóticas, da origen a las espermatogonias secundarias, las cuales se desarrollan para dar los espermatocitos, que son las células que van a entrar en meiosis. Tras la primera división meiótica se transforman en espermatocitos secundarios, para terminar dando espermátidas al culminar el proceso meiótico. A continuación, estas espermátidas sufren una serie de transformaciones morfológicas hasta obtener el espermatozoide. El conjunto de estas transformaciones se engloba bajo el nombre de espermiogénesis. En la mayoría de los animales, la espermatogénesis se lleva a cabo en unos órganos denominados testículos. Cada testículo está generalmente formado por el epitelio germinal, que contiene tanto las células germinales como las somáticas, rodeadas por otros tejidos. Este órgano es responsable de varias funciones, como la producción de los espermatozoides y la producción y liberación de las hormonas sexuales masculinas.

Aunque la mayor parte de los trabajos de investigación se centran en el estudio de la espermatogénesis de mamíferos, los anfibios poseen testículos con una organización histológica y anatómica que los convierten en modelos interesantes para el estudio de la espermatogénesis y de la producción de hormonas androgénicas: sus células germinales se desarrollan sincrónicamente rodeadas por las células foliculares, formando un espermatocisto o cisto, que crece en el interior de los lobulillos, y estos, de los lóbulos (Lofts, 1974). Los anfibios son vertebrados que se clasifican en tres órdenes. El mayor de todos ellos, en el que se agrupan más de dos tercios de los anfibios, es el orden Anura (ranas y sapos). Los otros dos órdenes son Urodela (tritones y salamandras) y los Apoda, un pequeño grupo de anfibios carentes de patas. Los anfibios son el más primitivo grupo de vertebrados terrestres, y la mayoría de las especies necesitan regresar a un ambiente acuoso para poder reproducirse.

La espermatogénesis se encuentra regulada principalmente por un mecanismo hormonal, aunque también existe un mecanismo de control paracrino. A pesar de ser semejantes, diferenciaremos el control de mamíferos del de los urodelos y anuros.

## 1.- REGULACIÓN EN MAMÍFEROS.

### 1.1.- Regulación hormonal.

La regulación hormonal de la espermatogénesis está basada en un sistema integrado por varias glándulas. La primera de ellas es el hipotálamo, regulado mediante señales que provienen tanto del sistema nervioso central como de los testículos. Estas señales controlan la producción y la secreción de la hormona



liberadora de gonadotropinas o GnRH. La liberación de esta hormona por parte del hipotálamo se realiza a pulsos, que son esenciales para la producción y liberación de las gonadotropinas por parte de la segunda glándula implicada en el proceso, la hipófisis anterior o glándula pituitaria. Las hormonas gonadotrópicas son la hormona luteneizante (LH) y la hormona estimuladora de los folículos (FSH), secretadas en respuesta a la GnRH. Ambas, a través del torrente sanguíneo, van a unirse a receptores específicos de las células de Leydig y de Sertoli respectivamente, ambos tipos celulares presentes en los testículos.

La hormona FSH va a controlar, entre otros factores, la entrada de las células germinales primordiales en el proceso espermatogénico y las divisiones mitóticas de las espermatogonias. Actúa a través de receptores asociados a proteínas G, situados sólo en las células de Sertoli. El rendimiento en la producción de espermatozoides se eleva bajo su acción, evitando además la degradación de las espermatogonias primarias. Es necesaria durante el desarrollo para estabilizar las funciones de las células de Sertoli. En los testículos inmaduros, controla la proliferación de las células de Sertoli (Orth, 1993). Ya en edad adulta, la espermatogénesis es dependiente de esta hormona. La secreción de esta hormona se encuentra controlada por retroalimentación negativa a través de la testosterona, el estradiol y de las inhibinas, unas hormonas testiculares, producidas por las células de Sertoli (Hayes y cols., 2001). Si se produce un descenso en la espermatogénesis disminuye el nivel de inhibinas, y esta reducción se asocia con un aumento en los niveles de FSH. También se controla mediante un mecanismo paracrino, mediado por las activinas, de las que hablaremos posteriormente.

La segunda hormona gonadotrópica, la LH, se encarga de elevar los niveles testiculares de testosterona (T), realizando su acción sobre las células de Leydig. Esta otra hormona, la testosterona, es el inhibidor primario de la secreción de la LH, también mediante retroalimentación negativa. Puede ser metabolizada en tejidos periféricos a dihidrotestosterona (DHT), un potente andrógeno, o a estradiol, un estrógeno. Estos andrógenos y estrógenos actúan de manera independiente de la secreción de la LH.

Además de las hormonas ya mencionadas, el proceso espermatogénico se encuentra regulado por otras hormonas. Por un lado se encuentra la testosterona, andrógeno producido por las células de Leydig, que promueve la función de las células de Sertoli; por otro, el estradiol, producido por las células de Sertoli, al igual que las inhibinas.

La T es liberada al torrente sanguíneo y actúa sobre el hipotálamo y la hipófisis. En estas glándulas actúa como regulador en la liberación tanto de la LH como de la FSH si actúa sobre el hipotálamo, disminuyendo la liberación de la GnRH. También actúa como regulador de la LH si actúa sobre la hipófisis, impidiendo su liberación. Actuando por retroalimentación negativa es un regulador importante de la espermatogénesis.

La T es esencial para el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis. Actúa uniéndose a receptores de andrógenos (AR), que en los testículos se encuentran en las células de Sertoli, células tubulares y en las propias células de Leydig. Su mecanismo de acción en los testículos entraría dentro del control paracrino.

Otras moléculas que intervienen en el control hormonal de la espermatogénesis pertenecen al grupo de los llamados factores de crecimiento, que como veremos también intervienen en el control paracrino de la espermatogénesis. Los factores de crecimiento más importantes para la función testicular pertenecen a la superfamilia TGF- $\beta$ , y son las inhibinas y las activinas (Mather y cols., 1997). De las inhibinas existen dos formas, que son la inhibina A y la inhibina B (Ling y cols., 1985; Robertson y cols., 1985). Ambas son dímeros disulfuro que comparten la subunidad  $\alpha$ , diferenciándose en la subunidad  $\beta$ , siendo  $\beta_A$  en la inhibina A ( $\alpha\beta_A$ ) y  $\beta_B$  en la inhibina B ( $\alpha\beta_B$ ). Ambas tienen la capacidad de suprimir la secreción de la hormona FSH de la hipófisis, sin afectar a la secreción de la otra hormona gonadotrópica, la LH. Por su parte, de las activinas existen tres tipos distintos, denominados activina A, activina B y activina AB, estimulando todas ellas la secreción de la FSH (Ling y cols., 1986; Vale y cols., 1986). Están compuestas por heterodímeros o por homodímeros disulfuro de las subunidades  $\beta$  de las inhibinas, siendo  $\beta_A\beta_A$  la composición para la activina A,  $\beta_B\beta_B$  para la activina B y  $\beta_A\beta_B$  para la activina AB.

Existen otras tres subunidades  $\beta$ , denominadas  $\beta_C$  y  $\beta_D$  (sólo en *Xenopus*) y la  $\beta_E$ , que forman las activinas C, D y E respectivamente (Hötten y cols., 1995; Oda y cols., 1995; Fang y cols., 1996). Estas no tienen efecto en la secreción de la FSH, pero la subunidad  $\beta_C$  es capaz de formar heterodímeros con las subunidades  $\beta_A$  y  $\beta_B$  (Mellor y cols., 2000), por lo que indirectamente puede controlar la secreción de la FSH impidiendo la formación de las activinas A y B.

Los principales órganos de producción de las inhibinas son el testículo y el ovario. Ejercen su acción, llegando a través del torrente circulatorio, en la hipófisis, suprimiendo la secreción de la FSH. El testículo es el órgano que más contribuye a los niveles de inhibina circulante. Las inhibinas tienen una vida media mayor que la T. La subunidad  $\alpha$  se produce sólo en el interior de las células de Sertoli (Cuevas y cols., 1987; Shaha y cols., 1989; Kaipia y cols., 1993; Majdic y cols., 1997; Noguchi y cols., 1997), siendo las células de Sertoli el principal lugar de producción de inhibinas en los varones. La secreción de estas inhibinas se encuentra regulada principalmente por la hormona FSH, que regula la producción del m-RNA de la subunidad  $\alpha$  (Steinberger y Steinberger, 1976; Le Gac y de Krester, 1982; Hancock y cols., 1992).

Por su parte, las activinas ejercen su acción en la secreción de la FSH a través de mecanismos paracrinos en la hipófisis (Corrigan y cols., 1991). Entre otros lugares, las subunidades  $\beta_A$  y  $\beta_B$  se producen en la misma hipófisis, y actúan localmente estimulando la secreción de la FSH (Roberts y cols., 1989). Tienen un amplio espectro de mecanismos de acción (Woodruff, 1998). Existen reservas de estas activinas en varios órganos, generalmente unidas a proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG), hecho que se confirma con la

capacidad que tiene la heparina, una vez se difunde por el torrente circulatorio, de estimular liberaciones rápidas y grandes de activinas y de folistatina (otra hormona) (Klein y cols., 1996; Phillips, 2000). Al contrario que con las inhibinas, los testículos no contribuyen significativamente a los niveles circulatorios de las activinas, aunque se haya encontrado el m-RNA y proteínas de las subunidades  $\beta_A$  y  $\beta_B$  en las células de Sertoli tanto de la rata (Toboesch y cols., 1988; Kaipia y cols., 1992; Majdic y cols., 1997) como del ser humano (Anderson y cols., 1998a). Las células intersticiales secretan activina A in vitro (Lee y cols., 1989; de Winter y cols., 1994) y estudios inmunocitoquímicos en los testículos humanos han identificado la proteína  $\beta_B$  en espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátidas redondas, por lo que también pueden ser lugares para la producción de activina B (Andersson y cols., 1998b).

## 1.2.-Regulación paracrina.

Las funciones testiculares, que son la producción de andrógenos y la maduración de los gametos, se encuentran reguladas principalmente mediante el control endocrino (Weinbauer y Nieschlag, 1998). Sin embargo, y debido a la complejidad de los eventos que tienen lugar en el interior de los testículos, se hace necesario un mecanismo de regulación local. Es decir, que las funciones de los testículos y, por tanto, la de sus compartimentos, se encuentran influenciadas primariamente por el hipotálamo y la hipófisis, pero en el testículo existen otros reguladores locales (paracrinos y autocrinos) que modulan las acciones de las hormonas en las células germinales y somáticas.

Por definición, los factores paracrinos son aquellos que se liberan a los espacios intercelulares, se transportan por difusión y actúan en otros tipos celulares que se encuentren próximos a la célula que ha liberado el factor. Por el contrario, los factores que actúan sobre el mismo tipo celular que los ha liberado se denominan autocrinos. Son varios los factores involucrados en este tipo de control, de los que hablamos a continuación.

El primero de estos factores es la T. Aunque realice funciones endocrinas en otros órganos (masa muscular, eritropoyesis...), en los testículos tiene una función paracrina. Estimula la espermatogénesis, aunque indirectamente, ya que sólo puede unirse a las células somáticas testiculares. Debido a su naturaleza lipofílica, es capaz de atravesar las membranas fácilmente y alcanzar las células diana por simple difusión pasiva. En los testículos actúa tras su conversión en dihidrotestosterona (DHT), gracias a la enzima  $5\alpha$ -reductasa. En dosis comparativas, la DHT es tan efectiva como la T en la estimulación de la espermatogénesis (Singh y cols., 1995).

Este andrógeno también interviene en la diferenciación morfológica y funcional de las células somáticas testiculares en etapas previas al inicio de la actividad espermatogénica. Por ejemplo, las células Leydig se diferencian a partir de fibroblastos bajo el control de la relación LH/andrógenos (Teerds y cols., 1994), o las células peritubulares de los primates, que son células miodes con capacidad de contraerse, cuya maduración se encuentra inducida por los

andrógenos. Es la T, más que la FSH, la que desempeña un papel más importante en la maduración de las células de Sertoli, ya que induce la creación del patrón de distribución de la actina filamentosa y monomérica dentro de estas células. Se necesita una correcta organización morfológica y funcional de las células de Sertoli para mantener el contacto con las espermátidas durante la espermiogénesis. En la rata, la FSH estabiliza a las células de Sertoli para unirse a las espermátidas redondas (Cameron y cols., 1993), mientras que la T estimula la unión de las espermátidas sólo en presencia de la FSH. Parece ser que la N-cadherina es el mediador entre la interacción del control endocrino entre las células de Sertoli y las espermátidas (Perryman y cols., 1996).

El segundo de estos factores es el receptor de andrógenos, que es un factor de transcripción que en los testículos se encuentra localizado en las células de Leydig, de Sertoli y peritubulares. Aparentemente, las células germinales carecen de este receptor (Bremmer y cols., 1994; van Roijen y cols., 1995), aunque no se ha descartado su presencia en espermátidas tardías (Vornberger y cols., 1994). Parece que los efectos de los andrógenos en las células germinales son dependientes del grado de maduración en que se encuentren (Bremmer y cols., 1994). La FSH y la testosterona influyen en la expresión del receptor de andrógenos, y en los testículos humanos se ha visto que hay una expresión dependiente de estado de este receptor (Suarez-Quian y cols., 1999).

Por otra parte, la proteína transportadora de andrógenos (ABP) participa en el transporte de la T. La T se sintetiza en el compartimento intersticial, en las células de Leydig. Como ya se ha mencionado, puede difundirse fácilmente debido a su naturaleza lipofílica, pero no puede excluirse otros mecanismos de transporte más específicos. La ABP se produce en las células de Sertoli y se secreta al fluido intersticial y al de los túbulos seminíferos (Danzo y Eller, 1985), por lo que podría participar en la distribución testicular e intratubular de los andrógenos. La producción de esta proteína se encuentra regulada por la T y por la FSH. Así, se ha comprobado que una deficiencia en los niveles de gonadotropinas disminuye el contenido testicular de la ABP (Danzo y cols., 1990; Huang y cols., 1991, 1992).

Esta proteína transportadora de andrógenos se encuentra implicada en el control de la espermatogénesis. Por ejemplo, el ratón transgénico con una sobreexpresión de la ABP de rata, tiene una reducción en su fertilidad (Larriba y cols., 1995; Joseph y cols., 1997). Puede explicarse, bien porque niveles elevados de ABP capturen andrógenos, regulando la disponibilidad biológica de la T evitando su acción sobre las células germinales, bien porque la ABP de rata compita con la de ratón.

Otro factor implicado es el estradiol, un estrógeno esteroideo considerado regulador local de la espermatogénesis. La presencia de los receptores de estrógenos en los testículos de los vertebrados se comprobó hace varios años (Fasano y Pierantoni, 1993), realizando funciones importantes en la espermatogénesis. Por ejemplo, los ratones carentes del receptor  $\alpha$  tienen alteraciones espermatogénicas y son estériles (Lubahn y cols., 1993; Eddy y cols., 1996). En estos animales se pierde la reabsorción de los fluidos en los

conductos eferentes (Hess y cols., 1997), ya que el estradiol regula la expresión de la proteína acuaporina-1. Los estrógenos también influyen en las células germinales, al comprobar que en un ratón hipogonadal se puede inducir la espermatogénesis (Ebling y cols., 2000). Existe un segundo receptor de estrógenos, el  $\beta$  (Kuiper y Guatafsson, 1997). Ambos receptores se encuentran presentes tanto en los conductos eferentes como en el epidídimo. Además, en el interior de los testículos el receptor  $\alpha$  se expresa en las células de Leydig, mientras que el  $\beta$  se encuentra presente en las células de Sertoli y en las células germinales mitóticas y meióticas (Saunders, 1998), lo que sugiere un papel en la espermatogénesis, aunque su falta no altere la fertilidad (Krege y cols., 1998). Existe una fuente de estrógenos intratesticular, ya que se ha detectado actividad de la P450 aromatasa en los espermatocitos en fase de paquiteno y en las espermátidas redondas y alargadas (Janulis y cols., 1996; Levallet y cols., 1998).

Existen otras moléculas implicadas en la regulación de la espermatogénesis. Las citoquinas son proteínas de secreción, entre las que se encuentran los interferones, los factores de necrosis tumoral y las interleucinas. De entre todas ellas, se ha sugerido la intervención del factor de necrosis tumoral en la comunicación entre las células de Sertoli y las células germinales (Benahmed, 1997), y parece que el factor inhibidor de la leucemia se encuentra implicado en el control autocrino de la proliferación de las células de Sertoli (Hara y cols., 1998). Por otra parte, a la interleucina-1 ( $IL-1$ ) $\alpha$  se la ha relacionado con la síntesis de DNA tanto en las espermatogonias como en las células meióticas de los testículos de rata, mientras que ratones carentes del receptor para esta proteína continúan siendo fértiles (Cohen y Pollard, 1998).

A diferencia de las citoquinas anteriores, existe una citoquina cuya necesidad en la espermatogénesis es esencial. Se trata del factor de células madre (stem cell factor, SCF) (Loveland y Schlatt, 1997), también llamado Steel Cell Factor. El SCF es el ligando para el receptor tirosina kinasa c-kit. Este sistema tiene una función crucial en la supervivencia de las células germinales (Packer y cols., 1995; Hakovirta y cols., 1999) y de Leydig (Yan y cols., 2000a), en la proliferación y diferenciación de las células germinales (Yoshinaga y cols., 1991; Manova y cols., 1993; Vincent y cols., 1998; Sette y cols., 2000), además de evitar la apoptosis de estas células en los testículos de mamíferos in vitro (Yan y cols., 2000b). El SCF se sintetiza en las células de Sertoli (Motro y cols., 1991; Rossi y cols., 1993; Tajima y cols., 1991), mientras que el receptor c-kit se expresa en las espermatogonias y en las células de Leydig (Manova y cols., 1990; Motro y cols., 1991; Sorrentino y cols., 1991). Su importancia es tal que los ratones carentes de uno de los componentes de este sistema, bien de SCF o bien de c-kit, son estériles, ya que sus gónadas carecen de células germinales (Munsie y cols., 1997). También intervienen en la migración de las células germinales primordiales en los testículos de los neonatos, que depende de la expresión de c-kit y de la provisión de su ligando por parte de las células de Sertoli (Orth y cols., 1997). Además, en los ratones y ratas el sistema c-kit/SCF es imprescindible para la diferenciación espermatogénica (Tajima y cols., 1991; Dym y cols., 1995). Este importante sistema regulador se encuentra controlado hormonalmente, ya que la expresión testicular de SCF se regula por la FSH

(Rossi y cols., 1993). En los humanos, el receptor c-kit se expresa en las espermatogonias, mientras que SCF se sintetiza en las células de Sertoli (Strohmeier y cols., 1995; Sandlow y cols., 1997).

Otras moléculas implicadas en el control paracrino de la espermatogénesis son los factores de crecimiento. Son moléculas polipeptídicas que se unen a receptores de superficie situados en las células diana, en las que provocan la activación de las vías de transducción de señales involucradas en la división y diferenciación celular. Su acción puede ser tanto activadora como inhibitoria. Algunos de estos factores, como el FGF (Fibroblast growth factor) y el IGF (Insulin-like growth factor), se han encontrado en las células de Sertoli y en las células germinales. Por otra parte, otros factores, como el EGF (Epidermal growth factor)/TGF (Transforming growth factor), se encuentran específicamente implicados en la supervivencia y proliferación de las espermatogonias primarias de rata (Haneji y cols., 1991).

## 2.- REGULACIÓN EN URODELOS.

### 2.1.-Regulación hormonal.

Al igual que ocurre en mamíferos, las hormonas de la hipófisis y los factores locales son los encargados de regular la espermatogénesis en anfibios (Fasano y Pierantoni, 1993).

La presencia de las hormonas gonadotrópicas en la hipófisis de los tritones se ha demostrado tanto por el aislamiento de los cDNA de la FSH $\beta$  y de la LH $\beta$  como por la detección inmunocitoquímica de los antígenos en esta glándula (Saito y cols., 2002). Sin embargo, en estos animales la espermatogénesis no es continua, tienen un ciclo anual, variando los niveles de las gonadotropinas a lo largo del año. Por ejemplo, en julio, cuando los niveles de las gonadotropinas y de la espermatogénesis son elevados, aumentan los niveles de la FSH secretada desde la hipófisis, presentando dos picos máximos, mientras que los niveles de la LH no varían (Tanaka y Takikawa, 1984). En febrero, los niveles de ambas hormonas presentan valores similares. Por su parte, los niveles de T plasmática muestran también dos picos máximos distintos, uno de ellos a principios de primavera (finales de febrero) y otro en otoño (octubre), mientras que el nivel mínimo de secreción es en julio (Tanaka y Takikawa, 1984). Por otra parte, la DHT muestra tres picos. El más alto de ellos es en mayo, y los otros dos, más pequeños, se dan al comienzo de la primavera y otoño. También presenta cambios estacionales el 17 $\beta$ -estradiol, que muestra dos picos, uno en mayo y otro en verano. En el anfibio urodelo *Necturus maculosus* la enzima aromatasa es muy activa y al inyectar FSH ovina se estimula, ante todo, la secreción del estrógeno (Callard y cols., 1978; Bolaffi y Callard, 1981). Estos resultados pueden indicar una relación funcional entre la producción de estrógenos por los testículos y la regulación de la espermatogénesis en los anfibios urodelos (Tanaka y Takikawa, 1984), pero el papel de los estrógenos en la espermatogénesis no está muy claro.

Debido al hecho de que todavía no se han aislado ni la FSH ni la LH de tritón, aunque sí los receptores de la FSH (Nakayama y cols., 2000), algunos investigadores han estudiado los efectos de la FSH y de la LH de mamíferos y de otros anfibios en estos animales. Por ejemplo, si se inyectan gonadotropinas de mamíferos a un adulto hipofisectomizado de *Triturus cristatus carnifex*, se estimula la maduración de las espermatogonias hasta espermatocitos primarios en estado de paquiteno (Vellano y cols., 1974). Por otra parte, inyecciones de FSH a machos de *Pleurodeles waltl* hipofisectomizados promueven la espermatogénesis y carecen de efectos en el tejido glandular, mientras que la inyección de LH causa reacciones en este tejido, pero no cambios en las células germinales (Andrieux y cols., 1973). Idénticas inyecciones en larvas de *Ambystoma trigrinum* hipofisectomizadas estimulan la proliferación de las espermatogonias secundarias y su diferenciación a espermatocitos (Moore, 1975). Por su parte, en *Cynops pyrrhogaster*, la FSH ovina promueve la espermatogénesis, mientras que la LH promueve la producción de testosterona (Tanaka y Takikawa, 1984). En estos animales con un ciclo reproductivo anual, uno de los factores más importantes en la regulación de la espermatogénesis es la temperatura. La FSH resulta ser más potente a temperaturas altas (18°C), mientras que la LH es más eficiente a temperaturas bajas (8°C).

Si se inyectan gonadotropinas de anfibio en vez de mamíferos, la temperatura mantiene un papel destacable en el control. Esto ocurre in vivo, pero si los testículos son troceados y cultivados a diferentes temperaturas en presencia de LH y de FSH de otro anfibio, la rana toro (*Lithobates catesbeianus*), la producción de testosterona por parte de la LH aumenta a medida que lo hace la temperatura. Por otro lado, otro efecto de la temperatura y las gonadotropinas de anfibios lo podemos ver in vivo, en tritones hipofisectomizados a los que se les inyectan estas hormonas y se mantienen a 8 y a 18°C. En el grupo de 18°C, el peso testicular del control hipofisectomizado (sin inyección hormonal) disminuye con respecto al control intacto, mientras que el peso testicular del grupo hipofisectomizado tratado con LH decrece más que el grupo hipofisectomizado control, lo que indica que la LH induce la liberación de los espermatozoides maduros. En los tritones tratados con FSH el peso testicular es mayor que en el grupo hipofisectomizado control y mantiene un valor similar al control intacto, sin hipofisectomizar. En el grupo de 8°C, no existen diferencias significativas entre el grupo control intacto, el grupo control hipofisectomizado y los tritones tratados con FSH, pero la LH también induce la espermiación a esta temperatura. El nivel de testosterona plasmática, que en tritones hipofisectomizados disminuye drásticamente, es restaurado de un modo efectivo por la LH. Sus efectos son más potentes a 8°C que a 18°C. Por otro lado, la FSH no induce un aumento significativo en los niveles plasmáticos de T a ninguna de las temperaturas, lo que indica una diferencia dependiente de la temperatura en la respuesta de los testículos in vitro e in vivo a la LH y FSH (Tanaka y cols., 2004).

## 2.2.-Regulación paracrina.

Para averiguar los diferentes mecanismos moleculares por los que se regula el inicio de la meiosis, el Dr. Sin-Ichi Abé desarrolló un sistema de cultivo de órganos con un medio químicamente definido (Ji y cols., 1992; Abé y Ji, 1994). Si los fragmentos testiculares constituidos únicamente por espermatogonias se cultivan en este medio suplementado además con FSH porcina, las espermatogonias proliferan y se diferencian a espermatocitos, y estos a espermátidas. Ni la adición de LH ni de andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona) al medio basal estimula su diferenciación. Se ha comprobado que la FSH se une a las células de Sertoli, pero no así a las células germinales (Ji y cols., 1995; Ito y Abé, 1999).

Debido a la función crucial que tiene el sistema SCF/c-kit en la espermatogénesis de mamíferos, se espera que se encuentre también implicado en la espermatogénesis de los tritones. Estudios realizados *in vitro* muestran que la adición de SCF recombinante humano (RhSCF) a cultivos testiculares de tritón estimula la proliferación espermatogónica y que estas espermatogonias progresan hasta la 7ª generación, que es el penúltimo estado antes de diferenciarse a espermatocitos. Sin embargo, no se diferencian a espermatocitos, sino que mueren por apoptosis (Abé y cols., 2002). Se concluye que el sistema SCF/c-kit desempeña un papel importante en la espermatogénesis de tritón, estimulando la proliferación de las espermatogonias, pero no su entrada en meiosis. De hecho, la FSH promueve la proliferación de las espermatogonias principalmente a través de la activación de la expresión de SCF en las células de Sertoli.

La proliferación espermatogónica se encuentra también controlada por otro factor de crecimiento, el IGF-I (Insulin growth factor-I). Tanto el IGF-I como el IGF-II recombinantes de humanos (rhIGF-I y rhIGF-II), así como la insulina humana, promueven la diferenciación de las espermatogonias a espermatocitos primarios en cultivos de fragmentos de testículo de tritón (Nakayama y cols., 1999). Este fenómeno es dependiente de la dosis, siendo más efectivo el IGF-I que el IGF-II, teniendo menor efecto la insulina. Se ha comprobado que la adición de FSH porcina (pFSH) a cultivos de fragmentos de testículos de tritón incrementa significativamente la expresión del mRNA de IGF-I, hecho que sugiere que la diferenciación de las espermatogonias secundarias a espermatocitos se encuentra, al menos parcialmente, mediada por el IGF-I de las células somáticas, y que la expresión del mRNA de IGF-I se encuentra autorregulada. Resultados similares se han observado en mamíferos, en los que la FSH aumenta la expresión del mRNA de IGF-I en los testículos de ratas hipofisectomizadas adultas (Closset y cols., 1989), además de estimular la producción de IGF-I en los cultivos de células de Sertoli del cerdo (Naville y cols., 1990) y la rata (Cailleau y cols., 1990). Así, la FSH puede regular la producción de IGF-I entre los vertebrados.



### 2.3.-Punto de control.

En los anfibios urodelos y como consecuencia de la reproducción estacional, se produce el proceso de muerte celular programada o apoptosis. La muerte celular programada ocurre en los testículos de varias especies (Roosen-Runge, 1977) incluyendo el tritón, ya que posteriormente se ha visto que la muerte celular que ya se describió en los tritones (Galgano, 1944) es por apoptosis, durante la transición de espermatogonia a espermatocito, cuando la temperatura ambiente disminuye naturalmente. Esta es la causa por la que no se produce la espermatocitogénesis o diferenciación de los espermatocitos primarios en otoño, cuando los espermatozoides maduros se encuentran casi formados.

Existe otra hormona hipofisaria, la prolactina (PRL), que se encuentra asociada con varios fenómenos reproductivos en los urodelos, tales como la adaptación al ambiente reproductivo, el comportamiento sexual, el desarrollo de los órganos reproductores y los caracteres sexuales (Chadwick, 1941; Kikuyama y cols., 1975; Kikuyama y cols., 1986; Kikuyama y Toyoda, 1999). La administración de PRL ovina al tritón crestado (*Triturus cristatus carnifex*) induce la muerte celular de las espermatogonias, mientras que la co-inyección de FSH evita este proceso (Mazzi y cols., 1967; Mazzi y Vellano, 1968). Por otro lado, la inyección intraperitoneal de PRL ovina en el tritón japonés de vientre rojo (*Cynops pyrrhogaster*) induce la degeneración de las espermatogonias de los cistos situados al lado de la línea de frontera entre las zonas de espermatogonias y espermatocitos (Yazawa y cols., 2000). No sólo la inyección, sino que la adición de PRL al medio de cultivo de órganos testiculares induce también la muerte de las espermatogonias, lo que demuestra que la PRL actúa en los testículos de un modo directo. Esta degeneración espermatogónica es proporcional a la concentración de PRL, mientras que la FSH inhibe la acción de esta hormona de manera dependiente de dosis. Resumiendo, la FSH y la PRL actúan de forma antagónica.

Esta apoptosis de las espermatogonias se produce también cuando la temperatura ambiental es baja (12 y 8°C), pero no así cuando es alta (18 y 22°C) (Yazawa y cols., 1999). El hecho de que a bajas temperaturas las concentraciones de PRL en el plasma sean elevadas permite una interpretación de los eventos fisiológicos que ocurren in vivo en la naturaleza. En primavera, a medida que la temperatura va en ascenso, la relación de las concentraciones de FSH/PRL en el plasma también aumenta, ya que la cantidad de la PRL secretada por la hipófisis es reducida, mientras que la de la FSH aumenta (Tanaka y Takikawa, 1984). Esto previene la muerte de las espermatogonias y permite su diferenciación a espermatocitos primarios. Por otra parte, en otoño, al descender las temperaturas, la razón FSH/PRL también disminuye, debido al aumento en la secreción de PRL por parte la hipófisis y al descenso en la secreción de FSH, causando la muerte de las espermatogonias y el cese de la espermatocitogénesis. El significado fisiológico de este fenómeno es que la espermatogénesis se complete en otoño y que los testículos no formen más espermatocitos primarios innecesarios para el resto del año.

Se ha postulado la existencia de un punto de control, basándose en el hecho de que, como ya se ha mencionado, la FSH de mamíferos induce la diferenciación de las espermatogonias secundarias en espermatocitos primarios en cultivos orgánicos de fragmentos testiculares, mientras que en un medio carente de esta hormona las espermatogonias no se diferencian a espermatocitos. Sin FSH las espermatogonias mantienen su actividad proliferativa y viabilidad, progresan hasta la 7ª generación, pero se vuelven moribundas durante la fase G2/M, por lo que la 8ª y última generación de espermatogonias, previa a los espermatocitos, nunca aparece, lo que sugiere que la muerte celular es la principal razón por la que no se forman espermatocitos en ausencia de FSH (Yazawa y cols., 2002). La FSH es indispensable para la culminación de última mitosis de las espermatogonias. Por otro lado, la muerte celular en las espermatogonias de tritón está inducida por la PRL, tanto in vivo (Mazzi y cols., 1967; Yazawa y cols., 1999; Kikuyama y cols., 2000; Yazawa y cols., 2000) como in vitro (Yazawa y cols., 2000, 2001) y también en un estadio específico, el penúltimo. Esto sugiere la presencia de un punto de control para que las espermatogonias se diferencien en el penúltimo estadio de la fase mitótica. Cuando la razón de concentración FSH/PRL es elevada (en época cálidas), las espermatogonias realizan las correspondientes 7 divisiones mitóticas y entran en meiosis. En cambio, si la razón es baja (época fría), las espermatogonias no pueden completar la 7ª división mitótica, muriendo por apoptosis. Una cantidad suficiente de FSH puede evitar el punto de control activando a las células de Sertoli para que puedan producir algunos factores que prevengan a las espermatogonias de la apoptosis y entren en meiosis. Este punto de control se encuentra regulado por la dopamina, hormona liberada cuando la temperatura ambiente es templada y que suprime la liberación de la PRL por parte la hipófisis. En épocas frías, el hipotálamo no segrega dopamina, lo que permite la liberación de PRL por parte de la hipófisis, disminuyendo la razón FSH/PRL e induciendo la muerte celular y el cese de la espermatocitogénesis.

El cese de la producción de espermatocitos también se da en tiburones (Simpson y Wardle, 1967) y rana (Champy, 1913; Aron, 1926) durante los meses de primavera. Parece que este punto de control está conservado evolutivamente, al menos desde condriactos a anfibios, y contribuye al control estacional de la espermatogénesis en los vertebrados de sangre fría.

### 3.- REGULACIÓN EN ANUROS.

La regulación espermatogénica en anuros es similar a la de urodelos, por lo que sólo comentaremos de forma somera algunas peculiaridades. En estos vertebrados varios factores, como las gonadotropinas y el estradiol, actúan en la proliferación de las espermatogonias (Minucci y cols., 1986; 1997; Di Matteo y cols., 1988; Cobellis y cols., 1999). También tiene efecto la temperatura. Así, las bajas temperaturas impiden la transformación de las espermatogonias en espermatocitos (Rastogi e Iela, 1980), al igual que ocurre en urodelos.

Los espermatocitos secundarios se transforman en espermátidas bajo la acción de la testosterona (Rastogi e Iela, 1980). El impedimento en la formación de las

espermátidas inducido por un antiandrógeno aumenta la proliferación de las espermatogonias, lo que sugiere que la pérdida de los espermatozoides puede disparar la mitosis espermatogónica (Minucci y cols., 1992).

En la rana *Rana esculenta*, el  $17\beta$ -estradiol promueve la proliferación espermatogónica (Minucci y cols., 1997; Chieffi y cols., 1997) a través de la actividad de la proteína Fos (Cobellis y cols., 1999), lo que sugiere que la aparición nuclear de la oncoproteína puede disparar el inicio de la espermatogénesis. De hecho, los productos de los protooncogenes se han encontrado en estas especies. En particular, las proteínas Myc, Fos, Jun y Mos han sido localizadas en las células germinales durante el ciclo sexual anual. Myc, Fos y Jun tienen una localización inusual, al encontrarse presentes en el citoplasma de las espermatogonias. Los transcritos de c-fos y c-jun también han sido encontrados en los testículos de rana durante el ciclo sexual anual (Cobellis y cols., 1997). En particular, el m-RNA de c-fos aparece a altos niveles durante y después del pico del estradiol, ocurriendo en un periodo del año caracterizado por la elevada proliferación espermatogónica.

También se ha comprobado la implicación de la vía ERK2 kinasa (Chieffi y cols., 2000). La GnRH también induce la proliferación de las espermatogonias en ranas intactas e hipofisectomizadas, al igual que en sistemas in vitro (Minucci y cols., 1986; Di Matteo y cols., 1988).

#### 4.- CONCLUSIONES.

En conclusión, podemos afirmar que pese a las diferencias específicas propias de cada grupo o incluso de cada especie, los mecanismos básicos de regulación hormonal y paracrina son similares en todos los vertebrados, lo que convierte a los anfibios urodelos, por su peculiar organización histológica y anatómica del testículo, en un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de regulación de la espermatogénesis.

## 5.- BIBLIOGRAFÍA.

- Abé K, Jin Y, Yamamoto T y Abé S-I. Human recombinant stem cell factor promotes spermatogonial proliferation, but not meiosis initiation in organ culture of newt testis fragments. *Biochim Biophys Res Comm* 2002; 294: 695-699
- Abé S-I y Ji Z-S. Initiation and stimulation of spermatogenesis *in vitro* by mammalian follicle-stimulating hormone in the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 201-208
- Anderson RA, Evans LW, Irvine DS, McIntyre MA, Groome NP y Riley SC. Follistatin and activin A production by the male reproductive tract. *Hum Reprod* 1998a; 13: 3319-3325
- Andersson AM, Müller J y Skakkebaek NK. Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1998b; 83: 4451-4458
- Andrieux B, Collenot A, Collenot G y Perórale C. Aspects morphologiques de l'action d'hormones gonadotropes mammaliennes sur l'activité testiculaire du Triton *Pleurodèles* mature hypophysectomisé. *Ann Endocrinol* 1973; 34: 711-712
- Aron M. Recherches morphologiques et expérimentales sur le déterminisme des caracteres sexuels secondaires mâles chez les Anoures. *Arch Biol* 1926; 36: 1-97
- Benahmed M. Role of tumor necrosis factor in the male gonad. *Contracept Fertil Sex* 1997; 25: 569-571
- Bolaffi JL y Callard IP. *In vivo* regulation of steroidogenesis by ovine gonadotropins in male and female mudpuppies, *Necturus maculosus* (Rafinesque). *Gen Comp Endocrinol* 1981; 44: 108-116
- Bremmer WJ, Millar MR, Sharpe RM y Saunders PTK. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 1994; 135: 1227-1234
- Cailleau J, Vermeire S y Verhoeven G. Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 69: 79-89
- Callard IP, Callard GV, Lance V, Bolaffi JL y Rosset JS. Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. *Biol Reprod* 1978; 18: 16-43
- Cameron DF, Muffly KE y Nazian SJ. Testosterone stimulates spermatid binding to competent Sertoli cells *in vitro*. *J Endocrinol* 1993; 1: 61-65
- Chadwick CS. Further observations on the water drive in *Triturus viridescens*. II Induction of water drive with the lactogenic hormone. *J Exp Zool* 1941; 86: 175-187
- Champy C. Recherches sur la spermatogénèse des batraciens et les elements accessoires du testicule. *Arch Zool Exp Gen* 1913; 52: 13-304
- Chieffi P, Colucci-D'Amato GL, Staibano S, Franco R y Tramontano D. Estradiol-induced mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) activity in the frog (*Rana esculenta*) testis. *J Endocrinol* 2000; 167: 77-84
- Chieffi P, Minucci S, Cobellis G, Fasano S y Pierantoni R. Changes in proto-oncogen activity in the testis of the frog, *Rana esculenta*, during the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 99: 126-136

Closset J, Gothot A, Sente B, Cipo ML, Igout A, Vandebroek M, Dombrowicz D y Hennen G. Pituitary hormones dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 1125-1131

Cobellis G, Pierantoni R y Fasano S. C-fos and c-jun-like mRNA expression in frog (*Rana esculenta*) testis during the annual reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 106: 23-29

Cobellis G, Pierantoni R, Minucci S, Pernas-Alonso R, Meccariello R y Fasano S. C-fos activity in *Rana esculenta* testis: seasonal and estradiol-induced changes. *Endocrinology* 1999; 140: 3238-3244

Cohen PE y Pollard JW. Normal sexual function in male mice lacking a functional type 1 interleukin-1 (IL-1) receptor. *Endocrinology* 1998; 139: 815-818

Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, Bald LN, Schmelzer CH, Fendly BM, Mason AJ, Chin WW, Schwall RH y Vale W. Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrinology* 1991; 128: 1682-1684

Cuevas P, Ying SY, Ling H, Ueno N, Esch F y Guillemin R. Immunohistochemical detection of inhibin in the gonad. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142: 23-30

Danzo BJ y Eller BC. The ontogeny of biologically active androgen-binding protein in rat plasma, testis and epididymis. *Endocrinology* 1985; 117: 1380-1388

Danzo BJ, Pavlou SN, Anthony IIL. Hormonal regulation of androgen-binding protein in the rat. *Endocrinology* 1990; 127: 2829-2838

De Winter JP, Vanderstichele HM, Verhoeven G, Timmerman MA, Wesseling JG y de Jong FH. Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin A and express activin receptor type II *in vitro*. *Endocrinology* 1994; 135: 759-767

Di Matteo L, Minucci S, Fasano S, Pierantoni R, Varriale B y Chieffi G. GnRH antagonist decreases androgen production and spermatogonial multiplication in frog (*Rana esculenta*): indirect evidence for the existence of GnRH or GnRH-like material receptor in the hypophysis and testis. *Endocrinology* 1988; 122: 62-67

Dym M, Jia MC, Dirami G, Price JM, Rabin SJ, Mocchetti I y Ravindranath N. Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type A spermatogonia. *Bio Reprod* 1995; 52: 8-19

Ebling FJP, Brooks AN, Cronin AS, Ford H y Ken JB. Estrogenic induction of spermatogenesis in the hypogonadal mouse. *Endocrinology* 2000; 141: 2061-2069

Eddy EM, Washburn TF, bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB y Korach KS. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and fertility. *Endocrinology* 1996; 137: 4796-4805

Fang J, Yin W, Smiley E, Wang SQ y Bonadio J. Molecular cloning of the mouse activin  $\beta_E$  subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 669-674

Fasano S y Pierantoni R. The vertebrate testis: Communication between interstitial and germinal compartments. En: F. Facchinetti, I. Henderson, R Pierantoni y AM Polzonetti-Magni, Editors, *Cellular Communication in Reproduction*, J Endocrinol Ltd, Bristol (1993). Pp. 113-124

Galgano M. Il ciclo sessuale annuale in *Triturus cristatus carnifex* Laur. I. Il ciclo naturale nei due sessi. *Archo Ital Anat Embriol* 1944; 50: 2-143

- Hakovirta H, Yan W, Kaleva M, Zhang F, Vanttinen K, Morris P, Soder M, Parvinen M y Toppari J. Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 1999; 140: 1492-1498
- Hancock AD, Robertson DM y de Krester DM. Inhibin and inhibin  $\alpha$  chain precursors are produced by immature rat Sertoli cells in culture. *Biol Reprod* 1992; 46: 155-161
- Haneji T, Koide SS, Tajima Y y Nishimune Y. Differential effects of epidermal growth factor on the differentiation of type A spermatogonia in adult mouse cryptorchid testes *in vitro*. *J Endocrinol* 1991; 128: 383-388
- Hara T, Tamura K, de Miguel MP, Mukoyama Y, Kim HJ, Kogo H; Donovan PJ y Miyajima A. Distinct roles of oncostatin M and leukemia inhibitory factor in the development of primordial germ cells and Sertoli cells in mice. *Dev Biol* 1998; 201: 144-153
- Hayes FJ, De Cruz S, Seminara SB, Boepple PA y Crowley WF Jr. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 53-58
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS y Lubahn DB. A role of estrogens in the male reproductive system. *Nature* 1997; 390: 509-512
- Hötten G, Neidhardt H, Schneider C y Pohl J. Cloning of a new member of the TGF- $\beta$  family: a putative new activin  $\beta_C$  chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 608-613
- Huang HFS, Pogach L, Giglio W, Nathan E y Seebode J. GnRH-A induced arrest of spermiogenesis in rats is associated with altered androgen binding protein distribution in the testis and epididymis. *J Androl* 1992; 13: 153-159
- Huang HFS, Pogach LM, Nathan E, Giglio W y Seebode JJ. Synergistic effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized rats: relationship with the androgen-binding protein status. *Endocrinology* 1991; 128: 3152-3161
- Ito R y Abé S-I. FSH-initiated differentiation of newt spermatogonia to primary spermatocytes in germ-somatic cell reagggregates cultured within a collagen matrix. *Int J Dev Biol* 1999; 43: 111-116
- Janulis L, Bahr JM, Hess RA y Bunick D. P450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells: detection by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *J Androl* 1996; 17: 651-658
- Ji Z-S, Kubokawa K y Abé S-I. Promotion of differentiation of newt primary spermatocytes into spermatids by mammalian FSH via Sertoli cells. *J Exp Zool* 1995; 272: 374-383
- Ji Z-S, Kubokawa K, Ishii S y Abé S-I. Differentiation of secondary spermatogonia to primary spermatocytes by mammalian follicle-stimulating hormone in organ culture of testes fragments from the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Dev Growth Differ* 1992; 34: 649-660
- Joseph DR, O'Brien DA, Sullivan PM, Bcchis M, Tsuruta JK y Petrusz P. Overexpression of androgen binding protein/sex hormone-binding globulin in male transgenic mice: tissue distribution and phenotypic disorders. *Biol Reprod* 1997; 56: 21-32
- Kaipia A, Parvinen M y Toppari J. Localization of activin receptor (ActR-IIB<sub>2</sub>) mRNA in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 1993; 132: 2703-2710

- Kaipia A, Penttila TL, Shimasaki S, Ling N, Parvinen M y Toppari J. Expression of inhibin beta A and beta B, follistatin and activin A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 1992; 131: 2703-2710
- Kikuyama S y Toyoda F. Sodefrin: a novel sex pheromone in a newt. *Rev Reprod* 1999; 4: 1-4
- Kikuyama S, Nakano R y Yasumasu I. Synergistic action of prolactin and androgen on the cloacal glands of the newt. *Comp Biochem Physiol A* 1975; 51: 823-826
- Kikuyama S, Seshimo H, Shirama K, Kato T y Noumura T. Interaction of prolactin with sex steroid in oviduct and tail of newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zool Sci* 1986; 3: 131-138
- Kikuyama S, Yazawa T, Abé S-I, Yamamoto K, Iwata T, Hoshi K, Hasunuma I, Mosconi G y Polzonetti-Magni AM. Newt prolactin and its involvement in reproduction. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78: 984-999
- Klein R, Robertson DM y Clarke IJ. Studies in sheep examining plasma follistatin elevations due to frequent blood sampling or surgery. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 273-277
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA y Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor. *Med Sci* 1998; 95: 15677-15682
- Kuiper GG y Gustafsson JA. The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett* 1997; 410: 87-90
- Larriba S, Esteban C, Toran N, Gerard A, Audi L, Gerard H y Reventos J. Androgen binding protein is tissue-specifically expressed and biologically active in transgenic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 573-578
- Le Gac F y de Krester DM. Inhibin production by Sertoli cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 1982; 28: 487-498
- Lee W, Mason AJ, Schwall R, Szonyi E y Robertson DM. Secretion of activin by interstitial cells in the testis. *Science* 1989; 243: 396-398
- Levallet J, Bilinska B, Mittre H, Genissel C, Fresnel J y Carreau S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod* 1998; 58: 919-926
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Esch F, Denoray L y Guillemin R. Isolation and partial characterization of a Mw 32000 protein with inhibin activity from the porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7217-7221
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M y Guillemin R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the  $\beta$  subunits of the two forms of inhibin. *Nature* 1986; 321: 779-782
- Lofts B. Reproduction. En: Lofts B (ed) *Physiology of the amphibia*. Academic Press, New York London, 1974 pp 107-218
- Loveland KL y Schlatt S. Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from mother nature's gene knockouts. *J Endocrinol* 1997; 153: 337-344
- Lubahn DB, Moyer JS, Holding TS, Couse JF, Korach KS y Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 11162-11166

- Majdic G, McNeilly AS, Sharpe RM, Evans LR, Groome NP y Saunders PTK. Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology* 1997; 138: 2136-2147
- Manova K, Huang EJ, Angeles M, DeLeon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer P y Bachvarova RF. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 1993; 157: 85-99
- Manova K, Nocka K, Besner P y Bachvarova RF. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 1990; 110: 1057-1069
- Mather JP, Moore A y Li RH. Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 215: 209-222
- Mazzi V, Vellano C y Toscazo C. Antigonadal effects of prolactin in adult male crested newt (*Triturus cristatus carnifex* Laur). *Gen Comp Endocrinol* 1967; 8: 320-324
- Mazzi V y Vellano C. The counterbalancing effect of follicle-stimulating hormone on the antigonadal activity of prolactin in the male newt *Triturus cristatus carnifex* (Laur). *J Endocrinol* 1968; 40: 529-530
- Mellor SL, Cranfield M, Ries R, Pederson J, Cancilla B, de Krester D, Groome NP, Mason AJ y Risbridger GP. Co-localization of activin  $\beta_A$ -,  $\beta_B$ -, and  $\beta_C$ -subunits in human prostate and evidence for formation of new activin heterodimers of  $\beta_C$ -subunit. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4851-4858
- Minucci S, Di Matteo L, Chieffi P, Pierantoni R y Fasano S.  $17\beta$ -estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool* 1997; 278: 93-100
- Minucci S, Di Matteo L, Pierantoni R, Variáale B, Rastogi RK y Chieffi G. *In vivo* and *in vitro* stimulatory effect of a gonadotropin-releasing hormone analog (HOE766) on spermatogonial multiplication in the frog, *Rana esculenta*. *Endocrinology* 1986; 119: 731-736
- Minucci S, Di Matteo L, Fasano S, Chieffi-Baccari G y Pierantoni R. Intratesticular control of spermatogenesis in the frog, *Rana esculenta*. *J Exp Zool* 1992; 264: 113-118
- Moore FL. Spermatogenesis in larval *Ambystoma tigrinum*: positive and negative interactions of FSH and testosterone. *Gen Comp Endocrinol* 1975; 26: 525-533
- Motro B, van der Kooy D, Rossant J, Reith A y Bernstein A. Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci. *Development* 1991; 113: 1207-1221
- Munsie M, Schlatt S, deKrester DM y Loveland KL. Expression of the stem cell factor in the postnatal rat testis. *Mol reprod Dev* 1997; 47: 19-25
- Nakayama Y, Yamamoto T y Abé S-I. IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. *Int J Dev Biol* 1999; 43: 343-347
- Nakayama Y, Yamamoto T, Oba Y, Nagahama Y y Abé S-I. Molecular cloning, functional characterization and gene expression of a follicle-stimulating hormone receptor in the testis of newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 121-128
- Naville D, Chatelain PG, Avallet O y Saez JM. Control of production of insulin-like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. *Cell-cell interactions. Mol Cell Endocrinol* 1990; 70: 217-224



- Noguchi J, Hikono H, Sato S, Watanabe G, Taya K, Sasamoto S y Hasegawa Y. Ontogeny of inhibin secretion in the rat testis: secretion of inhibin-related proteins from fetal Leydig cells and of bioactive inhibin from Sertoli cells. *J Endocrinol* 1997; 155: 27-34
- Oda S, Nishimatsu SI, Murakami K y Ueno N. Molecular cloning and functional analysis of a new activin  $\beta$  subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 581-588
- Orth JM. Cell biology of testicular development in the fetus and neonate. En : Desjardins C, Ewing LL, eds. *Cell and Molecular Biology of the testis*. New York: Oxford University Press; 1993; 3-43
- Orth JM, Qiu J, Jester WF y Pilder S. Expression of the c-kit gene critical for migration of neonatal rat gonocytes *in vitro*. *Bio Reprod* 1997; 57: 676-683
- Packer AI, Besmer P y Bachvarova RF. Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 303-310
- Perryman KJ, Stanton PG, Loveland KL, McLachlan RI, Robertson DM. Hormonal binding dependency of neural cadherin in the binding of round spermatids to Sertoli cells *in vitro*. *Endocrinology* 1996; 137: 3877-3883
- Phillips DJ. Regulation of activin's access to the cell: why is Mother Nature such a control freak?. *BioEssays* 2000; 22: 689-696
- Rastogi RK e Iela L. Steroidogenesis and spermatogenesis in anuran amphibia: a brief survey. En: Delrio G y Brachet J, Editors, *Steroids and their mechanism of action in non-mammalian vertebrates*. Raven Press, New York, 1980; pp 131-146
- Roberts V, Meunier H, Sawchenko PE y Vale W. Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology* 1989; 125: 2350-2359
- Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MTW, Burger HG, Wettenhall REH y de Krester DM. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126: 220-226
- Roosen-Runge EC. *The process of spermatogenesis in animals*. Cambridge University Press, London 1977
- Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Ricca R y Geremia R. Follicle-stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev Biol* 1993; 155: 68-74
- Saito A, Kano Y, Suzuki M, Tomura H, Takeda J y Tanaka S. Sequence analysis and expressional regulation of mRNAs encoding  $\beta$ -subunits of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Biol Reprod* 2002; 66: 1299-1309
- Sandlow JI, Feng HL y Sandra A. Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. *Urology* 1997; 49: 494-500
- Saunders PTK. Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ). *Rev Reprod* 1998; 3: 164-171
- Sette C, Dolci S, Geremia R y Rossi P. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol* 2000; 44: 599-608

- Shaha C, Morris PL, Chen CLC, Vale W y Bardin CW. Immunostainable inhibin subunits are in multiple types of testicular cells. *Endocrinology* 1989; 125: 1941-1950
- Simpson TH y Wardle CS. A seasonal cycle in the testis of the spurdog, *Squalus acanthias*, and the sites of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Mar Bio Ass UK* 1967; 47: 699-708
- Singh J, O'Neill C y Handelsman DJ. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (*hpg*) mice. *Endocrinology* 1995; 136: 5311-5321
- Sorrentino V, Giorgi M, Geremia R, Besmer P y Rossi P. Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 1991; 6: 149-151
- Steinberger A y Steinberger E. Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 1976; 99: 918-921
- Strohmeier T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M y Slamon D. Expression of the c-kit proto-oncogen and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J Urol* 1995; 153: 511-515
- Suarez-Quian CA, Martínez-García F, Nistal M y Regadera J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 350-358
- Tajima Y, Onoue H, Kitamura Y y Nishimune Y. Biologically active kit ligand growth factor is produced by mouse Sertoli cells and is defective in *Sld* mutant mice. *Development* 1991; 113: 1031-1035
- Tanaka S y Takikawa H. Amphibian and reptilian gonadotropin: biological activity. *Gunma Symposi on Endocrinology* 1984; 21: 37-61
- Tanaka S, Sakai M, Hattori M-A, Kikuyama S, Wakabayashi K y Hanaoka Y. Effect of bullfrog LH and FSH on newt testes under different temperatures. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 138: 1-7
- Teerds KJ, Veldhuizen-Tsoerkan MB, Rommerts FFG, de Rooij DG y Dorrington DJ. Proliferation and differentiation of testicular interstitial cells: aspects of Leydig cell development in the prepubertal and adult testis. En: *Molecular and cellular endocrinology of the testis*. Verhoeven G, Habenicht UF (eds) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1994 pp 37-66
- Toboesch AMW, Robertson DM, Tropman J, Klaasen P, de Paus RA, de Jong FH y Grootegoed JA. Effects of FSH and IGF I on immature rat Sertoli cells: inhibin  $\alpha$  and  $\beta$ -subunit mRNA levels and inhibin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 1988; 55: 101-105
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D y Spiers J. Purification and characterization of a FSH releasing protein from porcine follicular fluid. *Nature* 1986; 321: 776-779
- Van Rooijen JH, van Assen S, van der Kwast TH, de Rooij DG, Boersma JA, Vreeburg JTM, Weber RFA. Androgen receptor immunoexpression in the testis of infertile men. *J Androl* 1995; 16: 510-516
- Vellano C, Sacerdote M y Mazzi V. Effects of mammalian gonadotropins (FSH and LH) on spermatogenesis in the crested newt under different temperature conditions. *Monitore Zool Ital (NS)* 1974; 8: 177-188
- Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa S-I, Sage J, Cuzin F y Rassoulzadegan M. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during males gametogenesis in the mouse: AKit-KL interaction critical for meiosis. *Development* 1998; 125: 4585-4593

Vornberger W, Prins G, Musto NA y Suarez-Quian CA. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 1994; 123: 2307-2316

Weinbauer GF y Nieschlag E. Hormonal control of spermatogenesis. In: *Molecular biology of the male reproductive system*. De Krester DM (ed) Academic Press, San Diego, 1993 pp 99-142

Woodruff TK. Regulation of cellular and system function by activin. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 953-963

Yan W, Kero J, Huhtaniemi I y Toppari J. Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/c-kit system in Leydig cell development. *Dev Biol* 2000a; 227: 169-182

Yan W, Suominen J y Toppari J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis *in vitro*. *J Cell Sci* 2000b; 113: 161-168

Yazawa T, Fujimoto K, Yamamoto T y Abé S-I. Caspase activity in newt spermatogonial apoptosis induced by prolactin and cycloheximide. *Mol Repr Dev* 2001; 59: 209-214

Yazawa T, Yamamoto K, Kikuyama S y Abé S-I. Elevation of plasma prolactin concentrations by low temperature is the cause of spermatogonial cell death in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Gen Comp Endocrinol* 1999; 113: 302-311

Yazawa T, Yamamoto T y Abé S-I. Prolactin induces apoptosis in the penultimate spermatogonial stage of the testes in Japanese red-bellied newt (*Cynops pyrrhogaster*). *Endocrinology* 2000; 141: 2027-2032

Yazawa T, Yamamoto T, Jin Y y Abé S-I. Follicle-stimulating hormone is indispensable for the last spermatogonial mitosis preceding meiosis initiation in newts (*Cynops pyrrhogaster*). *Biol Reprod* 2002; 66: 14-20

Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi SI, Kunisada T, Fujimoto T y Nishikawa S-I. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 1991; 113: 689-699

## **CAPÍTULO: 4**

### **ONTOGÉNESIS DENTAL Y CÉLULAS MADRE.**

Maitane Aurrekoetxea Campo, Idoia Ortega Martínez.

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	115
2.- ORGANOGÉNESIS: INTERACCIONES ENTRE CÉLULAS EPITELIALES Y MESENQUIMALES .....	115
3.- DESARROLLO ANATÓMICO DEL DIENTE .....	116
4.- FACTORES DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION .....	118
5.- MODELO ANIMAL Y REGENERACION DENTAL .....	119
6.- EL POTENCIAL DE LAS CÉLULAS MADRE .....	121
7.- NICHOS DE CÉLULAS MADRE .....	122
8.- CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL .....	122
9.- CÉLULAS MADRE DEL EPITELIO DENTAL .....	124
10.- CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO DENTAL .....	126
11.- CONCLUSIÓN .....	127
12.- BIBLIOGRAFÍA .....	128

## 1.- INTRODUCCIÓN

El tratamiento con células madre es, hoy en día, la esperanza terapéutica por excelencia.

Desde que en 1998 un equipo de científicos estadounidenses aislara por primera vez células madre humanas los avances que se han realizado en este campo son innumerables. El descubrimiento de nuevos nichos de células madre en múltiples tejidos, ya no sólo embrionarios, sino también de individuos adultos, abre las puertas a nuevas perspectivas en el ámbito de la terapia celular y los trasplantes de tejidos.

Pero, ¿dónde están las células madre? Poco a poco, científicos de todo el mundo van descubriendo nuevas ubicaciones de células madre. Hoy podemos hablar de células madre cardíacas, cerebrales o hematopoyéticas, y así hasta más de 20 tipos diferentes hasta hoy definidos. En este trabajo prestaremos especial atención a las células madre de origen dental.

## 2.- ORGANOGÉNESIS: INTERACCIONES ENTRE CÉLULAS EPITELIALES Y MESENQUIMALES

Antes de explicar el desarrollo dental u odontogénesis,, situaremos de una forma sencilla, este proceso dentro del desarrollo embrionario y de los procesos de organogénesis que acontecen durante el mismo.

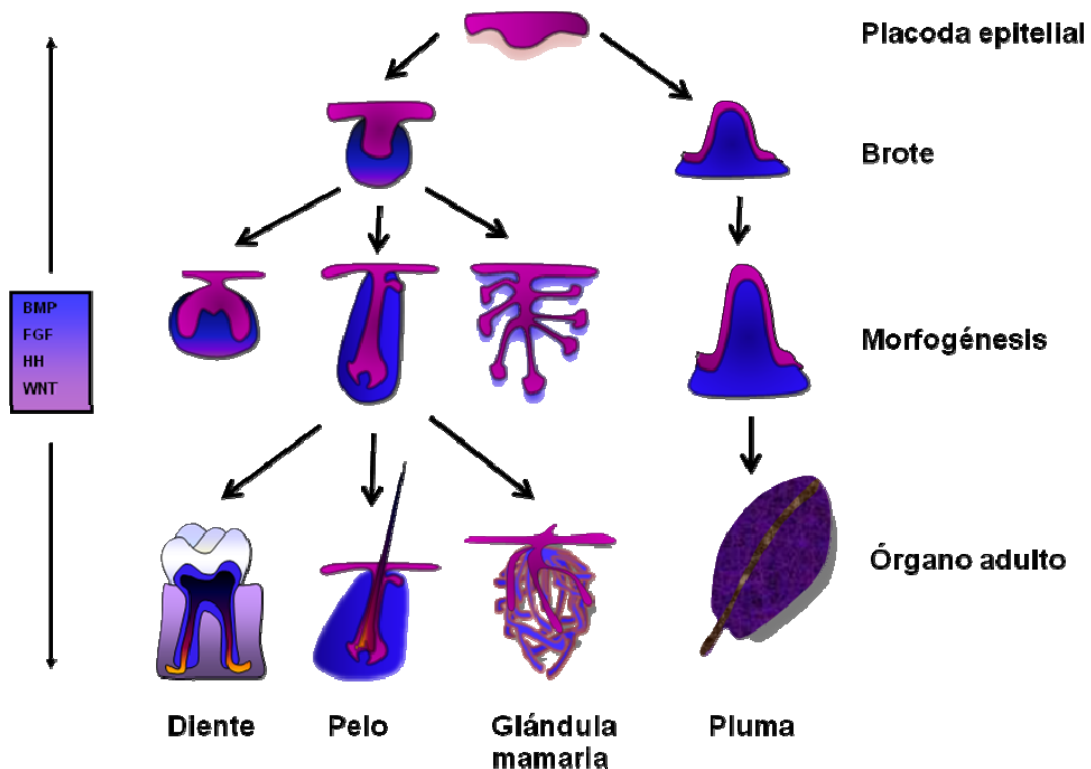
La organogénesis implica tres fases fundamentales; la fase de inicio, la de morfogénesis y la de diferenciación. Este proceso se origina por una cascada de interacciones celulares llamadas inductivas, que corresponden a una serie de acontecimientos que tienen lugar entre dos tejidos de origen embrionario diferentes y que conducen a la alteración del curso de su desarrollo (Grobstein, 1967). Una de estas interacciones más frecuente es la ocurrida entre el epitelio y el mesénquima. La importancia de estas interacciones entre tejidos ha sido demostrada mediante experimentos clásicos de recombinación de tejidos (Grobstein 1967; Saxén 1977; Kollar 1983; Kratochwil 1986). Estos estudios han indicado también que la interacción epitelio-mesenquimal es secuencial y recíproca, y que ambos componentes pueden jugar un papel dominante en la organogénesis dependiendo del órgano del que se trate y su etapa de desarrollo.

Entre los órganos ó estructuras que se desarrollan mediante interacciones epitelio-mesenquimales podemos citar el riñón, pulmón, glándula mamaria, extremidades, tubérculo genital, pelo y diente. Las interacciones entre el epitelio y el mesénquima subyacente constituyen el mecanismo principal que regula la morfogénesis de todos estos órganos (Collar y Baird, 1970; Collar 1970).

El desarrollo inicial de la morfología de estos órganos es similar en todos ellos: el epitelio sufre un engrosamiento local, seguido de una condensación del

mesénquima alrededor de este engrosamiento. La invaginación posterior que sufre el epitelio dentro del mesénquima es a la que se denomina brote. A partir de éste momento, el desarrollo de estos órganos es diferente y en cada uno de ellos, tienen lugar procesos dirigidos a la formación de órganos especializados (Sakakura 1987).

Llegados a este punto, muchos se plantearán que moléculas están implicadas en estas interacciones, estas son: Las BMPs (bone morphogenetic proteins), pertenecientes a la superfamilia Tgf $\beta$ , sonic hedgehog, de la familia Hedgehog, así como las familias Fgf ( fibroblast growth factor), TNF (tumor necrosis factor) y Wnt, que desarrollan una importante función en las interacciones epitelio-mesenquimales que se producen durante la organogénesis y en concreto durante el desarrollo dental (Thesleff, 2003).



**Fig 1:** Interacciones epitelio-mesenquimales presentes durante el desarrollo de órganos de origen ectodérmico.

### 3.- DESARROLLO ANATÓMICO DEL DIENTE

Aunque no es nuestra intención, con este apartado, convertir al lector en un experto en odontogénesis, se hace necesario exponer brevemente el desarrollo morfológico del diente para poder comprender la ubicación y el significado de los nichos de células madre naturales de este tejido.

El proceso de odontogénesis comprende una serie de estadíos sucesivos, resumidos en la figura 2. A partir de la lámina dental, el desarrollo dentario se realiza en cuatro etapas; germen o brote dental, caperuza o capuchón, campana y campana tardía, durante las cuales ocurren tanto la morfodiferenciación como la histodiferenciación del órgano dental.

Aunque existen variaciones específicas de especie, estas etapas dan una perspectiva global del desarrollo dental en mamíferos.

Los ratones, son el principal modelo empleado para el estudio de la odontogénesis. En ellos el desarrollo dental comienza el día 10.5 de desarrollo embrionario (E10.5), con la formación de la lámina dental. Ésta se presenta como un engrosamiento epitelial, que posteriormente penetrará, como un brote epitelial, en el mesénquima subyacente, derivado de células de la cresta neural. Aunque en esta etapa del desarrollo, denominada etapa de inicio, el potencial odontogénico proviene del epitelio oral, ya en E12.5 ese potencial pasa al mesénquima (Mina y Collar, 1987; Lumsdem, 1988). Este cambio inductivo parece ser consecuencia de las señales recibidas de la placoda dental, centro señalizador que se forma en el epitelio dental.

Alrededor de E13.5-E14.5, en la fase de caperuza, se forma un nuevo centro de señalización denominado nudo del esmalte primario (NEP). El NEP se ha llegado a considerar como el responsable del crecimiento de los bucles cervicales.

En el estadio de campana, E15.5-E16.5, en el que ya diferenciamos el órgano del esmalte, los bucles cervicales continúan su crecimiento hacia el mesénquima. Por otra parte aparecen nuevos nudos del esmalte secundarios en las zonas de las futuras cúspides dentales.

Llegando ya a las etapas finales del desarrollo dental, en E17.5-19.5, nos encontramos con la diferenciación de las células especializadas en la secreción de dentina (odontoblastos) y esmalte (ameloblastos).

Las interacciones epitelio-mesénquimales continúan jugando un papel imprescindible en estos fenómenos de diferenciación, de modo que el desarrollo de un tejido influye, significativamente, sobre la diferenciación y morfogénesis del otro.

Para constituir la estructura definitiva y completa del diente, tras la diferenciación, los extremos de la campana o asas cervicales continúan su proliferación, hasta formar la raíz dental. Por último, algunas células del mesénquima dental forman el ligamiento periodontal, el cemento de la raíz y parte del hueso alveolar, que sostiene el diente.

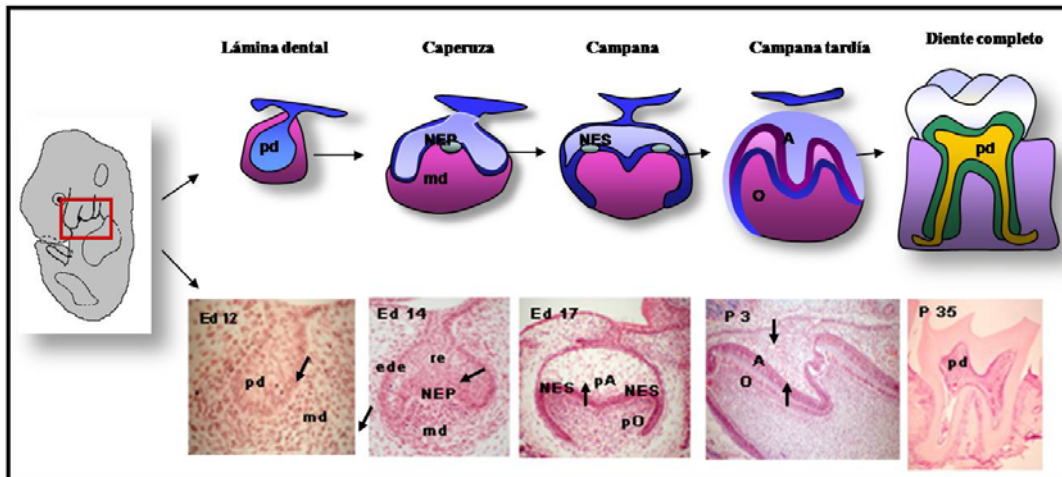


Fig 2: Desarrollo morfológico de un molar, desde el estado de inicio hasta la citodiferenciación.

#### 4.- FACTORES DE CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION

Los factores de crecimiento y diferenciación son los responsables de impulsar a las células madre en distintas direcciones.

Los mecanismos de crecimiento y diferenciación celular han sido objeto de estudio desde hace décadas. Uno de los pioneros en este campo fue Hans Spemann, ganador del Premio Nobel en 1935 por sus estudios de inducción de señales en tejidos embrionarios.

Las familias de factores de crecimiento y diferenciación más comúnmente estudiadas son las presentes en la tabla 1.

Familias de los factores de crecimiento y diferenciación
Factores de crecimiento transformante- $\beta$ (TGF- $\beta$ )
Proteínas morfogenéticas óseas (BMP)
Activina
Wnt (Wingless)
Ácido retinoico (RA)
Factores de crecimiento fibroblástico (FGF)
Factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF)
Hedgehog

Tabla 1: Factores de crecimiento y diferenciación más comúnmente estudiados.

Las diversas vías de señalización interactúan entre sí, lo cual permite a una célula responder a múltiples estímulos simultáneamente. Es común encontrar bucles de retroalimentación positiva que involucran tanto a factores de



señalización como a factores de transcripción. Además, el desarrollo de órganos diferentes está a menudo regulado por las mismas familias de factores, regulación que incluso presenta grandes similitudes en animales invertebrados y vertebrados.

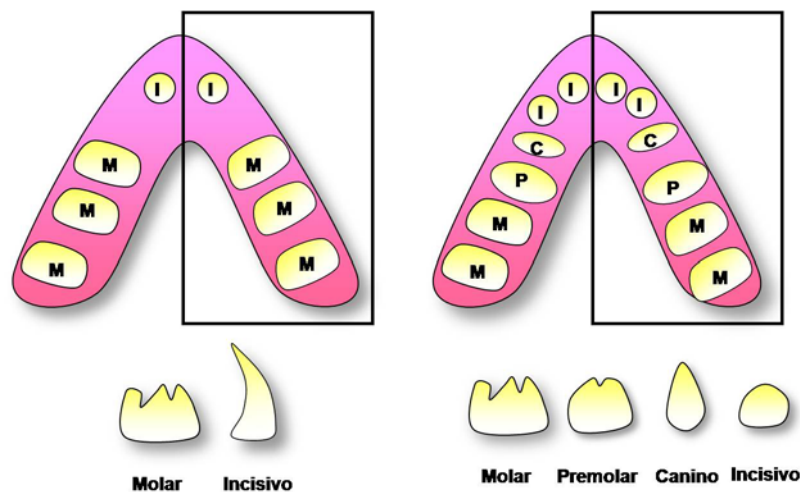
## 5.- MODELO ANIMAL Y REGENERACION DENTAL

El diente es una estructura que únicamente la poseen los animales vertebrados y que resulta fundamental para su supervivencia.

La importancia de este órgano hace que, en la actualidad se planteen muchas investigaciones enfocadas al estudio de la regeneración de tejidos dentales.

Entre los diferentes métodos que se barajan, se incluye la estimulación de las células madre de origen dental, en el intento de reemplazar la pérdida o daño dental acontecido tras enfermedades, accidentes o por causa de la edad.

Los humanos presentan una dentición compleja con cuatro familias de dientes diferentes: incisivos, caninos, premolares y molares. Los ratones, por el contrario sólo presentan dos familias diferentes, incisivos y molares.



**Figura 3:** Esquemas comparativos entre la dentición de ratones y humanos.

Otra discrepancia significativa entre ambas especies es que, a diferencia de la dentición humana, los incisivos de los roedores crecen de forma constante y presentan asimetría en cuanto a la presencia de esmalte entre su lado labial y lingual.

A pesar de estas diferencias, los ratones resultan buenos modelos experimentales para el estudio de la odontogénesis y la regeneración dental, especialmente para el estudio de molares por presentar modelos de desarrollo muy similares.

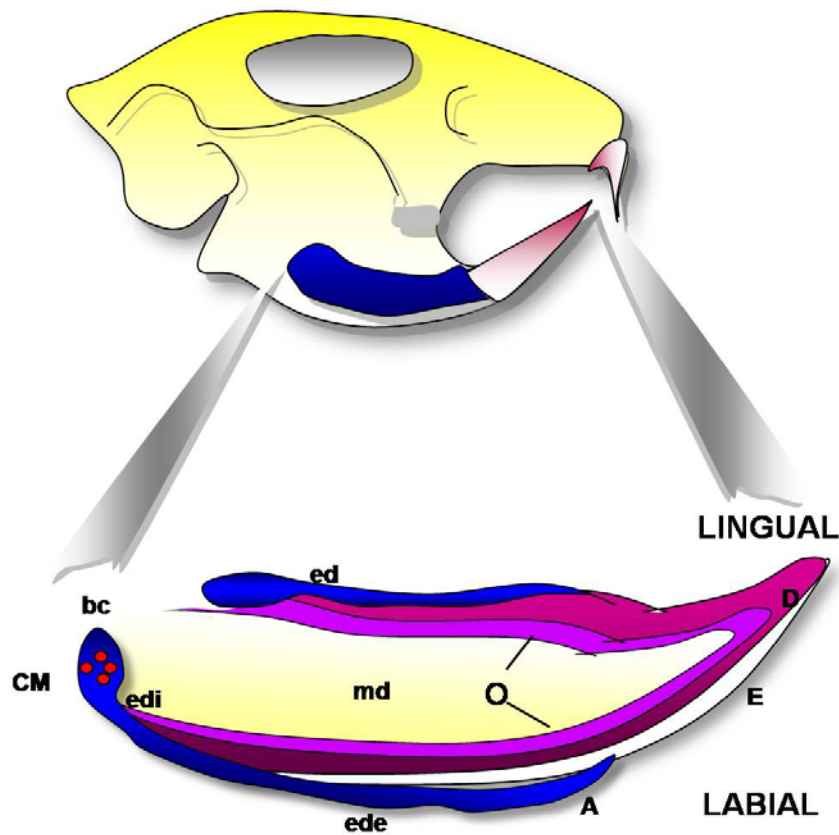
Por otra parte, las peculiares características presentadas por los incisivos de los ratones, ofrecen amplias posibilidades en el estudio del desarrollo del esmalte, así como en la regeneración dental.

El incisivo del roedor es una de las adaptaciones clásicas al proceso de evolución. Su forma cónica estrechada en la punta es el resultado de la abrasión que ejercen incisivos superiores e inferiores y que puede darse como consecuencia de la asimetría de los mismos.

Los incisivos, según están situados en la cavidad oral, presentan una mitad labial (la más cercana a los labios) y otra lingual (la más cercana a la lengua). En el lado labial, el gradiente de las células del epitelio dental forman ameloblastos diferenciados que dan lugar a esmalte. En el lado lingual no se produce la diferenciación del epitelio y por tanto tampoco la secreción de esmalte.

Por el contrario, odontoblastos y dentina están presentes en ambos lados del incisivo, labial y lingual.

Esta asimetría es muy útil para estudiar las rutas de diferenciación de las células epiteliales.



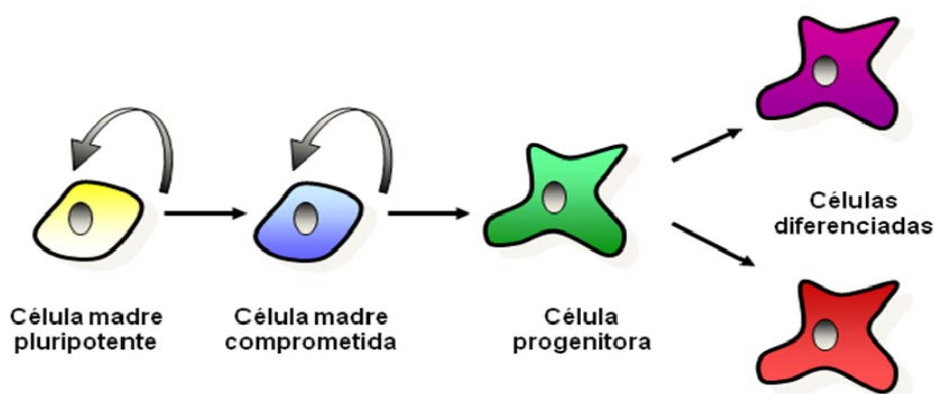
**Fig: 4:** Esquema de un incisivo de ratón adulto. El bucle cervical se sitúa en al extremo proximal a partir de donde se produce el nuevo tejido. El lado labial presenta una capa de esmalte, inexistente en el lado lingual.

## 6.- EL POTENCIAL DE LAS CÉLULAS MADRE

La investigación de las células madre tiene su origen alrededor de 1850, con el descubrimiento de algunas células que podían generar otro tipo celular distinto. Así, alrededor de 1900 se descubrieron las primeras células troncales capaces de diferenciarse a células sanguíneas.

En 1994 fueron descubiertas las primeras células madre embrionarias humanas, pero no fue hasta finales del año 1998 cuando un grupo de investigadores de la Universidad de Wisconsin (EEUU) consiguió el primer cultivo en el laboratorio de células madre embrionarias humanas a partir de blastocistos

A pesar de que el concepto de “células madre” o “stem cells” fue introducido hace varias décadas, aun hoy, la definición que se hace de estas células es, únicamente, desde el punto de vista funcional. Así pues, llamamos células madre o indiferenciadas, a aquellas dotadas de la capacidad de autorrenovarse, es decir, producir nuevas células madre, o bien de continuar la vía de diferenciación para producir diversos tipos de células especializadas.



**Fig: 5:** Esquema representativo del concepto de células madre. Las células madre pluripotenciales pueden diferenciarse en distintas líneas celulares o regenerar la población de células madre.

Estas características específicas de las células madre las hace especialmente interesantes tanto en la investigación básica, por aportar un modelo de desarrollo biológico en etapas tempranas de desarrollo, como en la clínica, por la posibilidad de plantear nuevas posibilidades terapéuticas.

Según su potencial de diferenciación, las células madre pueden clasificarse en totipotenciales, pluripotenciales, o multipotenciales, y según el tejido de origen en embrionarias o adultas.

En embriones tempranos las células madre son pluripotenciales, lo que significa que tienen la capacidad de formar cualquier tipo de célula proveniente de los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el

germinal y el saco vitelino, es decir, pueden formar todas las estructuras del embrión. En este proceso de diferenciación, hacia otros tipos celulares, las células pierden su plasticidad. Por otra parte, las células indiferenciadas descubiertas en tejidos adultos demuestran que las células madre se mantienen aun después del desarrollo embrionario con la función de renovar su progenie (Takahashi et al., 2007; Park I-H et al., 2008). La plasticidad de estas células madre adultas es menor que las embrionarias, ya que solo pueden generar células de su propia capa o linaje embrionario de origen. A estas células se les conoce como multipotenciales.

En diente han sido identificadas diferentes poblaciones de células madre (Yen and Sharpe, 2008). Así, hoy en día, hablamos de células madre mesenquimales, epiteliales y del folículo dental. Por ser el diente un órgano no vital, así como accesible, las células madre mesenquimales dentales son muy empleadas tanto para la experimentación, como con propósitos terapéuticos (Reynolds and Jahoda, 2004; Shi et al., 2005).

## 7.- NICHOS DE CELULAS MADRE

Para conocer la verdadera naturaleza de las células madre, así como los mecanismos que las regulan es fundamental conocer el microambiente o nicho que las rodea y que les permite mantener su estado indiferenciado y de autoprotección (Giraldo et al. 2003).

El nicho de cada linaje celular es capaz de definir, de forma precisa, la forma de dividirse de la célula madre y el destino final de las células hijas. Además este microambiente también ejerce un control sobre la diferenciación de estas células mediante la secreción de moléculas específicas, llamadas factores de crecimiento y diferenciación (Watt F et al. 2000).

En el tejido dental se han identificado varios nichos de células madre, tanto en el mesénquima como en el epitelio dental, concretamente, este último, en el bucle cervical de los incisivos de roedores (Harada et al. 1999).

## 8.- CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL

La pulpa dental, comúnmente llamada “nervio” es un tejido blando y fibroso, muy vascularizado e innervado, formado por células conectivas. Se localiza en el interior del diente, ocupando el interior de la corona y las raíces. La pulpa dental es responsable de la formación de la dentina.

El inicio de la maduración de la pulpa coincide con los primeros signos de formación de dentina. Esta maduración involucra la orientación y arreglo específico de componentes asociados con un tejido pulpar funcional, como son las células y el medio extracelular.

Tras la diferenciación de las células mesenquimatosas a odontoblastos, comienza la producción de predentina, etapa que marca el inicio de la transición de papila dental a pulpa dental.

En la pulpa dental están presentes distintas poblaciones celulares, entre las que destacan, odontoblastos, fibroblastos y células ectomesenquimáticas, también llamadas células indiferenciadas o células madre.

Estas células, derivadas de la cresta neural tienen la capacidad de diferenciarse multipotencialmente y dar lugar a distintos linajes celulares como adipocitos, fibroblastos o células endoteliales y de músculo liso (Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003). En ratón se ha visto como las células mesenquimales de los incisivos pueden diferenciarse a osteoclastos, condrocitos e incluso odontoblastos (Braut et al., 2002, 2003).

La capacidad extraordinaria de estas células para diferenciarse a odontoblastos capaces de secretar nueva dentina, ha abierto una nueva puerta a la investigación interesada en la obtención de "dentina reparativa", es decir, en la obtención, mediante mecanismos naturales, de nueva dentina tras caries o accidentes dentales.

Esta diferenciación, a odontoblastos funcionales, se puede inducir *in vitro*, experimentalmente, tras la exposición de las células del mesénquima dental a factores de crecimiento específicos (Begue-Kirn C et al., 1994; Unda F et al., 2000). Estos resultados sugieren claramente que las células del mesénquima indiferenciadas están presentes en la pulpa y son capaces de diferenciarse a odontoblastos y secretar dentina cuando son expuestas a los factores adecuados.

Recientemente se ha identificado una población de células madre postnatales en papilas dentales humanas, denominadas DPSCs. (Batouli et al. 2003; Gronthos et al. 2000, 2002; Miura et al. 2003) Estas células se caracterizan por ser multipotentes y por expresar marcadores de células madre mesenquimáticas como son Stro-1 and CD146.

Comentar, finalmente que otros experimentos indican que existe una continua fuente de células progenitoras de la pulpa dental localizadas alrededor de los vasos sanguíneos de la pulpa (Tecles, 2005). En este contexto, los pericitos, células fusiformes dispuestas circunferencialmente alrededor de capilares y vénulas, co-expresan Stro-1 y el antígeno asociado a pericitos 3G5 (Shi and Gronthos, 2003), esto sugiere que los pericitos pueden ser considerados como las células madre de la pulpa dental o que los pericitos son la misma entidad.

La producción de hueso *in vitro* y *in vivo* ha sido vista recientemente en una subpoblación de las células de la pulpa dental (Laino et al., 2005, 2006 a, b; d'Aquino et al., 2007).

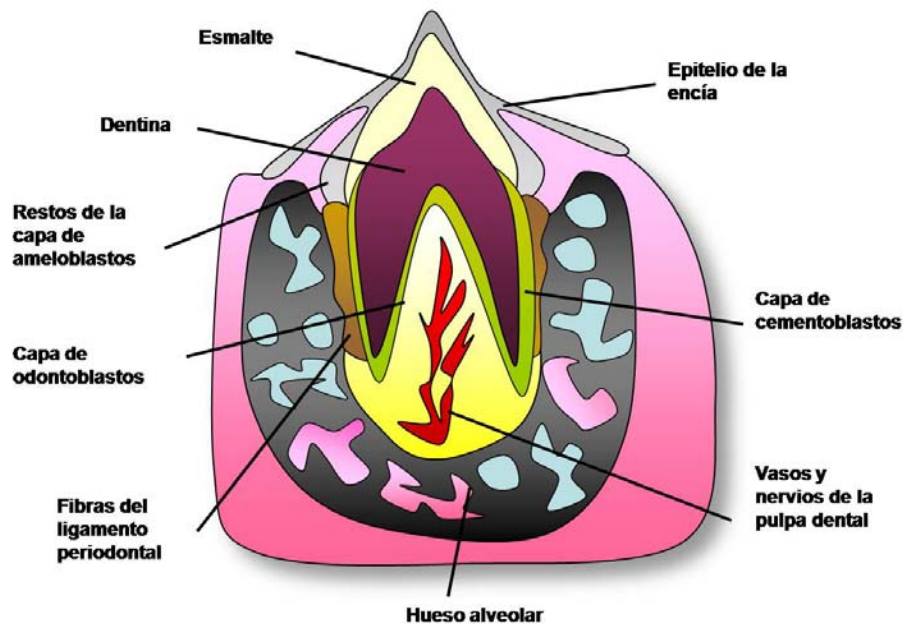


Fig: 6: Molar preparado para la erupción.

## 9.- CÉLULAS MADRE DEL EPITELIO DENTAL

Las células del epitelio dental ejercen importantes funciones durante el crecimiento y desarrollo del diente, especialmente en la diferenciación de ameloblastos y producción de esmalte.

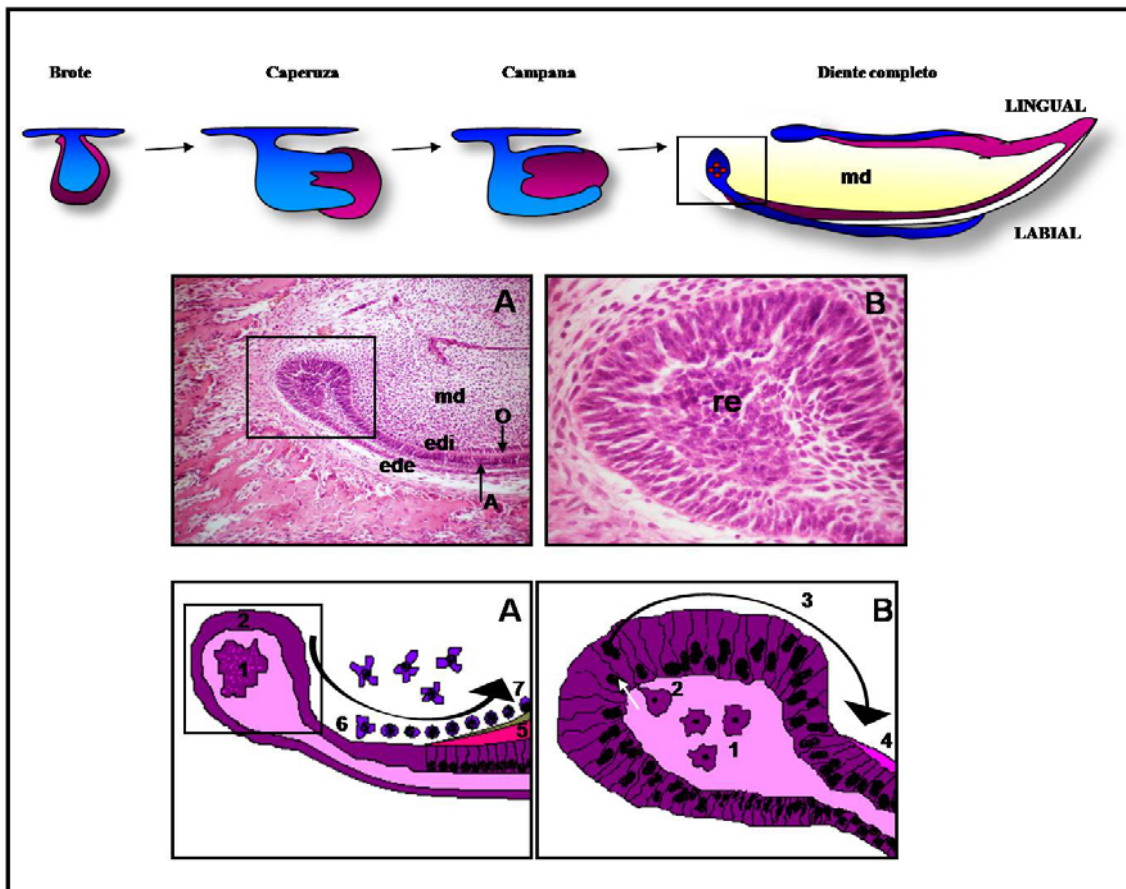
En la gran mayoría de los mamíferos, tras caries o daños en el diente, no resulta posible la regeneración, de forma natural de la capa de esmalte, ya que todos los derivados dentales epiteliales, incluidos los ameloblastos, se pierden tras la erupción del diente.

Solo algunos mamíferos, como los roedores, poseen incisivos con capacidad de crecer de forma constante. La asimetría presentada en ambos lados, labial y lingual, de los incisivos de roedor, supone un modelo ideal para el estudio de los mecanismos de regeneración del epitelio dental.

Tan sólo en el lado labial del incisivo el gradiente de las células del epitelio dental forman ameloblastos diferenciados que dan lugar a esmalte. Estudios recientes apuntan a que las células madre epiteliales de los incisivos de roedores residen en el centro del retículo estrellado del bucle cervical, el cual se localiza en la unión entre el epitelio dental interno y el epitelio dental externo.

Estas células se dividen dando lugar a una célula progenitora que se inserta en la capa basal del epitelio dental interno y prolifera, formando un grupo de células de amplificación transitoria, que comenzarán a diferenciarse en ameloblastos

por la zona más alejada del bucle cervical, e irán depositando la matriz de esmalte.



**Fig 7:** Desarrollo de un incisivo de ratón. A-B; Detalles del bucle cervical. 1; células madre del retículo estrellado, 2; inserción de las células madre en la membrana basal del epitelio, 3; proliferación de las células epiteliales, 4; ameloblastos diferenciados, 5; depósito de esmalte, 6; células del mesénquima dental, 7; odontoblastos diferenciados.

Se ha visto que el mantenimiento de las células madre epiteliales del bucle cervical se debe a señales provenientes del mesénquima adyacente.

Los factores de crecimiento fibroblástico 3 y 10 (*Fgf3* y *Fgf10*) constituyen las señales mesenquimales clave que estimulan la proliferación epitelial en los incisivos de ratón (Harada et al., 1999, 2002; Wang et al., 2006). Sus efectos están modulados por dos señales de la superfamilia *Tgfβ*: *Bmp4* inhibe la expresión de *Fgf3*, y *Activina* contrarresta los efectos de *Bmp4* estimulando la proliferación y el continuo suministro de progenitores de ameloblastos.

Cabe destacar que *BMP4* tiene roles opuestos en la proliferación y diferenciación de las células madre dentales, inhibe la proliferación de las células madre mientras estimula su diferenciación a ameloblastos en la lado labial.



En el lado lingual, el balance Activina-BMP es distinto. La intensa expresión de Activina en el lado labial previene el efecto inhibitorio de Bmp4 en la proliferación de las células madre (Wang, 2006; Thesleff 2007). Además, Folistatina, un inhibidor de Tgfβs que se expresa preferentemente en el epitelio lingual, previene la función de Activina en el nicho de células madre del lado lingual permitiendo que Bmp4 inhiba Fgf3 y se reduzca la proliferación de esas células madre.

En la zona en la que las células epiteliales normalmente se diferencian en ameloblastos, en el lado lingual, la Folistatina inhibe el efecto inductivo de Bmp4 y previene la diferenciación y la formación de esmalte (Wang *et al.*, 2004b). Los estudios realizados en ratones transgénicos y mutantes de Folistatina confirman estos datos; así, la delección de Folistatina provoca el aumento del tamaño del nicho de las células madre en el lado lingual y la formación de esmalte.

Este crecimiento anómalo del lado lingual ocurre también cuando se combina la ausencia de algunos genes como *Spry*. La formación ectópica de esmalte se debe a la formación de una población de células madre en el epitelio del lado lingual debido a la hipersensibilidad a la señalización Fgf que presentan los tejidos dentales en ausencia de genes *Spry* (Klein *et al.*, 2008).

## 10.- CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO DENTAL

Las células mesenquimatosas que rodean a los dientes se conocen como folículo dental. Algunas de estas células foliculares, que se sitúan inmediatamente adyacentes al órgano del esmalte migran periféricamente durante los estadios de caperuza y campana, desde el órgano del esmalte hacia el folículo para desarrollar el hueso alveolar y el ligamento periodontal. Se ha seguido el trayecto de estas células desde este origen hasta el lugar donde se diferencian en osteoblastos y forman hueso o fibroblastos que forman fibras de ligamento. Después de la erupción del diente, estos tejidos sirven de soporte de los dientes durante su función.

La capacidad que presentan estas células para diferenciarse en múltiples tipos celulares, es la que les ha hecho ser consideradas como células madre multipotentes (Handa *et al.* 2002 a, b Luan *et al.* 2006).

Las células progenitoras del folículo dental humano pueden ser obtenidas de los terceros molares y se caracterizan por su plasticidad en cultivo y expresión de marcadores de Nestin y Notch-1. Estas células son consideradas como capaces de diferenciarse a hueso y cemento (Morsczeck *et al.* 2005). La inyección de células foliculares bovinas en ratones inmunodeficientes da como resultado la formación de cemento (Handa *et al.* 2002). Estas células, han podido ser aisladas e inmortalizadas recientemente (Saito *et al.* 2005). Las últimas investigaciones ha puesto de manifiesto la capacidad de las células madre del folículo dental para diferenciarse en adipositos y neuronas ( Yao *et al.* 2008).



Por su parte, el ligamento periodontal tiene capacidad de regeneración tras un daño. La regeneración periodontal (RP) es un proceso complejo que requiere la coordinación entre la proliferación, diferenciación y desarrollo de varios tipos de células. Durante el desarrollo del diente las células madre periodontales, originadas de las células del folículo dental, son capaces de diferenciarse para formar cemento radicular, ligamento periodontal y hueso alveolar. Algunas de estas células madre permanecen en el ligamento periodontal después que el diente acabe su desarrollo. Durante la curación de la herida periodontal estas células madre junto con aquellas localizadas en la región perivascular del hueso alveolar, son estimuladas a proliferar, migrar dentro del defecto y diferenciarse para formar nuevos cementoblastos, fibroblastos del ligamento periodontal y osteoblastos. Si este proceso se realiza de forma sincronizada el resultado es un nuevo aparato de soporte periodontal (Pablo de et al. 2006).

## 11.- CONCLUSIÓN

En general, los tejidos tienen un potencial muy limitado de regeneración, sin embargo, los recientes progresos en el estudio de las células madre y la ingeniería de tejidos abren nuevas posibilidades de regeneración en la práctica dental. Las células madre descubiertas tanto en embriones como en tejidos adultos, incluido el diente, tienen el potencial de formar nuevos tejidos adultos (Thesleff et al. 2003).

En el caso del diente, células madre tanto de folículo como de papila dental pueden dar lugar a múltiples linajes celulares, como cementoblastos, fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos, permitiendo así la regeneración del hueso alveolar, ligamento periodontal y dentina. Las proteínas morfogenéticas óseas o BMPs son los factores de crecimiento y diferenciación más estudiados en estos procesos (Tawal R. et al. 2001; Ripamonti U, et al. 1996; Rutherford RB et al. 1993).

La regeneración del esmalte dental, por su parte, resulta más problemática. Las células madre descubiertas en el epitelio dental, en concreto en el bucle cervical del incisivo de ratón, pueden ser la respuesta para la regeneración de este tejido (Harada H et al. 1999). Se ha sugerido que el mantenimiento y/o diferenciación de estas células es estimulado por factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) (De Moerlooze L et al. 2000).

Finalmente hay estudios que afirman que los elementos dentales pueden ser formados por células madre de tejidos no dentales. Por ejemplo, las células madre derivadas de la médula o de origen neural tienen la habilidad de expresar genes dentales y producir estructuras dentales (Modino and Sharpe, 2005; Ohazama et al, 2004).

A pesar de los rápidos avances en el campo de la biología del desarrollo y la medicina regenerativa, aun son necesarias muchas investigaciones en torno a la regeneración dental y en particular acerca de las características y rutas de acción de las células madre dentales.

## 12.- BIBLIOGRAFÍA

Alpiste I, Francisco M, Buitrago P, Grado Canabilles P *et al.* Regeneración periodontal en la práctica clínica. *Med. oral patol. oral cir.bucal (Internet)*. [online]. 2006, vol. 11, no. 4 [citado 2008-10-13], pp. 382-392.

Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult Human Dental Pulp Stem cells differentiate towards functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem cells* 2008 (in press).

Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Desr Res*. 2003. 82(12); 976-81.

Bègue-Kirm C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1994; 38(3):405-20.

Braut A, Kalajzic I, Kalajzic Z, Rowe DW, Kollar EJ, Mina M. Col1a1-GFP transgene expression in developing incisors. *Connect Tissue Res*. 2002; 43(2-3):216-9.

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*. 2007; 14(6):1162-71.

Dassule HR, McMahon AP. Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol*. 1998; 202(2):215-27.

Grobstein C. Mechanisms of organogenetic tissue interaction. *Natl Cancer Inst Monogr* 1967; 26:279-99.

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002; 81(8):531-5.

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol*. 1999; 147(1):105-20.

Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang XJ, Haikel Y, Wang SL, Lesot H. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res*. 2006; 85(5):416-21.

Klein OD, Lyons DB, Balooch G, Marshall GW, Basson MA, Peterka M, Boran T, Peterkova R, Martin GR. An FGF signaling loop sustains the generation of differentiated progeny from stem cells in mouse incisors. *Development* 2008; 135(2):377-85.

Kollar EJ, Baird GR. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 1970; 24(1):173-86.

Kratochwil K. Tissue combination and organ culture studies in the development of the embryonic mammary gland. *Dev Biol* 1986; 4:315-33.

Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, Gombos F, Caruso F, Guida L, Rullo R, Menditti D, Papaccio G. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*. 2006; 17(3):511-5.

- Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 1988; 103 Suppl:155-69.
- Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol.* 1987; 32(2):123-7.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807-12. Epub 2003 Apr 25.
- Modino SA, Sharpe PT. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(2):255-8.
- Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res.* 2004; 83(7):518-22.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008; 451(7175):141-6.
- Reynolds AJ, Jahoda CA. Cultured human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. *Differentiation.* 2004; 72(9-10):566-75.
- Sakakura Y. Effects of parathyroid hormone on odontogenesis of the mouse embryonic molar tooth in vitro. *Calcif Tissue Int* 1987; 40(1):49-54.
- Saxén L. Directive versus permissive induction: a working hypothesis. *Soc Gen Physiol Ser* 1977; 32:1-9.
- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005; 8(3):191-9.
- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003; 18(4):696-704.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; 131(5):861-72.
- Téclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, About I. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(2):103-8.
- Thesleff I, Tummars M. Stem Cells and Tissues Engineering: Prospects for Regenerating Tissues in Dental Practice. *Med Princ Pract* 2003; 12; 43-50.
- Thesleff I, Wang XP, Suomalainen M. Regulation of epithelial stem cells in tooth regeneration. *C R Biol.* 2007; 330(6-7):561-4.
- Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int* 2003; 34(8):613-20.
- Unda FJ, Martín A, Hilario E, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Aréchaga J. Dissection of the odontoblast differentiation process in vitro by a combination of FGF1, FGF2, and TGFbeta1. *Dev Dyn.* 2000; 218(3):480-9.

Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 1993;75(1):45-58.

Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT, Plikus MV, Maas RL, Chuong CM, Schimmang T, Thesleff I. An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol.* 2007; 5(6):e159.

Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell.* 2004; 7(5):719-30.

Watt F, Hogan BL. Out of eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427- 1430.

Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* 2008; 331(1):359-372.

## CAPÍTULO 5:

### DIENTE Y GLÁNDULA MAMARIA COMO MODELOS DE ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN DE ÓRGANOS ECTODÉRMICOS.

Lucía Jiménez-Rojo y Unai Silván.

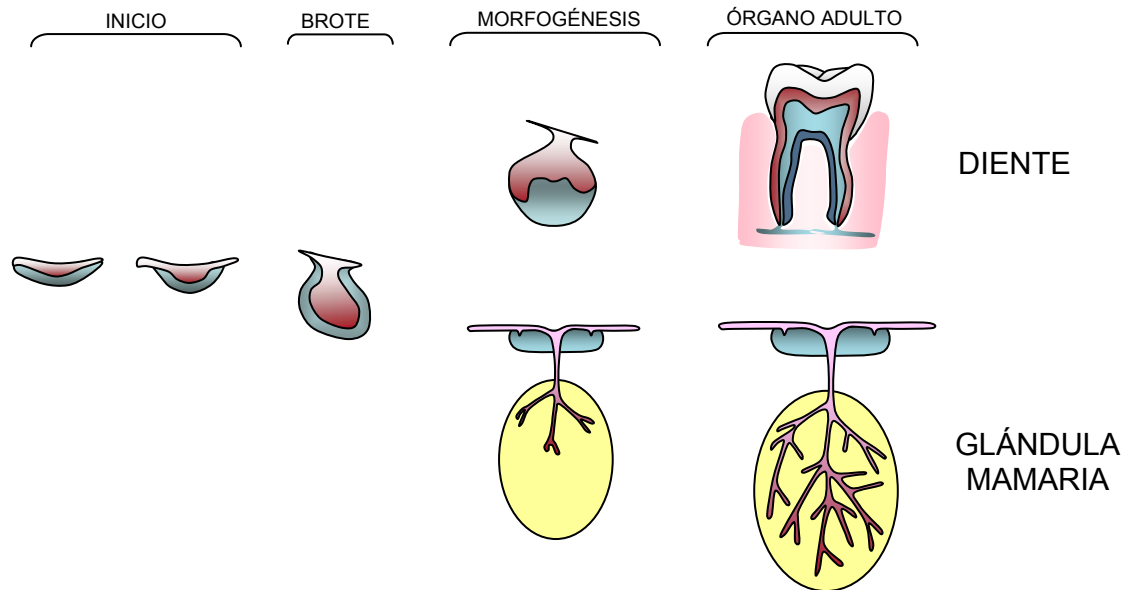
#### Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	132
2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DENTAL Y MAMARIO.....	133
3. FAMILIAS DE FACTORES DE SEÑALIZACIÓN.....	135
3.1. Familia Fgf.....	135
3.2. Familia Wnt.....	136
3.3. Superfamilia Tgf $\beta$ .....	136
4. DIENTE.....	137
4.1. Desarrollo dental.....	137
4.1.1. Inicio de la odontogénesis.....	138
4.1.2. Estadio de caperuza.....	138
4.1.3. Estadio de campana.....	139
4.1.4. Estadio de diferenciación.....	140
4.2. Ingeniería de tejidos dentales.....	142
5. GLÁNDULA MAMARIA.....	143
5.1. Desarrollo embrionario.....	143
5.1.1. Inicio del desarrollo mamario.....	144
5.1.2. Placoda mamaria.....	144
5.1.3. Brote mamario.....	145
5.1.4. Yema mamaria y formación del árbol ductal.....	145
5.2. Desarrollo postnatal.....	146
5.2.1. Elongación ductal.....	146
5.2.2. Formación de las ramificaciones laterales y morfogénesis alveolar.....	148
5.2.3. Diferenciación alveolar, lactogénesis e involución.....	148
5.3. Cáncer de mama y diferenciación.....	149
6. BIBLIOGRAFÍA.....	151

## 1. INTRODUCCIÓN.

A lo largo de la evolución, las especies han ido desarrollando órganos ectodérmicos de diversas morfologías (plumas, uñas, glándulas sebáceas, pelo, dientes, glándulas mamarias, etc.), con el objetivo de adaptarse a las diferentes condiciones ambientales.

El diente y la glándula mamaria, son un ejemplo de cómo órganos con un origen común pueden llegar a obtener formas tan diversas y especializarse para realizar diferentes funciones. Los dientes están relacionados con la alimentación de los animales y su forma ha variado a lo largo de la evolución como mecanismo de adaptación a los cambios en la dieta. La glándula mamaria, por su parte, facilita la alimentación de los neonatos que permite un mayor desarrollo fuera del huevo o útero. La interacción que se produce entre la madre y sus descendientes durante los primeros días después del nacimiento, ha favorecido que a lo largo de la evolución hayan ido aumentando los niveles de inteligencia hasta llegar a los que actualmente presentan los primates superiores (Peaker, 2002). A pesar de poseer formas y funciones tan diferentes entre sí, estos dos órganos de origen ectodérmico, comparten mecanismos reguladores y presentan etapas del desarrollo similares. Ambos se desarrollan mediante interacciones secuenciales y recíprocas entre el epitelio derivado del ectodermo y el mesénquima subyacente. Los apéndices epiteliales pueden sobresalir del epitelio, como ocurre con los dientes, o invaginarse hacia el mesénquima que lo rodea, como es el caso de las glándulas mamarias. En la etapa de **inicio**, se forma un engrosamiento epitelial, denominado placoda ectodérmica, que constituye un centro de señalización que expresa diversos factores responsables de inducir la condensación de las células mesenquimales subyacentes (Figura 1). Este mesénquima a su vez, secreta una serie de factores que señalizan sobre el epitelio, y como consecuencia, la placoda se invagina hacia el mesénquima y forma un brote epitelial. Durante el estadio de **morfogénesis**, dicho brote epitelial crece y se pliega (en el caso del diente) o se ramifica (glándula mamaria), adquiriendo así la forma y tamaño final del órgano del que se trate. Posteriormente, durante la fase de **diferenciación**, las células se especializan y se forman las estructuras específicas de cada órgano. Mientras que en el caso del diente, los tipos celulares característicos bien diferenciados se observan ya en el momento del nacimiento o durante los días inmediatamente posteriores al mismo, la glándula mamaria presenta un desarrollo postnatal importante regulado hormonalmente, alcanzando su máxima diferenciación durante el embarazo.

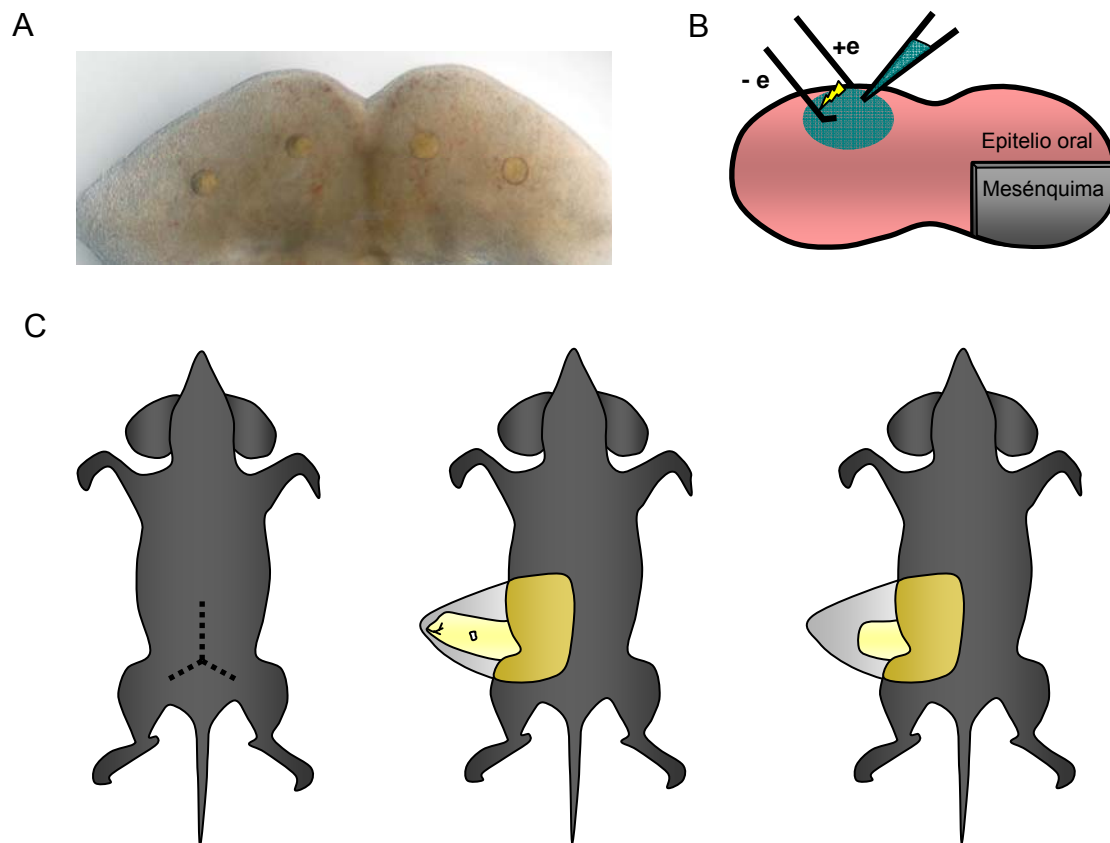


**Figura 1.** Esquema que representa algunas de las etapas del desarrollo del diente y la glándula mamaria. El primer signo morfológico del desarrollo de estos órganos ectodérmicos es el engrosamiento del epitelio, acompañado de la aparición de la denominada placoda epitelial. Como respuesta a las señales secretadas por dicho centro regulador, el mesénquima subyacente se condensa e induce la invaginación del epitelio formándose así el brote epitelial. A partir de este punto, el epitelio crece, se pliega o ramifica dependiendo del órgano que vaya a originarse en cada caso y posteriormente las células se diferencian permitiendo así que estos órganos puedan realizar su función correctamente.

Aunque la glándula mamaria y el diente comparten similitudes tanto morfológicas como moleculares durante ciertos estadios de su desarrollo, es obvio que también poseen mecanismos reguladores característicos que les confieren la capacidad de especializarse para realizar diferentes funciones. Un conocimiento más profundo a nivel molecular de los procesos responsables de dicha diferenciación será crucial para poder realizar avances tanto en el campo de la ingeniería de tejidos como en el tratamiento de patologías asociadas a alteraciones en su desarrollo.

## 2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DENTAL Y MAMARIO.

A pesar de que tanto los dientes como las glándulas mamarias, presentan notables diferencias entre especies en cuanto al número y a la complejidad se refiere, se ha visto que en numerosas ocasiones, las moléculas implicadas en el desarrollo de los mismos pueden ser comunes en diferentes organismos. Estos órganos, se forman a través de procesos muy similares en el humano y en el ratón, y es por ello que éste último es ampliamente utilizado como modelo de estudio del desarrollo de los mismos.



**Figura 2.** Técnicas utilizadas para el estudio del desarrollo de diente y glándula mamaria. A) Explante mandibular E10.5, en el que se observan cuatro microesferas de heparina acrílica impregnadas con el factor cuyo efecto se quiere estudiar, colocadas en las zonas de los futuros molares e incisivos. B) Electroporación de un constructo de DNA en el epitelio oral del primer arco branquial de embriones E10.5. Tras colocar el electrodo positivo (e+) debajo del epitelio y el electrodo negativo (e-) en la superficie del mismo, se deposita la solución de DNA o RNA sobre el epitelio y se aplican pulsos eléctricos. C) Preparación de un ratón huésped para un trasplante de epitelio mamario, brote embrionario mamario o células epiteliales mamarias. Tras realizar tres incisiones de alrededor de 1 cm en la piel del abdomen, se separa cuidadosamente la piel del peritoneo de forma que quede visible la cuarta glándula mamaria, que es la más comúnmente utilizada para este tipo de experimentos. Una vez eliminada la parte de la glándula que va desde el nódulo linfático (situado aproximadamente en el centro) hasta el pezón, el ratón queda preparado para transplantar el tejido que se desee.

El conocimiento de los mecanismos que regulan el desarrollo del diente y la glándula mamaria ha aumentado considerablemente durante los últimos años gracias a numerosos avances técnicos. Entre ellos está la producción de animales knockout y transgénicos, en los cuales se eliminan o sobreexpresan genes, tanto ubicuamente, como en un momento o tejido concretos. En lo que al estudio del desarrollo embrionario se refiere, los cultivos de gérmenes dentales y rudimentos mamarios ha permitido estudiar el efecto de determinados factores de crecimiento y sus inhibidores sobre el desarrollo de los mismos (Figura 2A y B). Técnicas de adición exógena de dichos factores mediante microesferas, así como la electroporación de DNA o RNA en dichos tejidos embrionarios, han sido de gran utilidad para conocer la función de los mismos sobre el desarrollo del órgano cultivado. Además, si lo que se quiere es analizar el efecto a largo plazo de un factor dado, es posible transplantar el órgano en estadio embrionario



dentro de cápsulas renales, permitiendo así su desarrollo en condiciones más similares a las fisiológicas. En el caso concreto de la glándula mamaria, se pueden realizar trasplantes tanto de brotes mamarios embrionarios como de fragmentos de epitelio adulto o células epiteliales mamarias, en la almohadilla adiposa mamaria de ratones huéspedes de tres semanas de edad (antes de la pubertad), eliminando previamente el rudimento mamario que estos presentaban (DeOme y cols., 1959) (Figura 2C). El hecho de que el tejido trasplantado exprese un gen marcador como puede ser la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés Green Fluorescent Protein), facilita el posterior análisis de este tipo de experimentos. Esta técnica permite por ejemplo estudiar posibles defectos en la diferenciación de la glándula mamaria de embriones transgénicos con letalidad perinatal, o ratones transgénicos que sean infértiles, ya que la glándula mamaria, como se explicará más adelante, termina de diferenciarse durante el embarazo.

### 3. FAMILIAS DE FACTORES DE SEÑALIZACIÓN.

Durante los primeros estadios de su desarrollo, los dientes y las glándulas mamarias comparten multitud de mecanismos reguladores. Sin embargo, a medida que avanza su desarrollo, y sobre todo a partir del estadio de brote, cuando comienzan a presentar patrones de morfogénesis y diferenciación únicos, empiezan también a observarse diferencias moleculares entre ambos órganos.

A continuación, se muestra un breve resumen de la estructura y función de las principales familias de factores de señalización implicadas tanto en el desarrollo dental como en el mamario. Su función concreta en el desarrollo de los mismos se explicará en posteriores apartados.

#### 3.1. Familia Fgf.

Los factores de crecimiento fibroblástico (Fgf, del inglés Fibroblast growth factor), forman una familia de factores de crecimiento de moléculas de señalización intercelular que en vertebrados está compuesta por 22 miembros (Ornitz e Itoh, 2001). Los Fgfs son los reguladores principales del desarrollo embrionario y afectan a funciones celulares como la proliferación, supervivencia, diferenciación, adhesión y migración (Szebenyi y Fallon, 1999). Se unen a receptores de membrana celular con dominios intracelulares tirosinaquinasa y dominios extracelulares con motivos de tipo inmunoglobulina, uno de los cuales (hélice Ig-3) determina la especificidad del ligando. Existen cuatro tipos de genes de receptores de Fgfs (*Fgfrs*), *Fgfr1*, *Fgfr2* y *Fgfr3* y *Fgfr4*. El dominio extracelular de los *Fgfrs* interactúa con los proteoglicanos heparan-sulfato (HSPG), incluyendo sindecano y perlecan, que regulan la unión a los ligandos (Zhu y cols., 1991; Faham y cols., 1996; Ornitz 2000; Ornitz e Itoh 2001). Cuando un complejo Fgf-cofactor se une a un *Fgfr*, el receptor homo- o heterodimeriza, lo cual desencadena la fosforilación y la transducción de la señal al interior celular (Givol y Yayon, 1992; Johnson y Williams, 1993; Faham y cols., 1996). Existen numerosos genes diana tanto indirectos como directos de los Fgfs, entre los cuales se encuentran los genes *Sprouty* que codifican para

inhibidores de la vía de los Fgfs (Hacohen y cols., 1998). La mayor parte de los Fgfs son necesarios para la correcta morfogénesis de varios tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario.

### 3.2. Familia Wnt.

Los genes *Wnt* codifican para una familia de proteínas secretadas ricas en cisteína, que señalizan a través de proteínas con 7 hélices transmembrana pertenecientes a la familia Frizzled (Wodarz y Nusse, 1998). La diversidad de las vías de transducción de la señal tras la señalización de Wnt está regulada a nivel de los receptores, pudiendo desencadenarse hasta 3 diferentes cascadas de señalización. La activación de la vía de transducción **canónica** se produce tras la activación de la proteína intracelular Disheveled (Dsh) y la posterior estabilización de  $\beta$ -catenina, que se dirige al núcleo donde forma complejos con factores de transcripción de tipo TCF/LEF y activa la transcripción de los genes diana de la vía Wnt. En ausencia de señales Wnt, un complejo de destrucción multiproteico formado por GSK3, Axina, APC y  $\beta$ -TrCP/Slimb, desencadena la degradación de  $\beta$ -catenina en el proteasoma (Seidensticker y Behrens, 2000). El segundo tipo de vía, denominada **vía de polaridad planar (PCP)**, se separa de la vía canónica a nivel de Dsh y funciona de forma independiente a  $\beta$ -catenina. La cascada de señalización PCP regula la actividad de la quinasa Jun N-terminal (JNK) (Boutros y cols., 1998). La activación de la tercera vía estimula el incremento del **Ca<sup>2+</sup> intracelular** y activa la protein quinasa C (Sheldahl y cols., 1999).

Las proteínas relacionadas con Frizzled (FRPs) Dickkopf (Dkk), Cerberus y Factor inhibidor de Wnt (WIF)-1, actúan como antagonistas secretados que regulan la función de Wnt extracelularmente (Wang y cols., 1997; Piccolo y cols., 1999; Hsieh y cols., 1999; Zorn 2001). En ratones, los genes *Wnt* están implicados en el desarrollo de la mayor parte de los órganos, regulando la proliferación celular, migración, diferenciación e interacciones epitelio-mesenquimales (Millar, 2002).

### 3.3. Superfamilia Tgf $\beta$ .

Los primeros miembros de esta superfamilia se identificaron por su actividad para inducir un fenotipo transformado de ciertos tipos celulares en cultivo, pero recientemente se ha visto que estos factores de crecimiento desempeñan también importantes funciones en la regulación del desarrollo, ejerciendo tanto efectos proliferativos como antiproliferativos, dependiendo del factor que se trate. Además tienen la capacidad de estimular la expresión de moléculas de adhesión celular, de otros factores de crecimiento y de moléculas de la matriz extracelular. La superfamilia del Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (Tgf $\beta$ , del inglés Transforming Growth Factor  $\beta$ ) está compuesta por más de 50 miembros estructuralmente relacionados, con varios subgrupos que incluyen Tgf $\beta$ s, Bmps (Bone Morphogenetic Proteins) y Activina/Inhibina. La mayor parte de las moléculas son factores de señalización e inhibidores de los mismos (Massagué, 2000; Balemans y Van Hul., 2002), y al igual que en otras muchas vías de transducción de señales, el inhibidor y el receptor están bajo un control

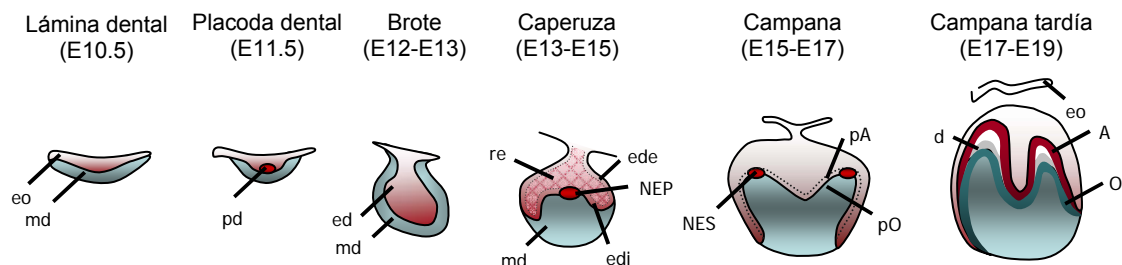
intrínseco. Las proteínas codificadas por los genes de esta familia se forman inicialmente como precursores inactivos y posteriormente son sometidas a un procesamiento proteolítico para su activación. Los precursores contienen un péptido amino terminal, un predominio central y un dominio carboxilo terminal que constituye el factor de crecimiento maduro activo. Los factores en su forma activa, se asocian formando dímeros, que pueden ser homodímeros, si se asocian entre ellos mismos, o heterodímeros si lo hacen con otros péptidos de la superfamilia Tgf $\beta$  diferentes, como ocurre en el caso de Activinas y Bmps (Hogan, 1996).

La regulación de la transducción de la señal está mediada por señales inhibitoras que actúan a diferentes niveles en la vía. En la vía de señalización Bmp, la inhibición puede llevarse a cabo intracelularmente por los Smads inhibidores (I-Smads; Smad6 y Smad7), a nivel de membrana plasmática por el pseudoreceptor Bambi, y a nivel extracelular por Nogina, Cordina, Ectodina y Folistatina, entre otros. Los Bmps fueron descubiertos por su capacidad de inducir la formación ectópica de hueso y cartílago, y por ello fueron denominados proteínas morfogenéticas óseas (Urist, 1965; Wozney y cols., 1988). Se ha visto que los Bmps realizan una amplia variedad de actividades biológicas y regulan el crecimiento, proliferación, diferenciación, quimiotaxis y apoptosis en varios tipos celulares.

## 4. DIENTE.

### 4.1. Desarrollo dental.

Existen variaciones específicas de especie en lo que se refiere a los dientes. En humanos, por ejemplo, hay dos generaciones de dientes: la dentición primaria y la secundaria o permanente, la cual consiste en dos incisivos, un canino, dos premolares y tres molares en cada cuadrante de las mandíbulas. Los ratones sólo presentan una dentición, con un incisivo y tres molares en cada mitad de la mandíbula. En este apartado, se expondrán los diferentes estadios del desarrollo dental en ratones, así como las principales moléculas reguladoras que han sido identificadas hasta la fecha mediante diversos estudios realizados en modelos de ratón.



**Figura 3.** Desarrollo del primer molar de ratón desde el estadio de inicio hasta la citodiferenciación. A, ameloblastos; d, dentina; e, esmalte; ede, epitelio dental externo; edi, epitelio dental interno; eo, ectodermo oral; hm, hueso mandibular; md, mesénquima dental; NEP, nudo del esmalte primario; NES, nudo del esmalte secundario; O, odontoblastos; p, pulpa dental; pA, preameloblastos; pd, placoda dental; pO, preodontoblastos; r, raíz dental; re, retículo estrellado.

#### 4.1.1. Inicio de la odontogénesis.

La primera evidencia del desarrollo del diente en ratones, se observa alrededor del día E10.5 (Figura 3), cuando se produce un engrosamiento celular en la capa basal del epitelio oral, lo que corresponde a la **lámina dental**, la cual penetra dentro del ectomesénquima de la encía primitiva. Los experimentos clásicos de recombinación han demostrado que el epitelio oral en los primeros estadios (E9-11) posee el potencial odontogénico o instructivo para que se el inicio del desarrollo dental (Mina y Kollar, 1987; Lumsden, 1988).

A pesar de los numerosos estudios realizados hasta la actualidad, aún no se conoce con detalle la combinación de vías de señalización que da lugar a la inducción de la formación de los dientes. Bmps y Fgfs inducen la expresión de varios factores de transcripción mesenquimales, muchos de los cuales son necesarios para la continuación del desarrollo dental. Se sabe que Fgfs y Bmps actúan de forma antagonista, de forma que Fgf8 estimula y Bmp2 y Bmp4 inhiben la expresión de *Pax9* en el mesénquima dental E10.5, el cual se ha propuesto como el responsable de la determinación de la posición de los brotes dentales en la lámina dental (Neubuser y cols., 1997).

Una vez establecida la especificidad del tipo de diente que se formará en cada región de la lámina dental y tras producirse el engrosamiento del epitelio, éste comienza a crecer y se introduce en el mesénquima como un brote epitelial (Figura 3). Para que esto ocurra, es necesaria la presencia de un centro señalizador denominado **placoda dental**. La placoda expresa localmente varios genes como *Bmp2*, *Shh*, *Wnt10a*, *p21*, *Msx2* y *Lef1*, que desencadenan la expresión de factores mesenquimales, los cuales actúan sobre el epitelio induciendo así la formación de dicho **brote dental**. En el estadio E11.5-E12, el potencial odontogénico pasa al mesénquima, y se ha postulado que la expresión de los genes de la placoda dental es necesaria para que el mesénquima adquiera dicha capacidad (Jernvall y Thesleff, 2000).

#### 4.1.2. Estadio de caperuza.

En el estadio E13, el brote epitelial alcanza su máxima altura vertical. Es entonces cuando el extremo del brote se aplanar debido al crecimiento a lo ancho del mismo, y se forma un nuevo centro de señalización denominado nudo del esmalte primario (NEP) en la punta del brote ensanchado. El NEP es una estructura transitoria no proliferativa que se cree que es la responsable del crecimiento de los bucles cervicales flanqueantes que se invaginarán y formarán una estructura con forma de **caperuza** rodeando a la papila dental mesenquimal (Jernvall y cols., 1998). La transición de la etapa de brote a la de caperuza es una etapa crítica en el desarrollo del diente y requiere una señalización recíproca y secuencial entre el epitelio y el mesénquima. Si esta señalización se ve interrumpida, el desarrollo dental cesa en este estadio, como ocurre en el caso de los ratones deficientes en *Msx1*, *Lef1*, *Pax9* y *Activina*  $\beta$ A. En ninguno de estos mutantes se llega a formar el nudo del esmalte primario, lo cual indica que es un requisito imprescindible para esa transición de brote a caperuza.

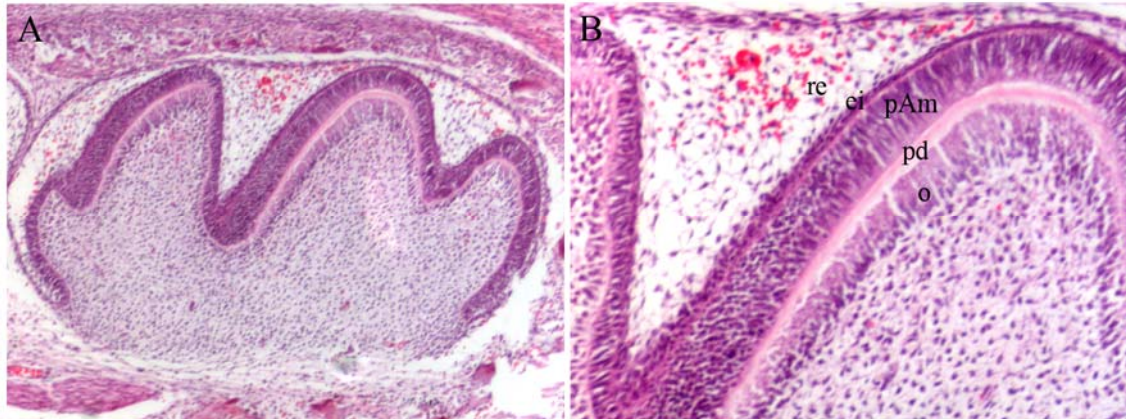
Posteriormente, en el estadio de caperuza (E14-E14.5), el NEP es histológicamente distinguible como un grupo de células condensadas en el epitelio dental interno que expresan genes como *Fgf3*, *Fgf4*, *Bmp4*, *Wnt3*, *Wnt10a* (Kettunen y Thesleff, 1998; Sarkar y Sharpe, 1999; Jernvall y cols., 1998). En este momento es cuando comienza el proceso de citodiferenciación. Así, a partir del epitelio dental, también denominado órgano del esmalte, se diferencian varios tipos celulares distintos (Fig 3). Las células del interior segregan proteoglicanos que al hidratarse incorporan agua al espacio extracelular formando una red o retícula, denominándose retículo estrellado. Esta masa celular queda separada del mesénquima del folículo por el epitelio dental externo, y de la papila dental por el epitelio dental interno. Entre el epitelio dental interno y el retículo estrellado existen entre dos y tres capas de células aplanadas que forman el estrato intermedio. Los extremos de la campana donde se unen los epitelios dentales externo e interno se denominan asas cervicales. Más tarde, las células que forman el nudo del esmalte primario desaparecen por apoptosis, probablemente con el fin de silenciar el centro regulador una vez que éste ha realizado su función (Vaahtokari y cols., 1996).

#### 4.1.3. Estadio de campana.

Más adelante, aparecen nuevos nudos del esmalte secundarios (NES) en las zonas de las futuras cúspides dentales. En este estadio, denominado de **campana**, los bucles cervicales crecen hacia el mesénquima y el epitelio del esmalte adquiere una forma acampanada. Los NES están formados por células no proliferativas, que de forma similar a las del NEP, expresan *Fgf4* y acaban desapareciendo por apoptosis (Vaahtokari y cols., 1996; Coin y cols., 1999). Se ha descrito que la función de esos NES es determinar el tamaño y posición de las cúspides dentales mediante un correcto balance de señalización de Fgfs, probablemente nivelado por Bmps y moléculas relacionadas (Jung y cols., 1998). En el diente, *Fgf4* funciona como un activador de las cúspides dentales, mientras que los Bmps y posiblemente *Shh* pueden funcionar como inhibidores regulando la distancia entre las mismas. Sin embargo, también se ha visto que la acción de *Shh* sobre el epitelio dental es indirecta, ya que éste actúa sobre el mesénquima dental que recíprocamente regula el crecimiento de los bucles cervicales epiteliales (Gritli-Linde y cols., 2002). Además, se ha observado que la señalización *Tgf $\beta$ /Bmp* tiene un papel importante durante la formación de las cúspides, ya que los ratones transgénicos para Folistatina presentan alterada la formación de las mismas. Un balance incorrecto de Activinas/Bmps y su inhibidor Folistatina puede causar un patrón de cúspides anormal. Hay evidencia de la importancia de la correcta relación entre activadores e inhibidores para que se de un desarrollo normal de las cúspides dentales. Así, los ratones deficientes en *Ectodina*, inhibidor de Bmps y modulador de la señalización *Wnt*, presentan defectos severos en el desarrollo de las cúspides (Kassai y cols., 2005).

#### 4.1.4. Estadio de diferenciación.

El proceso de diferenciación comienza durante la morfogénesis de las cúspides dentales, y ocurre mediante un gradiente espacial específico, comenzando en la punta de las cúspides dentales y siguiendo hacia la base de las mismas.



**Figura 4.** Sección histológica de un molar de ratón E19.5 (A), en el que se observan odontoblastos secretores de predentina y preameloblastos en la zona cercana a las cúspides dentales (B). ei, estrato intermedio; o, odontoblastos, pAm, preameloblastos; pd, predentina; re, retículo estrellado.

Las células de la papila dental adyacentes al epitelio dental interno (denominadas preodontoblastos), que inicialmente presentan forma cilíndrica, alrededor del día E17.5-E18.5 comienzan a elongarse y se polarizan dando lugar a **odontoblastos**. Cuando empiezan a secretar la matriz de dentina, forman largos procesos celulares que quedan embebidos dentro de dicha matriz compuesta por colágeno tipo I (86%), proteoglicanos, glicoproteínas y dentinosialofosfoproteína (DSPP) (Ruch y cols. 1995; MacDougall y cols., 1998).

Se ha visto mediante experimentos de recombinación de tejidos, que de forma similar a lo que ocurre en estadios precedentes del desarrollo dental, la diferenciación de preodontoblastos no tiene lugar sin la presencia del epitelio dental interno (Thesleff y Hurmerinta, 1981; Ruch y cols., 1995). Los factores de crecimiento implicados en la diferenciación de odontoblastos pertenecen principalmente a las familias Fgf y Tgf $\beta$ . Experimentos in vitro han demostrado que Tgfb1 y 3, así como Bmp2, 4 y 6, pueden inducir la polarización de preodontoblastos y estimular la secreción de matriz dental cuando se combinan con heparina o fibronectina (Begue-Kirn y cols., 1992; 1994; Martin y cols., 1998; Ruch, 1998; Lesot y cols., 2001).

Los **ameloblastos** proceden de las células del órgano del esmalte, conocidas inicialmente como epitelio dental interno, que se van alargando y estableciendo uniones intercelulares, incluidas uniones estrechas hasta formar los ameloblastos maduros. A partir de este momento se secretan las proteínas específicas del esmalte entre las cuales están Amelogenina, Ameloblastina, Enamelina, Tuftelina, Sialofosfoproteína de la dentina y Laminina 5 (Robinson y

cols., 1998). Posteriormente, los ameloblastos van progresivamente degenerando hasta desaparecer durante el proceso de erupción del diente.

De la misma forma que sucedía con el proceso de diferenciación de odontoblastos, las interacciones epitelio-mesenquimales son esenciales para que el epitelio dental interno se diferencie a ameloblastos, siendo necesaria la presencia de odontoblastos secretores y la matriz de predentina o dentina para que esto ocurra (Karcher-Djuricic y cols., 1985).

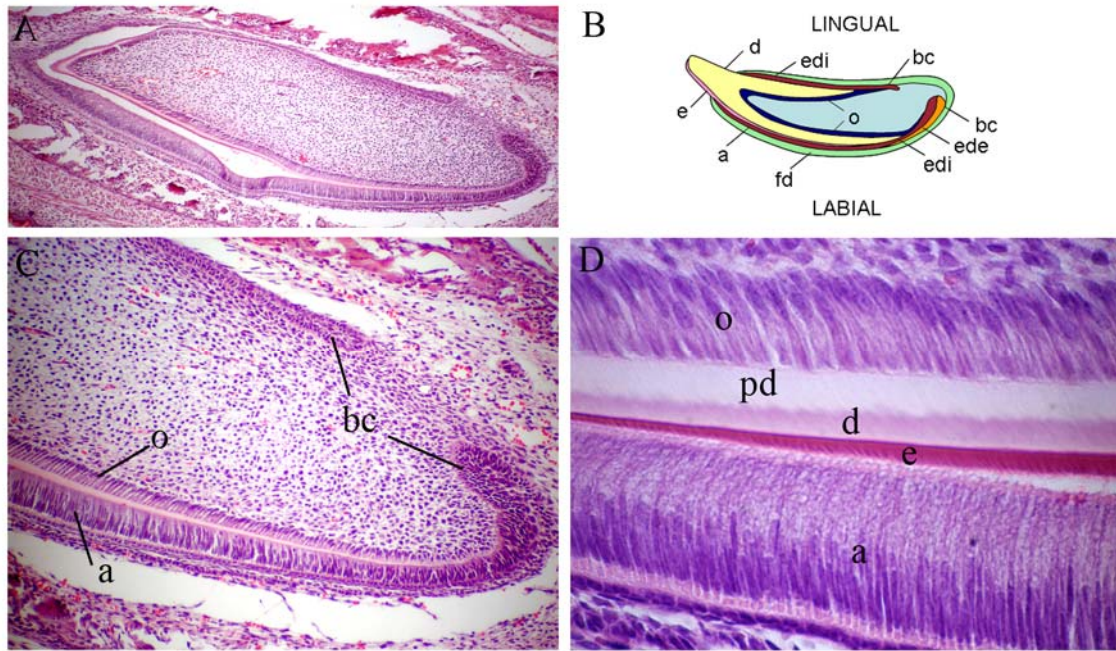
Recientemente se ha visto que Bmp4 es una de las principales señales provenientes de los odontoblastos que inducen la diferenciación de ameloblastos, cuyo efecto es antagonizado por la Activina del folículo dental (Wang y cols., 2004a). También se ha observado que Shh es necesario para la regulación de la proliferación celular en el epitelio dental y para el control de la diferenciación de los preameloblastos (Gritli-Linde y cols., 2002).

El incisivo de roedores presenta forma cónica y se estrecha en la punta como resultado de una característica especial de este tipo dental (Figura 5). Mientras que su lado labial presenta un esmalte equivalente al de la corona dental de los molares, el lado lingual tan sólo presenta dentina, de forma similar a las raíces de los molares. Un rasgo característico del incisivo de roedores es que erupcionan continuamente a lo largo de toda su vida, gracias a las células madre que se encuentran en el bucle cervical de la base del diente (Smith y Warshawsky, 1975, 1976; Harada y cols., 1999, 2002). Dichas células madre, se dividen dando lugar a una célula progenitora que se inserta en la capa basal del epitelio dental interno y prolifera, formando un grupo de células de amplificación transitoria, que comienzan a diferenciarse en ameloblastos por la zona más alejada del bucle cervical, y van depositando la matriz de esmalte. Este gradiente de diferenciación que se observa en los incisivos de roedores hace que éstos sean un modelo único para el estudio del proceso de diferenciación de ameloblastos.

En la zona en la que las células epiteliales normalmente se diferencian en ameloblastos, en el lado lingual, Folistatina inhibe el efecto inductivo de Bmp4 y previene la diferenciación y la formación de esmalte (Wang y cols., 2004b). Hay una serie de ratones transgénicos que presentan un fenotipo destacable en los incisivos. Así, una sobreexpresión de Folistatina (expresada bajo el promotor de K14) previene la proliferación de las células madre (inhibiendo el efecto de Activina), y el incisivo es de menor tamaño. Además, Folistatina inhibe el efecto inductivo de Bmp4 en la diferenciación de ameloblastos y por lo tanto no se llega a formar esmalte. La delección de Folistatina provoca el efecto contrario: aumenta el tamaño del nicho de células madre en el lado lingual, y se estimula la formación de esmalte. Esto ocurre también cuando se combina la ausencia de algunos genes Spry, y esta formación ectópica de esmalte se debe a la formación de una población de células madre en el epitelio del lado lingual debido a la hipersensibilidad a la señalización Fgf que presentan los tejidos dentales en ausencia de genes Spry (Klein y cols., 2008). Tras el estudio de este último modelo se ha propuesto que la función de los genes Spry es inhibir en el lado lingual del incisivo la señalización recíproca entre los Fgfs



mesenquimales y epiteliales, evitando así la diferenciación del epitelio dental interno en ameloblastos y por lo tanto la formación de esmalte. Estos genes *Spry* también se expresan en el lado labial, pero en esa zona no son capaces de inhibir la señalización entre los *Fgfs* mesenquimales y epiteliales, produciéndose entonces la proliferación y diferenciación de células epiteliales y la subsiguiente deposición de esmalte.



**Figura 5.** Incisivos de ratón. Secciones histológicas de incisivos de ratón E19.5 (A y C), en las que ya se observa un gradiente de diferenciación que comienza en el epitelio y mesénquima indiferenciado en la zona más cercana al bucle cervical (bc). Sección histológica de un incisivo de un ratón de 20 días de edad (D) en el que se pueden distinguir los ameloblastos (a) y la capa de esmalte (e), así como la dentina (d) y predentina (pd) producidas por los odontoblastos (o). ede, epitelio dental externo; edi, epitelio dental interno; fd, folículo dental.

## 4.2. Ingeniería de tejidos dentales.

Los descubrimientos hechos hasta la fecha sobre las moléculas reguladoras del desarrollo dental, sirven como base para numerosos estudios dirigidos a la reconstrucción de tejidos dentales. Dichos estudios comparten un mismo objetivo, generar dientes completamente diferenciados y funcionales, usando para ello diferentes estrategias:

- Crear una matriz biodegradable con la forma del diente, y posteriormente añadir las células que componen el tejido dental, esperando que acabe por formarse el diente (Young y cols., 2002; Dualibi y cols., 2004). El mayor problema de este método, es que los dientes no llegan a adquirir la forma exacta de la matriz, y además no se genera tejido óseo, el cual es fundamental para el soporte dental.



- Construir un diente *de novo*, creando individualmente cada parte que constituye un diente (Robey, 2005).

- Inducir una tercera dentición que pueda sustituir a los dientes perdidos. La idea es añadir factores que induzcan *de novo* el inicio del desarrollo dental en el adulto. Existen una serie de genes sobre los cuales podría basarse esta estrategia, como *Runx2*, cuya mutación en humanos da lugar a la enfermedad conocida como displasia cleidocraneal, que se caracteriza por la presencia de una tercera dentición (Mundlos y cols., 1997). Hay además diversos animales genéticamente modificados en los cuales se observa la presencia de dientes supernumerarios, como es el caso de aquellos que carecen de *Spry2* o *Spry4* (Klein y cols., 2006), *Polaris hypomorphs* (Zhang y cols., 2003), *Pax6* (Kaufman y cols., 1995), *Ectodina* (Kassai y cols., 2005), *Epiprofina* (Nakamura y cols., 2008) y aquellos que sobreexpresan Ectodisplasia o su receptor (Mustonen y cols., 2003; Pispá y cols., 2004).

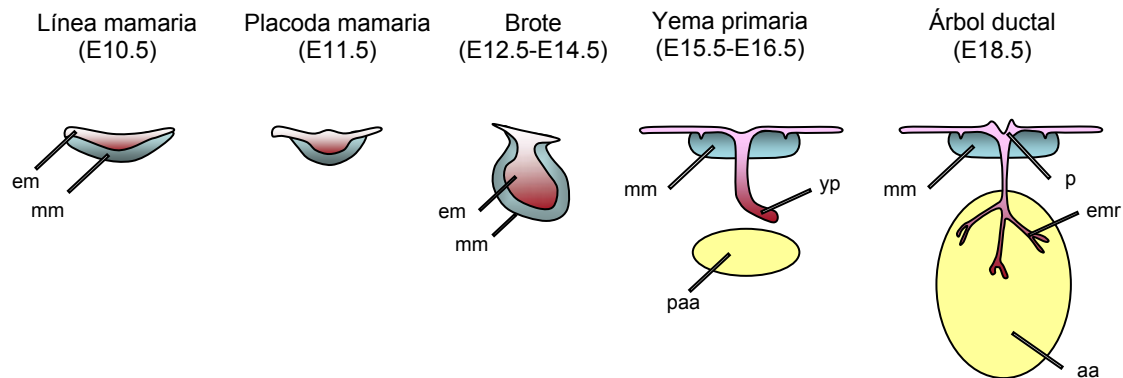
- Reproducir a partir de células madre, el desarrollo dental embrionario en la cavidad oral adulta. Esta estrategia esta basada en el simple hecho de que dado que los dientes se forman en el embrión, para conseguir generar un diente *in vitro*, es necesario conocer bien los mecanismos que regulan su desarrollo embrionario (Shartaj y Sharpe, 2006). Dado que hasta el momento no han conseguido aislarse células madre dentales de humano, el reto es conseguir que otro tipo celular presente en el adulto pueda diferenciarse y dar lugar a odontoblastos y ameloblastos funcionales. En este sentido, se han realizado una serie de experimentos mediante los cuales se ha demostrado que las células del estroma de la médula ósea adulta son capaces de responder a estímulos provenientes del epitelio dental embrionario para dar lugar a células mesenquimales dentales (Ohazama y cols., 2004) y células de aspecto ameloblástico (Hu y cols., 2006).

## 5. GLÁNDULA MAMARIA.

La glándula mamaria es un órgano complejo cuyo desarrollo comienza durante la embriogénesis pero que se desarrolla principalmente durante el periodo postnatal bajo la influencia de diversas hormonas (Nandi, 1958). Mientras en el humano, sólo se forma un par de glándulas mamarias, el ratón posee 3 pares en la región torácica y otros dos en la región inguinal. A pesar de que la complejidad de estos órganos es menor en el caso del ratón, existen notables similitudes en la regulación del desarrollo de la glándula mamaria entre ambas especies, siendo además los estrógenos, progesterona y prolactina, las hormonas que modulan el desarrollo postnatal en ambos casos.

### 5.1. Desarrollo embrionario.

El desarrollo de la glándula mamaria durante la embriogénesis comprende una serie de interacciones secuenciales y reciprocas entre el epitelio y el mesénquima subyacente (Figura 4). Tal y como se ha mencionado anteriormente, este proceso es muy similar en diversos órganos de origen ectodérmico, entre ellos el diente.



**Figura 6.** Estadios del desarrollo de la glándula mamaria antes del nacimiento. aa, almohadilla adiposa; em, epitelio mamario; mm, mesénquima mamario; p, pezón; paa, precursor de la almohadilla adiposa; yp, yema primaria.

### 5.1.1. Inicio del desarrollo mamario.

La primera señal del inicio de desarrollo mamario en el ratón, se observa alrededor de E10.5 con la formación de un engrosamiento del ectodermo mamario constituido por una sola capa celular, que recibe el nombre de surco mamario o línea mamaria. Dicha estructura, que es solo distinguible mediante secciones histológicas, se caracteriza por la expresión de diversos genes como por ejemplo *Wnt10b* (Velmaat y cols., 2004).

### 5.1.2. Placoda mamaria.

Alrededor de E11.5, la línea mamaria se separa en 5 pares de placodas individuales que en 24 horas se transformarán en abultamientos de células epiteliales morfológicamente diferentes a la epidermis que las rodea. Parece ser que la formación de estos abultamientos no está relacionada con una mayor proliferación celular como se creía inicialmente (Balinsky, 1949), sino con la migración de las células ectodérmicas inducida por el mesénquima subyacente (Propper, 1978; Cunha y cols., 1955). El fenotipo de los ratones mutantes que carecen de *Fgf10* o su receptor *Fgfr2*, los cuales no llegan a desarrollar placodas mamarias, indica el papel clave que juegan ambas moléculas en el inicio del desarrollo mamario (Mailleux y cols., 2002). El hecho de que los ratones que sobreexpresan *Dkk1*, inhibidor de la vía de los genes *Wnt*, tampoco presenten placodas, indica que la vía de señalización *Wnt* es también crucial para la especificación de dichas estructuras (Andl y cols., 2002). Otro importante regulador de la formación de las placodas mamarias es *p63*. En el ratón knockout para este gen se observa una detención en el desarrollo del pelo, diente y glándula mamaria en estadios iniciales. Aunque hay autores que sugieren la relación de *p63* con la vía *Wnt* y *Fgf* (Mills y cols., 1999; Fomenkov y cols., 2003), el mecanismo exacto de dicha posible interacción no ha sido aún determinado.

### 5.1.3. Brote mamario.

El día E12.5, las placodas aumentan de tamaño, y comienzan a invaginarse hacia el mesénquima subyacente. Al mismo tiempo, dicho mesénquima se condensa alrededor del brote mamario y comienza a expresar el receptor de andrógeno, mientras las células epiteliales que recubren el brote comienzan a especializarse para formar el pezón. La invaginación del epitelio, así como el mantenimiento de los brotes, parece requerir la señalización Wnt/ $\beta$ catenina, ya que los ratones knockout para *Lef1*, gen diana de esta vía, presentan pequeñas placodas que degeneran antes de formar los brotes (Boras-Granic y cols., 2006). Otros ratones que presentan este mismo fenotipo son los dobles mutantes *Msx1*<sup>-/-</sup>*Msx2*<sup>-/-</sup>, indicando un papel crucial de estos factores de transcripción homeobox en este estadio (Hens y cols., 2005).

### 5.1.4. Yema mamaria y formación del árbol ductal.

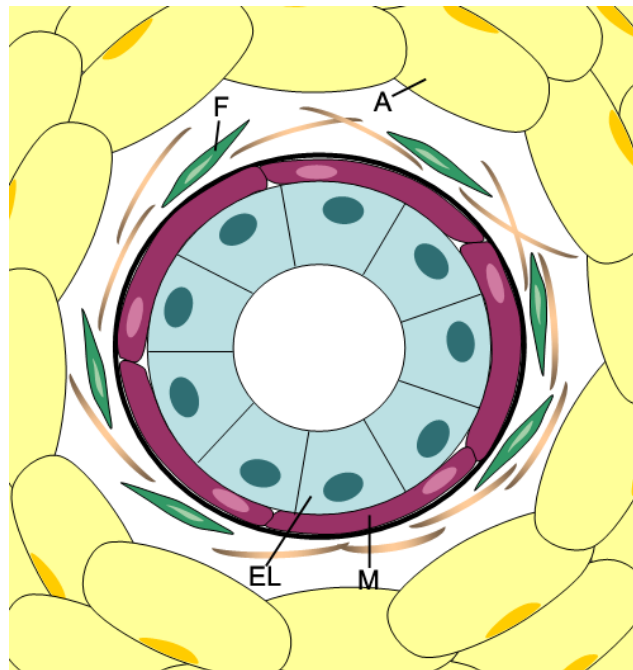
Entre los días E13.5 y E15.5, en los embriones de ratón de sexo masculino y bajo la influencia de los andrógenos fetales, particularmente testosterona, los brotes mamarios se separan del ectodermo y degeneran (Kratochwil, 1987). En el caso de las hembras, los brotes permanecen en un estado de quiescencia hasta E16. Es en este momento cuando las células epiteliales comienzan a proliferar y el brote atraviesa el mesénquima, para formar la yema mamaria. La elongación del brote mamario requiere la expresión en el epitelio de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (*PThrP*), y de su receptor, *PTH1R* en el mesénquima (Hens y cols., 2005). Además, la adición exógena de la proteína *Bmp4* a cultivos de brotes mamarios deficientes en *PThrP*, puede rescatar la inhibición de la elongación ductal, lo cual demuestra que *Bmp4* participa en la función de *PThrP* de regular la interacción que se da entre el brote epitelial y el mesénquima (Hens y cols., 2007).

Una vez que la yema primaria ha alcanzado la almohadilla adiposa, el epitelio comienza a ramificarse y se forma un lumen en su interior, hasta que en E18.5 adquiere el aspecto de un pequeño sistema ductal, también denominado árbol ductal. La formación defectuosa de las ramificaciones epiteliales en los embriones de ratones que carecen de algunos genes, ha demostrado la importancia de los mismos en la ramificación ductal ocurrida en este estadio. Este es el caso de *msx2*, el receptor EGF (EGFR), el ligando para EGFR anfiregulina (AREG) y la metaloproteinasas transmembrana ADAM17 que libera dicho ligando de la membrana activándolo (Satokata y cols., 2000; Sternlicht y cols., 2005).

El desarrollo mamario embrionario termina el día E18.5, con la diferenciación de la epidermis en la piel del pezón bajo la influencia de diversas señales provenientes del mesénquima mamario (Foley y cols., 2001).

## 5.2. Desarrollo postnatal.

En el momento del nacimiento, la glándula mamaria consiste en una almohadilla adiposa que contiene un epitelio rudimentario muy poco ramificado. Cada ramificación esta formada por una monocapa de células epiteliales, llamadas células luminales epiteliales, que rodean el lumen de los conductos mamarios (Figura 5). Rodeando este epitelio luminal, existe una monocapa de células mioepiteliales, cuya función es ejercer presión sobre las células luminales una vez que estas se han diferenciado por completo, y facilitar así la liberación de la leche al lumen. Dichas células mioepiteliales descansan sobre la lámina basal que separa el compartimento epitelial del estroma, compuesto por diversos tipos celulares como lo son los fibroblastos, adipocitos y células endoteliales.

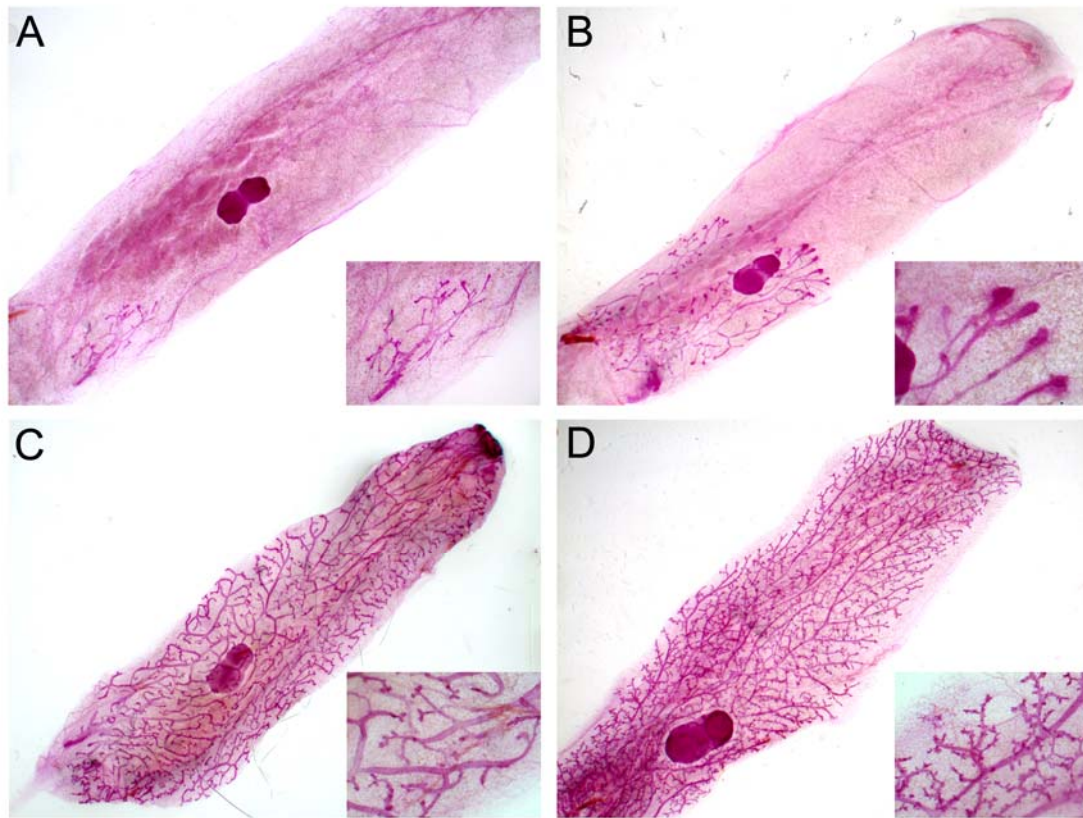


**Figura 7.** Esquema en el cual se representa un corte transversal de un conducto mamario, compuesto por el epitelio luminal (EL) y células mioepiteliales (M) que rodean dicho epitelio. La membrana basal separa el mioepitelio del estroma circundante, en el cual se pueden encontrar diversos tipos celulares como por ejemplo fibroblastos (F) y adipocitos (A).

### 5.2.1. Elongación ductal.

Durante las 3 primeras semanas de vida del ratón, la glándula mamaria crece en proporción al aumento de tamaño corporal, sin sufrir importantes cambios. Es a las 3 semanas, al comienzo de la pubertad, cuando en respuesta a estrógenos y a progesterona, los conductos empiezan a expandirse hacia el estroma circundante, la almohadilla adiposa mamaria. Los denominados brotes laterales (TEB, del inglés Terminal End Bud) de los conductos, son estructuras que contienen células altamente proliferativas que darán lugar a las células luminales y las mioepiteliales, y representan el primer lugar de mitosis que

facilita la elongación ductal y la ramificación en el tejido adiposo mamario (Figura 6B).



**Figura 8.** Análisis de la cuarta glándula mamaria de ratón en diferentes estadios. A las cuatro semanas (A), el rudimento mamario comienza ya a elongarse en respuesta a las hormonas ováricas estrógenos y progesterona. A las 6 semanas (B), los conductos mamarios han alcanzado ya el nódulo linfático, y se observa la aparición de los TEBS (mostradas en detalle en el recuadro). A las 8 semanas (C), la mayor parte de los TEBS han llegado a los márgenes de la almohadilla adiposa, y se observa la presencia de múltiples ramificaciones laterales. A las 10 semanas (D) es notable el aumento de la ramificación epitelial en respuesta al aumento en los niveles de progesterona, y comienza además la formación de los brotes alveolares.

Durante este estadio, son los estrógenos las hormonas encargadas de inducir la proliferación del epitelio mamario a través de su unión al receptor de estrógenos  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) mediante una serie de mecanismos paracrinos (Mallepell y cols., 2006). Una vez que los estrógenos se unen a sus receptores, situados en algunas de las células epiteliales luminales, estas células liberan anfiregulina (AREG) que llega hasta sus células diana del estroma atravesando la capa de células mioepiteliales y la lámina basal (Ciarloni y cols., 2006). Una vez en el estroma, la AREG se une a los receptores de factores de crecimiento epidermal (EGFR), activando así la señalización EGFR que resulta en la expresión de diversos factores que vuelven al epitelio para inducir la formación de los TEBS y por lo tanto la proliferación y elongación del mismo, que cesará cuando los ductos alcancen los márgenes de la almohadilla adiposa.

Otra de las moléculas implicadas en la regulación de la elongación ductal es  $TGF\beta 1$ . Se ha observado que los ratones transgénicos MMTV- $TGF\beta 1$ , que

sobreexpresan TGF $\beta$ 1 específicamente en el epitelio luminal bajo el promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV), presentan una inhibición en el crecimiento ductal (Pierce y cols., 1993). Este resultado se ve apoyado además por el hecho de que una inhibición de la señalización TGF $\beta$ 1 resulta en un aumento anormal de la complejidad del sistema ductal mamario (Joseph y cols., 1999).

### 5.2.2. Formación de las ramificaciones laterales y morfogénesis alveolar.

Entre las 10 y las 12 semanas de edad, la mayoría de los TEBs han alcanzado ya el borde de la almohadilla adiposa (Figura 6D). El desarrollo de las ramas laterales y los brotes alveolares tiene lugar durante el periodo postpuberal del ratón en respuesta a la secreción de las hormonas ováricas con cada ciclo estral. Sin embargo, no es hasta el embarazo, cuando en respuesta a los elevados niveles de progesterona, el epitelio mamario alcanza su mayor complejidad. Dicha hormona actúa por medio de su receptor (PR), que se localiza en algunas de las células del epitelio luminal, induciendo mediante mecanismos paracrinos, la ramificación lateral de los conductos mamarios (Lydon y cols., 1995; Brisken y cols., 1998). Experimentos de trasplante de epitelio mamario de embriones *Wnt4*<sup>-/-</sup>, han demostrado que este factor juega un papel fundamental en la ramificación lateral que tiene lugar durante el embarazo temprano. Se ha observado además, que la progesterona es necesaria para que *Wnt4* se exprese durante el embarazo. Estos datos indican que *Wnt4* es un mediador esencial de la ramificación ductal dirigida por la progesterona (Brisken y cols., 2000).

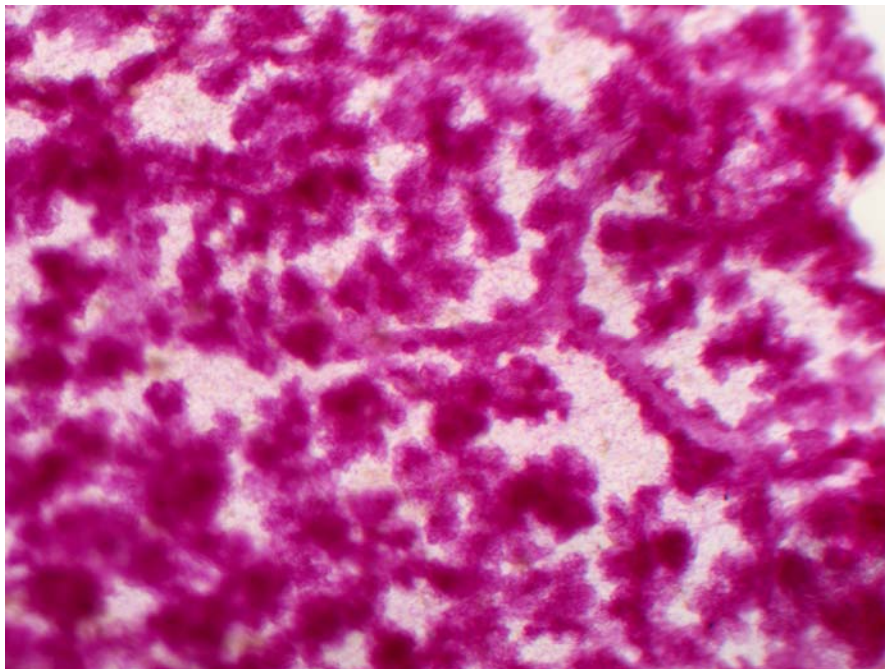
### 5.2.3. Diferenciación alveolar, lactogénesis e involución.

Los alvéolos son estructuras esféricas huecas recubiertas por una monocapa de células epiteliales lumbales, rodeadas a su vez por una capa discontinua de células mioepiteliales. Aunque los denominados brotes alveolares aparecen ya en las ramificaciones secundarias durante el periodo postpuberal bajo la influencia de la progesterona (Figura 5D), no es hasta la segunda mitad del embarazo cuando dichas estructuras progresan hacia unidades totalmente diferenciadas capaces de secretar leche (Figura 6). Durante el embarazo, tanto la progesterona como la prolactina (hormona adenohipofisaria) son necesarias para el desarrollo alveolar. Mediante experimentos de trasplante de células epiteliales mamarias de ratones que carecen del receptor de la prolactina (*PrIR*<sup>-/-</sup>), se ha demostrado el papel fundamental de la señalización llevada a cabo a través de dicho receptor en el desarrollo y la completa diferenciación de los alvéolos (Brisken y cols., 1999). Estudios posteriores, han permitido conocer algunos de los genes cuya expresión está inducida por la prolactina y que son necesarios para que la formación de los alvéolos se de correctamente. Entre ellos están *Jak2*, *Stat5* (Oakes y cols., 2006), *IGF2* y *CiclinaD1* (Brisken y cols., 2002). La expresión de dichos genes es necesaria para inducir la síntesis de diferentes proteínas de la leche (lacto-albúmina,  $\beta$ -caseína, etc.) en la primera etapa del proceso conocido como lactogénesis. La segunda etapa de la



lactogénesis ocurre durante el parto, cuando la expresión de las proteínas de la leche aumenta considerablemente y las vacuolas presentes en las células luminales alveolares son liberadas al lumen del alvéolo gracias a la contracción de las células mioepiteliales inducida por la oxitocina.

Una vez que finaliza el periodo de lactancia, la glándula mamaria experimenta un proceso de muerte celular programada y remodelación denominado involución. El epitelio alveolar desaparece por apoptosis y es sustituido por tejido adiposo mediante un proceso que implica la participación de macrófagos así como la expresión de metaloproteasas (Watson y cols., 2006). En el ratón, la involución dura aproximadamente dos semanas, pasadas las cuales la glándula mamaria recobra un aspecto prácticamente idéntico al observado en el pre-embarazo.



**Figura 9.** Imagen que muestra alvéolos en glándulas mamarias de ratonas preñadas el día 18.5 de gestación, un día antes de parir.

### 5.3. Cáncer de mama y diferenciación.

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de los países occidentales y una de las causas más importantes de mortalidad entre mujeres de mediana edad (Althuis y cols., 2005). En los últimos años, el diagnóstico precoz ha ayudado a disminuir los índices de mortalidad por cáncer de mama, pero las opciones terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad en estadios avanzados, son aún limitadas (Allinen y cols., 2004).

El riesgo de padecer cáncer de mama es fuertemente dependiente del comportamiento reproductivo y de las condiciones endocrinas moduladas por la función ovárica, como son la edad de la menarquía (o primera menstruación) y menopausia. Así, la menarquía temprana y menopausia tardía constituyen

factores de riesgo para sufrir cáncer de mama. Como ocurre en otros tipos de cánceres, el cáncer de mama surge debido a alteraciones genéticas que pueden ser tanto heredadas, como acumuladas secuencialmente a lo largo del tiempo. La mayor parte de tumores mamarios se originan en las denominadas unidades ducto-lobulares terminales (TDLU, del inglés Terminal Ductal Lobular Unit), que son equivalentes a los TEBs de roedores, y que al igual que estos son áreas que contienen células con una proliferación activa, inducida por la presencia de hormonas ováricas (Wellings y Jensen, 1973). Por ello, cada ciclo menstrual, en el cual los niveles de dichas hormonas aumentan sustancialmente, supone una franja temporal en la cual las posibilidades de que las células epiteliales mamarias adquieran daños genéticos aumentan.

El riesgo de padecer cáncer de mama disminuye también notablemente en aquellas mujeres que han tenido el primer embarazo a término antes de los 24 años de edad con respecto a aquellas que son nulíparas o que han dado a luz a su primer hijo más tarde de dicha edad (Russo y cols., 2005). Experimentos realizados en ratas a las cuales se les administraban carcinógenos químicos, demostraron que para que se de la tumorigénesis, es necesario que el carcinógeno interactúe con un epitelio mamario indiferenciado y altamente proliferativo. La diferenciación completa del epitelio mamario, que es inducida por un embarazo a término, inhibe el efecto carcinogénico de los agentes administrados (Russo y Russo, 1996; Russo y cols., 2005). Este hecho sugiere que las mujeres nulíparas o que han tenido su primer embarazo a término en edades más avanzadas, presentan un epitelio mamario que se encuentra aún en un estado indiferenciado y de proliferación celular más activa, y por lo tanto más susceptible a sufrir transformaciones neoplásicas. Aunque la diferenciación reduce significativamente la proliferación celular en la glándula mamaria, el epitelio mamario sigue siendo capaz de proliferar frente a un estímulo dado, como puede ser un nuevo embarazo. Sin embargo, en estas glándulas mamarias que ya se diferenciaron por completo durante el primer embarazo llegado a término, las células epiteliales expresan genes que les confieren la capacidad de metabolizar agentes carcinógenos, así como reparar daños en el DNA más eficientemente que en aquellas que nunca se han llegado a diferenciar hasta el momento. El mejor conocimiento tanto de los genes implicados en este fenómeno, así como de aquellos que dirigen el desarrollo normal de la glándula mamaria y de la progresión de los tumores mamarios, será crucial para poder diseñar nuevas estrategias de prevención del cáncer de mama y nuevas terapias moleculares para combatir la enfermedad.



## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- Allinen M, Beroukhir R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. 2004 *Cancer Cell* 6: 17-32
- Althuis M, Dozier J, Anderson W, Devesa S, Brinton L. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973–1997. *Int J Epidemiol* 2005 34: 405-412
- Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. 2002 *Dev Cell* 2: 643-653
- Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signalling in Vertebrates: A cocktail of Modulators. *DevBiol* 2002; 250: 231-250
- Balinsky BI. On the developmental processes in mammary glands and other epidermal structures. *Transactions of the Royal Society, Edinburgh* 1949; 62: 1–31
- Begue-Kirn C, Ruch JV, Ridall AL, Butler WT. Comparative analysis of mouse DSP and DPP expression in odontoblasts, preameloblasts, and experimentally induced odontoblast-like cells. *Eur J Oral Sci* 1998 106: 254-259
- 7.- Boras-Granic K, Chang H, Grosschedl R, Hamel PA. Lef1 is required for the transition of Wnt signaling from mesenchymal to epithelial cells in the mouse embryonic mammary gland. *Dev Biol* 2006 295: 219-231
- Briskin C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, Kelly PA, Ormandy CJ. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol* 1999 210: 96-106.
- Briskin C, Heineman A, Chavarria T, Elenbaas B, Tan J, Dey SK, McMahon JA, McMahon AP, Weinberg RA. Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* 2000 14: 650-654
- Briskin C, Ayyannan A, Nguyen C, Heineman A, Reinhardt F., Tan J., Dey SK, Dotto GP, Weinberg RA. IGF-2 is a mediator of prolactin-induced proliferation/morphogenesis in the breast. *Developmental Cell* 2002 3: 877-887
- 10.- Briskin C, Park S, Vass T, Lydon J, O'Malley B, Weinberg R. A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci* 1998 95: 5076-5081
- Boutros M, Paricio N, Strutt D, Mlodzik M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 1998 94: 109-118
- Ciarloni L, Mallepell S, Briskin C. Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor {alpha} function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 104: 5455-5460
- Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV. Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol* 1999 43: 261-267
- Cunha GR, Young P, Christov K, Guzman R, Nandi S, Talamantes F, Thordarson G. Mammary phenotypic expression induced in epidermal cells by embryonic mammary mesenchyme. *Acta Anatomica* 1995 152: 195-204

DeOme KB, Faulkin LJ Jr., Bern HA, Blair PB. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res* 1959 19: 515-520

Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res* 2004 83: 523- 528

Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Linhardt RJ, Rees DC. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* 1996 271: 1116-1120

Foley J, Dann P, Hong J, Cosgrove J, Dreyer B, Rimm D, Dunbar M, Philbrick W, Wysolmerski J. Parathyroid hormone-related protein maintains mammary epithelial fate and triggers nipple skin differentiation during embryonic breast development. *Development* 2001 128: 513-525

Fomenkov A, Huang YP, Topaloglu O, Brechman A, Osada M, Fomenkova T, Yuriditsky E, Trink B, Sidransky D, Ratovitski E. P63 alpha mutations lead to aberrant splicing of keratinocyte growth factor receptor in the Hay-Wells syndrome. *J Biol Chem* 2003 278: 23906-23914

Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 1992 6: 3362-3369

Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP. Shh signalling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development* 2002 129: 5323-5337

Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow MA. Sprouty encodes a novel antagonist of FGF signalling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 1998 92: 253-263

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 1999 147:105-120

Harada H, Toyono T, Toyoshima K, Yamasaki M, Itoh N, Kato S, Sekine K, Ohuchi H. FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development* 2002 129: 1533-1541

Hens JR, Wysolmerski JJ. Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Res* 2005 7: 220-224

Hens JR, Dann P, Zhang JP, Harris S, Robinson GW, Wysolmerski J. BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development* 2007 134: 1221-1230

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996 10: 1580-1594

Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 1999 398: 431-436

Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang XJ, Haikel Y, Wang SL, Lesot H. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res* 2006 85, 416-421

Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I. The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 1998 125: 161-169

Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 2000 92: 19-29

Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993 60: 1-41

Joseph H, Gorska AE, Sohn P, Moses HL, Serra R. Overexpression of a kinase-deficient transforming growth factor-beta type II receptor in mouse mammary stroma results in increased epithelial branching. *Mol Biol Cell* 1999 10: 1221-1234

Jung HS, Francis-West PH, Widelitz RB, Jiang TX, Ting-Berreth S, Tickle C, Wolpert L, Chuong CM. Local inhibitory action of BMPs and their relationships with activators in feather formation: implications for periodic patterning. *Dev Biol* 1998 196: 11-23

Karcher-Djuricic V, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV. Acellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. *Differentiation* 1985 29: 169-175

Kassai Y, Munne P, Hotta Y, Penttila E, Kavanagh K, Ohbayashi N, Takada S, Thesleff I, Jernvall J, Itoh N. Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin. *Science* 2005 309: 2067-2070

Kaufman MH, Chang HH, Shaw JP. Craniofacial abnormalities in homozygous Small eye (Sey/Sey) embryos and newborn mice. *J Anat* 1995 186: 607-617

Kettunen P, Thesleff I. Expression and function of FGFs-4, -8 and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* 1998 211: 256-268

Klein OD, Lyons DB, Balooch G, Marshall GW, Basson MA, Peterka M, Boran T, Peterkova R, Martin GR. An FGF signaling loop sustains the generation of differentiated progeny from stem cells in mouse incisors. *Development* 2008 135: 377-385

Klein, OD, Minowada G, Peterkova R, Kangas A, Yu BD, Lesot H, Peterka M, Jernvall J, Martin GR. Sprouty genes control tooth number via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. *Dev* 2006 11: 181-190

Kratochwil K. Tissue combination and organ culture studies in the development of the embryonic mammary gland. En: *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis* (Ed RBL Gwatkin). New York: Plenum Press. 1987 315-334

Lesot H, Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Mitolo V, Ruch JV. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 2001 15: 8-13

Lumsden, AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 1988 103: 155-169

Lydon J; De MF; Funk C; Mani S; Hughes A; Montgomery CJ; Shyamala G; Conneely O; O'Malley B. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Dev* 1995 9: 2266-2278

MacDougall M, Nydegger J, Gu TT, Simmons D, Luan X, Cavender A, D'Souza RN. Developmental regulation of dentin sialophosphoprotein during ameloblast differentiation: a potential enamel matrix nucleator. *Connect Tissue Res* 1998 39: 25-37

MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ* 1970 43: 209-221

Mailleux AA, Spencer-Dene B, Dillon C, Ndiaye D, Savona-Baron C, Itoh N, Kato S, Dickson C, Thiery JP, Bellusci S. Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development* 129 53-60

Mallepell S, Krust A, Chambon P, Briskin C. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 103: 2196-2201

Martin A, Unda FJ, Begue-Kirn C, Ruch JV, Arechaga J. Effects of aFGF, bFGF, TGFbeta1 and IGF-I on odontoblast differentiation in vitro. *Eur J Oral Sci* 1998 106: 117-121

Massague J. How cells read the Tgf-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000 1: 169-178

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999 398: 708-13

Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 1987 32: 123-127

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R., Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997 89: 773-779

Mustonen T, Pispä J, Mikkola ML, Pummila M, Kangas AT, Pakkasjarvi L, Jaatinen R, Thesleff I. Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1. *Dev Biol* 2003 259: 123-136

Nakamura T, de Vega S, Fukumoto S, Jimenez L, Unda F, Yamada Y. Transcription factor epiprofin is essential for tooth morphogenesis by regulating epithelial cell fate and tooth. *J Biol Chem* 2008 283: 4825-4833

Nandi S. Endocrine control of mammary-gland development and function in the C3H/He Crgl mouse. *J Natl Cancer Inst* 1958 21: 1039-1063

Neubuser A, Peters H, Balling R, Martin GR. Antagonistic interactions between FGF and BMP signalling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 1997 90: 247-255

Oakes SR, Hilton HN, Ormandy CJ. The alveolar switch: coordinating the proliferative cues and cell fate decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. *Breast Cancer Res* 2006 8: 207

Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004 83: 518-522

Ornitz D, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001 2: 3005

Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 2000 22: 108-112

Peaker M. The mammary gland in mammalian evolution: A Brief Commentary on Some of the Concepts. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002 7: 347-53

Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T, De Robertis EM. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of nodal, Bmp and Wnt signals. *Nature* 1999 397: 707-710

- Pispa J, Mustonen T, Mikkola ML, Kangas AT, Koppinen P, Lukinmaa PL, Jernvall J, Thesleff I. Tooth patterning and enamel formation can be manipulated by misexpression of TNF receptor Edar. *Dev Dyn* 2004 231: 432-440
- Propper AY. Wandering epithelial cells in rabbit embryo milk line. *Dev Biol* 1978 67: 225-231
- Robey PG. Post-natal stem cells for dental and craniofacial repair. *Oral Biosci Med* 2005 2: 83-90
- Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* 1998 106: 282-291
- Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995 39: 51-68
- Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. *Biochem Cell Biol* 1998 76: 923-938
- Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 1996 104: 938-967
- Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2005 7: 131-142
- Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev* 1999 85: 197-200
- Sartaj R, Sharpe P. Biological tooth replacement. *J Anat* 2006 209: 503-509
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000 24: 391-395
- Seidensticker MJ, Behrens J. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta* 2000 1495: 168-182
- Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 1999 9: 695-698
- Smith CE, Warshawsky H. Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using 3Hthymidine. *Anat Rec* 1975 183: 523-561
- Smith CE, Warshawsky H. Movement of entire cell populations during renewal of the rat incisor as shown by radioautography after labeling with 3Hthymidine. The concept of a continuously differentiating cross-sectional segment. *Am J Anat* 1976 145: 225-259
- Sternlicht MD, Sunnarborg SW, Kouros-Mehr H, Yu Y, Lee DC, Werb Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development* 2005 132: 3923-33
- Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast Growth factors as multifunctional signaling factors. *Int.Rev. Cytol.* 1999 185: 45-106
- Thesleff I, Hurmerinta K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation* 1981 18: 75-88
- Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965 150: 893-899
- Vahtokari A, Åberg T, Jernvall J, Keränen S, Thesleff I. The enamel knot as a signalling center in the developing mouse tooth. *Mech Dev* 1996 54: 39-43

Veltmaat JM, Van Veelen W, Thiery JP, Bellusci S. Identification of the mammary line in mouse by Wnt10b expression. *Dev Dyn* 2004 229: 349-356

Wang S, Krinks M, Lin K, Luyten FP, Moos M. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell* 1997 88: 757-766

Wang XP, Suomalainen M, Felszeghy S, Zelarayan LC, Alonso MT. An integrated gene regulatory network controls stem cell proliferation in teeth. *PLoS Biol* 2007 5: 159

Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Wankell M, Werner S, Thesleff I. Modulation of activin/BMP signalling by follistatin is required for the morphogenesis of mouse molar teeth. *Dev Dyn* 2004a 231: 98-108

Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signalling and ameloblast differentiation. *Dev Cell* 2004b 7: 719-730

Watson CJ. Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* 2006 8: 203

Wellings SR, Jensen, HM. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Natl Cancer Inst* 1973 50: 1111-1118

Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in Development. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1998 14: 59-88

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988 242: 1528-1534

Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002 10: 695-700

Zhang Q, Murcia NS, Chittenden LR, Richards WG, Michaud EJ, Woychik RP, Yoder BK. Loss of the Tg737 protein results in skeletal patterning defects. *Dev Dyn* 2003 227: 78-90

Zhu X, Komiya H, Chirino, A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC. Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 1991 251: 90-93

Zorn AM. Wnt signalling: Antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol* 2001 11: 592-595

## CAPÍTULO 6:

### DIFERENCIACIÓN A HEPATOCITOS.

Eider Azkona Uribelarrea, Eluska Iruarrizaga Ovejas, Ines Marrodan Ciordia y Xabier Mielgo Rubio.

#### Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	158
2. HÍGADO .....	159
2.2. Poblaciones celulares: .....	159
3. CÉLULAS MADRE ADULTAS .....	160
3.1. Tipos de células madre: .....	162
3.1.2. No derivadas de la médula ósea .....	164
3.2. Versatilidad, fusión celular y células madre adultas .....	165
4. TRASPLANTE DE HEPATOCITOS HUMANOS .....	166
4.1. Fisiología .....	167
4.2. Criopreservación de hepatocitos humanos .....	168
4.3. Estado actual del Tx de hepatocitos humanos .....	168
5. CÉLULAS PROGENITORAS INTRAHEPÁTICAS .....	169
5.1. Células ovales .....	170
5.2. Identificación de las células progenitoras hepáticas .....	170
6. CÉLULAS PROGENITORAS DE LA MÉDULA OSEA .....	171
7. CÉLULAS HEPÁTICAS FETALES .....	173
8. CÉLULAS PROGENITORAS EMBRIONARIAS .....	174
8.1. Células hepáticas embrionarias como modelo para diferenciarse en hepatocitos y células ductales .....	174
8.1.1. H-CFU-Cs .....	175
8.1.2. Rhe .....	176
8.1.3. HBC-3 .....	176
8.1.4. BMEL .....	176
8.1.5. MMH (Met murine hepatocito) palmate cells .....	177
8.1.6. Células hepática bipotenciales fetales de primate .....	177
9. STEM CELL HEPÁTICAS Y CANCER .....	178
10. BIBLIOGRAFÍA .....	179

## 1. INTRODUCCIÓN

Ante la gran necesidad de buscar fuentes alternativas al trasplante de órgano entero surgen diversas alternativas como el trasplante celular (uno de los más prometedores actualmente); tanto de hepatocitos adultos diferenciados, como de células madre (F.Prosper y cols., 2006). Estas últimas muestran un futuro más esperanzador, gracias a la capacidad que tienen de diferenciarse en distintos tipos celulares dependiendo del entorno en el que se encuentren, por lo que constituirían un recurso inagotable de células hepáticas para trasplante y terapia génica (Taléns cols., 2006).

Diversos estudios han demostrado la propiedad del hígado de regenerarse, como se ha podido observar tras hepatectomías parciales en animales de investigación, en los que las células remanentes restauran la celularidad hepática (Lorenti, 2001; Vintermyr, 2005). Apoyando esta idea, se ha visto que el número de hepatocitos derivados de células hematopoyéticas es mayor si hay lesión hepática previa. Así, la medula ósea es la fuente de células madre más prometedora, y la podemos considerar como la tercera fuente de reclutamiento de células madre para la regeneración de hepatocitos (Taléns cols., 2006).

En septiembre del 2006, se ha inaugurado en el H<sup>a</sup> de La Fe una nueva unidad de trasplante celular hepática que pretende abastecer de células hepáticas a toda España una vez que se ponga en marcha la terapia experimental que se esta desarrollando en este centro. Así, en esta misma ciudad, en noviembre del 2006 se ha realizado el primer Congreso Europeo De Trasplante de Hepatocitos Humanos (para más información Fundación investigación Hospital La Fe).

Resumiendo lo anteriormente expuesto, y lo citado en dicho congreso, las posibles estrategias para obtener hepatocitos humanos diferenciados como posibles fuentes celulares son:

- Células hepáticas ( ya disponibles)
- Células madre embrionarias humanas
- Hepatocitos fetales humanos
- Células progenitoras hepáticas
- Medula ósea
- Tejido graso
- Células sanguíneas (monocitos).

Se proponen otras fuentes: células progenitoras de cordón umbilical, células epiteliales del líquido amniótico, y células placentarias.

Aunque la forma más ampliamente utilizada de terapia celular (TC) es el trasplante de progenitores hematopoyéticos, el término TC, en un sentido amplio incluye cualquier tipo de tratamiento que utiliza células como agentes terapéuticos (F.Prosper y cols., 2006).



## 2. HÍGADO

### 2.1. Origen embrionario (Lorenti, 2001)

El primordio hepático, aparece hacia la mitad de la tercera semana como una evaginación del epitelio endodérmico en extremo distal del intestino anterior, denominada divertículo hepático (Langman, 2001). Estas células endodérmicas multipotenciales dan origen a los hepatoblastos bipotenciales, que son el origen común de las células epiteliales hepáticas (hepatocitos y células ductales). La interacción entre células endodérmicas y el mesodermo que las rodea es indispensable. Pero hay diferencias según las zonas: las derivadas del divertículo hepático craneal invaden el septo transversal mesenquimal, dando lugar al parénquima hepático y ductos intra y extrahepáticos; mientras que las caudales forman la vesícula y conducto cístico. Estas últimas no tienen lugar en el desarrollo embrionario de la rata, lo que explica que en ratas adultas no encontremos vesícula ni su conducto.

Una vez que el brote hepático emerge del tubo intestinal, las células hematopoyéticas migran en el día 11 en el ratón, y las células hepáticas se conocen como hepatoblastos, estas expresan genes específicos, como albúmina, alfa fetoproteína, y citokeratina 19 en el humano, y pueden dar lugar a los hepatocitos y células ductales definitivos. Además, estos hepatoblastos, dan origen a otros hepatoblastos bipotenciales en el canal de Hering, que retienen la capacidad bipotencial para diferenciarse en hepatocitos y células epiteliales biliares.

Su función hematopoyética disminuye en los 2 últimos meses de vida intrauterina, y en el nacimiento solo quedan pequeños islotes hematopoyéticos (Langman, 2001).

### 2.2. Poblaciones celulares:

- Células epiteliales de 2 tipos: hepatocitos (la fracción más abundante) y células ductales
- Células endoteliales: en los sinusoides alrededor de los hepatocitos.
- Células de Kuffer: macrófagos del hígado
- Células de Ito (stellate cells)

Según su localización en las placas, los hepatocitos son distintos (Lorenti, 2001). Cerca del tracto portal son más pequeños, diploides y con capacidad proliferativa (J. Kano, 2007). A medida que se acercan a la vena central, van aumentando su tamaño, su ploidía y sus marcadores de diferenciación, y disminuyendo su potencial de proliferación. Una posible explicación es que las células progenitoras están localizadas en, o muy cercanas a los ductos biliares o canales de Hering (zona periportal), y van sufriendo un proceso de diferenciación terminal unidireccional que termina en la vena central (zona medio acinar y pericentral con las células más maduras). La expresión de genes

específicos del hígado, con distintos patrones, están asociados con distintas zonas del acino hepático (Strick-Marchand y cols., 2003; Harrison).

### 3. CÉLULAS MADRE ADULTAS

Las primeras evidencias científicas de que en el organismo adulto existen células madre, proviene de experimentos de Till y Mc Cullach a finales de los años cincuenta (Taléns y cols., 2006); sin embargo la capacidad de regenerar tejidos en organismos adultos, e incluso de regenerar órganos completos, como las planarias, se conoce desde mucho antes (Prósper y cols., 2006).

Las células madre, mejor denominadas células troncales, se definen como células con capacidad de dividirse indefinidamente y diferenciarse en distintos tipos de células especializadas, morfológica y funcionalmente (para más información The National Institutes of Health resource for Stem Cell Research). Se pueden clasificar según su potencial de diferenciación en distintos tejidos (potencialidad) (Prósper y cols., 2006):

- Totipotenciales: capaces de producir tanto tejido embrionario (un embrión completo) como extraembrionario (placenta y anejos). En sentido estricto, solo serían los estadios iniciales de cigoto.
- Pluripotenciales: capacidad de diferenciarse en tejidos procedentes de cualquier de las 3 capas embrionarias, incluyendo las células germinales.
- Multipotenciales: capaces de diferenciarse en distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria (meso, ecto o endodermo)

Desde el punto de vista de su origen, las clasificamos en:(Prósper y cols., 2006)

- Embrionarias: derivan del embrión, bien del blastocisto en el estadio de embrión pre-implantado o de la cresta gonadal. Hasta 1998 no fue posible obtener células embrionarias humanas (las de ratón desde hace más de 20 años). Son células pluripotenciales. Hay varias limitaciones que hacen que aun no haya ningún estudio abierto en pacientes:
  - Debido a su capacidad proliferativa, en los modelos animales en los que se han usado, se han producido tumores (teratomas y teratocarcinomas).
  - El trasplante (Tx) de estas células, se haría entre individuos inmunológicamente incompatibles, por lo que sería necesario el uso de tratamiento inmunosupresor (teóricamente evitable con clonación).
- Adultas (de tejidos adultos): se sabe que distintos tejidos tienen capacidad de autoregenerarse, porque tienen células madre residentes. Poseen las dos características: auto-renovación y diferenciación. A diferencia de las embrionarias su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación son menores.

Son multipotenciales, pero cada vez parece más evidente que también se diferencian a tejidos de otras capas embrionarias (versatilidad o capacidad de transdiferenciación); no todos apoyan esta idea, ya que en opinión de algunos, es por fenómenos de fusión celular.

Además de las células madre, existen las denominadas células progenitoras o precursoras (algunos autores diferencian estos términos, pero se suelen usar como sinónimos para simplificar) que serían aquellas comprometidas a un determinado linaje, pero con cierta capacidad proliferativa (también denominadas células TAC o “transient amplifying cells”). Las diferencias entre células madre y las precursoras en ocasiones no son claras (Prósper y cols., 2006); las progenitoras serían las descendientes de las stem cells, sin capacidad de autoregeneración, y con menor plasticidad, aunque si proliferan y se diferencian en células especializadas (de forma estricta aquí se deberían incluir las células progenitoras de tejidos especializados).

Las principales características de las stem cells son (Young y col., 2008; Lorenti, 2001):

1. Son células indiferenciadas
2. Tienen capacidad proliferativa
3. Capacidad de automantener la población (una de las más representativas)
4. Capacidad de producir gran número de progenies de células indiferenciadas (Taléns, 2006).
5. Capaces de regenerar tejidos tras una injuria.

En el otro extremo, las que no cumplen ninguna de estas condiciones, son las células maduras, y entre ambos tipos están las células en transito o transitorias (o comisionadas), que son las que han comenzado a adquirir marcadores de diferenciación, pero no han alcanzado aún la madurez completa (Lorent, 2001).

Tradicionalmente se habían considerado las células madre embrionarias como pluripotenciales y las células madre adultas como multipotenciales. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la potencialidad de algunos tipos de células madre adultas podría ser mayor a lo esperado, al existir células troncales pluripotenciales en algunos órganos adultos con capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las 3 capas embrionarias.

Para que una célula sea considerada pluripotencial, debe de cumplir las siguientes condiciones (Prósper y Herreros, 2004):

1. Una única célula debe ser capaz de diferenciarse en células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria
2. Demostrar la funcionalidad in vitro e in vivo de las células en las que se han diferenciado
3. Que se produzca un asentamiento claro y persistente de estas células en el tejido diana, tanto en presencia o ausencia de daño en el tejido en el que se injertan.

Actualmente no hay ningún estudio que cumpla todos los criterios estrictamente, aunque algunos de ellos indican de manera bastante fidedigna la posible existencia de células madre adultas pluripotenciales. Lo que no admite controversia, es la presencia de células madre adultas en distintos tejidos: hematopoyético, neuronal, epidérmico, gastrointestinal, músculo esquelético, cardíaco, hígado, páncreas y pulmón. Cada vez parece más evidente que las células madre adultas derivadas de estos órganos pueden generar tejidos de otras capas embrionarias a parte de dicho tejido. El caso más típico es el de las células madre hematopoyéticas con capacidad de diferenciarse en tejidos como hepatocitos, músculo cardíaco... este fenómeno es denominado **Versatilidad** o capacidad de transdiferenciación.

Aunque apoyado por muchos estudios, este fenómeno también está cuestionado por otros, los cuales justifican algunos de los hallazgos anteriores en función de **fenómenos de fusión celular**.

Hoy día las aplicaciones clínicas de la terapia celular se limitan a las células adultas. Es posible que en el futuro los embriones se apliquen de forma terapéutica. Estas aplicaciones se pueden dividir en dos grupos principales:  
 Regenerar tejidos destruidos o dañados (ejem: enfermedades neurodegenerativas)  
 Emplearlas como vehículo de genes, como en enfermedades monogénicas como la hemofilia o incluso en terapias antitumorales o antiangiogénicas.

### 3.1. Tipos de células madre:

#### 3.1.1. De la médula ósea (Prósper y Herreros, 2004; Taléns y cols., 2006):

- Hematopoyéticas (HSC): se han identificado tanto in vivo como in vitro. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos ha demostrado definitivamente la existencia de HSC en médula ósea y sangre periférica. En el ser humano no se ha podido identificar la célula responsable de la regeneración del resto de líneas celulares hematopoyéticas. Estudios recientes demuestran su capacidad para generar tejidos de distintas capas embrionarias y su contribución a la angiogénesis y vasculogénesis in vivo. De forma que las células CD34<sup>+</sup> contienen progenitores hematopoyéticos y células progenitoras endoteliales. Hoy en día se considera al hemangioblasto como progenitor común endotelial y hematopoyético, apoyado por estos hallazgos de la potencialidad endotelial de las células troncales hematopoyéticas de la médula ósea. También se han publicado trabajos que apoyarían la capacidad de las HSC en diferenciarse en:
  - Células de músculo cardíaco: el grupo de Orlic y Anversa han demostrado en un modelo de infarto de miocardio murino, que una inyección de células de médula ósea Lin<sup>-</sup> y c-kit<sup>+</sup> (fenotipo de marcadores de superficie de HSC) en el corazón dañado da como resultado la colonización de estas células en más de la mitad de la zona infartada; estas posibles HSC adquirieron un fenotipo

característico de células de miocardio y contribuyeron a la mejora y la supervivencia de los animales. La contribución de las células madre adultas a la regeneración cardiaca se ha sugerido en modelos de trasplante cardiaco en humanos: grupo de pacientes varones trasplantados con corazón de donante femenino, al analizar las biopsias se identificó que entre el 7-10% de los cardiomiocitos provenían del receptor (ya que en ellos se podía identificar el cromosoma Y). Aunque el origen de dichas células no se pudo determinar estos hallazgos sugirieron la capacidad de las células adultas en diferenciarse en tejido cardiaco (Conigliaro y cols., 2008).

- Tejido hepático: el grupo de Lagasse y col. han demostrado que HSC con el fenotipo Lin-, c-kit+, Sca-1 son capaces de regenerar un hígado murino en un modelo de fallo hepático fulminante, mientras que con modelos de quimerismo en pacientes sometidos a Tx de médula ósea o de hígado, y utilizando el cromosoma Y como marcador del origen celular, se ha demostrado que un porcentaje de hepatocitos provienen de células madre de origen hepático

A pesar de todo, ningún estudio publicado hasta el momento demuestra que una única célula madre hematopoyética contribuya de forma robusta y funcional a la regeneración de un tejido distinto al hematopoyético, y por lo tanto, en sentido estricto no cumple los criterios para hablar de versatilidad; sin embargo, tomando los estudios de forma conjunta aportan evidencias de la existencia de HSC con estas características y potencialidades.

- Mesenquimáticas (= estromales = MSC): marcadores de superficie que las han permitido aislar e identificar: SH2, SH3, CD 29, CD 44, CD 71, CD90 y CD106. No expresan antígenos típicos de las HSC como CD34, Cd45 o CD14. Estudios recientes han demostrado in vitro que son capaces de diferenciarse en tejidos mesodérmicos funcionales (osteoblastos, condroblastos, adipocitos y miofiblastos esqueléticos). Aunque varios grupos afirman haber diferenciado MSC en células derivadas del neuroectodermo, basándose en la adquisición de marcadores de origen neuronal, no han llegado a demostrar que estas células adquieran características funcionales similares a neuronas o células de la glía. A pesar de lo citado, no se diferencian en tejido derivado del endodermo, por lo tanto no se pueden considerar células madre pluripotenciales (Prósper y cols., 2006).
- Side population cells (SP) (población lateral): se han aislado, tanto a partir de médula ósea como de músculo. Se sabe que son capaces de diferenciarse en HSC en humanos, roedores y otras especies. Además algunos estudios describen que podrían dar lugar a otros tipos de células especializadas e integrarse en distintos tejidos in vivo.

- Células adultas multipotenciales (MAPC): población celular descrita por el grupo de Catherine Verfaillie. Se han descrito como auténticas células pluripotenciales con una capacidad de diferenciación muy similar a las células madre embrionarias. Se han aislado tanto en médula ósea humana como murina. Son capaces de proliferar in vitro más de 120 divisiones celulares sin un aparente envejecimiento ya que mantienen niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. No expresan CD 34, CD44, MHC I, MHC II, CD45, ni c-kit; expresan niveles bajos de Flk-1, Sca-1 y Thy-1; y altos de CD 13, SSEA-1 (ratón/rata) y SSEA-4 (humano). Al igual que las células madre embrionarias, se detecta la activación de los factores de transcripción Oct-4 nanong y Rex-1, factores que son necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado. Se han realizado experimentos de clonación que prueban que es una única célula la que es capaz de diferenciarse en tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias.
  - In vitro se pueden inducir a diferenciarse en tejidos derivados del mesodermo, como hueso, cartílago, adipositos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio.
  - No han sido capaces de diferenciarse en tejido hematopoyético maduro o cardiomiocitos.
  - Se han podido diferenciar en hepatocitos, y funcionar como tales, ya que son capaces de producir urea, albúmina, inducir el citocromo p450 con fenobarbital, y almacenar glucógeno
  - In vitro también se ha demostrado su capacidad de diferenciación en tejidos derivados del ectodermo como neuronas, astrositos y oligodendrocitos.

Aun no se han publicado experimentos que prueben que no existen fenómenos de fusión celulares, pero estos experimentos son los que más se han acercado a la demostración de la existencia de células madre pluripotenciales, mostrando su potencialidad en el ámbito terapéutico y como un instrumento para poder comprender mejor los eventos que inducen a las células madre a la diferenciación (Lorent, 2001).

### 3.1.2. No derivadas de la médula ósea

No hay controversia sobre la existencia de células madre en tejidos como SNC, hígado, corazón, músculo y piel. Esto ha dejado totalmente obsoleta la idea tradicional de que órganos como el SNC o el corazón no fueran capaces de regenerarse, porque carecían de células con potencial de proliferación y diferenciación (Prósper y Herreros, 2004).

Algunos de los estudios que indican la posibilidad de que células madre obtenidas de algunos de estos órganos tengan un potencial mayor al esperado:

- El experimento de Clarke y col., es uno de los que mejor prueba la existencia de células madre adultas pluripotenciales de origen neuronal y su capacidad diferenciadora: inyectó las células madre neuronales o neuroesferas procedentes de un ratón transgénico para el gen señalador LacZ en embrión de ratón, así, el 25% de los embriones presentaron quimerismo en tejido neuronal y en tejidos del mesodermo y endodermo; cuando se inyectaron en un blastocisto de ratón la contribución, se extendió al SNC, corazón, hígado y otros tejidos. No se pudo evaluar la funcionalidad de estas células, ya que los animales no se evaluaron después del nacimiento.
- Grupo de Qu-Petersen y col. aislaron diferentes poblaciones de células madre musculares murinas basándose en la capacidad de adhesión y proliferación. Estas células pueden mantenerse en cultivo durante más de 60 divisiones sin anormalidades cromosómicas y son capaces de diferenciarse in vivo e in vitro en células del linaje neuronal, endotelio y músculo. Sin embargo no se ha experimentado sobre si es una única célula, o una población heterogénea.
- De la epidermis humana y murina se han aislado células madre con capacidad de diferenciarse en células especializadas procedentes de 2 capas embrionarias distintas. Estas células se pueden mantener en cultivo durante más de 12 meses sin diferenciarse y se puede inducir su diferenciación in vitro en neuroectodermo o linajes mesodérmicos. Su diferenciación en derivados del ectodermo y mesodermo se ha demostrado a nivel clonal, pero no hay evidencias de una multipotencialidad in vivo y tampoco de que los tejidos diferenciados sean funcionales.
- Un estudio que ha levantado grandes expectativas sugiere que en el músculo cardiaco es posible aislar células madre multipotenciales capaces de diferenciarse in vitro e in vivo en cualquiera de los tejidos necesarios para reconstituir un corazón dañado, esto es endotelio, músculo liso y cardiaco; lo más sorprendente es que dichas células son identificables porque expresan c-kit junto con la ausencia de expresión de marcadores específicos de línea (c-kit+ Lin-).

### 3.2. Versatilidad, fusión celular y células madre adultas

Evidencias científicas cuestionan la verdadera naturaleza de los fenómenos de diferenciación (de la existencia de células madre adultas pluripotenciales y de la capacidad de células madre de transdiferenciación): ¿Cuál es el mecanismo que lo justifica? Se barajan 4 hipótesis: (Prósper y Herreros, 2004)

1. Heterogeneidad de la población celular: la mayor parte de los estudios no han sido capaces de demostrar esta potencialidad a nivel clonal, es decir, que sea una única célula, la que de origen a 2 poblaciones celulares diferentes. Por lo que es posible que muchas de estas observaciones correspondan a la heterogeneidad, por lo que podrían existir diversas células madre en la misma población, cada vez con distintas capacidades.

2. Fenómenos de fusión entre células trasplantadas y residentes: este fenómeno suele acompañarse de la formación de células con características de ambas poblaciones fusionadas y generalmente con doble dotación cromosómica, lo cual induce una desventaja proliferativa.
3. Desdiferenciación: al igual que durante el proceso de clonación el núcleo de la célula somática sufre un proceso de reprogramación, es posible que estas células en ciertas circunstancias puedan desdiferenciarse para posteriormente diferenciarse en células de distinta estirpe.
4. Es posible que en el organismo adulto persistan células madre indiferenciadas, remanentes de tejido embrionario con capacidad pluripotencial.

#### 4. TRASPLANTE DE HEPATOCITOS HUMANOS

Aun en fase clínica experimental se prevé como complementario al Tx de órgano entero. Consiste en usar células hepáticas adultas aisladas de hígado donante (hepatocitos) para implantarlas en órgano enfermo, así las células implantadas pueden asumir las funciones que las células enfermas no pueden desarrollar (Chowdhury y col. 2007; *New frontiers in Regenerative Medicine*, 2007).

Su indicación más clara es en enfermedades metabólicas en niños; otras posibles aplicaciones son la hepatopatía alcohólica, hepatitis fulminante y las hepatitis tóxicas (Ying y cols., 2007).

En enfermedades metabólicas, supone una alternativa al Tx hepático, especialmente si el hígado está intacto, pero hay daño extrahepático. Hasta el momento más de 20 pacientes han sido tratados, para la mayoría de ellos fue propuesto como un puente para el Tx. El número de hepatocitos aislados proveyó alcanzar 5-10% de la masa hepática teórica. No han sido documentados efectos adversos.

Los primeros experimentos en animales, comenzaron ya en 1979, con el trasplante de hepatocitos al bazo. En 1986 se vio que eran funcionales, y podían proliferar. Con estos experimentos se estableció que con el alotrasplante de hepatocitos normales y el autotrasplante de hepatocitos modificados genéticamente se podían corregir defectos metabólicos.

Entre 1994 y 1995 fueron estudiados 2 modelos genéticos:

- Ratón transgénico uPa: se realizaron trasplantes masivos de células hepáticas porque tenían mayor capacidad de proliferación y replicación que las células residentes cuando estas desaparecían.
- Fah knockout mouse (FAH): modelo de toxicidad hepática, con la ventaja que reproduce enfermedades hereditarias letales como la tirosinemia tipo 1. Cuando son trasplantadas en bazo, migran dentro del hígado y se dividen hasta que ha sido reemplazada más del 95% de la masa hepática.



Con estos 2 modelos se ha cambiado la primera impresión que se tenía de que los hepatocitos tenían capacidad limitada de proliferación, demostrando su alta capacidad de proliferación. Esta capacidad única de regeneración de los hepatocitos se basa en 2 características: el extenso y continuo daño hepático, y la fuerte ventaja selectiva de las células trasplantadas para sobrevivir comparando con las células residentes. Posteriormente se ha continuado exhaustivamente haciendo estudios en animales, como el trasplante de hepatocitos a tino de ratas con o sin tratamiento inmunosupresor (Mula y cols., 2008).

La pregunta a formularse sería ¿son las hepatocitos stem cells?: los hepatocitos no cumplen el criterio esencial de las células madre, la multipotencialidad. Se pueden considerar más como las células B y T, que si las activamos, pueden ellas mismas renovarse, y formar cantidad de células plasmáticas o células CD4 y CD8 activadas, sin embargo en circunstancias normales estas células no generan ni células mieloides ni eritroides. Es interesante, que se ha señalado que los hepatocitos potencialmente se pueden transdiferenciar en células biliares tanto in vivo como in vitro: si se confirman estos resultados, se podría sugerir que los hepatocitos pueden funcionar como células madre facultativas así como tener capacidad de autoregeneración y comprometerse en líneas celulares. Como se ha visto que los hepatocitos no son poblaciones homogéneas, sería discutible si sería una sola población distintiva de hepatocitos primitivos los que podrían tener esta capacidad de células madre.

#### 4.1. Fisiología

Supone la transferencia de hepatocitos aislados en una suspensión, probando distintos métodos de cultivo, (Tomomura y cols., 2005) a un órgano enfermo vía el sistema porta. La técnica requiere un acceso vascular intacto para poder acceder los sinusoides hepáticos a los cuales se va a infundir los hepatocitos para injertarlos en el parénquima hepático.

Los hepatocitos se obtienen de hígados de donantes cadavéricos usando una técnica llamada "Técnica de perfusión de colagenasa en dos pasos" o modificado por Seglen (Strick-Marchand y cols., 2003). La 1ª perfusión se lleva a cabo con un buffer que contiene una base de etilen-glicol, que ayuda a disolver las uniones intercelulares entre los hepatocitos; mientras que el 2º buffer de perfusión contiene calcio y colagenasa (Berry y col., 1969; Seglen, 1976).

Los hepatocitos recuperados son sometidos a diversas clases de tests para valorar su esterilidad, viabilidad y actividad metabólica. Las células pueden ser infundidas inmediatamente, luego del aislamiento, manteniéndolas en una solución de la Universidad de Wisconsin. Además pueden ser criopreservadas para futuros trasplantes. Debido a que este procedimiento se encuentra aun en fase de desarrollo, no hay acceso a un pool de órganos cadavéricos dentro de los sistemas de distribución de órganos. La posibilidad de obtener células recién aisladas, no es posible para que se hagan pruebas de compatibilidad con los

pacientes, especialmente aquellos con insuficiencia hepática fulminante. Debido a esto, el reto está en mantener aislados los hepatocitos, viables y funcionales hasta que exista un receptor adecuado (Fiegel y cols., 2008).

Para llevar a cabo este programa los órganos donados son un gran problema. Los hepatocitos son generalmente obtenidos de segmentos hepáticos resecados obtenidos luego de procedimientos de reducción hepática realizados en los Tx hepáticos. Estos segmentos hepáticos proveen suficientes hepatocitos para un trasplante en serie en neonatos, infantes y niños. Los hígados que han sufrido algún traumatismo y no son viables para realizar un trasplante de órgano entero completo, son perfectos para este procedimiento. Por el contrario, hepatocitos aislados de órganos esteatósicos, no tienen una buena viabilidad ni para Tx hepático, ni para aislamiento hepatocitario. El donador vivo, no puede ser considerado una fuente mientras se mantenga en esta etapa de desarrollo.

## 4.2. Criopreservación de hepatocitos humanos

Hasta hoy es la única opción para mantener a largo plazo los hepatocitos en almacenamiento, permitiendo el uso adecuado para la práctica clínica. Estos hepatocitos han demostrado comportarse similar a las células aisladas en fresco luego de una trasplatación, y tiene habilidad de repoblar el hígado dañado y corregir la función en varios modelos animales (Jamal y cols, 2000; David P y cols, 2001)

En los humanos, los hepatocitos criopreservados, han sido utilizados exitosamente en el hígado bioartificial, como un aparato de soporte externo de la función hepática, y en pacientes con deficiencia de ornitina transcarbamilasa, en espera de Tx (Stephen y cols, 2005). La viabilidad y calidad de estos hepatocitos permanece muy alterada luego de la criopreservación<sup>2</sup>. Recientemente ha sido demostrado que no sólo la ultraestructura mitocondrial es afectado por el hielo, sino que también se induce una alteración del complejo 1 de la cadena de la respiración mitocondrial (Steephenne y cols, 2007). Las alteraciones de los hepatocitos in vitro, la falta de órganos a nivel mundial, los riesgos de las células xenogénicas y los efectos de la inmunosupresión prolongada, llevó a investigadores a evaluar el potencial de las células progenitoras para mejorar la regeneración hepática (Baccarani y cols., 2003).

## 4.3. Estado actual del Tx de hepatocitos humanos

Stephenne Strom (2007) (jefe del departamento de patología celular de la Universidad de Pittsburg, EEUU), ha sido el primer científico en llevarlo a cabo. Ha realizado 20 casos, siendo su grupo pionero ya en 1992, realizando en primer trasplante en Virginia. En España el pionero ha sido el H<sup>a</sup> de la Fe, siendo a su vez este centro el que más experiencia posee en realizar Tx hepáticos (más de 1300) así como en el aislamiento y cultivo de hepatocitos a partir de hígados humanos (ver Fundación investigación H<sup>a</sup> La Fe).

El éxito del trasplante de células hepáticas depende de la supervivencia de los hepatocitos trasplantados, su adquisición dentro del parénquima y la proliferación in vivo para la repoblación del órgano. En los humanos solo se puede evaluar por biopsias, lo que limita su estudio. La demostración del implante está basada en la recuperación de la expresión genética específica o de la actividad enzimática deficiente (Stéphenne y cols, 2006).

Un implante limitado, y la durabilidad de los hepatocitos trasplantados son las principales limitaciones. El 70-80% de estos hepatocitos son eliminados tempranamente por fagocitos y macrófagos en los espacios vasculares hepáticos. Para prevenirlo se requiere una mejora de los hepatocitos, una comprensión del rol de estas células y otras células residentes en la inducción de eventos inmunológicos.

## 5. CÉLULAS PROGENITORAS INTRAHEPÁTICAS

La identificación de stem cells hepáticas tiene gran potencial terapéutico: (Young y col., 2008)

- Fuente continua de células para trasplante celular
- Como recurso para hígados bioartificiales
- Terapia génica para enfermedades metabólicas
- Pruebas farmacéuticas
- Estudios para comprender mecanismos de regulación del desarrollo, especificidad y maduración de hígado normal

Diversos estudios sobre la patogénesis de enfermedades hepáticas han demostrado la existencia de células progenitoras hepáticas a pesar de haber sido discutido durante muchos años (Prósper y cols., 2006; Lorent, 2001; Strick-Marchand y cols., 2004; Fougère- Deschatrette y cols., 2006). Las características morfológicas, bioquímicas y funcionales, así como la capacidad proliferativa y los patrones de expresión de genes de los hepatocitos varían según su ubicación dentro del parénquima.

Un daño en hígado adulto, produce la estimulación de células diferenciadas hepáticas, a través del reingreso de las mismas en el ciclo celular (primero los hepatocitos maduros, seguidos de las células epiteliales biliares y las endoteliales sinusoidales), y la consecuente reparación de dicho daño. Sin embargo cuando el daño compromete una fracción muy grande del parénquima, y/o cuando la proliferación de los hepatocitos es inhibida, no puede esperarse su participación en la reparación, en estos casos la reparación se produce a través de células progenitoras (Rutherford y col., 2008). En este caso se produce la activación de células progenitoras ubicadas en los canales de Hering, que originan las células ovas, (Conigliaro y cols., 2008) descritas en roedores y en el hombre. Como tercera alternativa es la activación de las stem cell extrahepáticas provenientes de médula ósea, con capacidad de migrar, integrarse al hígado, diferenciar, y producir su repoblación (Lorenti, 2001; Conigliaro y cols., 2008).

## 5.1. Células ovales

Las células ovales, situadas en los canales de Hering (ver Principles of tissue engineering), participan en la regeneración hepática cuando la proliferación de las células parenquimatosas es defectuosa (Strick-Marchand y cols., 2004). Tienen capacidad clonogénica (capacidad de proliferación) y bipotencial (capacidad de diferenciarse en linaje hepático y epitelial biliar) (Ueberham y cols., 2008).

Se han reconocido en distintos modelos animales. El concepto de células ovales comenzó a ganar importancia a partir de estudios de carcinogénesis (Lorenti, 2001): ratones expuestos a carcinógenos muestran un patrón uniforme de cambios, que terminan en el desarrollo de un carcinoma hepatocelular: necrosis, diseminación e inflamación, seguidos por la proliferación de hepatocitos. Concomitantemente comienza la proliferación de células ovales en la zona del tracto portal.

La población de células en proliferación es en realidad un grupo heterogéneo de poblaciones, por lo se llama “compartimiento de células ovales” (Lorenti, 2001); además de estas, contienen células en transición (intermedias entre ovales y hepatocitos), células con características de ductales biliares y una gran variedad de células mesenquimáticas.

Expresan marcadores antigénicos específicos característicos de células progenitoras, así como otros típicos de los hepatocitos y del epitelio biliar adulto, que las identifican. Expresan marcadores de células epiteliales de hígado fetal, incluyendo CK 7, 18 y 19, alfa-fetoproteína, albúmina, marcadores progenitores (OV6 en rata y A6 y G7 en ratón). Han sido desarrollados anticuerpos monoclonales para identificar estos antg (OC2 y OC3), usando estos anticuerpos se han identificado en hígados normales poblaciones celulares antigénicamente relacionadas a las células ovales (Lorenti, 2001). Muchos de estos antígenos, así como otros determinantes antigénicos de superficie, son compartidos con las células progenitoras hematopoyéticas, incluyendo c-kit, CD34 y Thy-1 en roedores y c-kit y CD34 en humanos (Prósper y cols., 2006; Ochsner y cols., 2007).

## 5.2. Identificación de las células progenitoras hepáticas

Las primeras células progenitoras en aislarse fueron células de ratas clonogénicas (Strick-Marchand y cols., 2004; Kubota and Reid, 2000). Usando colonias in vitro y citometría de flujo se aislaron células fetales hepáticas RT1A<sup>1-</sup>/OX18<sup>low</sup>/ICAM.1<sup>+</sup>. Fueron consideradas como hepatoblastos con bipotencial de diferenciación. Este descubrimiento fue seguido de la identificación de una población similar de hepatoblastos en hígado fetal de ratón, las cuales eran capaces de formar mayores colonias y mantener su descendencia más tiempo. Las células fetales MET<sup>+</sup>/CD 49f<sup>+/low</sup>/c-kit-/CD45-/TER119- fueron propagadas en cultivos y mostraron capacidad de producir continuamente hepatocitos y células biliares mientras mantenían su característica primitiva; cuando fueron

trasplantadas al ratón se diferenciaron morfológica y funcionalmente en hepatocitos y células biliares, además estas células eran capaces de diferenciarse en células acinares pancreáticas, gástricas e intestinal cuando se trasplantaban en estos órganos, por lo que recuerdan a las células madre endodérmicas.

Se ha debatido mucho sobre la presencia en el hombre de células similares a las encontradas en ratones. Se sabe la capacidad bipotencial de los hepatoblastos, pero no ha sido demostrada su capacidad clonogénica, por lo que no se les puede equiparar a células ovals o progenitoras (Weiss y cols., 2008).

Realmente en humanos se sabe poco. El mejor intento para aislarlas, ha sido descrito por Schmelzer et al. usando EPCAM y NCAM; aislaron células que tenían capacidad de diferenciación bipotencial; además fueron capaces de repoblar modelos de hígados dañados de animales; curiosamente estas células son negativas para albúmina y AFP y positivas para CD44, NCAM, claudina y AC133 (Young y cols., 2008).

Recientemente se ha encontrado una población progenitora multipotencial (hFLMPC) (Conigliaro y cols., 2008), capaz de diferenciarse en líneas hepática y mesenquimal (Strick-Marchand y cols., 2004; Dan et al, 2006). Su fenotipo era CD34+, CD90+, c-kit+, EPCAM+, c-met+, SSEA-4+, CK18+, CK19+, Alb-, AFP-, CD44h+ y vimentina+. En medios apropiados, estas células se podían diferenciar tanto en hepatocitos y células ductales, como en grasa, hueso, cartílago y células endoteliales. Curiosamente estas células hFLMPC sobreviven y se diferencian en hepatocitos in vivo cuando se trasplantan a modelos de animales con enfermedad hepática. Sin embargo no expresan marcadores hepáticos como albúmina, AFP y factores de transcripción primitivos hepáticos en su estado indiferenciado y tienen propiedades mesenquimales. Esto podría sugerir que son células transicionales mesenquimales-epiteliales, probablemente de origen mesodérmico.

## 6. CÉLULAS PROGENITORAS DE LA MÉDULA OSEA

En 1999 se suma a la teoría de las células progenitoras hepáticas, la teoría de obtención de células ovals a partir de células progenitoras hematopoyéticas (obtenidas de médula ósea) (Prósper y cols., 2006; Lorenti, 2001). El primero que observó fue el grupo de Peterson.

Las células progenitoras hematopoyéticas migran en el hígado y dan origen a las células ovals, hepatocitos y células epiteliales biliares. Modelos ensayados por Peterson y col., muestran que células asociadas a la médula pueden comportarse como progenitoras de los diversos tipos de células hepáticas en condiciones fisiopatológicas; para ello estudiaron el origen de las células que repoblaban el hígado de animales que recibían Tx hepático ortotópico o de médula ósea. La hipótesis que se plantearon, fue que las células ovals y otras

células hepáticas podían surgir en m.ósea, o asociadas a ella (Lorenti, 2001). Esto se ensayó por 3 modelos:

- Trasplante de medula ósea en ratas hembra letalmente irradiadas, singénicas, a partir de donantes macho, y detección del cromosoma Y. (Young y cols., 2008; Lorenti, 2001).
- Trasplante de m.ósea de donantes positivo para dipeptidil-peptidasa IV, una enzima presente en los espacios canaliculares biliares entre hepatocitos, en animales receptores hembra, negativos para esa enzima (Lorenti, 2001).
- Trasplante de hígado en ratas receptoras que expresan el antígeno L21-6, a partir de donantes alogénicos que no expresan dicho antígeno (Lorenti, 2001).

Aun no está claro el éxito de estas células para la regeneración hepática, y parece depender del modelo animal que sea utilizado.

Diversos experimentos en animales hacen que aumente el interés en esta línea de investigación:

- En hepatitis C y B se ha visto una disminución de la viremia tras la inyección intravenosa de m.ósea o células hematopoyéticas de sangre periférica, cuando las células madre eran transfectadas con interferón beta.
- En cirrosis: inhibición de la fibrogénesis y apoptosis con desaparición de la fibrosis cuando las células hematopoyéticas eran transfectadas con el factor de crecimiento hepatocítico (Young y cols., 2008).
- En ratones se ha comprobado la capacidad de las células de la m.ósea de curar enfermedades metabólicas como la tirosinemia tipo 1 (Prósper y cols., 2006).
- En hepatopatías crónicas: repoblación masiva con los hepatocitos normales trasplantados, después que la proliferación de los hepatocitos residentes previamente dañados había sido bloqueada con la administración de retrorsina.

Han sido publicados dos estudios hechos en humanos, que avalan los resultados de los roedores (Lorenti, 2001):

- Obtuvieron especímenes de hígado de dos pacientes femeninas sin historia previa de enfermedad hepática, receptoras de m.ósea de donantes masculinos. Se analizaron mediante técnicas de hibridación por fluorescencia in situ para el cromosoma Y, e inmunohistoquímica para citokeratinas 8, 18 y 19. El examen post-mortem indicó la presencia en sus hígados de hepatocitos y células ductales biliares provenientes de los donantes; esto indicaría que sin un daño previo, las células podrían movilizarse a un nivel basal, fisiológicamente.
- De 4 varones receptores de Tx ortotópico a partir de donantes femeninas; varones se encontraron acúmulos de hepatocitos que contenían el cromosoma Y un tiempo después del Tx.

A partir de estos estudios plantearon dos explicaciones:

1. Que las células progenitoras hepáticas pasan a través de la circulación y se intercalan en los cordones preexistentes como hepatocitos directamente, sin un estadio previo de células ovales.
2. Que las células progenitoras extrahepáticas entran como intermediarias tipo ovales, quizás a través de los canales de Hering; con la consiguiente expansión y diferenciación que produciría la formación de acúmulos de hepatocitos.

Otros estudios en los que se ha usado células progenitoras hematopoyéticas humanas para generar hepatocitos en hígados con daño crónico, avalan la proliferación y colonización por parte de estas células exógenas. Además los autores postulan, que en el daño crónico también se produciría la colonización por parte de células hemopoyéticas endógenas.

El primer caso que probó que las stem cell de médula ósea podían repoblar un hígado dañado fue observado por Lassege et al., usando un modelo de tirosinemia tipo 1 hereditaria. Pero luego se vio que este proceso de reparación era primariamente mediado por la fusión con una subpoblación de monocitos y no por transdiferenciación de stem cells de médula ósea (Prósper y cols., 2006). Por otro lado Harrit et al., usó un método sofisticado cre/los que mostró que era posible encontrar células epiteliales derivadas de médula ósea sin evidencia de fusión. Estudios posteriores señalan que aunque esto sea posible, que la mayor parte del fenómeno de transdiferenciación se debe al fenómeno de fusión. Por todo ello, hoy día, no hay evidencias concluyentes para decir que las stem cell hematopoyéticas jueguen un papel importante fisiológico o patológico en el hígado dañado y en la vía de transdiferenciación.

## 7. CÉLULAS HEPÁTICAS FETALES

Los hepatocitos fetales son una fuente alternativa, pero existen muchas dudas éticas que podrían prevenir el uso de este material para propósitos terapéuticos. Muestran una capacidad proliferativa muy alta y son menos inmunogénicas y más resistentes a la criopreservación, lesión isquémica, lo cual podría darle el éxito necesario durante el trasplante celular (Lilja y cols., 1998).

Se han realizado diversos estudios para demostrar la existencia de estas células. En roedores se vio que las células progenitoras que formaban hepatocitos o colangiocitos podían ser identificadas con el marcador de las stem cell, Thy-1. Para identificarlas en hígados fetales humanos se han usado distintas técnicas de inmunohistoquímica, y se ha comprobado la presencia de células Thy-1+ en el tracto portal, y también, aunque en menor cuantía, dispersas por el parénquima.

Está la hipótesis de que las células progenitoras de hígado adulto sean precursoras de hepatoblastos. Estas células podrían ser restos del desarrollo embriológico hepático donde las células progenitoras son “atrapadas” en su “nicho progenitor”. Aunque las células progenitoras abundan en hígados con

enfermedad avanzada, el acumulo de mutaciones del DNA y el acortamiento de los telómeros en estas células adultas hace que sus homólogos en el hígado fetal sean más aptos como candidatos para las aplicaciones de la terapia celular. Pero está el inconveniente de los problemas éticos (Young y cols., 2008).

El potencial de las células progenitoras fetales se puede entrever por los modelos de repoblación donde hepatoblastos fetales criopreservados se transplantan a hígados adultos normales, y son capaces de repoblar más del 14%. Esto tiene gran implicación para la terapia génica en enfermedades metabólicas, y en hepatopatías avanzadas. Similares resultados se han visto en hígados fetales humanos.

## 8. CÉLULAS PROGENITORAS EMBRIONARIAS

Son una nueva promesa para el tratamiento de enfermedades hepáticas avanzadas. Derivados de embriones pre-implantados son capaces de auto-renovarse y mantener la pluripotencialidad (Baharvand y cols., 2008).

Estas células han sido reportadas con la capacidad de diferenciarse en hepatocitos. Antes de poder ser aplicadas, se requieren más estudios en cuanto a la capacidad de estas células de formar teratomas e inducir la respuesta inmune. Verificando su potencialidad, estas células se han aislado y comprometido en líneas endodérmicas. Esto lo han demostrado distintos grupos, tanto in vitro como in vivo. Como las stem cells embrionarias cultivadas pueden producir AFP, transferrina y albúmina; esto se ha reproducido satisfactoriamente usando stem cells embrionarias humanas. Se han usado distintos protocolos de butirato sódico (Zhou y cols., 2007), activina, factor de crecimiento de fibroblastos 2, proteína ósea morfogenética 2 (BMP), factor de crecimiento hepatocitario y oncostatina M y/o co-cultivo con thy-1 células mesenquimáticas fetales, células humanas hepáticas no parenquimatosas o hepatocitos maduros. La principal prueba de que estas células pueden ser útiles en terapéutica, se ha demostrado sobre todo en modelos murinos con hígados dañados (Young y cols., 2008; Baharvand y cols., 2008).

### 8.1. Células hepáticas embrionarias como modelo para diferenciarse en hepatocitos y células ductales

Analizar las células durante su desarrollo está facilitado por la posibilidad de poder complementar estudios in vivo con experimentos de células en cultivo (Strick-Marchand y cols., 2002).

A continuación se citan distintos resultados sobre la capacidad bipotencial de Stem cells hepáticas en embriones:

- En ratones: HBC3, H-CFU-C, MMH Y BMEL
- En rata: rhe 14321
- En primates: IPFLS



Para estudiar el hígado y sus componentes, es frecuente que los cultivos primarios resulten inadecuados, porque son heterogéneos, de corta vida y difíciles de valorar el potencial de diferenciación de la progenie. Por eso muchos grupos se dedican al desarrollo de células en modelos de cultivo de hígados normales, incluyendo hígados embrionarios. Con algunas de estas líneas celulares, sería posible investigar marcadores que permitan (Strick-Marchand y cols., 2002):

- Identificar las células de origen
- Identificar señales de la vía que esta implicada en el mantenimiento del fenotipo de las células madre y en la decisión de diferenciación en una u otra dirección.
- Definir condiciones óptimas del cultivo para la proliferación en un estado indiferenciado, así como para la diferenciación y/o morfogénesis.
- Comparar las stem cell proliferativas y su progenie usando microarrays métodos de hibridación supresiva (supresión substractive hybridization= SSH) para obtener el perfil global de expresión genética
- Si las stem cells son realmente un verdadero reflejo de las células normales de las que derivan, deberían ser capaces de repoblar hígado usando modelos animales
- Detectar ratones con déficit de genes importantes para especificación del tipo, responder a la señalización, regulación de la transcripción o de la diferenciación, en este caso los cuales serían invaluable.

### 8.1.1. H-CFU-Cs

Usando anticuerpos monoclonales y métodos de fluorescencia (fluorescent activated cell sorting= FACS) se han llevado a cabo análisis prospectivos de células madre hepáticas y su capacidad de proliferación y diferenciación.

Suzuki y colaboradores (2000): células hepáticas fueron disociadas de embriones de ratones E13.5 y marcadas para ausencia de marcadores antigénicos limitados a células hematopoyéticas (CD45-, TER119-), para reaccionar contra anticuerpos contra B1 y alfa6 subunidades de integrinas (CD29+, CD49f+) y para ausencia de c-kit (c-kit-): de estas poblaciones de células marcadas, que eran el 3.3% de las aisladas, en presencia de HGF y otros nutrientes y hormonas, el 0.2% de las células eran capaces de formar H-CFU-C (unidades formadoras de colonias hepáticas en cultivo). Mostraban 2 morfologías: células tipo fibroblastos, y colonias de morfología mixta. Células de estas colonias eran capaces de diferenciarse en hepatocitos o células ductales, y mediante inmunocitoquímica, diversos investigadores consideraron como marcadores diagnósticos, la albúmina y CK29 respectivamente. Se examinó el RNA de las que tenían positivo uno u otro marcador, y en todos los casos, con el paso del tiempo las fracciones de colonias que daban positivo era mayor. **Conclusión:** identifican candidatos para los hepatoblastos bipotenciales, que no expresan ni albúmina, ni CK19, pero que dan lugar a progenie, que espontáneamente expresan uno u otro marcador.

El mismo grupo (2002): mejoraron los estudios previos introduciendo anticuerpos c-met con pobre expresión de alfa 6 integrina y lo trasplantaron in vivo: las células seleccionadas solo representaban el 0.3% de la población inicial, y 40% de ellas daban colonias, de las cuales solo el 2% fue identificado como H-CFU-Cs. (Strick-Marchand y cols., 2002)

### 8.1.2. Rhe

Kubota y Reid (2000) usaron FACS para identificar células precursoras clonogénicas hepáticas de embriones ratón. Para ello llevaron a cabo diversos estudios en ratas describiendo las propiedades de 3 líneas celulares hepáticas aisladas en embriones de rata E15. Una de ellas rhel 4321 expresaba albúmina y AFP en las células hijas, morfológicamente eran agregados, y estaban desprovistas de MHC clase I, con pobre expresión de OX18, heterogéneas para ICAM-1 y todas integrina B1+. Definieron como “colonias hepáticas” aquellas capaces de producir albúmina y AFP. **Conclusión:** las células iniciales eran albúmina+ y los colangiocitos derivados de ellas podrían no volverse CK19+ e incluso podrían perder la expresión de albúmina. Realmente cuando las cultivaban en ausencia de EGF, la mayoría de las colonias expresaban albúmina y CK19 en distintos territorios dentro de la misma colonia. Examinaron los marcadores de superficie y el potencial de crecimiento de las células en suspensión de hígado de rata adulto e identificaron células capaces de proliferar como colonias (RT1A+, OX18+, ICAM-1+), y a diferencia de las células embrionarias que crecen mejor en ausencia de EGF, las células adultas dependen para su proliferación de EGF; y no detectaron una población celular con MHC clase I negativo (Strick-Marchand y cols., 2002).

### 8.1.3. HBC-3

Rogler (1997) fue el primero en obtener una línea celular de los hepatoblastos. Cultivo células disociadas en medios de cultivo enriquecidos con suero. Inoculó en cada cultivo de 1 a 10 microdisecciones de divertículo hepático y recogió colonias epiteliales después de 7-10 días. Obtuvo una línea celular, que denominó HBC-3. Las células expresaban albúmina, y si las mantenía en los medios enriquecidos se detectaba también GGT, AFP y CK 14. Posteriormente uso butirato de sodio o DMSO para obtener la diferenciación de líneas hepatocitarias y obtuvo estructuras ductulares y la expresión de marcadores de colangiocitos, GGT y CK19 (Strick-Marchand y cols., 2002).

### 8.1.4. BMEL

Stem cells embrionarias hepáticas bipotenciales de ratón, participan en la regeneración hepática en albúmina-urokinasa factor activador del plasminógeno combinado en ratones transgénicos con inmunodeficiencias (Alb-uPA/SCID) (Strick-Marchand y cols., 2004).

En 2007 se usaron líneas celulares bipotenciales de ratones embrionarias de 14 días postcoital para determinar los marcadores expresados en células progenitoras hepáticas= BMEL (bipotencial mouse embrionic liver cells). Se vio que proliferaban en estado indiferenciado, y que eran capaces de diferenciarse en hepatocitos y colangiocitos in vitro. Tras el trasplante, se podían diferenciar en hepatocitos y colangiocitos in vivo.

Con distintos análisis (microarrays...) se determinaron marcadores:

- en células indiferenciadas: genes envueltos en regulación del ciclo celular.

- en células diferenciadas: expresaban genes para funciones de hígado adulto.

- señales de la vía Notch podrían participar en mantener BMEL en estado de células madre indiferenciadas.

- Se observó que el marcador CD 24a se expresaba en células ovales, por lo que podría considerarse molécula candidata para purificar células progenitoras hepáticas (Strick-Marchand y cols., 2002).

#### 8.1.5. MMH (Met murine hepatocito) palmate cells

Amicone (1997) aisló líneas celulares hepáticas llamadas RLSCs de hígados de ratones transgénicos que expresaban c-Met humano. Estas líneas se vio que expresaban factores de transcripción enriquecidos hepáticos (LEFT), funciones de hepatocitos y que no formaban tumores en ratones desnudos. Clonándolas, se vio que contenían 2 tipos de células. Unas de ellas, las epiteliales, contenían estos factores de transcripción, y se expresaban en todas las células hepáticas CK8, 18 y 19. Además podían inducirse a que expresen las funciones de albúmina y transtirretina en cultivos de gelatina o en presencia de DMSO o FGF. La segunda línea celular, llamada "palmate" (línea celular precursora bipotencial derivada de hígados embrionarios de ratones transgénicos cyto-Met) (Conigliaro y cols., 2008) expresan las mismas citoqueratinas hepáticas pero no LEFT, ni funciones hepáticas. Pero se vio que si permanecían tiempo cultivadas también comenzaban a expresar pequeñas cantidades de LEFT, y tras 45 generaciones, se transformaban en células epiteliales, que expresaban más LEFT y podían ser inducidas para funciones hepáticas.

#### 8.1.6. Células hepática bipotenciales fetales de primate

Allain y colaboradores (2002): pusieron células fetales de mono en placas en suspensión con suplementos, que expresaron AFP, alb, CK7 y CK 19. Para obtener stem cells hepáticas fetales inmortalas el cultivo fue transducido con un retrovirus que expresaba SV40 antg T, y para encontrar las células, usaron otro retrovirus que expresaba LacZ. Los cultivos no trasducidos murieron en 2 semanas, sin embargo, los trasducidos al de 4 y 6 meses sobrevivían 144 clones, pero tras un año, solo 1 clon permanecía proliferativo= IPFLS (inmortalizad primate fetal liver stem cell); se vio que expresaban albúmina y CK 19, lo que implica que eran bipotenciales, también expresaban niveles altos de

telomerasa y acumulo de p53 nuclear. Lo que sugería que eran inmortales. Se inyectaron en vena porta de ratones con hepatectomías parciales y entre 7 y 21 días se habían integrado en el hígado, y expresaban AFP y albúmina, además no producían tumores (Strick-Marchand y cols., 2002).

Con lo anteriormente expuesto, la pregunta que cabe esperar es: **¿Derivan todas las células hepáticas bipotenciales de la misma célula?** (Strick-Marchand y cols., 2002).

Primeramente es importante destacar que muchas de las diferencias encontradas en los resultados, se pueden deber a que unos grupos usaban la fluorescencia para identificar las células bipotenciales clonogénicas, otros obtenían las células mediante cultivos en suspensión, así como por la distinta metodología...

La conclusión que se puede obtener tras comparar las distintas líneas celulares, es que probablemente todas derivan de la misma célula diana, que será el hepatoblasto.

## 9. STEM CELL HEPÁTICAS Y CANCER

La biología de las células madre y el cáncer están íntimamente relacionados (Lorenti, 2001). Está ampliamente aceptado que las células madre son las únicas que poseen la envergadura suficiente para adquirir los múltiples cambios genéticos para el crecimiento de las neoplasias (Lagasse, 2007). Por eso todos los cánceres son clonales, es por ello, que representan la descendencia de una sola célula, que a sufrido mutaciones secuenciales debido a la inestabilidad genética y/o a factores ambientales. Además trasplantes experimentales han demostrado que las células tumorales son funcionalmente heterogéneas, por lo que solo un número limitado de ellas son capaces de iniciar la génesis tumoral. Por ello, los cánceres son considerados como una nueva formación de tejidos anormales iniciados por unas pocas células iniciadoras de cáncer o células madre bajo condiciones aberrantes de organogénesis.

Esta teoría jerárquica para las células tumorales señala que el tumor podría constar de células iniciadoras que son diferentes de la mayoría de células del tumor, y que podrían tener una función análoga a las células madre normales. Una característica de todos los cánceres es su capacidad ilimitada de renovación, lo cual es una característica de las stem cell (Lagasse, 2007). Por todo lo anterior, se propone que el cáncer se podría iniciar en células madre normales que sufre transformaciones.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

A. Conigliaro, M. Colletti, M.T. Guerra, R. Zini, V. Bordoni, F. Siepi, M. Leopizzi, M. Tripodi, L. Amicone. Isolation and Characterization of a murine resident liver stem cell. *Cell Death and Differentiation*. 2008; 15: 123-133.

A. Rutherford, T. Chung Raymond. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. *Seminars in liver disease. Liver failure and liver support*. 2008; 28: 167-174.

A. S. Lorenti. Células progenitoras hepáticas. Instituto de Ciencias Básicas y Medicina experimental, Hospital Italiano, Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*. 2001; 61: 614-620

A. Tomomura, N. Sawada, G.L. Sattler, H. K. Kleinman, H. C. Pitot. The control of DNA synthesis in primary cultures of hepatocytes from adult and young rats: interactions of extracellular matrix components, epidermal growth factor, and the cell cycle. *Journal of Cellular Physiology*. 2005; 130: 221-227.

Alberts, Bruce, Brey, Lewis. *Biología molecular de la célula*. Omega 4ª ed. Barcelona 2004.

C. Fougère-Deschatrette, T. Imaizumi-Scherrer, H. Strick-Marchand, S. Morosan, P. Charneau, D. Kremsdorf, M. Faust, M.C. Weiss. Plasticity of hepatic cell differentiation: bipotential adult mouse liver clonal cell lines competent to differentiate in vitro and in vivo. *Stem Cells*. 2006 ; 24 : 2098-2109.

Cellular Transplantation. Elsevier Science & Technology Academic Pressing. N.j. Krebs, C. Neville, J. Vacanti. (218-235).

D.O. Seglen. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 1976; 13: 29-83.

David.P., Alexandre.E., Audet. M., Chenard-Neu. M-P., Wolf. P., Jaeck.D.; Azimzadeh.A., Richert.L. Engraftment and Albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase Albuminemic Rats (NAR). *Cell Transplantation*. 2001; 10: 67-80.

E. Ueberham, R. Lindner, M. Kamprad, R. Hiemann, N. Hilger, B. Woithe, D. Mahn, M. Cross, U.Sack, R. Gebhardt, T.Arendt, U. Ueberham. Oval cell proliferation in p16INK4a expressing mouse liver is triggered by chronic growth stimuli. *Journal of Cellular & Molecular medicine*. 2008; 12: 622-638.

F. Prósper, J. Herreros. Células madre adultas. *Rev Argent Cardiol* 2004; 72: 68-73.

F. Prósper, J.J. Gavira, J. Herreros, G. Rábago, R. Luquin, J. Moreno, J.E. Robles, P. Redondo. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. *Clínica Universitaria Navarra*. 2006; 29

Fundación investigación Hospital La Fe, unidad de hepatología experimental. *Biología molecular, celular y genética*. BOE 19-02-2007

H. Baharvand, S.M. Hashemi, M.Shahsavani. Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in serum-free adherent culture condition. Department of Stem Cells Rayan Institute, P.O. Wiley Publishers. 2008; 76: 465-477.

H. Lilja, P. Blanc, A.A. Demetriou, J. Rozga. Response of cultured fetal and adult rat hepatocytes to growth factors and cyclosporine-interactions of extracellular matrix components, epidermal growth factor, and the cell cycle. *Cell Transplantation*. 1998; 7: 257-266.

H. Strick-Marchand, M. C. Weiss. Embryonic liver cells and permanent lines as models for hepatocyte and bile duct cell differentiation. *Mechanisms of Development* 120 (2003) : 89-98

- H. Strick-Marchand, S. Morosan, P. Charneau, D. Kremsdorf, M. C. Weiss. Bipotencial mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Pnas* 8360-8365. June 1, 2004/vol101/nº22.
- H.C. Fiegel, P.M. Kaufmann, B. Helge, K. Dietrich, E.H. Raymund, J.P. Vacanti, U. Kneser. Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from laboratory. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008; 12:56-66.
- H.Z. Jamal, T. C. Weglarz, E. P. Sandgren. Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity in vivo. *Gastroenterology*. 2000; 118: 390-394.
- Harrison. *Medicina Interna*. Mc Graw Hill 16ªed; 1992-1997. Alteraciones genéticas 2058-2062; Trasplante hepático 2062-2069.
- J. Kano, T. Ishiyama, T. Iijima, Y. Morishita, S. Murata, K. Hisakura, N. Ohkohchi, M. Noguchi. Differentially expressed genes in a porcine adult hepatic stem-like cell line and their expression in developing and regenerating liver. *Laboratory investigation advance online publication*. 2007; doi: 10.1038.
- K. Mitamura, E. Ellis, T. Miki, S. Strom. *New Frontiers in Regenerative medicine. Hepatocyte transplantation for liver disease (-7)*. Ed. Springer. Japan 2007
- Langmann. *Embriología médica Panamericana* 7ªed, Madrid 2001: 239-240.
- M.N. Berry, D.S. Friend. High-Yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: A Biochemical and Fine Structural Study. *The Journal of Cell Biology*. 1969 ; 43 : 506-520
- N. Mula, J.F. Cubero, J Codesal, S. De Andres, C. Escudero, S. García-Barrutia, I. Millan, M. Arahetes, P. Maganto. Survival of allogeneic hepatocytes transplanted into the thymus. *Cell Tissues Organs*. 2008; 188: 270-279.
- N.R. Chowdhury, J.R. Chowdhury. *Hepatocyte transplantation*. Up to date. 2007.
- O. K. Vintermyr, S. O. Doskeland. Cell cycle parameter of adult rat hepatocytes in a defined medium. A note on the timing of nucleolar DNA replication. *Journal of Cellular Physiology*. 2005; 132: 12-21.
- Principles of tissue engineering*, 3ªed, Lanza 2007 Eric Lagasse. Liver stem cells; 695-705.
- Q.J. Zhou, L.X. Xiang, J.Z. Shao, R.Z. Hu, Y.L. Lu, H. Yao, L.C. Dai. In vitro differentiation of hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells induced by sodium butyrate. *Journal Cell Biochem*. 2007; 100: 29-42.
- R. Taléns-Visconti, A. Bonora-Centelle, J.V. Castell, M.j. Gómez-Lechón. Fuentes alternativas de hepatocitos para la terapia celular. *Gastroenterología y Hepatología*. 2006; 29: 366-378.
- S.A. Ochsner, H. Strick-Marchand, Q. Qiu, S. Venable, A. Dean, M. Wilde, M.C. Weiss, G.J. Darlington. Transcriptional profiling of bipotential embryonic liver cells to identify liver progenitor cell surface markers. *Stem Cells*. 2007; 25: 2476-2487.
- T.S. Weiss, Kirchner, P. Stock, H. Aurich, B. Christ, G. Brockhoff, L. Kunz-Schughart, H-J. Schlitt. Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation. *Gut*. 2008; 57: 1129-1138.
- The National Institute of Health resource for stem Cell research. *Stem Cell*. Appendix D y E. U. Baccarani, A. Donini, A. Sanna, A. Risaliti, B. Nardo, A. Cavallari, G. Martinelli, L. Ridolfi, G. Bellini, M. Scalapogna, F. Bresadola. First report of cryopreserved human hepatocytes

based bioartificial liver successfully used as bridge to liver transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2003; 4: 286-289.

X. Stephenne, M. Najimi, F. Smets, R. Reding, J. De Ville de Goyet, E.M. Sokal. Cryopreserved liver cell transplantation controls ornithine transcarbamylase deficient patient while awaiting liver transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2005; 5: 2058-2061.

X. Stephenne, O.Vosters, M. Najimi, C. Beuneu, D.K. Ngoc, W. Wijns, M.Goldman, E.M.Sokal. Tissue factor-dependent procoagulant activity of isolated human hepatocytes: relevance to liver cell transplantation. *Liver Transplant*. 2007; 13: 599-606.

X.Stéphenne, M.Najimi, C.Sibille, M.C. Nassogne, F. Smets, E.M.Sokal. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 1317-1323.

Y. Ying, J. Zheng, X. Zhou, Z. Yang, Y. Tan, A. Liu, X. Gao, Z. Chang, H.Z. Sheng. Potential treatment of liver-related disorders with in vitro expanded human liver precursors. *Differentiation*. 2007; 75: 928-938.

Y.Young Dan, G. C. Yeoh. Liver stem cells: A scientific and clinical perspective. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2008; 23: 687-698

## CAPÍTULO 7:

# TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES EN LA DIÁLISIS PERITONEAL. METÁSTASIS PERITONEAL DE TUMORES.

Fermín Aspichueta Vivanco.

## Índice

1. DIÁLISIS PERITONEAL:.....	183
1.1. Introducción.....	183
1.2. Antecedentes históricos de la diálisis peritoneal: .....	183
1.3. Relación entre la diálisis peritoneal y la transición epitelial-mesenquimal .....	185
2. TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL Y CÁNCER.....	186
2.1. Cambios moleculares en la transición epitelial-mesenquimal .....	187
2.2. Extravasación tisular y formación de la metástasis .....	189
2.3. Células Mesoteliales .....	190
3. CONCLUSIÓN. ....	191
4. BIBLIOGRAFÍA. ....	193



## 1. DIÁLISIS PERITONEAL:

### 1.1. Introducción

La diálisis peritoneal es una técnica por la cual se infunde una solución de composición y osmolaridad controlada en la cavidad peritoneal, se deja un tiempo de permanencia y posteriormente se drena.

Durante el tiempo de permanencia, el agua y los solutos pasan de los capilares peritoneales al líquido de diálisis a través de la membrana biológica que es el peritoneo estableciéndose un equilibrio entre el plasma y la cavidad peritoneal. En la diálisis peritoneal aprovechamos una membrana que rodea los órganos internos del abdomen llamada peritoneo. Esta membrana tiene facultades dialíticas. Mediante un catéter que se inserta mediante cirugía (y anestesia local) se infunde una cantidad de un líquido preparado que viene en bolsas.

Hay dos tipos de diálisis peritoneal:

1. Diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA).
2. Diálisis peritoneal automatizada (DPA).

Nosotros nos centraremos en la primera:

- En la diálisis peritoneal continuada ambulatoria (DPCA) la solución de diálisis viene presentada en bolsas con una capacidad que varía entre 1 y 2 litros. El paciente conecta al catéter un equipo con dos bolsas; una con el líquido a infundir y otra vacía que recogerá el líquido de una anterior infusión, que se encuentra alojado en la cavidad peritoneal.

- Acto seguido se deja que el líquido salga del peritoneo a la bolsa vacía. A continuación el líquido a infundir pasa de la bolsa nueva al peritoneo. Todo este proceso se efectúa gracias a las diferencias de altura: es decir, por gravedad. La bolsa de drenaje ha de estar en el suelo y la de infusión ha de colocarse a mayor altura que el abdomen. Esto se conoce por intercambio y, normalmente, se efectúa cuatro veces al día. El contenido de la última bolsa quedará dentro de la cavidad peritoneal toda la noche.

- Un componente característico en la composición del líquido para diálisis peritoneal es la glucosa. Esta sustancia es la que posibilita que el exceso de líquido del organismo pase al peritoneo y de aquí se drene. La solución se presenta en dos concentraciones de glucosa: 1,5 y 4,25 %. Esta última, por su mayor poder de ultrafiltración, es la que se emplea para el último intercambio.

### 1.2. Antecedentes históricos de la diálisis peritoneal:

#### **Años 1700/1800 - Las primera referencias**

Las primeras referencias sobre la membrana peritoneal vienen del Antiguo Egipto, donde los físicos de la época describieron la fisiología peritoneal.

El concepto inicial de diálisis peritoneal se desarrolla en 1740 en Gran Bretaña por Christopher Warrick. En esa fecha trata por primera vez a una paciente de cincuenta años. No obstante la reacción de la paciente fue espantosa y tres sesiones después debió de abandonarse el tratamiento.

Desde mediados del siglo XIX los investigadores iniciaron los estudios sobre el funcionamiento del peritoneo como membrana semipermeable y con capacidad para remover toxinas, siendo Wegner en 1877, el primero en comprobar el funcionamiento peritoneal en los animales.

### **Años 1900/1950 - Primera aplicaciones clínicas**

En 1923 se realizaron en Alemania las primeras aplicaciones clínicas de la diálisis peritoneal por el Dr. Georg Ganter. El primer paciente tratado por este sistema era una mujer con insuficiencia renal como consecuencia de un parto. Desgraciadamente pasados unos días la paciente falleció.

Ganter realizó una serie de observaciones en el tratamiento de pacientes con insuficiencia renal que todavía hoy son válidas: la adecuación del acceso y las soluciones estériles prevén infecciones.

Es en este momento donde se realizan las primeras descripciones puntuales sobre los riesgos de peritonitis y que todavía hoy son válidas. Rosenak, en 1926, junto con sus colaboradores, desarrolló un catéter para lavados peritoneales continuos.

### **Años 1950/1960 - El primer tratamiento continuo con diálisis peritoneal**

Durante la guerra de Corea (1950/53), un grupo liderado por el Dr Paul Doolan, experimentó la posibilidad de realizar diálisis peritoneal en el propio campo de batalla. Conjuntamente con un equipo de médicos del Hospital Naval de San Francisco desarrolló un catéter resistente y de larga duración.

Consiguieron gracias a su tenacidad pero sobre todo a la voluntad de la paciente que la membrana se dializara incluso cada día de manera continua. El catéter permaneció inamovible durante más de siete meses.

### **Años 1960/1970 - Diálisis Peritoneal continua**

En 1960 el Dr. Fred S.T. Boen trabajó conjuntamente con el Dr. Gerge Shilipetar y otros doctores de la Universidad de Washington en el desarrollo de una unidad automatizada que podía trabajar de manera continua de noche.

Por su parte el Dr. Norman Lasker inicia en 1961 la investigación de nuevas formas de tratamiento en los pacientes con insuficiencia renal y trabaja en un

tipo de diálisis peritoneal que permita un más fácil manejo de todos los instrumentos de este tipo de diálisis.

### **Años 1970/1980 - Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria**

En 1972 se produce un hecho histórico como es el reconocimiento por parte de las autoridades norteamericanas de que todos los pacientes que lo requieran puedan recibir tratamiento substitutivo de la insuficiencia renal crónica. De este modo en 1970, 5000 pacientes en todo el mundo reciben algún tipo de tratamiento. Mientras en 1980, la cifra alcanza los 150.000 y un crecimiento estimado de 10.000 al año.

Tras múltiples cálculos y estudios determinan que cinco cambios por día pueden ser los más adecuados y que en total se deben cambiar doce litros de líquido por día. Así nace la diálisis peritoneal continua ambulatoria. Crean la DPCA tal y como la conocemos ahora.

### **En la actualidad**

La moderna técnica de la diálisis peritoneal no se introduce hasta que, a finales de la década de los 70 se inicia el uso de la terapia como tratamiento alternativo en la insuficiencia renal crónica

En la actualidad, los programas de diálisis peritoneal constituyen en todo el mundo uno de los puntales en la atención integral al paciente renal, por lo que en muchos hospitales se han introducido dichos programas.

En España se inició la diálisis peritoneal continua ambulatoria (CAPD) en 1979, llegando a ser en 1988 un 8% de todos los pacientes en diálisis los que reciben dicho tratamiento en la modalidad de CAPD. Actualmente, el número de pacientes en Diálisis Peritoneal, está aumentando.

### **1.3. Relación entre la diálisis peritoneal y la transición epitelial-mesenquimal**

Durante la diálisis peritoneal ambulatoria continuada (CAPD), las soluciones de diálisis causan la formación de nuevos vasos (angiogénesis) así como la fibrosis tisular, dando lugar, finalmente, al fracaso de ultrafiltración. Sin embargo, hoy en día la fisiopatología de este proceso no es del todo bien conocida.

Se han caracterizado fenotípicamente las células mesoteliales aisladas a partir de efluentes de pacientes en CAPD, en comparación con células mesoteliales normales obtenidas a partir de mesenterio (omento). Esta caracterización fenotípica demostró que poco después del inicio de la diálisis peritoneal las células mesoteliales sufren una transición epitelial-mesenquimal (TEM), con pérdida progresiva de características epiteliales y adquisición de fenotipo fibroblástico con capacidad fibrogénica e invasiva.

La transición epitelial-mesenquimal es un complejo proceso por el cual las células epiteliales pierden muchas de sus características epiteliales y adquieren propiedades que son típicas de células mesenquimales. Características típicas del nuevo estado son la pérdida de polaridad apico-basal así como la rotura de las uniones intercelulares. Las nuevas células mesenquimales adquieren características migratorias, invasivas y fibróticas (Selgas, R. 2004) Los mecanismos que gobiernan esta transformación en el embrión son bien conocidos; se ha encontrado un cierto paralelismo con lo que ocurre durante la evolución del fenotipo canceroso (Huber, 2005).

Se ha visto que la transdiferenciación se puede dar "in-vitro" por medio de diferentes factores como Interleucinas, el TGF- $\beta$ ..."in-vivo" se ha demostrado que sólo se da en unos pocos procesos.

Las células mesoteliales juegan un papel activo en la alteración estructural y funcional del peritoneo durante la diálisis peritoneal. Asimismo, los datos sugieren que la TEM de las células mesoteliales podría ser una diana terapéutica para prevenir la fibrosis y angiogénesis asociadas al fracaso de ultrafiltración. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto una serie de marcadores de transdiferenciación que pueden ser utilizados para testar la biocompatibilidad de nuevos líquidos de diálisis peritoneal tanto en modelos in vitro como en pacientes tratados con estos nuevos líquidos.

## 2. TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL Y CÁNCER

La adquisición de las características específicas de la célula mesenquimal puede ser un paso importante en el proceso metastásico. Sin embargo, en muchos tumores diseminados, la lesión primitiva conserva rasgos epiteliales bien diferenciados; lo que sugiere que entre la forma epitelial (fija) y la mesenquimal (móvil) puede haber estadios intermedios. Por otro lado, parece lógico que la capacidad invasiva sea multifactorial, como otros tantos eventos en la carcinogénesis. Así, investigaciones de los últimos años han demostrado que la célula cancerosa puede modificar el estroma que la rodea; y que, inversamente, las células del estroma son capaces de cambiar algunas características del fenotipo canceroso (Zalatnai, 2006).

Desde siempre se sabe que la expansión local del cáncer no es homogénea. Probablemente, esto ocurre en función de la capacidad invasiva de las diferentes líneas celulares y de la existencia de zonas "más susceptibles" en el estroma. Parece que los primeros pasos de la diseminación de la enfermedad requieren colaboración de la transición epitelial-mesenquimal de la célula tumoral y de cambios en el microambiente donde se desarrolla el tumor (Tse, 2007). Una parte importante de esta colaboración corresponde a la secreción, por parte de las células tumorales y por la del estroma, de enzimas proteolíticos que favorecen la migración y permiten atravesar la membrana basal del epitelio y del endotelio capilar.

## 2.1. Cambios moleculares en la transición epitelial-mesenquimal

La descripción de la transición epitelial-mesenquimal ha sido, hasta hace pocos años, exclusivamente morfológica; ahora, se empieza a conocer el conjunto de cambios moleculares que la origina. A lo largo de todo el proceso intervienen más de 25 proteínas que presentan cambios cualitativos o cuantitativos (Lee, 2006). Otros cambios, conocidos desde hace más años, guardan relación con la función de algunas proteínas que facilitan la **migración** de células tumorales o con fallos en la expresión de un grupo de genes que se consideran supresores de las metástasis. Algunos de estos cambios, que se estudian a continuación, participan en la transición epitelial-mesenquimal.

### A Proteínas que facilitan la migración

Existen tres tipos de proteínas que permiten a la célula cancerosa desplazarse por el estroma y atravesar la membrana basal del epitelio y la del endotelio capilar:

Tabla 1: Proteínas que favorecen la diseminación

Función	Componentes
Adhesividad	-CAMs: moléculas de adhesión celular -Integrinas -Inmunoglobulinas
Migración	-Proteínas que actúan con la actina -Integrinas -Vinculinas
Proteólisis	-Colagenasa IV -Catepsina B -Metaloproteinasas

#### ● Las moléculas de adhesión celular (CAM)

La E-caderina es la molécula de este grupo que ha sido más estudiada en la transición epitelial-mesenquimal; fallos en la expresión del gen, por mutación o silenciamiento, juegan un papel importante en la diseminación de muchos carcinomas (Wong, 2003).

#### ● Las proteasas

Una gran variedad de enzimas proteolíticas facilitan la migración de la célula cancerosa por la matriz extracelular, al hidrolizar sus componentes; permiten, también, atravesar las membranas basales del epitelio y del endotelio capilar. Muchas proteasas se sintetizan como proenzimas que deben ser activados en el entorno pericelular, en competición con sus correspondientes inhibidores.

En los 20 últimos años se ha prestado especial atención a las metaloproteinasas, una familia de endopeptidasas que degradan distintos componentes de la matriz extracelular. Varios miembros, segregados por la célula tumoral o por las del estroma, han sido implicados en varias etapas de la diseminación, desde la intravasación en la lesión primitiva hasta la extravasación en las redes capilares (Rundhaug, 2003).

- **Proteínas del citoesqueleto.**

El citoesqueleto forma una estructura filamentosa, reticular que se extiende por toda la célula; tiene encomendadas muy diversas funciones: desde el desplazamiento de cromátidas y cromosomas durante la mitosis y meiosis, hasta el mantenimiento de la organización interna y de la configuración de la célula. Es, también, responsable de los movimientos celulares; no solo del desplazamiento de la célula entera, sino también del transporte interno de organelas y otras estructuras. La actina, uno de sus componentes, centra esta actividad; participa en múltiples interacciones proteína-proteína, de modo que su comportamiento depende, especialmente de las proteínas con las que interactúa (Button, 1995).

## **B: Genes supresores de las metástasis**

Se ha identificado más de una docena de genes que, atendiendo al papel que desempeñan, se suelen agrupar bajo el nombre de “genes supresores de las metástasis”; es decir: genes supresores que impiden la diseminación de la enfermedad; pero, probablemente, son solo piezas de un proceso más complejo. *NM23*, el primero identificado y el más estudiado, participa claramente en el desarrollo de las metástasis del cáncer de mama, pero su intervención en otras neoplasias es discutible; algo parecido se puede decir del resto de sus compañeros (Steeg, 2004). La interpretación que se dio a los primeros hallazgos fue que la mutación o el cambio epigenético de estos genes favorecen la diseminación en la fase inicial del proceso; esto puede ser cierto en algunos casos, pero la mayoría permite, también, la expansión de las metástasis (Berger, 2005).

- **Cambios en el transcriptoma**

El análisis del genoma mediante microchips, útil en muchos campos de la Oncología, está aportando información muy interesante en este terreno al informar sobre los genes que se expresan en un grupo de células. Así, se ha descrito un “perfil molecular de mal pronóstico”, común a muchos tipos de tumores (Ramasmam, 2003); está presente solo en los enfermos que tienen mala evolución (téngase en cuenta que, en Oncología, mal pronóstico es sinónimo de existencia o riesgo de metástasis). Otros investigadores han encontrado resultados similares (Hynes, 2003). Pero, quizá, lo más interesante es la aparición de este perfil en tumores pequeños, incluso en carcinomas de mama no infiltrantes (Ma, 2003); lo que viene a confirmar la sospecha clínica de

que el fenotipo metastásico se puede desarrollar en cualquier momento de la evolución.

En un estudio realizado recientemente por Strippoli y cols (2008) se ha mostrado la existencia de una cascada de señales que implica a la quinasa MAP-ERK, que regula a su vez el factor de transcripción Nck-b, necesario en los procesos inflamatorios y a su vez regula al Snail-1, característico de la transición epitelio-mesenquimal. La vía de señalización estudiada se dispara en las células mesoteliales cuando se incuban en el líquido de diálisis que se recuperó de los pacientes. Al bloquear la vía con inhibidores de la fosforilación de la quinasa MAP-ERK se previene la fibrosis peritoneal y se puede llegar a revertir.

El estudio se llevó a cabo con células primarias aisladas de pacientes bajo tratamiento con diálisis peritoneal. Se vio en ratones que existen fármacos tóxicos que inhiben y bloquean esa vía de señalización evitando de esta manera que se dé la fibrosis. Esos fármacos son más útiles para pacientes con insuficiencia renal crónica, son, como se ha dicho antes, inhibidores de las vías de las MAP quinasas.

## 2.2. Extravasación tisular y formación de la metástasis

Las células cancerosas están dotadas de una gran plasticidad que les permite pasar a través de las redes capilares; es una expresión más de la transición epitelial-mesenquimal (Prindull, 2005). Los factores mecánicos tienen poca importancia en la localización de las metástasis. Parece más importante que algunas células se adhieran al endotelio capilar y se extravasan. La extravasación puede tener tres consecuencias:

I) Originar una metástasis que se hará clínicamente relevante meses o años más tarde.

II) Originar una micrometástasis o un grupo de células solitarias que permanecen durmientes durante años o décadas.

III) Eliminar la célula extravasada que no se adapta al estroma.

La extravasación celular no es un fenómeno aleatorio; existe un evidente tropismo celular por determinadas redes capilares. Esta afirmación se apoya en una numerosa serie de experimentos que tienen el siguiente esquema:

A) Se inocula en un animal inmunodeprimido las células tumorales.

B) Se obtienen las células de un determinado tipo de metástasis (por ejemplo, pulmonares)

C) Inoculación de estas células en un nuevo grupo de animales.

En los primeros experimentos aparecen metástasis en distintas localizaciones; en los segundos, solo las del tipo seleccionado (en el ejemplo, solo metástasis pulmonares); la eficiencia aumenta al repetir, varias veces, el mismo

experimento. En conjunto, estos experimentos sugieren que existen células con afinidad para metastatizar en órganos predeterminados; y que estas células retienen la especificidad tisular.

Las células que sobreviven en el estroma recuperan la morfología y las propiedades específicas de la célula epitelial (transición mesenquimal – epitelial) y mantienen una cierta actividad metabólica. Para que se manifieste una metástasis se necesita la concurrencia de dos factores:

- 1) Una proliferación activa de las células extravasadas que puede ser espontánea o como respuesta a los factores de crecimiento autocrinos o paracrinos.
- 2) La génesis de nuevos vasos.

### 2.3. Células Mesoteliales

Según Selgas y cols. los cambios fenotípicos de las células mesoteliales durante la diálisis peritoneal pueden estar relacionados con el fallo de la función del peritoneo, mostrando un claro protagonismo de las células mesoteliales en el fracaso de la ultrafiltración en pacientes bajo diálisis peritoneal.

Las células mesoteliales en condiciones “in-vitro” tratadas con altas concentraciones de glucosa, componente fundamental del líquido de diálisis, o citoquinas inducen la expresión de TGF- $\beta$  (Ha, 2001) y disminuye la expresión de la E-cadherina (molécula de adhesión intercelular) (Ito, 2000). Ésta juega un papel fundamental en el desarrollo de la transición epitelio-mesenquimal, ya que si se pierde su expresión o deja de realizar su función las células epiteliales adquieren características invasivas y migratorias, características típicas de las células mesenquimales (Perl, 1998). Se ha visto que al disminuir la E-cadherina se relaciona con un aumento del factor de transcripción Snail, cuya función es reprimir a la E-cadherina e inducir la transdiferenciación (Batlle, 2000). Así, pues, el factor Snail es un claro inductor de la transición epitelio-mesenquimal.

En un experimento “in-vivo” con ratas llevado a cabo por Margetts y cols. (Margetts, 2001) se ha puesto de manifiesto la importancia del TGF- $\beta$ . Se transdujo un gen de TGF- $\beta$  al peritoneo de la rata viendo que se producía una peritonitis muy acusada por medio de una neo-angeogénesis.

Se ha visto que altas concentraciones de glucosa induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cultivos de células mesoteliales, lo que provoca una neoangeogénesis en el peritoneo, una hiperpermeabilidad en la membrana peritoneal y por último y más grave una fibrosis peritoneal. ROS está relacionada con el TGF- $\beta$  y potencia la transición epitelio-mesenquimal (Rhyu, 2005). Los productos de degradación de la glucosa (PDG), sinérgicamente con la acción del ROS induce la TEM en el peritoneo (Che, 1997). Por último, se ha demostrado que la Rapamicina, un antibiótico inhibidor de la quinasa serina/treonina que bloquea una proteína que participa en la división de las



células e inhibe el crecimiento y la función de ciertas células T del sistema inmunitario que ayudan al cuerpo a rechazar los tejidos y órganos ajenos, inhibe la TGF- $\beta$ .

### 3. CONCLUSIÓN.

La reducción de la unión célula epitelial con célula epitelial por medio de la represión en la transcripción de las cadherinas en combinación con la adquisición de las propiedades mesenquimales son la clave en la determinación de la transición epitelio-mesenquimal, ésta está asociada a etapas tempranas de estados carcinogénicos, invasión de células cancerígenas y metástasis. A la hora de estudiar la presencia de células cancerígenas el análisis patológico del proceso de TEM es crítico. La lista de moléculas que definen el proceso de TEM está creciendo día a día y será una herramienta clave en su estudio tanto patológico como biológico (De Wever, 2008).

Frente a la hipótesis clásica de lesión inicial, diseminación y metástasis, se ha demostrado que en la génesis de las células iniciales del cáncer se altera la expresión de una serie de genes de la familia Snail que participan en la diseminación celular. Esto indica, que potencialmente la diseminación se puede originar desde el mismo momento en que se produce la lesión o lesiones génicas en la célula inicial, lo que demostraría que la célula tumoral diana puede migrar y estar en condiciones de migrar incluso antes de que haya tumor primario.

Se plantea la hipótesis de que el cáncer sería una enfermedad generalizada desde el inicio, con lo cual no existiría el tumor local. En este sentido, los genes de la familia Snail serían potenciales dianas terapéuticas para prevenir la diseminación del cáncer. Hasta hace muy poco, sólo se habían relacionado con las transiciones epitelio-mesenquimales, sin embargo, ahora se he descrito una nueva función que vincula a la familia Snail directamente con la génesis y diseminación de la célula tumoral.

Se ha demostrado en ratones que cuando se modifica la expresión de los genes Snail se produce metástasis. Esta participación de Snail en la génesis y diseminación del cáncer ha sido confirmada. De ahí que el futuro de esta línea de investigación se centre a partir de ahora en analizar si estos genes pueden servir como marcadores para monitorizar el curso clínico de la enfermedad.

Ahora se quiere ver si en humanos estos genes son válidos para monitorizar el estadio de la enfermedad, en concreto en cáncer de mama, colon y ovario. Si es así, ayudarán a definir nuevos protocolos terapéuticos de actuación. La expresión de las proteínas que median la transición epitelio-mesenquimal promueve una conversión maligna que aparece de forma conjunta con el aumento de la capacidad metastásica. La diseminación de las células tumorales primarias puede ocurrir en cualquier momento del desarrollo del cáncer. Los genes Snail constituirían un elemento clave en este proceso, y se convertirían en el objetivo terapéutico. (Sánchez-García, 2008).

La caracterización del proceso de TEM de las células mesoteliales abre una nueva línea de investigación, que no ha sido explorada en detalle hasta el momento y que consiste en analizar el papel de la transdiferenciación mesenquimal de las células mesoteliales en la implantación y el crecimiento intraperitoneal de tumores metastáticos. Es vital el estudio de esta transdiferenciación por las evidencias existentes sobre la importancia de la interacción mesotelio-tumor para la implantación tumoral, y en parte por la contribución de esta transdiferenciación a la progresión de las micrometástasis desde un estado prevascular hasta un estado vascularizado.

La posibilidad de manipular el fenómeno de la TEM por medio de estabilizantes epiteliales naturales (BMP-7)(Wang, 2003) o induciendo la transición inversa desde fibroblastos (Amari, 2002) abre unas claras expectativas en el campo de la regulación de tejidos.(Selgas, 2004).

#### 4. BIBLIOGRAFÍA.

- R.Selgas, M<sup>a</sup> A.Bajo, A.Aguilera, J.A. Sánchez-Tomero, A. Ciregeda, G. del Peso, V.Álvarez, J.A. Jiménez-Heffernan, C.Díaz y M. López-Cabrera. NEFROLOGÍA. Vol XXIV. Número 1. 2004.
- Huber MA, Kraut N, Beug H. - Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005; 17 (5): 548-58.
- Zalatnai A. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med.* 2006; 6(6):685-93.
- Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: Epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem.* Publicado on line 22-enero- 2007.
- Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* 2006; 172(7): 973-81.
6. Wong AS, Gumbiner BM. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol.* 2003; 161(6): 1191-203.
- Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(2): 551-4.
- Button E, Shapland C, Lawson D.- Actin, its associated proteins and metastasis.- *Cell Motil Cytoskeleton.* 1.995; 30(4): 274-51.
- Steeg PS. Perspectives on classic article: metastasis suppressor genes. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(6):E4.
- Berger JC, Vander Griend DJ, Robinson VL, Hickson JA et al. Metastasis suppressor genes: from gene identification to protein function and regulation. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4(8):805-12.
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet.* 2.003; 33(1):49-54.
- Hynes RO. - Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both? *Cell.* 2.003; 113(7):821-3.
- Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, et al.- Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2.003) 100(10): 5974-9.
- Prindull G. Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells? *Exp Hematol.* 2.005; 33(7):738-46.
- Ha H, Yu MR, Lee HB: High glucose-induced PKC activation mediates TGF- $\beta$ 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 59: 463-470, 2001.
- Ito T, Yorioka N, Yamamoto M, Kataoka K, Yamakido M: Efect of glucose on intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 1969-1979, 2000.
- Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: A causal role for E-cadherina in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature:* 190-193, 1998.
- Battle E, Sancho E, Franci C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García-Herreros A: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherina gene expresión in epithelial tumor cells. *Nat Cell Biol* 2: 84-89, 2000.

Margetts P, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockey TR, Gauldie J: Gene transfer of transforming growth factor-b1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 12: 2029-2039, 2001

Rhyu DY, Yang Y, Ha H, Lee GT, Song JS, Uh ST, Lee HB. Role of reactive oxygen species in TGF- $\beta$ 1-induced MAPK activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 667-75.

Che W, Asahi M Takahashi, Kaneto H, Okado A, Higashiyama S, Tamiguchi N. Selective induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in rat aortic smooth muscle cells. The involvement of reactive oxygen species formation and a possible implication for atherogenesis in diabetes. *J Biol Chem* 1997; 272: 18453-9.

De Weber O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emani S, Reudeilh G, Gespach C, Bracke M, Berx G. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* (2008) 130: 481-494

Sánchez-García, I. The Crossroads of Oncogenesis and Metastasis. *New England Journal of Medicine* (27th October 2008)

Wang S, Cheb Q, Simon TC y cols: Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 63: 2037-2049, 2003

Amari M, Taguchi K, Iwakara M y cols: Inmunohistochemical and ultrastructural study on effect of fibroblast growth factor on transformation of fibroblasts to regenerated mesothelial cells. *Med Electro Microsc* 35: 225-233, 2002.

R.Selgas, M<sup>a</sup> A.Bajo, A.Aguilera, J.A. Sánchez-Tomero, A. Ciregeda, G. del Peso, V.Álvarez, J.A. Jiménez-Heffernan, C.Díaz y M. López-Cabrera. *NEFROLOGÍA*. Vol XXIV. Número 1. 2004.

## CAPÍTULO 8:

### DIFERENCIACIÓN Y TUMORES.

Enrique Hilario, Jaione Lacalle, Daniel Alonso-Alconada y Antonia Alvarez

#### Índice

1.- DIFERENCIACION, MADURACION Y REPARACION TISULAR.....	196
1.1.- Renovación, maduración y adquisición del fenotipo diferenciado de los tejidos. ....	196
2.- REPARACIÓN TISULAR, METAPLASIA, DISPLASIA Y ANAPLASIA. ....	196
2.1.- Reparación .....	196
2.2.- Metaplasia vs transdiferenciación. ....	197
2.3.- Displasia .....	197
2.4.- Diferenciación y Anaplasia. ....	198
3.- TEORÍA DEL CÁNCER COMO UNA DETENCIÓN EN LA MADURACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS STEM.....	199
3.1.- Introducción .....	199
3.2.- Origen celular del cáncer.....	200
3.2.1.- Teoría embrionaria del cáncer .....	200
3.2.2.- Desdiferenciación y cáncer .....	200
3.2.3.- Diferenciación y desarrollo embrionario.....	201
3.2.4.- Detención de la maduración / bloqueo ontogenético.....	202
4.- TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS .....	202
4.1.- Células de carcinoma embrionario .....	202
4.2.- Células de carcinoma embrionario y células madre embrionarias .....	203
4.3.- Células de carcinoma embrionario y diferenciación.....	204
4.4.- Cuerpos embrioides.....	204
5.- OTROS TIPOS DE CARCINOMAS .....	205
5.1.- Células basales epidérmicas.....	205
5.2.- Células basales endo y exocervicales .....	205
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	207

## 1.- DIFERENCIACION, MADURACION Y REPARACION TISULAR

### 1.1.- Renovación, maduración y adquisición del fenotipo diferenciado de los tejidos.

La renovación de las diferentes células del organismo se produce por medio de células stem o de reserva. En función de su capacidad para originar células con diferente potencialidad se habla de totipotentes, multipotentes, pluripotentes y unipotentes.

Las blastómeras del embrión hasta el estadio de 8 células son totipotentes, con capacidad de formar un nuevo individuo a través de la proliferación, diferenciación y organización del tejido diferenciado. Las células multipotentes tienen ya restringido su potencial y tan sólo pueden dar lugar a determinados tipos celulares, como es el caso de las células embrionarias que tan sólo pueden dar lugar a derivados ecto, endo o mesodérmicos. Las células pluripotentes pueden dar lugar a varias estirpes celulares como ocurre en el caso de la sangre, que originan las diferentes series sanguíneas: roja, blanca y trombocitogénica. Las células unipotentes tan sólo originan un tipo celular, como ocurre con las de la epidermis que únicamente dan lugar a queratinocitos.

Esta clasificación nos permite conocer su grado de determinación y diferenciación y por lo tanto su potencialidad. Sin embargo, los límites en algunos casos son poco definidos, siendo difícil establecer la potencialidad de algunos tipos celulares. En este sentido existe un caso un tanto controvertido que es el de las Células Stem Neurales (CSN), que en el cerebro adulto derivan de células stem (Reynolds & Weiss 1992; Gage et al 1995; Gage 2000; Taupin et al 2000). Son células multipotentes relativamente quiescentes mitóticamente (Morshead et al 1994) que se autorenewan y proliferan, pudiendo dar lugar a cualquier tipo celular presente en el sistema nervioso. Pueden sufrir una división simétrica, dando lugar a dos CSN iguales, o una división asimétrica que origina una célula stem y una célula progenitora (un precursor específico de línea con una potencial de desarrollo más restringido) que dará lugar a los principales fenotipos del sistema nervioso (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos). Aunque se las considera una población de progenitores multipotentes homogénea, recientemente Merkle y cols. (Merkle et al 2007) han mostrado que son una población diversa y con un potencial restringido de progenitores, que no son reespecificados por factores ambientales del cerebro.

## 2.- REPARACIÓN TISULAR, METAPLASIA, DISPLASIA Y ANAPLASIA.

### 2.1.- Reparación

Cuando se produce una lesión con pérdida de sustancia se produce una proliferación de las células stem que restaura la zona dañada, quedando la zona igual, o prácticamente igual, a como lo estaba en su estado original. Este aumento origina que haya un mayor número de células presentes en un

determinado tejido y que se conoce con el nombre de hiperplasia. Este proceso se produce a lo largo de toda la vida y garantiza la integridad de los tejidos.

## 2.2.- Metaplasia vs transdiferenciación.

Este proceso se produce cuando existe una causa que de forma reiterada (crónica) "irrita" un determinado tejido y obliga a su sustitución por otro, en principio "más adecuado" para resistir la agresión que se está produciendo. Es el caso que se produce en los fumadores, en los que el epitelio respiratorio de las vías aéreas altas, que es de tipo pseudoestratificado ciliado se transforma en otro de tipo escamoso (plano estratificado). Esta forma de reparación, que aunque sea frecuente de observar en la práctica clínica no deja una situación normal o basal suele venir precedida por la hiperplasia de una o varias capas de células de reserva. Sin embargo, algunas de estas células metaplásicas pueden conservar su capacidad bipotencial y producir, si cesa la agresión, de nuevo un epitelio original.

## 2.3.- Displasia

Etimológicamente displasia significa alteración del desarrollo. Sin embargo, desde el punto de vista morfológico se aplica a células epiteliales o mesenquimales (principalmente a las primeras) que han experimentado alteraciones citológicas atípicas, que afectan al tamaño, forma y organización celular. No se trata de un proceso adaptativo pero, al estar en estrecha relación con la hiperplasia a veces se denomina hiperplasia atípica.

La displasia epitelial se reconoce por la existencia de alteraciones de la forma y tamaño de las células, así como de las características tintoriales, así como por una pérdida de la orientación normal (polaridad) de las células. Normalmente existe un aumento en la actividad proliferativa y aunque hay un incremento del número de mitosis estas no suelen ser anormales (como sucede en el cáncer). Se da con más frecuencia en los epitelios de revestimiento, principalmente en los escamosos, como es el caso del cervix uterino, y en el aparato respiratorio.

La displasia epitelial implica:

- pérdida de la orientación normal de las células.
- alteraciones de la forma y tamaño celular.
- alteraciones de las características tintoriales.
- aumento en la actividad proliferativa (las mitosis no suelen ser anormales).
- se da con más frecuencia en los epitelios de revestimiento, principalmente en los escamosos.

Los cambios displásicos pueden ser reversibles y, al cesar la causa inductora, el epitelio puede volver a la normalidad.

Aunque la displasia epitelial precede casi en muchos casos a la aparición de cáncer, los cambios displásicos pueden ser reversibles y, al cesar la causa inductora, el epitelio puede volver a la normalidad.

## 2.4.- Diferenciación y Anaplasia.

El proceso por el cual una célula va adquiriendo los rasgos morfofuncionales que caracterizan su estado maduro se denomina diferenciación. En este sentido, cuando las células de un tumor presentan un alto grado de semejanza morfológica y/o funcional con el tejido normal del que procede, y su organización intenta remedar una estructura normal, se dice que está bien diferenciado. En cambio, cuanto menor semejanza mantengan se dice que están moderadamente o poco diferenciados. En general, los tumores benignos están bien diferenciados y los malignos, por el contrario, varían desde bien diferenciadas a indiferenciadas.

La ausencia de diferenciación se denomina anaplasia y es considerada como rasgo de la transformación maligna. Así, mientras que displasia se considera una transformación peligrosa pero potencialmente reversible, anaplasia ya implica malignidad. Anaplasia, etimológicamente significa pérdida de la forma y la adopción de un aspecto semejante a las células embrionarias poco diferenciadas y por lo tanto implica la pérdida de un fenotipo diferenciado. Sin embargo, este hecho no significa necesariamente el hecho de que las células pasen desde un alto nivel de diferenciación a otro más bajo, ya que los tumores pueden originarse en células de reserva o progenitoras, que tienen rasgos indiferenciados y que están presentes en prácticamente todos los tejidos especializados. Esto nos lleva a una cuestión clave: la ausencia de diferenciación no es necesariamente una consecuencia de la dediferenciación.

La ausencia de diferenciación, o anaplasia, se caracteriza por ciertos cambios morfológicos y funcionales.

Cambios morfológicos:

### A) a microscopía óptica:

- las células y sus núcleos muestran pleomorfismo (variaciones en el tamaño y la forma) tanto de los citoplasmas como de sus núcleos.
- hipercromatismo.
- aumento de la relación núcleo/citoplasma.
- alteraciones en la cromatina.
- aparición de varios o grandes nucléolos.
- incremento en el índice mitótico, con presencia de mitosis atípicas.

### B) a microscopía electrónica:



- las células neoplásicas bien diferenciadas, ya procedan de tumores malignos o benignos, muestran pocas variaciones respecto a las normales.
- al perder la diferenciación, las células cancerosas presentan:
  - +acentuación progresiva de la cromatina en grumos.
  - +simplificación del retículo endoplásmico rugoso.
  - +aumento de ribosomas libres.
  - +mayor pleomorfismo de las mitocondrias.
  - +algunas organelas pueden disminuir de tamaño o número o distribuirse de forma anómala.

Cambios funcionales:

- a mayor diferenciación existe mayor conservación de las capacidades funcionales propias de sus contrapartidas normales.
- a medida que se desciende en la escala de diferenciación, se pierden enzimas y vías metabólicas especializadas y las células sufren una simplificación funcional.

Esto significa que las células indiferenciadas muy anaplásicas, con independencia de su origen, acaban pareciéndose más entre sí que a las células de las que proceden; fenómeno que se denomina convergencia bioquímica.

No obstante, en ocasiones presentan funciones no esperadas. Así, los cánceres de origen no endocrino pueden sintetizar hormonas llamadas ectópicas (como sucede con los carcinomas broncogénicos) y algunos cánceres elaboran proteínas fetales.

En este proceso de transformación tumoral, o bien se produce una re-expresión de genes reprimidos o bien se forman nuevas secuencias de DNA. A pesar de las excepciones, cuanto más rápidamente crece un tumor y más anaplásico es, menor probabilidad tiene de desarrollar una actividad funcional especializada.

A pesar de la irreversibilidad de la transformación de las células neoplásicas se ha demostrado tanto in vivo como in vitro que las células de algunos tumores pueden diferenciarse. Así, las células del carcinoma embrionario pueden madurar a células benignas o las células del neuroblastoma pueden transformarse en neuronas maduras. Esto conllevaría el que las células de una neoplasia pueden diferenciarse o desdiferenciarse.

### 3.- TEORÍA DEL CÁNCER COMO UNA DETENCIÓN EN LA MADURACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS STEM

#### 3.1.- Introducción

Hay dos grandes teorías, no excluyentes sino mas bien complementarias, sobre el posible origen celular del cáncer (Shell & Pierce, 1994):

- a partir de la desdiferenciación (o indiferenciación) de las células maduras que han retenido la capacidad de dividirse.
- a partir de la detención en la maduración de células inmaduras.

La desdiferenciación es considerado como el mecanismo celular más importante en el desarrollo de carcinomas. Sin embargo, el papel de la detención en la maduración de las células stem en la carcinogénesis también representa un mecanismo a tener en cuenta. Fue sugerido por Pierce y cols. (Pierce & Johnson, 1971; Pierce y cols, 1978), quienes basándose en el estudio de teratocarcinomas llegaron a la conclusión de "el problema" radicaba en un fallo de las células para diferenciarse y morir. Este postulado se ha ampliado a otros tipos de tumores como las ha sido demostrado no solamente en teratocarcinomas sino en tumores hematopoyéticos tales como leucemias y linfomas.

## 3.2.- Origen celular del cáncer

### 3.2.1.- Teoría embrionaria del cáncer

Es conocido (Gilbert, 2000) que a lo largo del desarrollo embrionario las células stem comienzan a localizarse en los distintos órganos en desarrollo donde, en condiciones normales, esas células stem comenzarán a proliferar y diferenciarse. Por lo tanto, las células stem normales que asientan durante el desarrollo, están presentes en órganos adultos como células stem determinadas tisulares, y son poco diferentes, si lo son, de sus contrapartidas embrionarias. El fallo en la migración de las células germinales primordiales (desde la vecindad del alantoides hasta los órganos sexuales) da lugar a que puedan quedar alojadas en territorios "extraños". Estas células pueden degenerar y morir o quedar latentes a lo largo de toda la vida adulta.

La teoría embrionaria del origen del cáncer plantea que, bajo el influjo de determinadas circunstancias, estas células que han quedado aisladas podrían manifestar su capacidad embrionaria y empezar a proliferar sin control originando un tumor. Este tumor es de características embrionarias y sus células malignas no serían otras que las propias células stem normales, de tal manera que las células "malignas" stem son el equivalente neoplásico de las células stem normales (Sell & Pierce, 1994).

### 3.2.2.- Desdiferenciación y cáncer

Como ya hemos comentado la desdiferenciación es lo opuesto de la diferenciación y supone una pérdida de un fenotipo diferenciado y la adquisición de un potencial para diferenciarse en uno nuevo.

En la década de los setenta Okada (1976) y Eguchi (1979) demostraron como después de la retinectomía las células del epitelio pigmentado de la retina comienzan a depigmentarse y a proliferar para finalmente formar un epitelio

germinativo desde el cual se regenera una retina neural (con una capa de células neuronales) y células fotorreceptoras. Este proceso regenerativo implica una pérdida de fenotipo y una ganancia de potencial, que son los dos requisitos esenciales de la desdiferenciación. Los procesos de transdeterminación (cambio en la ruta de diferenciación que una célula y su descendencia van a tomar) y de transdiferenciación (reprogramación de células que ya han expresado una diferenciación) son mecanismos no tumorales que se pueden ver durante procesos celulares embrionarios y adaptativos.

La aparición de células indiferenciadas en un tumor se interpreta como una pérdida de la diferenciación y por lo tanto como el resultado de una desdiferenciación. Hace ya más de una década Sell y Pierce (1994) se preguntaron si podría extrapolarse a otros carcinomas la idea de que una célula stem es la célula diana en la carcinogénesis. En vista de los trabajos de Eguchi (1976) y de Okada (1976) podríamos pensar en la existencia de células que, por cualquier circunstancia (virus, agentes físicos, agentes químicos, etc.) se han transdiferenciado y que han sido objeto de dianización en el proceso de carcinogénesis.

El cultivo y clonado de un adenocarcinoma de colon de rata da lugar a líneas tumorales que contienen las células indiferenciadas, además de todos los tipos celulares diferenciados del mismo (Cox & Pierce, 1982). Esas células indiferenciadas neoplásicas no son menos diferenciadas que las células stem tisulares presentes en las criptas del colon. Su sobreproducción en el tumor, como resultado del bloqueo en la diferenciación, imprime el aspecto indiferenciado al tumor (Sell & Pierce, 1994).

### 3.2.3.- Diferenciación y desarrollo embrionario

Como ya hemos comentado las blastómeras hasta el estadio de 8 células son células totipotentes. Su diferenciación consiste en la sucesiva producción de generaciones de células stem, cada una de las cuales tiene una mayor restricción de su potencial para la diferenciación, hablando entonces de células stem determinadas.

La diferenciación es por lo tanto un proceso secuencial: así el cigoto totipotencial da lugar a tres poblaciones de células stem: ectodermo, endodermo y mesodermo, las cuales no tienen potencial para dar lugar a derivados de las otras hojas embrionarias (las células endodérmica no pueden dar lugar a derivados ectodérmicos o mesodérmicos, por ejemplo). Posteriormente sus correspondientes derivados van restringiendo su potencial a medida que aumentan su nivel de diferenciación, llegando por ejemplo a las células stem de la piel que sólo pueden dar lugar a queratinocitos. Este proceso se piensa que asienta en una regulación del genoma celular.

### 3.2.4.- Detención de la maduración / bloqueo ontogenético

Durante el desarrollo embrionario, las células stem totipotentes se diferencian para producir las células stem tisulares determinadas, las cuales dan lugar a los diferentes tipos celulares y tejidos maduros diferenciados.

Durante la carcinogénesis hay un bloqueo en el proceso de maduración que permite que las células stem neoplásicas se acumulen (detención en la maduración) (Sell & Pierce, 1994). Esto da lugar a un incremento en el número de células con un fenotipo restringido dividiéndose, que es característico del cáncer. Este proceso no es reversible. El tumor crece de tamaño porque hay más células que permanecen en división y muy pocas terminalmente diferenciadas, en comparación con la renovación tisular normal. El tumor retiene el potencial fenotípico básico de la línea celular de la cual deriva, pero expresa este potencial en diferentes grados que el tejido normal (Sell & Pierce, 1994). Así, los tumores bien diferenciados provendrán de células caí totalmente diferenciadas mientras que los indiferenciados provendrán de células stem menos diferenciadas y por lo tanto con un mayor potencial.

## 4.- TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS

Un teratoma es un tumor constituido por distintos tipos de células y tejidos en diversos estados de diferenciación. Así, un teratoma puede incluir, por ejemplo, células nerviosas, musculares, sanguíneas, cutáneas, glandulares y de otros tipos especializados. Las células pueden estar agregadas en verdaderas fibras musculares, tejidos glandulares o cerebrales, cartílago o hueso y englobados en la masa puede haber cabellos y dientes. Si las células están bien diferenciadas se denomina teratoma maduro. Si existen células que no están completamente diferenciadas ni dispuestas de forma organoide se denominan teratomas inmaduros, que pueden ser considerados tumores intermedios entre el teratoma maduro y el carcinoma embrionario. Existe una tercera variedad que son los teratomas con transformación maligna, la cual muestra claros signos en los tejidos derivados de una o más hojas embrionarias.

El teratocarcinoma, término acuñado por Friedman y Moore en 1946, es un tumor mixto que se caracteriza histológicamente por presentar células de carcinoma embrionario y una amplia variedad de tejidos de las tres hojas embrionarias, en varios grados de diferenciación. Las células de carcinoma embrionario, (denominadas así por su similitud morfológica con las células de carcinoma embrionario de los testículos humanos) son las responsables de la malignidad del teratocarcinoma.

### 4.1.- Células de carcinoma embrionario

Las células de carcinoma embrionario son las células stem de estos tumores y derivan espontáneamente de las células germinales primordiales (Stevens, 1967) y experimentalmente a partir de las células de la masa celular interna del blastocisto (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981), estableciéndose la masa

celular interna como la contrapartida del carcinoma embrionario. En condiciones normales la célula de la masa celular interna (el precursor multipotente del carcinoma embrionario) origina los tejidos de las tres hojas embrionarias, de una manera compatible con la embriogénesis, mientras que el carcinoma embrionario, al cual da lugar, tiene el potencial de hacer las tres hojas germinales como una caricatura del proceso normal (Sell & Pierce, 1994).

Gracias a los estudios realizados en 1964 por Keinsmith y Pierce se demostró que las células de carcinoma embrionario constituyen las células stem de estos tumores. A pesar de las diferencias existentes entre las células de carcinoma embrionario humanas y murinas existen numerosas semejanzas en cuanto a factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de la matriz extracelular y reguladores transcripcionales (Pera y cols, 1990; Damjanov, 1990). Existen dos factores que inhiben la determinación y diferenciación de las células de carcinoma embrionario: uno es producido por ellas mismas y el otro es un producto liberado por los tipos celulares diferenciados (Delli-Bovi y cols, 1988; Smith y cols, 1988).

#### 4.2.- Células de carcinoma embrionario y células madre embrionarias

Las células de carcinoma embrionario se pueden equiparar a las células madre embrionarias. Esta idea es apoyada por numerosos estudios realizados en teratocarcinomas (Graham, 1977; Hogan, 1977; Solter & Knowles, 1979; Gardner, 1983; Silver y cols, 1983; Rathjen y cols, 1988; Brinster 1993; Grabel y cols, 1998; O'Shea, 1999).

Por un lado, las propiedades morfológicas, bioquímicas e inmunohistoquímicas de las células de carcinoma embrionario son similares a las células de la masa celular interna o a l ectodermo primitivo, células del embrión en el estado de blastocisto. Fundamentalmente, en términos morfológicos, ambas son indistinguibles ya que tienen núcleos grandes, cromatina laxa y uno o más nucléolos y crecen formando colonias compactas. Además, las células de carcinoma embrionario pueden derivarse, *in vivo* e *in vitro*, a partir de las células madre embrionarias. Por otro lado, el modo de diferenciación de las células de carcinoma embrionario, tanto *in vitro* como *in vivo*, es muy similar al de las células del embrión: las células de carcinoma embrionario pueden dar lugar a una gran variedad de tipos celulares y la primera progenie que se diferencia en muchos casos posee rasgos de diferenciación hacia endodermo. Por último, las células de carcinoma embrionario implantadas en el embrión temprano de ratón pueden formar parte del desarrollo tumoral (Pierce y cols, 1979; Papaioannou, 1979; Rossant & Papaioannou, 1984) y producir todos los tipos diferenciados de células (Smith y cols, 1987).

En cualquier caso, para Andrews (1988a,b) aunque las células de carcinoma embrionario presentes en tumores se parezcan a las células germinales primordiales y a las células madre embrionarias en algunos aspectos, estas no son idénticas ya que incluso la célula de carcinoma embrionario que sea muy

parecida a la célula madre embrionaria no posee el mismo grado de potencial de diferenciación que poseen las células madre embrionarias.

#### 4.3.- Células de carcinoma embrionario y diferenciación

Diversos estudios sobre la diferenciación de las células murinas de carcinoma embrionario *in vitro* se han centrado en la diferenciación de éstas hacia células endodérmicas. En el embrión murino, las primeras células embrionarias diferenciadas se denominan endodermo primitivo, las cuales dan lugar al endodermo visceral y parietal. Las condiciones requeridas para mantener las células de carcinoma embrionario no diferenciadas y, por otro lado, para inducir en ellas la diferenciación varía de una línea de células de carcinoma embrionario a otra. Dependiendo del tipo de experimento, las células endodérmicas diferenciadas a partir de células de carcinoma embrionario se parecen a uno u otro tipo de endodermo (Graham, 1977; Martin y cols, 1977; Gardner 1983). Como la diferenciación endodérmica es característica de las células de carcinoma embrionario, estas células pueden ser utilizadas para imitar este proceso en el desarrollo del embrión. El estudio de esta diferenciación posee gran importancia ya que en este proceso se produce un gran descenso en la tumorigenicidad y grado de proliferación.

#### 4.4.- Cuerpos embrioides

Muchos investigadores han mostrado interés por una estructura que se encontraba en tumores de células germinales y que se parecía morfológicamente a un embrión, pero George Peyron (1939) el primero que describió en detalle esta estructura en tumores de células germinales testiculares humanas y la denominó "cuerpo embriode". Los cuerpos embrioides se encuentran ocasionalmente en los tumores de células germinales del testículo y en tumores de células germinales de zonas extragonadales, pero raramente en tumores germinales ováricos.

Algunos teratocarcinomas pueden crecer en el líquido ascítico formando agregados sólidos (simples) o quísticos de células tumorales, que se denominan cuerpos embrioides porque son morfológicamente similares a las mórulas y a los blastocistos tempranos (Pierce & Dixon, 1959; Stevens, 1960; Martin y cols, 1977). A pesar de esta similitud, la capa externa de los cuerpos embrioides está formada por endodermo y no por trofoectodermo. Los cuerpos embrioides corresponderían a una edad conceptual de un embrión de 5 ó 5,5 días más que a un blastocisto de 3,5 días. En este sentido, los cuerpos embrionarios corresponderían a blastocistos tardíos que ya han expresado su potencial endodérmico (Pierce & Speers 1988; Parchment y cols, 1990).

Mientras que las células de la capa externa de los cuerpos embrioides expresan rasgos de endodermo, las células situadas en su interior son conocidas como células de carcinoma embrionario debido a su gran semejanza con las células de carcinoma embrionario del testículo humano. Estas células de carcinoma embrionario son también las células stem multipotentes de los cuerpos

embrioides y el equivalente neoplásico de las células de la masa celular interna de los blastocistos.

Además de las variedades simple y quística existen numerosas formas intermedias (Parchment y cols, 1990; Unda y cols, 1994), con diferentes capacidades de diferenciación (Stevens, 1960). Los cuerpos embrioides se pueden mantener experimentalmente tanto in vivo mediante su inoculación intraperitoneal, o mediante su cultivo in vitro, expresando sus células una amplia variedad de morfologías y capacidades de diferenciación (Itskovitz-Eldor y cols., 2000; Alvarez y cols, 2004). Esta gran heterogeneidad y potencial de diferenciación sería la consecuencia de la existencia de varias poblaciones stem (Hilario y cols, 2001). Consecuentemente los cuerpos embrioides representan una estructura muy dinámica (Alvarez y cols, 2001) y un modelo muy interesante para el estudio de la diferenciación celular y del control epigenético de la malignidad (Martin GR, 1975; Alvarez y cols, 1999).

## 5.- OTROS TIPOS DE CARCINOMAS

### 5.1.- Células basales epidérmicas

La célula stem determinada de la epidermis es la célula sobre la que se desarrollan los carcinomas epidermoides. Esas células son unipotenciales, de tal forma que sólo tienen capacidad para dar lugar a los queratinocitos (son las células epidérmicas por excelencia) y tras su división podemos decir simplificando que una célula hija se diferenciará y la otra permanecerá como célula stem de reserva.

La exposición a agentes carcinogénicos suele provocar en ellas un proceso que se suele dividir en dos etapas: la iniciación: por la cual la célula queda alterada en su ADN y la promoción, que consiste en la proliferación de estas células ya dañadas que dan lugar a diversas mutaciones. Así, se admite que la mutación inicial no es suficiente para dar lugar a un fenotipo maligno, sino que tiene que existir un "microambiente" o circunstancias determinadas para que estas células terminen dando lugar a un tumor. Además, hay que tener en cuenta que la proliferación de esas células dañadas dará lugar a células normales y otras anormales, y que en cualquier caso, solamente el grado de diferenciación de la célula dañada del tejido diana determinará el grado de diferenciación del tumor, no pudiendo nunca ser más indiferenciado que las propias células stem del epitelio.

### 5.2.- Células basales endo y exocervicales

Las células de reserva del epitelio endocervical, además de presentar rasgos citológicos propios de las células stem (pequeñas, con poco citoplasma y sin signos de diferenciación), tienen un citoesqueleto diferente del de las células cilíndricas mucosas, que representan su progenie diferenciada. Ambos tipos celulares (Dallenbach-Hellweg & Poulsen, 1991) dan positiva la reacción para citoqueratinas de amplio espectro. En este sentido, las células cilíndricas

mucosas del endocérnix se tiñen con los anticuerpos anticitoqueratina propios de las células epiteliales de tipo glandular (tipo 1, 7, 8, 18 y 19) y no lo hacen con los anticuerpos para las citoqueratinas escamosas (anti KA1). Sin embargo, las células de reserva no se tiñen positivamente para las citoqueratinas glandulares y sí lo hacen para las citoqueratinas escamosas (anti KA1).

Como es de esperar, las distintas capas celulares del exocervix son positivas para citoqueratinas propias de las células de los epitelios escamosos (citoqueratinas 4, 10, 13 y 14). Sin embargo, sus células basales muestran citoqueratinas de tipo epitelial glandular (citoqueratinas PKK 1, 18 y 19) y no expresan las citoqueratinas 4 y 13.

La influencia de las hormonas sexuales hace que en la pubertad el epitelio mucoso endocervical se asome hacia la vagina, formando lo que se denomina un ectropion. La acidez existente en la vagina origina un cambio en la diferenciación (transdiferenciación) de las células de reserva del epitelio endocervical de esta zona, transformándose en escamoso. Esto implica la existencia de lo que se denomina zona de transformación, que se localiza entre el restante epitelio mucoso endocervical y el primitivo epitelio escamoso exocervical. En los estadios precoces, este epitelio regenerativo está constituido por células epiteliales diferenciadas y pobres en glucógeno pero posteriormente, cuando madura normalmente y de forma completa, resulta imposible distinguir el epitelio escamoso regenerativo del epitelio exocervical primitivo adyacente. La transdiferenciación viene precedida por la hiperplasia de una o varias capas de células de reserva que, de acuerdo con su dotación de citoqueratinas, sufren un cambio y se diferencian a epitelio escamoso.

La gran importancia médica de esta zona de transformación radica en su sensibilidad a infectarse por determinados tipos de virus (como el virus del papiloma humano: cepas 16 y 18, sobre todo). Representa una infección de transmisión sexual que constituye un factor etiológico muy importante en el carcinoma del cuello uterino (casi todos los cánceres se asocian con la presencia de estas cepas, aunque sólo una pequeña proporción de mujeres infectadas por ellas desarrollan cáncer).

La diferente composición en citoqueratinas de las células de reserva y sus capacidades bipotenciales para diferenciarse pueden explicar porqué y cómo ambos epitelios en la unión escamosa-columnar responden a las influencias regeneradoras y reparativas iniciadas por la eversión del endocérnix, y la especial sensibilidad de la zona de transformación (el 95% de los cánceres se originan en la zona de transformación).



## 6.- BIBLIOGRAFÍA

Alvarez A, Gomez-Urquijo S, Ramos A, Hilario E. Cells from the inner mass of blastocyst as a source of neural derivatives for differentiation studies. *Histol Histopathol.* 2004; 19: 371-379.

Alvarez A, Lacalle J, Garcia-Sanz M, Simon J, Aréchaga J, Hilario E. Epigenetic modulation of differentiation in CE44 teratocarcinoma. *Histol Histopathol.* 1999; 14: 1-9.

Alvarez A, Lopez-Mora I, Alvarez FJ, Barrionuevo J, Hilario E. Dynamic differentiation in organotypic cultures. *Biol. Cell.* 2001; 93: 399-400.

Andrews PW. Human teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta* 1988a; 948: 17-36.

Andrews PW. Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC lines. *APMIS* 1988b; 106: 158-168.

Brinster RL. Stem cell and transgenic mice in the study of development. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 89-99.

Cox WF, Pierce GB. The endodermal origin of the endocrine cells of an adenocarcinoma of the colon of the rat. *Cancer.* 1982; 50: 1530-1538.

Dallenbach-Hellweg G, Poulsen H. Atlas de histopatología del cuello uterino. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona. 1991. pp: 4-25.

Damjanov I. Teratocarcinoma stem cells. *Cancer Surv.* 1990; 9: 303-319.

Delli-Bovi P, Curatola AM, Newman KM, Sato Y, Moscatelli D, Hewick RM, Rifkin DB, Basilico C. Processing, secretion, and biological properties of a novel growth factor of the fibroblast growth factor family with oncogenic potential. *Mol Cell Biol.* 1988; 8: 2933-2941.

Eguchi G. "Transdifferentiation" in pigmented epithelial cells of vertebrate eyes in vitro. In: *Mechanisms of cell change* (Eds. JD Ebert, TS Okada). Wiley and Sons. New York. 1979. pp: 273-291.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.

Friedman NB, Moore RA. Tumors of the testis: a report of 922 cases. *Milit Surg* 1946; 99: 573-593.

Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11879-11883.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287: 1433-1438.

Gardner RL. Embryonic and germ cells tumours in man and animals. *Cancer Surv* 1983; 2: 207-220.

Gilbert S. *Developmental Biology*. 6<sup>a</sup> edition. Sinauer. Sunderland (MA) USA. 2000.

Grabel L, Becker S, Lock L, Maye P, Zanders T. Using EC and ES cell culture to study early development: recent observations on *Indian hedgehog* and *Bmps*. *Int J Dev Biol.* 1998; 42: 917-925.

Graham CG. Teratocarcinoma and embryogenesis. In: *Concepts in mammalian embryogenesis* (Ed. MI Sherman). MIT Press. Cambridge, Massachusetts. 1977. pp: 315-394.

Hilario E, Alvarez A, Simon J, Garcia-Sanz M, Lacalle J, Arechaga J. Presence of four stem cell populations in monolayer cultures derived from teratocarcinoma embryoid bodies. *In Vivo*. 2001; 15: 217-226.

Hogan BLM. Teratocarcinoma cells as a model for mammalian development. *Int J Biochem*. 1977; 15: 333-376.

Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med*. 2000; 6: 88-95.

Keensmith LJ, Pierce GB. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 1964; 24: 1544-1551.

Martin GR. Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell*. 1975; 5: 229-243.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from embryos cultured in a medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-7638.

Martin GR, Wiley LM, Damjanov I. The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. *Dev Biol*. 1977; 61: 230-244.

Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 2007; 317: 381-384

Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 1994; 13: 1071-82.

Okada TS. "Transdifferentiation" of cells of specialized eye tissues in cell culture. In: *Test of teratogenicity in vitro*. (Eds. JD Ebert, L Marois). North Holland. Amsterdam 1976. pp: 91-105. 1976

O'Shea KS. Embryonic stem cell models of development. *Anat Rec*. 1999; 257: 32-41.

Papaiouannou VE. Interactions between mouse embryos and teratocarcinomas. *INSERM Symp*. 1979; 10: 141-155.

Parchment RE, Gramzinski RA, Pierce GB. Neoplastic embryoid bodies of embryonal carcinoma C44 as a source of blastocoele-like fluid. *Differentiation*. 1990; 43: 51-58..

Pera MF, Roach S, Elliss CJ. Comparative biology of mouse and human embryonal carcinoma. *Cancer Surv*. 1990; 9: 243-262.

Peyron A. Faits nouveaux relatifs a l'origine et a l'histogenese des embryomes. *Bull Cancer* 1939; 28: 658-681.

Pierce GB, Dixon FJ. Testicular teratomas. I. The demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential cells. *Cancer*. 1959; 12: 573-583.

Pierce GB, Johnson LD. Differentiation and cancer. *In Vitro*. 1971; 7: 140-145.

Pierce GB, Lewis SH, Miller GJ, Moritz E, Miller P. Tumorigenicity of embryonal carcinoma as an assay to study control of malignancy by the murine blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 6649-6651.

Pierce GB, Shikes R, Fink LM. *Cancer: a problem of developmental biology*. Engelwood Cliffs. New Jersey. Prentice Hall Inc 1978. pp: 1-242.

Pierce GB, Speers WC. Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer Res.* 1988; 48: 1996-2004.

Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM, Bettess MD, Rathjen J. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod Fertil Dev.* 1988; 10: 31-47.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-1710.

Rossant J, Papaioannou VE. The relationship between embryonic, embryonal carcinoma and embryo-derived stem cells. *Cell Differentiation.* 1984; 15: 155-161.

Sell S, Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab. Invest.* 1994; 70: 6-22.

Silver LM, Martin GR, Stricklands S (ed). *Teratocarcinoma stem cells.* Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Cold Spring Harbor. New York. 1983.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature.* 1988; 336: 688-690.

Smith SC, Reuhl KR, Craig J, McBurney MW. The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. *J Cell Physiol.* 1987; 131: 74-84.

Solter D, Knowles BB. Developmental stage-specific antigens during mouse embryogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 1979; 13: 139-165.

Stevens LC. Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse. *Dev Biol.* 1960; 2: 285-297.

Stevens LC. Origin of testicular teratomas from primordial germ cell in mice. *J Natl Cancer Inst* 1967; 38: 549-552.

Taupin P, Ray J, Fischer WH, Suhr ST, Hakansson K, Grubb A, Gage FH. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/ paracrine cofactor. *Neuron* 2000; 28: 385-397.

Unda F, Garcia-Sanz M, Atencia R, Hilario E, Arechaga J. Co-expression of laminin and a 67 Kdaa laminin-binding protein in teratocarcinoma embryoid bodies. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 121-126.

## CAPÍTULO 9:

# NEOPLASIAS DE CÉLULAS GERMINALES: TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS.

Jaione Lacalle, Enrique Hilario, y Antonia Alvarez.

## Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	211
2. HISTOGÉNESIS Y CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES GERMINALES .....	211
2.1. Tumores testiculares.....	211
2.2. Tumores ováricos .....	212
3. RASGOS HISTOLÓGICOS BÁSICOS DE LOS TUMORES GERMINALES .....	213
4. TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS .....	214
4.1. Teratomas y teratocarcinomas en la investigación.....	215
4.1.1. Teratomas y teratocarcinomas espontáneos .....	215
4.1.2. Teratomas y teratocarcinomas inducidos experimentalmente.....	217
4.2. Líneas celulares derivadas de teratocarcinomas .....	218
4.3. Determinantes de la teratocarcinogénesis .....	220
4.3.1. Determinantes genéticos.....	220
4.3.2. Determinantes epigenéticos .....	221
5.- BIBLIOGRAFÍA .....	223

## 1.- INTRODUCCIÓN

El término neoplasia de célula germinal o tumor germinal se utiliza para definir un grupo heterogéneo de tumores cuyo origen se asienta en las células germinales. Debido a que estas células residen en las gónadas femeninas (ovarios) y masculinas (testículos), es aquí donde preferentemente se localizan este tipo de tumores. Sin embargo, tumores morfológicamente idénticos a estos pueden originarse en localizaciones extragonadales como pueden ser el mediastino anterior o el retroperitoneo (Damjanov y Solter, 1974; Damjanov, 2005).

## 2. HISTOGÉNESIS Y CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES GERMINALES

La diferente localización de los tumores germinales plantea algunas dudas acerca del origen de estas neoplasias, por ello, la clasificación de estos tumores sigue siendo objeto de controversia.

La clasificación histológica de los tumores germinales se realiza en función de su localización. Así, estos tumores se clasifican en tumores testiculares y tumores ováricos.

### 2.1. Tumores testiculares

Los tumores testiculares de células germinales representan aproximadamente el 1% de todos los tumores masculinos. Sin embargo, en hombres de 15-35 años de edad, son los tumores malignos más comunes (Ulbright TM, 2008).

Las clasificaciones de los tumores testiculares son muy numerosas y, desgraciadamente, muy distintas. Las principales causas de esta diversidad son los conceptos discordantes sobre la histogénesis de estas lesiones y la gran variedad de morfologías de los distintos tipos de neoplasias.

Actualmente la clasificación más ampliamente aceptada es la propuesta por la OMS de Mostofi y Sobin (1977). Tras 20 años después de esta primera edición de "Histological typing of testis tumours" (Mostofi y Sobin, 1977) (Tabla 1), Mostofi y Sesterhenn (1998) presentaron la última versión de la clasificación de los tumores testiculares según la OMS. Esta clasificación se basa en la idea de que las células germinales malignas intratubulares del testículo constituyen la lesión precursora de los tumores celulares germinales.

**Tabla 1.** Clasificación histológica de la OMS de los tumores germinales testiculares, 1977.

1. Tumores de un solo tipo histológico:
  - Seminoma
  - Seminoma espermatocítico
  - Carcinoma embrionario
  - Tumor del saco vitelino (carcinoma embrionario, de tipo infantil)
  - Poliembrioma
  - Coriocarcinoma
  - Teratomas:
    - Maduro
    - Inmaduro
    - Con transformación maligna
  
2. Tumores de más de un tipo histológico:
  - Carcinoma embrionario con teratoma (teratocarcinoma)
  - Coriocarcinoma con cualquiera de los otros tipos
  - Otras combinaciones

Actualmente no se conoce la relación exacta que existe entre las distintas variedades histológicas de los tumores de células germinales. Probablemente las células germinales neoplásicas pueden diferenciarse siguiendo la línea gonadal y dar lugar al seminoma, o transformarse en una población celular pluripotente capaz de generar tumores no seminomatosos. Gran parte de estas células pluripotentes pueden permanecer sin diferenciarse y formar el carcinoma embrionario, o diferenciarse siguiendo las líneas extraembrionarias para dar los tumores del saco vitelino o los coriocarcinomas. Los teratomas, por su parte, se deben a la diferenciación de las células de carcinoma embrionario siguiendo las líneas de las tres capas de células germinales (Robbins, 2000). Algunos estudios sugieren que los seminomas no son neoplasias que hayan alcanzado su estadio final, sino que al igual que los carcinomas embrionarios, pueden actuar como precursores de los que se formarían otras variedades de tumores testiculares de células germinales (Damjanov, 1989; Czaja y Ulbright, 1992; Ulbright, 1993).

## 2.2. Tumores ováricos

Los tumores ováricos de células germinales constituyen el 15-20% de todos los tumores ováricos. Estos tumores se pueden producir a cualquier edad. El 60% de los tumores ováricos en la infancia y adolescencia son de células germinales y 1/3 de éstos, malignos. En pacientes adultos el 95% corresponden a teratomas quísticos maduros. Son frecuentes las formas mixtas con presencia de diferentes tipos histológicos.

**Tabla 2.** Clasificación de la OMS de los tumores germinales ováricos, 1999..

1. La clasificación histológica de los tumores ováricos de origen germinal propuesta por la OMS se representa de forma simplificada en la Tabla 2 (Serov y cols., 1973; Gershenson, 1993; Scully y Sobin, 1999).
  - Disgerminoma
  - Tumor del seno endodérmico (tumor del saco vitelino, tumor del saco de yolk)
  - Carcinoma embrionario
  - Poliembrioma
  - Coriocarcinoma
  - Teratoma:
    - Maduro (adulto)
    - Inmaduro
    - Monodérmico o especializado (p. ej. *struma ovarii*, carcinoide)
  - Tumor mixto de células germinales

Los tumores germinales ováricos tienen una notable homología con los tumores germinales del testículo en los varones y se formarían de forma similar a partir de las células germinales.

### 3. RASGOS HISTOLÓGICOS BÁSICOS DE LOS TUMORES GERMINALES

Los *seminomas* testiculares y los *disgerminomas* ováricos son morfológicamente similares y derivan del mismo tipo de célula: la célula germinal (Gordon y cols., 1981). Estos tumores son la variedad más frecuente de tumores germinales (50%) y los que probablemente producen una población celular más homogénea. Casi nunca aparecen en lactantes y su incidencia máxima se sitúa en el cuarto decenio de la vida.

El *seminoma espermatocítico*, a pesar de su nombre, es un tumor distinto del seminoma clásico, tanto clínica como morfológicamente. Es una de las dos variedades de tumores de células germinales que no aparecen como una neoplasia de células germinales intratubulares (la otra son los teratomas de los niños). El seminoma espermatocítico es un tumor poco frecuente que representa un 1-2% de todas las neoplasias testiculares de células germinales. En general, aparece a una edad superior a 55 años y no suele producir metástasis (Plazas y Avila, 2002).

Las células que pueden permanecer en un estado indiferenciado dan lugar al *carcinoma embrionario* (denominado así por la similitud morfológica de sus células con las del carcinoma testicular). La mayoría de los carcinomas embrionarios aparecen entre los 20 y los 30 años de edad y son tumores más agresivos que los seminomas.

Cuando las células empiezan a diferenciarse hacia una multitud de tejidos derivados de las tres hojas embrionarias, el tumor resultante se denomina *teratoma*. Si las células están bien diferenciadas se denomina teratoma maduro. Si existen células que no están completamente diferenciadas ni dispuestas de forma organoide se denominan teratomas inmaduros, que pueden ser considerados tumores intermedios entre el teratoma maduro y el carcinoma embrionario. Si bien estos teratomas inmaduros son claramente malignos, sus elementos tisulares pueden no mostrar características citológicas de malignidad. Existe una tercera variedad que son los teratomas con transformación maligna, la cual muestra claros signos de malignidad en los tejidos derivados de una o más hojas embrionarias. Los teratomas pueden aparecer a cualquier edad, desde la lactancia a la vida adulta. Las formas puras del teratoma son bastante frecuentes en los lactantes y los niños, y ocupan el segundo lugar por orden en frecuencia después de los tumores del saco vitelino. En los adultos raramente aparecen teratomas puros ya que alrededor del 45% de estos tumores se presentan en combinación con otras variedades histológicas.

El *teratocarcinoma* (Friedman y Moore; 1946), es un tumor mixto que se caracteriza histológicamente por presentar células de carcinoma embrionario y una amplia variedad de tejidos de las tres hojas embrionarias, en varios grados de diferenciación. Las células de carcinoma embrionario son las responsables de la malignidad del teratocarcinoma.

El *coriocarcinoma* es una variedad muy maligna de tumor testicular que está formada por células de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. Este tumor normalmente se presenta como parte de un tumor germinal mixto. En pocas ocasiones se observa el coriocarcinoma como una neoplasia pura.

El *tumor del seno endodérmico* (carcinoma embrionario infantil o tumor del saco vitelino o tumor del saco de yolk) es la neoplasia más frecuente en los lactantes y en los niños hasta los 3 años de edad. Se cree que deriva de una población celular multipotente mediante selección y diferenciación hacia estructuras del saco vitelino. En los adultos son raras las formas puras de este tumor; en cambio, es frecuente que aparezcan elementos del saco vitelino combinados con los de carcinoma embrionario.

Una variedad especial lo constituyen aquellos tumores que contienen estructuras organoides que se parecen a embriones tempranos (cuerpos embrioides) de una a dos semanas de gestación, denominados *poliembriomas*.

#### 4. TERATOMAS Y TERATOCARCINOMAS

Los teratomas, según su localización, se pueden dividir en gonadales (si se originan en los ovarios y testículos) y en extragonadales (si se originan fuera de las gónadas).

Como ya se ha comentado anteriormente, un teratoma es un tumor formado por varios tipos de células y tejidos en diversos estados de diferenciación. En un teratoma nos podríamos encontrar con células nerviosas, musculares,



cutáneas... Las células pueden estar agregadas e incluso se puede encontrar estructuras como cabellos y dientes. Por todo ello, a estos tumores se le asignó el término *teratoma*, proveniente de la forma griega *teras* que se utiliza para designar lo “monstruoso”.

Los teratocarcinomas, por otro lado, estarían formados por células de carcinoma embrionario y por la amplia variedad de células que se pueden encontrar en los teratomas.

#### 4.1. Teratomas y teratocarcinomas en la investigación

Tanto los teratomas como los teratocarcinomas han sido objeto de estudio gracias a que estos tumores constituyen un valioso instrumento de investigación tanto para la patología como para la biología del desarrollo.

Entre todos los estudios realizados sobre teratomas y teratocarcinomas, podemos destacar los realizados sobre los teratocarcinomas murinos ya que gracias a ellos se ha obtenido una valiosa información respecto a la heterogeneidad celular tumoral y la capacidad de las células *stem* de estos tumores para diferenciarse en un gran número de tipos celulares. Además, el teratocarcinoma proporciona un modelo para el estudio de la diferenciación, proliferación celular, interacción célula-virus y factores que pudieran influenciar en la diferenciación del fenotipo maligno.

##### 4.1.1. Teratomas y teratocarcinomas espontáneos

Los teratomas y teratocarcinomas raramente se producen en mamíferos, a excepción de los humanos y de ciertas cepas de ratón (Stevens y Little, 1954). Estos tumores se localizan fundamentalmente en el ovario y en los testículos, pero también pueden presentarse en lugares extragonadales (Rosenberg y Lehman, 1988). En humanos, los teratomas espontáneos que se producen en los ovarios suelen ser benignos, mientras que los que se producen en los testículos tienen usualmente un comportamiento maligno. En el ratón, aunque muchos tumores gonadales son benignos, también se producen tumores malignos que pueden mantenerse como tumores transplantables (Stevens, 1958).

Los teratomas espontáneos ocasionalmente se desarrollan en los ratones utilizados en el laboratorio. Slyve y cols. (1919) solo encontraron un teratoma ovárico en 22.000 autopsias de ratones hembra y ninguno testicular en 19.000 autopsias realizadas en ratones macho. Con la excepción de los teratomas testiculares que ocurren en la cepa 129, en el ratón se han visto pocos casos de teratomas espontáneos ováricos (McGowan y cols., 1971), testiculares (Meier y cols., 1970; Stevens, 1967b) y extragonadales (Dunn y Andervont, 1963).

Los teratomas espontáneos murinos contienen diferentes tipos de tejidos adultos y cuando son transplantados, crecen reteniendo su apariencia

pleomórfica. Jackson y Brues (1941) y Fekete y Ferrigno (1952) observaron en teratomas la presencia de células no diferenciadas y de rápida división; elemento necesario que aseguraba la posibilidad de trasplante del tumor. Estos autores propusieron que los distintos tipos de tejidos somáticos encontrados en los teratomas se originaban a partir de estas células indiferenciadas.

Stevens y Little (1954) observaron una frecuencia relativamente alta de aparición de teratomas testiculares espontáneos en la cepa 129 de ratón. La incidencia de los teratomas en la cepa 129 original era de un 1%, pero tras la introducción de varios genes mutantes, particularmente el gen Steel (Sl), se aumentó la incidencia de teratomas espontáneos hasta el 10%. Stevens sugirió que los teratomas se originaban en los testículos a partir de las células germinales primordiales retransplantadas de teratomas testiculares primarios (Stevens, 1967a). Estos tumores fueron, junto con los teratomas que se desarrollaron a partir de las crestas genitales, la principal fuente de numerosos y fructíferos estudios (Stevens, 1964).

En 1973, Stevens desarrolló una nueva sublínea (129/ter-Sv) derivada de la cepa original 129/Sv. Esta sublínea presentaba una gran incidencia de teratomas testiculares espontáneos. Stevens examinó 17453 ratones macho de la cepa 129/ter-Sv y encontró un 32% de teratomas. Los tumores fueron mayoritariamente benignos y raramente se producían metástasis.

Otra cepa de ratón con un alto grado de incidencia de teratomas espontáneos es la cepa LT/Sv descrita por primera vez por Mac Dowell (1950). En esta cepa alrededor del 50% de todas las hembras de 3 meses presentaban teratomas ováricos espontáneos. Algunos de estos tumores eran pequeños y contenían pocos tipos celulares, pero otros eran grandes y poseían un amplio rango de tejidos: tejido nervioso en varios grados de diferenciación, cartílago y hueso con médula ósea, músculo, diferentes tipos de epitelio, incluyendo intestino y piel, células gigantes trofoblásticas, células embrionarias no diferenciadas, etc.

Stevens y Varnum (1974) describieron la presencia de embriones partenogénéticos en diferentes estadios de desarrollo dentro de los folículos ováricos de las hembras LT/Sv. La partenogénesis primero se observó en los ovarios en el 20% de los fetos de ratón de 17 días. El porcentaje de embriones partenogénéticos aumentaba con la edad, 20 días después del nacimiento se observaban embriones partenogénéticos en todos los ovarios de las hembras examinadas. La morfología de tales embriones era normal hasta el estadio de blastocisto. Los teratomas ováricos en la cepa de ratón LT/Sv se desarrollaban fundamentalmente a partir de un crecimiento desorganizado de los embriones partenogénéticos.

En otras especies también se ha publicado la existencia de teratomas y teratocarcinomas espontáneos. Así, se han publicado casos en ratas (Schardein y Fitzgerald, 1977), conejillo de indias (Rogers y Blumenthal, 1960; Mosinger, 1961), caballos (Mason, 1974; Moulton, 1961), perros (Clayton, 1975; Cotchin, 1961; Patnaik y cols., 1976), mono *Macacca mulatta* (Rohovsky y cols., 1977), pájaros (Campbell y Appleby, 1966; Helmboldt y cols., 1974; West, 1975) y en helmintos (Johnson y Viglierhio, 1970).

#### 4.1.2. Teratomas y teratocarcinomas inducidos experimentalmente

La relativa escasez de teratomas testiculares espontáneos conllevaba una gran dificultad a la hora de realizar estudios sobre la histogénesis de estos tumores. Aunque Stevens introdujo nuevos genes en la cepa 129 de ratón y dio lugar al ratón 129/ter-Sv que presenta una incidencia de tumores espontáneos del 32% (Stevens, 1973), pocos de estos tumores fueron malignos. Por lo tanto, los teratomas y teratocarcinomas espontáneos no constituyen un modelo de alto rendimiento para el estudio de estos tumores por lo que los tumores inducidos experimentalmente constituyen la herramienta más valiosa para llevarlos a cabo (Stevens, 1983a, 1983b).

##### - Derivados del trasplante de embriones:

Los teratocarcinomas pueden ser producidos experimentalmente mediante el trasplante de embriones normales en lugares extrauterinos de recipientes singénicos adultos, como es el caso de la cápsula del riñón (Solter y cols., 1970). Stevens (1970a) transplantó embriones en testículos y obtuvo resultados similares. Estos experimentos apoyaron la hipótesis postulada por Pierce (1967) en la que consideraba los teratomas y teratocarcinomas como caricaturas de la embriogénesis normal.

Diwan y Stevens (1976) separaron el cilindro embrionario en sus componentes y mostraron que los teratocarcinomas pueden ser producidos a partir sólo del epiblasto.

Según Damjanov y Solter (1974) las células embrionarias normales indiferenciadas transplantadas en lugares extrauterinos mantienen su naturaleza embrionaria y continúan proliferando debido a que el huésped no posee el control de su crecimiento. Por otro lado, también es posible que el huésped adulto secreta ciertas sustancias que estimulen la proliferación de las células embrionarias o prevenga su diferenciación en tejidos somáticos no proliferativos (Damjanov, 1991).

##### - Derivados del trasplante de crestas genitales:

Stevens llevó a cabo la producción de teratomas mediante el injerto de crestas genitales masculinas de embriones de ratón de 11-13 días en los testículos de un receptor adulto isogénico. Estos estudios se realizaron en cepas de ratón 129 y A/He. Gracias a estos trasplantes observó una incidencia de teratomas mayor que las que se producían en las gónadas no manipuladas (Stevens, 1964, 1966, 1970b). Actualmente, el 75-80% de las crestas genitales transplantadas producen teratomas. Estos tumores se parecen en todos los aspectos a los teratomas espontáneos y son fácilmente retransplantables.

La incidencia de los teratomas obtenidos tras el trasplante de las crestas genitales fue la misma en la cepa 129 que en la A/He, a pesar del hecho de que los teratomas espontáneos ocurren frecuentemente en la cepa 129 y raramente se producen en la cepa A/He (Stevens, 1967a; Meier y cols., 1970).

Por otro lado, también existen cepas de ratón como la C3H, en las cuales no es posible la producción de teratomas mediante el trasplante de las crestas genitales (Stevens, 1970a).

- Químicamente inducidos:

Michalowsky (1929) obtuvo teratomas en gallos mediante la inyección de una solución de cloruro de zinc en la glándula genital masculina. Estos experimentos fueron continuados por Bagg (1936). Se demostró que la inducción química de teratomas mediante sales de metales en el gallo es particularmente efectiva durante el periodo de actividad sexual, tras la estimulación de la función sexual con las hormonas gonadotrópicas. Experimentos similares fueron llevados a cabo en el ratón adulto (Bresler, 1959) y en la rata (Riviere y cols., 1960).

- Derivados de otro teratoma:

Todos los teratocarcinomas son retransplantables lo cual no significa que dicha capacidad sea del 100%. La eficacia del trasplante depende en parte del teratocarcinoma seleccionado ya que sólo la parte del tumor que contenga células de carcinoma embrionario crecerá en el nuevo hospedador.

Para obtener un teratoma, se injerta un fragmento de teratocarcinoma debajo de la piel de un ratón histocompatible y después de un tiempo (unas tres semanas), parte del material del tumor se trasplanta a otro ratón. El proceso se repite de tal forma que algunos teratocarcinomas trasplantables han sido mantenidos de esta manera durante muchos años. La estirpe celular maligna de algunos de ellos permanece pluripotente (capaz de diferenciarse en diversos tipos celulares). En otros casos, el potencial de desarrollo de la estirpe celular queda limitado después de varias generaciones de trasplantes, de modo que las células se diferencian en algunos tejidos como por ejemplo el tejido nervioso, músculo esquelético o endodermo.

Además de animales, también se han producido teratomas experimentales en plantas. Braun (1959) indujo teratomas en células de tabaco. En determinadas condiciones experimentales, el proceso es reversible, por lo tanto, el estado tumoral no parece estar definitivamente determinado en las plantas.

#### 4.2. Líneas celulares derivadas de teratocarcinomas

Dentro de las líneas celulares derivadas de teratocarcinomas las más utilizadas en la actualidad son las líneas celulares derivadas del ratón.

En el ratón, las células *stem* de los teratocarcinomas se pasan fácilmente de un animal a otro y pueden ser cultivados *in vitro* de una forma relativamente fácil. En el apéndice del libro editado por Silver y cols. (1983) podemos encontrar una lista de las líneas celulares derivadas del teratocarcinoma. Algunas de estas líneas están completamente caracterizadas mientras que otras están siendo aún objeto de estudio. En la actualidad las líneas comerciales se

recogen en los bancos de células como por ejemplo la ATCC ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)= American Type Culture Collection).

Una de las líneas celulares más utilizada derivadas del teratocarcinoma es la F9 (Bernstine y cols., 1973). Para algunos autores es una línea típica de carcinoma embrionario mientras que para otros es una línea celular del tipo de endodermo primitivo. Inicialmente se creía que esta línea era multipotente hasta que Sherman y Miller (1978) demostraron que se diferenciaba espontáneamente en células del saco de yolk. Posteriormente se mostró que la diferenciación de las células F9 podía derivar en endodermo parietal o visceral (saco de yolk) dependiendo de las condiciones de cultivo (Hogan y cols., 1983). Otras formas de diferenciación, tales como la formación de células neuronales, no han sido confirmadas (Tienari y cols., 1987). Existen varias sublíneas del F9 con diferentes morfologías y capacidades de diferenciación.

Las líneas celulares de teratocarcinoma son influenciadas por las condiciones de cultivo y tienden a cambiar su fenotipo según las mismas. Incluso cuando se clona varias veces una línea celular ésta tiende a ser pleomórfica. Este pleomorfismo refleja la tendencia de las células *stem* del teratocarcinoma para diferenciarse espontáneamente en otras formas celulares.

Existen diversas líneas de teratocarcinoma que corresponden a distintas poblaciones celulares del embrión de ratón desde el blastocisto al estadio primitivo del desarrollo. Las líneas celulares de carcinoma embrionario como NE (Damjanov, 1990) y NF-1 (Fox y cols., 1983) son verdaderamente células primitivas que no muestran señales de diferenciación citoplasmática y se parecen a las células F9.

Una línea celular que se ha establecido *in vitro* a partir de un teratocarcinoma con crecimiento ascítico es el CE44 (Parchment y cols., 1990; Unda y cols., 1994). Esta línea celular, junto con la línea F9, constituye una de las líneas más interesantes derivadas de la línea de teratocarcinoma OTT6050.

Existe una línea celular que corresponde a endodermo primitivo que se denomina Ter-C (Searls y Edidin, 1982). En contraste con las células de carcinoma embrionario típicas, las células Ter-C no expresan el antígeno embrionario específico SSEA-1 y no poseen actividad de fosfatasa alcalina, ambos marcadores de indiferenciación.

Las líneas celulares de carcinoma del saco de yolk son líneas de carcinoma del saco de yolk parietal, como la línea celular ME, o una mezcla de células del saco de yolk visceral y parietal, como la línea celular LRD (Damjanov, 1990).

Además de las líneas celulares murinas también existen líneas celulares derivadas de células germinales humanas y tumores relacionados. Dentro de estos tumores se encuentran las líneas de carcinoma embrionario humano. En las líneas celulares que derivan de tumores de células germinales humanas son de destacar dos líneas compuestas por células morfológicamente muy parecidas a las células de carcinoma embrionario humanas, éstas líneas son la 2102Ep y la TERA-2. La línea celular 2102Ep posee la capacidad de

diferenciarse de una manera limitada, mientras que la línea TERA-2, es capaz de diferenciarse en mayor número de derivados, incluyendo las neuronas.

### 4.3. Determinantes de la teratocarcinogénesis

No se conocen con exactitud los factores que controlan el origen y desarrollo de los teratomas y teratocarcinomas, a pesar de ello, los posibles factores se pueden resumir en dos grandes grupos:

- 1) genéticos, son lo que están relacionados con la capacidad endógena o con la predisposición de las células a sufrir este tipo de tumor y
- 2) epigenéticos, es decir, relacionados con agentes externos tales como ambientales, anatómicos, inmunológicos...

#### 4.3.1. Determinantes genéticos

En contraste con los embriones de ratón, los cuales dan lugar a teratocarcinomas tras su transplante en lugares extrauterinos, los embriones de rata (Svajger y cols., 1986) o hamster (Damjanov, 1978) de la misma edad de desarrollo, no producen tumores malignos y forman sólo teratomas. Aparentemente, la capacidad para formar teratocarcinomas derivados del embrión es una característica específica limitada a la especie del ratón. Sin embargo, incluso en ratones, no todas las cepas de una familia producen teratocarcinomas en un mismo grado, tal y como se observó inicialmente en el ratón C3H (Solter y cols., 1970). Damjanov y cols. (1983) clasificaron las cepas de ratón en dos grupos: las cepas permisivas de teratocarcinoma derivadas del embrión y las no-permisivas. Las cepas como C3H y BALB/c, las cuales daban lugar a teratocarcinomas derivados de embriones en al menos un 50% de los trasplantes fueron consideradas permisivas y las que formaban teratocarcinomas en menor porcentaje de los trasplantes fueron clasificadas como no-permisivas (Tabla 3). Esto muestra que la constitución genética de ratón utilizado para el transplante es un factor importante en estos tumores (Damjanov, 1993).

**Tabla 3.** Cepas de ratón para teratocarcinomas derivados del embrión (Damjanov, 1993).

Cepas permisivas	C3H BALB/c DAB/2
Cepas no-permisivas	C57BL/6 129 AKR

Como ya se ha mencionado anteriormente, en una serie de estudios sobre la predisposición del ratón 129 para formar teratocarcinomas, Stevens (1967a) observó que al introducir el gen Steel en esta cepa era posible aumentar el número de tumores testiculares, resultado que apoya la importancia de los

factores genéticos en la formación de estos tumores. También hay que tener en cuenta que la formación de teratomas mediante el transplante de crestas genitales fetales en testículos adultos se produce solamente en unas cepas específicas.

Por otro lado, también se han observado diferencias raciales en la incidencia de los tumores testiculares en humanos. Por ejemplo, las personas de raza negra de África tienen una incidencia sumamente baja de estas neoplasias la cual no se modifica con su emigración a Estados Unidos. En este país, las personas de raza blanca poseen una incidencia de estos tumores cuatro veces mayor que la de la raza negra (James y cols., 1988; Nicholson y Harlan, 1995).

#### 4.3.2. Determinantes epigenéticos

Michalowsky (1929) obtuvo en gallos teratomas testiculares inducidos químicamente, pero sólo lo logró cuando éstos eran tratados durante los primeros tres meses de vida. Estos resultados sugirieron una posible influencia de los factores hormonales en la teratocarcinogénesis. Posteriormente Bagg (1936) observó que las hormonas gonadotrópicas aumentaban la incidencia de los tumores. Bresler (1959), unos años más tarde, obtuvo dos teratomas en los testículos del ratón blanco inyectando una mezcla de sustancias tóxicas y testosterona.

Asimismo, la incidencia de los teratomas en humanos aumenta ampliamente en testículos no descendidos; cuanto más alta sea la localización del testículo no descendido (intraabdominal frente a inguinal), mayor es el riesgo de desarrollar el tumor. No están claros los factores relacionados con la criptorquidia que contribuyen a este aumento del riesgo de teratocarcinogénesis. Parece improbable que el ambiente anómalo de unos testículos mal posicionados tenga relación con un mayor riesgo de carcinogénesis, pues también existe una elevada incidencia de tumores en testículos contralaterales situados normalmente. Parece más verosímil que existan algunos factores comunes, posiblemente hormonales, en relación tanto con el tumor testicular como con la criptorquidia (Henderson y cols., 1979; Giwerzman A. y cols., 1989).

La disgenesia testicular, desarrollo anormal de la gónada que suele estar acompañado de alteraciones endocrinas, también parece predisponer al desarrollo de tumores, y aproximadamente en el 25% de los testículos disgenéticos aparecen tumores malignos de células germinales (Damjanov, 1990).

Willis (1953) observó que los teratomas humanos de ovario y testículo ocurrían con mayor frecuencia en el lado derecho que en el izquierdo. Sin embargo, Peterson y cols. (1955) estudiaron 1000 casos de teratomas ováricos y concluyeron que no existe una predilección por un lado determinado. A pesar de ello, aproximadamente el 70% de los teratomas de la cepa 129 de ratón ocurren en el testículo izquierdo, lo cual indica que las influencias medioambientales podrían jugar un papel en el inicio de la teratocarcinogénesis (Stevens y Mackensen, 1961).

Según Hall (1989) los factores de crecimiento y la matriz extracelular pueden determinar el microambiente que influenciaría el desarrollo de las células *stem* y su progenie a través de las moléculas de superficie celular como pueden ser las integrinas y receptores de factores de crecimiento. Estas señales se transmitirían al núcleo y modularían los procesos proliferativos y de diferenciación.

Chen y Kosco (1993) implantaron subcutáneamente células *stem* de teratocarcinoma en distintos lugares de un ratón desnudo y observaron que la diferencia de tamaño en los tumores producidos reflejaba la influencia de los factores medioambientales *in vitro* e *in vivo*, causando así varios grados de crecimiento.

También hay que tener presente que en los teratocarcinomas, al igual que en otros tumores, el sistema inmunológico desempeña un importante papel en su crecimiento y desarrollo (Damjanov y Solter, 1974; Damjanov, 1993).



## 5.- BIBLIOGRAFÍA

- Bagg HL. Experimental production of teratoma testis in the fowl. *Am J Cancer* 1936; 26: 69-84.
- Bernstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, Ephrussi B. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 3899-3903.
- Braun AC. A demonstration of the recovery of the crowngall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1959; 45: 932-938.
- Bresler VM. Experimental teratoids of white mouse testis induced by testosterone and copper sulphate. *Prob of Oncology* 1959; 5: 24-30.
- Campbell JG, Appleby EC. Tumours in young chickens bred for rapid body growth (broiler chickens): A study of 351 cases. *J Pathol* 1966; 92: 77-90.
- Chen U, Kosco M. Differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro: III. Morphological evaluation of tissues developed after implantation of differentiated mouse embryoid bodies. *Dev Dynamics* 1993; 197: 217-226.
- Clayton HM. A canine ovarian teratoma. *Vet Rec* 1975; 96: 567-568.
- Cotchin E. Canine ovarian neoplasms. *Res Vet Sci* 1961; 2 : 133-142.
- Czaja JT, Ulbright TM. Evidence for the transformation of seminoma to yolk sac tumor, with histogenetic considerations. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 468-477.
- Damjanov I. Development of teratomas from embryos transplanted into outbred and inbred adult hamsters. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 911-915.
- Damjanov I. Is seminoma a relative or a precursor of embryonal carcinoma? *Lab Invest* 1989; 60: 1-3.
- Damjanov I. Teratocarcinoma stem cells. *Cancer Surv* 1990; 9: 303-319.
- Damjanov I. Stem cells of teratocarcinomas and related germ cell tumors. *Period Biol* 1991; 93: 575-582.
- Damjanov I. Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 39-46.
- Damjanov I. The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2005; 1: 273-276.
- Damjanov I and Solter D. Experimental teratoma. *Curr Top Pathol* 1974; 59: 69-129.
- Damjanov I, Bagasra O, Solter D. Genetic and epigenetic factors regulate the evolving malignancy of embryo-derived teratomas. En: *Teratocarcinoma stem cells.* (Eds. LM Silver, GR Martin, S Strickland). Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation. Cold Spring Harbor, New York. 1983: 501-517.
- Diwan SB, Stevens LC. Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinder. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 937-942.
- Dunn GR, Andervont HB. Histology of some neoplasm and non-neoplastic lesions found in wild mice maintained under laboratory conditions. *J Natl Cancer Inst* 1963; 31: 873-901.
- Fekete E, Ferrigno MA. Studies on a transplantable teratoma of the mouse. *Cancer Res* 1952; 12: 438-440.

Fox N, Desouza L, Simon D, Damjanov I. Male murine embryonal carcinoma cell line selectively metastatic to the ovaries and adrenals. *Virchows Arch Cell Pathol* 1983; 43: 241-251.

Henderson BE, Benton B, Jing J, Yu MC, Pike MC. Risk factors for cancer of the testis in young men. *Int J Cancer* 1979; 23: 598-602.

Hogan BLM, Barlow DP, Tilly R. F9 teratocarcinoma cells as a model for the differentiation of parietal and visceral endoderm in the mouse embryo. *Cancer Surv* 1983; 2: 115-140.

Jackson EB, Brues AM. Studies on a transplantable embryoma of the mouse. *Cancer Res* 1941; 1: 494-498.

James GT, Webber MM, Wettlaufer JN. Testis tumors: geographic distribution and risk factors. En: *In vitro models for cancer research. Volume V. Carcinoma of the prostate and testis.* (Ed. MM Webber). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1988: 170-190.

Johnson RN, Viglierchio DR. Induction of a nematode teratoma. *Nature* 1970; 227: 190-191.

Mac Dowell EC. "Light" - a new mouse color. *J Hered* 1950; 41: 35-36.

Mason BJ. Temporal teratoma in the horse. *Vet Rec* 1974; 95: 226-228.

McGowan L, Davis RH, Bunnang B. Peritoneal fluid cytology associated with a solid ovarian teratoma in a mouse. *Acta Cytol* 1971; 15: 306-309.

Meier H, Myers DD, Fox RR, Laird CW. Occurrence, pathological features and propagation of gonadal teratomas in inbred mice and in rabbits. *Cancer Res* 1970; 30: 30-34.

Michalowsky I. Das experimentelle zinkteratom. *Virchows Arch Pathol Anat* 1929; 274: 310-325.

Mosinger M. Sur la carcinorésistance du cobaye. 1 ère partie. Les tumeurs spontanées du cobaye. *Bull. Ass. Franc. Cancer* 1961; 48: 217-235.

Mostofi FK, Sesterhenn IA. *Histological typing of testis tumours.* 2nd ed. Springer-Verlag, 1998.

Mostofi FK, Sobin LH. *International histological classification of testicular tumors. International Histologic Classification of Tumors.* No. 16. Geneva, WHO. 1977.

Moulton JE. *Tumors in domestic animals.* Berkeley, CA. University of California Press. 1961: 168-171.

Nicholson PW, Harland SJ. Inheritance and testicular cancer. *Br. J. Cancer* 1995; 71: 421-426.

Parchment RE, Gramzinski RA, Pierce GB. Neoplastic embryoid bodies of embryonal carcinoma C44 as a source of blastocoele-like fluid. *Differentiation* 1990; 43: 51-58.

Patnaik AK, Schaer M, Parks J, Liu SK. Metastasizing ovarian teratocarcinoma in dogs. A report of two cases and review of literature. *J. Small Anim Pract* 1976; 17: 235-246.

Peterson WF, Prevost EC, Edmunds FT, Hundley JM, Morris FK. Benign cystic teratomas of ovary: clinico-statistical study of 1,007 cases with review of literature. *Am J Obstet Gynecol* 1955; 70: 368-382.

Pierce GB. Teratocarcinoma: a model for the developmental concept of cancer. *Curr Top Dev Biol* 1967; 2: 223-246.

- Plazas R, Avila A. Tumores de células germinales. *Rev Colomb Cancer* 2002; 6: 33-46.
- Riviere M, Chouroulinkov J, Guerin M. Production de tumeurs par injections intratesticulaires de chlorure de zinc chez le rat. *Bull Ass Franc Cancer* 1960; 47: 57-87.
- Robbins. Aparato genital masculino. Aparato genital femenino. En: *Patología estructural y funcional*. (Eds. RS Cotran, V Kumar, T Collins). 6ª edición. McGraw-Hill-Interamericana. 2000: 1055-1136.
- Rogers JB, Blumenthal HT. Studies of guinea pig tumors. I. Report of fourteen spontaneous guinea pig tumors, with a review of the literature. *Cancer Res* 1960; 20: 191-197.
- Rohovsky MW, Fox JG, Chalifoux LV. Benign ovarian teratomas in two rhesus monkeys. *Lab Anim Sci* 1977; 27, 280-281.
- Rosenberg MP, Lehman JM. Murine teratocarcinomas. Capítulo 11. En: *In vitro models for Cancer research*. Volumen V. (Ed. MM Webber) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1988: 225-247.
- Schardein JL, Fitzgerald JE. Teratoma in a Wistar rat. *Lab Anim Sci* 1977; 27: 114-120.
- Scully RE, Sobin LH. Histological typing of ovarian tumours. World Health Organization. *International Histological Classification of tumours*. Second Edition. Springer. 1999.
- Searls DB, Edidin M. H-2 expression on a teratocarcinoma derived cell line Ter-C. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 1311-1315.
- Serov SF, Scully RE, Sobin LH. *International Histologic Classification of Tumours: No. 9. Histological Typing of Ovarian Tumours*. Geneva: World Health Organization, 1973.
- Sherman MI, Miller RA. F9 embryonal carcinoma cells can differentiate into endoderm-like cells. *Dev Biol* 1978; 63: 27-34.
- Silver LM, Martin GR, Stricklands S. (eds.) *Teratocarcinoma stem cells*. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Cold Spring Harbor. New York. 1983.
- Slyve M, Holmes HS, Wells HG. Primary spontaneous tumors of the testicle and seminal vesicle in mice and other animals. *J. Cancer Res*. 1919; 4: 207-228.
- Solter D, Skreb N, Damjanov I. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* 1970; 227: 503-504.
- Stevens LC. Studies of transplantable testicular teratomas of strain 129 mice. *J. Natl. Cancer Inst* 1958; 20: 1257-1262.
- Stevens LC. Experimental production of testicular teratomas in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1964; 52: 654-661.
- Stevens LC. Development of resistance to teratocarcinogenesis by primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst* 1966; 37: 859-867.
- Stevens LC. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst* 1967a; 38: 549-552.
- Stevens LC. The biology of teratomas. In: *Advances in morphogenesis*. (Eds. M Abercrombie, J Brachet). Academic Press. New York. 1967b: 1-31.
- Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Dev. Biol*. 1970a: 21, 364-382.

Stevens LC. Experimental production of testicular teratomas in mice of strains 129, A/He and their F1 hybrids. *J Natl Cancer Inst* 1970b; 44: 929-932.

Stevens LC. A new inbred subline of mice (129/ter Sv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *J Natl Cancer Inst* 1973; 50: 235-242.

Stevens LC. The origin and development of testicular, ovarian and embryo-derived teratomas. En: *Cold Spring Harbor Conferences on cell proliferation: teratocarcinoma stem cells.* (Eds. LM Silver, GR Martin, S. Strickland). 1983a: 23-36.

Stevens LC. Testicular, ovarian, and embryo-derived teratomas. *Cancer Surv.* 1983b; 2: 75-91.

Stevens LC, Little CC. Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1954; 40: 1080-1087.

Stevens LC, Mackensen JA. Genetic and environmental influences on teratocarcinogenesis in mice. *J Natl Cancer Inst* 1961; 27: 443-453.

Stevens LC, Varnum DS. The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. *Dev Biol* 1974; 37: 369-380.

Svajger A., Levak-Svajger B. and Skreb N. (1986). Rat embryonic ectoderm as renal isograft. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 94, 1-27.

Tienari J., Virtanen I., Soinila S. and Lehtonen E. (1987). Neuron-like derivatives of cultured F9 embryonal carcinoma cells express characteristics of parietal endoderm cells. *Dev. Biol.* 123, 566-573.

Ulbright T.M. (1993). Germ cell neoplasms of the testis. *Am. J. Surg. Pathol.* 17, 1075-1091.

Ulbright TM. The most common, clinically significant misdiagnoses in testicular tumor pathology, and how to avoid them. *Adv Anat Pathol* 2008; 15: 18-27.

Unda F.J., García-Sanz M., Atencia R., Hilario E. and Aréchaga J. (1994). Co-expression of laminin and a 67 kDa laminin-binding protein in teratocarcinoma embryoid bodies. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 121-126.

West JL. Ectopic feather follicles in a chicken teratoma or malformation. *Poult Sci* 1975; 54: 1442-1445.

Willis RA. *Pathology of tumours.* 2d ed., London, Butterworth and Co., Ltd. 1953: 330-336.

## CAPÍTULO 10:

### DESARROLLO Y TRANSFORMACIÓN TUMORAL DE LOS MELANOCITOS

Idoia Ortega Martínez, Maitane Aurrekoetxea Campo.

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	228
2.- EL MELANOCITO Y SU ORIGEN .....	228
3.- INTERACCIÓN SCF - c-kit DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS .....	230
4.- PROTEÍNAS WINGLESS (WNT) EN EL DESARROLLO DE LOS MELANOCITOS .....	232
4.1.- Familia de las proteínas Wnt .....	232
4.2.- Receptores de Wnt .....	233
4.3.- Ruta de señalización Wnt / $\beta$ -catenina .....	233
4.4.- Proteínas Wnt y la cresta neural.....	235
4.5.- Señalización Wnt en el desarrollo y progresión del melanoma.....	236
5.- MITF .....	237
5.1.- Regulación de MITF .....	238
5.2.- MITF y cáncer .....	239
6.- MELANOGENÉNESIS .....	239
6.1.- Maduración de los melanosomas .....	240
6.2.- Bioquímica de la melanogénesis .....	241
7.- BIBLIOGRAFÍA: .....	243

## 1.- INTRODUCCIÓN

Una de las características que más llama la atención en los seres humanos es la pigmentación. Ésta es debida a la melanina, pigmento elaborado por unas células dendríticas llamadas melanocitos, y que funciona como fotoprotector evitando que la radiación solar dañe los tejidos del cuerpo (Costin y Hearing, 2007).

La pigmentación, es visible tanto en el pelo como en la piel, esta relacionada con la sensibilidad a la radiación ultravioleta (UV) y por lo tanto con el riesgo de desarrollar un cáncer de piel bien melanoma o no melanoma. Cuando la piel se expone al sol, y por consiguiente a la radiación de los rayos UV, los melanocitos producen más melanina como defensa contra la acción de éstos. En este capítulo nos referiremos sólo al melanoma, cáncer de piel basado en la concentración de melanocitos malignos (Jhappan y cols., 2003) ya que cuando éstos son benignos lo denominamos pecas, lunares y léntigos.

Dentro de los cánceres de piel, el melanoma es uno de los más agresivos. A pesar de no ser de los más comunes dentro de los cánceres de piel, la incidencia del melanoma esta aumentando notablemente en los últimos años y es el que presenta un índice de mortalidad más elevado (Kaskel y cols. 2001). Generalmente, este tipo de cáncer aparece en adultos, pero con el paso de los años se han empezado a encontrar casos en adolescentes e incluso, ocasionalmente, en niños. Si tenemos la suerte de detectarlo y por lo tanto tratarlo en estadíos tempranos de la enfermedad, la probabilidad de su curación es muy alta, sin embargo, si la detección ocurre en estadíos más avanzados, el melanoma puede diseminarse rápidamente a otras partes del cuerpo, bien a través de la sangre o bien a través del sistema linfático, convirtiéndose de esta forma, en un melanoma metastático, el cual es muy difícil de tratar.

Para poder comprender la biología del melanoma, progresar en su tratamiento médico, y así mejorar en cierta medida el triste pronóstico de esta enfermedad, es necesario comenzar conociendo la biología del propio melanocito, ya que muchos de los genes expresados en las líneas celulares de melanoma se expresan también durante el desarrollo de los melanocitos, lo que nos puede ayudar a comprender las bases genéticas del cáncer y su progresión (Grammill y Bronner-Fraser, 2002; Segal y cols., 2003; Clark y cols., 2000.) .

## 2.- EL MELANOCITO Y SU ORIGEN

El melanocito es una célula de origen nervioso capacitada para sintetizar melanina. Se diferencia a partir de células pluripotenciales de la cresta neural (Lecoin y cols., 1998) y durante la embriogénesis migra hacia numerosos lugares del cuerpo, entre otros el folículo piloso, la dermis, la epidermis de la piel, donde se encuentran intercaladas con otras células y en contacto con los queratinocitos por medio de sus dendritas. Son células que encontramos también en el tegumento, oído interno y ojos de los organismos vertebrados entre otros.

La cresta neural es una estructura transitoria que se crea por delaminación del tubo neural dorsal y es muy importante para el desarrollo de los vertebrados. Las células de la cresta neural migrarán siguiendo diferentes rutas perfectamente definidas, hasta poblar diferentes regiones del embrión (Le Douarin y Kalcheim, 1999).

Los precursores de los melanocitos son los melanoblastos. Su determinación a partir de los precursores de la cresta neural es un proceso progresivo que implica la restricción de las células pluripotenciales a la línea melanogénica, la adopción del perfil de expresión de genes de la línea melanocítica y la consiguiente transformación morfológica (Dupin y Le Douarin, 2003).

Además de los melanocitos, de las células de la cresta neural, se diferencian otros muchos tipos celulares con localizaciones y funciones muy diferentes en el organismo adulto, como son las neuronas, células gliales del sistema nervioso central y periférico, células cardíacas, tejidos craneofaciales, músculo liso, etc... (Serbedzija y cols., 1994)

Cualquier proceso anormal en la migración, proliferación, y/o diferenciación de las células de la cresta neural puede dar lugar a desordenes genéticos produciéndose un cáncer, por ejemplo melanoma.

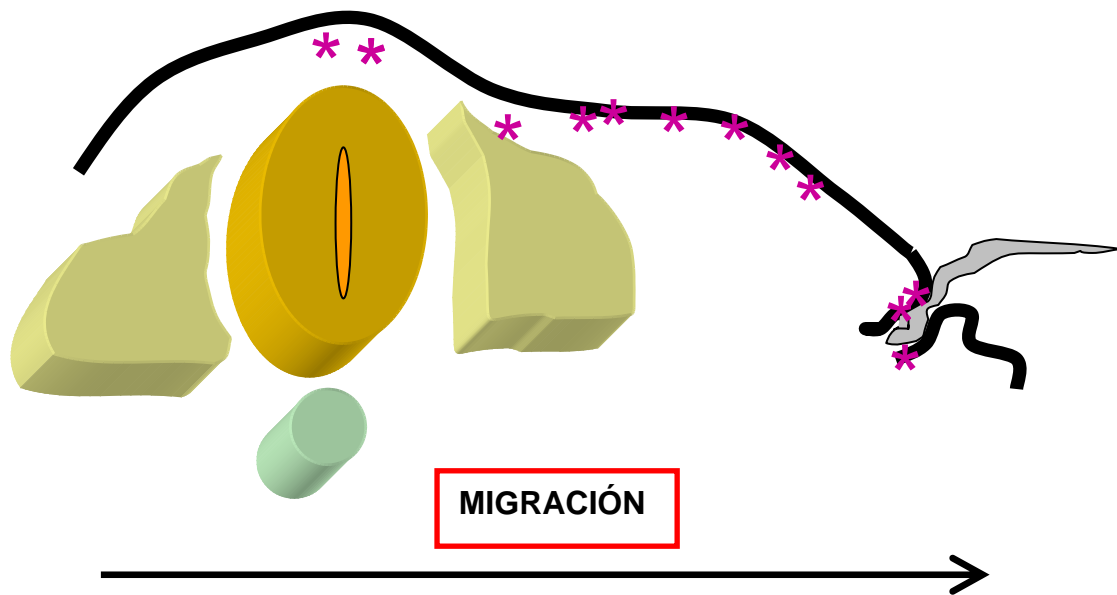
A pesar de lo importante que sería conocer las bases de los mecanismos implicados en el desarrollo y diferenciación de los melanocitos, así como los factores que regulan su supervivencia y proliferación, incluyendo factores de transcripción, ligandos extracelulares, receptores transmembrana y moléculas de señalización intracelular entre otros para poder entender las diferentes patologías relacionadas con estas células (en nuestro caso el melanoma), hoy en día no está del todo claro.

En función de la localización y la expresión de marcadores implicados en el desarrollo y diferenciación de los melanocitos, vamos a dividir el proceso en varias etapas para facilitar la comprensión del mismo.

- a) Primeramente se forma la población celular de la cresta neural a partir de los bordes dorsales del tubo neural.
- b) Comienzo de la migración temprana con la diferenciación de las células precursoras de los melanoblastos a partir de una subpoblación de las células de la cresta neural formada en la etapa anterior, y migración dorso-lateral de éstos bajo el ectodermo.
- c) Migración de los melanoblastos a través de la dermis primeramente y posteriormente por la epidermis. Durante esta migración de los melanoblastos, existe una división celular muy activa y una inhibición simultánea de la apoptosis.

d) Posteriormente comienza lo que llamamos migración tardía de los melanoblastos, ésta se da dentro de la epidermis con la consiguiente incorporación de los melanoblastos en los folículos pilosos en desarrollo.

e) Los melanoblastos continúan migrando y poblando tanto la epidermis como los folículos pilosos y finalmente se convierten en melanocitos totalmente diferenciados, a los 6 meses de la vida fetal, y productores de pigmento.



**Figura 1.** Esquema que muestra la migración de los melanocitos desde su determinación en la cresta neural hasta convertirse en verdaderos melanocitos diferenciados ocupando y realizando su función en diferentes partes del embrión.

Se piensa que los melanoblastos son las únicas células derivadas de la cresta neural que migran a lo largo de la vía dorso-lateral del tubo neural, entre el dermomiótomo y el ectodermo superficial (Teillet y Le Dourain, 1970) y la presencia de otros derivados es eliminada por muerte celular selectiva (Wakamatsu y cols., 1998)

El comportamiento de migración está determinado por la expresión tanto de moléculas de señalización como de receptores en la superficie celular (Harris y Erickson, 2007) y están gobernados básicamente por las moléculas de señalización Wnt y BMP, aunque otras rutas de señalización, como las activadas por SCF y Endotelina 3, pueden también estimular la melanogénesis.

### 3.- INTERACCIÓN SCF - c-kit DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

Como hemos dicho anteriormente, tanto la supervivencia como la migración de las células de la cresta neural durante la embriogénesis dependen de



interacciones entre receptores específicos de la superficie celular y sus ligandos extracelulares. Por ejemplo, el steel factor o stem cell factor (SCF), factor de crecimiento de los mastocitos, se une al receptor transmembrana tirosinasa c-Kit activándolo en los melanoblastos y melanocitos controlando la migración, proliferación y supervivencia de éstos (Murphy y cols., 1992; Morrison-Graham y Weston., 1993; Lahav y cols., 1994; Reid y cols., 1995). Este factor es producido por muchos tipos celulares de la piel como por ejemplo los fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales por lo que juega un papel importante en la fisiología y patología cutánea.

El patrón de expresión del ligando SCF empieza en el dermomiótomo y más tarde en la dermis y el folículo piloso, anterior a la llegada de los melanocitos.

La unión del factor steel a su correspondiente receptor tirosinasa c-kit induce la activación mediante dimerización y autofosforilación de éste produciéndose la transducción de la señal a través de una cascada de proteínas, SCF/c-kit, RAS, RAF, MEK, ERK y finalmente MITF que actúa como factor de transcripción de genes relacionados con la diferenciación, supervivencia y el ciclo celular entre otros.

La vía de señalización SCF/c-kit puede además estimular la formación de prolongaciones dendríticas en los melanocitos e intervenir en la pigmentación inducida por la radiación UV.

A pesar de que c-kit tiene efectos claros en la proliferación de los melanocitos, su papel en la tumorigénesis del melanoma no está del todo claro.

Hace años se vio que las células de melanoma humano no expresaban niveles detectables de c-kit (Lassam y Bickford. 1992) por lo que podemos pensar que la transformación maligna de los melanocitos puede estar asociada a cambios en la expresión del receptor c-kit. El receptor era encontrado en melanocitos y nevi benignos, pero no en melanomas primarios o metastáticos. (Natali y cols., 1992; Montoe y cols., 1997). Diferentes ensayos demuestran que la unión de SCF al receptor promueve la proliferación de melanocitos normales, pero inhibe la proliferación de las células tumorales (Zakut y cols., 1993; Huang y cols., 1996), es decir, la unión de SCF a su receptor en células tumorales, conduce a la apoptosis de éstas. La pérdida del receptor c-kit permite a las células malignas de melanoma escapar de la apoptosis mediada por SCF/c-KIT, contribuyendo al crecimiento del tumor incluso a la metástasis, ya que las células altamente metastáticas de melanoma humano que expresan el receptor c-kit tienen reprimida la tumorigenicidad y el índice metastático (Gutman y cols., 1994).

También se ha visto que hay un tipo de endotelina, la endotelina 3, que juega un papel importante en el desarrollo de los melanocitos, mediante la unión a su receptor asociado a proteína G (Lahav y cols., 1996, Reid y cols., 1996; Yanagisawa y cols., 1998 ). Actúa como potente mitógeno de las células de la cresta neural antes de la diferenciación (Lahav y cols., 1996). Esta también implicada en la diferenciación y el mantenimiento del fenotipo de los melanocitos ya que después de la interacción receptor-ligando, hay muchos

factores de transcripción (es decir, proteínas con la capacidad de unirse al DNA e influir sobre la actividad de otros genes) que tienen funciones importantes sobre los melanocitos y sus precursores.

Al igual que c-kit, la endotelina 3 se requiere durante la migración temprana de los melanoblastos antes de su entrada en la epidermis (Yoshida y cols., 1996; Shin y cols. 1999) lo que sugiere que END3 es necesario para el crecimiento de la población de las células de la cresta neural, así como para promover la supervivencia y proliferación de los precursores de los melanocitos (Lahav, 1998).

## 4.- PROTEÍNAS Wingless (Wnt) EN EL DESARROLLO DE LOS MELANOCITOS

### 4.1.- Familia de las proteínas Wnt

La familia de proteínas Wnt esta formada por mas de 19 miembros, altamente conservados, insolubles en agua, ricos en cisteína y todos ellos secretados, estando implicadas en numerosos procesos biológicos (Cadigan y Nusse, 1997; Miller, 2002).

Los genes de estas proteínas presentan de entre 3 a 6 exones y han sido identificados tanto en vertebrados como en invertebrados pero no en procariotas, eucariotas unicelulares y plantas. Codifican para factores de crecimiento que se asocian con las superficies celulares y la matriz extracelular.

Las proteínas (39-56 KDa) están formadas por unos 350-400 aminoácidos, con un péptido señal hidrofóbico secretor en el extremo amino terminal (Morin y Weeraratna, 2003). La glicosilación de estas proteínas es importante para el plegamiento, secreción y actividad biológica (Smolich y cols., 1993). Las proteínas Wnt llevan un palmitato unido covalentemente a su extremo amino terminal, crucial para la señalización Wnt (Willert y cols., 2003). El extremo carboxilo terminal es responsable de la especificidad de la ruta.

Durante el desarrollo juegan un papel importante en el destino celular, proliferación, migración, polaridad y muerte celular. En el individuo adulto alteraciones bien en estas proteínas o bien en sus rutas de señalización pueden dar lugar a numerosos procesos oncogénicos (Rijsewijk y cols., 1987; Jue y cols., 1992; Weeraratna, 2005; Morin, 1999)

Los ligandos Wnt, expresados espacial y temporalmente, se unen a receptores de superficie de membrana denominados Frizzled (Fz) (Yang-Snyder and cols., 1996), pudiendo activarse al menos 3 rutas distintas de señalización en función del miembro de la familia que este implicado (Veeman y cols., 2003):

- Ruta canónica:

- *Wnt/β-catenina*, en la que se da la activación y estabilización de la *β-catenina*.

- Rutas no canónicas:

- *Wnt/ Ca<sup>2+</sup>*, identificada por primera vez en vertebrados y en la que se produce la activación de la PKC y un incremento de los niveles de calcio intracelulares
- *Wnt/ polaridad o polarizad planar (Wnt/ PLP)*, relacionada con los movimientos celulares durante la gastrulación

La ruta que se active y los resultados de la misma dependerá del miembro de la familia de proteínas Wnt que este implicado en la señalización y en este caso, errores en la activación de estas rutas también puede conducir al desarrollo o progresión de diferentes tipos de canceres (Weeraratna, 2005).

#### 4.2.- Receptores de Wnt

La transducción de la señal de Wnt implica la unión de la proteína a miembros de dos familias de receptores de superficie de membrana:

- Receptores de la familia Frizzled (Fz): Evidencias bioquímicas y genéticas señalan a estos receptores como las moléculas sobre las que actúan y a las que se unen las proteínas Wnt. Son receptores de 7 dominios transmembrana, asociados a proteína G heterotrimérica (Slusarski y cols., 1998). La subunidad de la proteína G implicada depende sobre todo del tipo de proteína y receptor entre los que se establezca la unión. Presenta un extremo N-terminal rico en cisteínas (CDR) al que se une Wnt, y un extremo c-terminal citosólico muy corto (Xu y Nusse, 1998).
- Receptores de la familia de proteínas relacionadas con los receptores de lipoproteína de baja densidad LDL, proteínas LRP o co-receptores de Frizzled. Tiene un dominio transmembrana y son necesarios para la señalización Wnt (Tamai y cols., 2000). En vertebrados se han identificado LRP5 y LRP6 (Pinson y cols., 2000; Brennan y cols., 2004), implicados en la ruta canónica Wnt / β-catenina.

#### 4.3.- Ruta de señalización Wnt / β-catenina

Una de las principales rutas implicadas en el desarrollo de los melanocitos desde la cresta neural e incluso en la transformación tumoral de éstos y en la

que forman parte las proteínas de la familia Wnt, es la ruta WNT/Beta-catenina, en la que participan proteínas como Wnt1 y Wnt8.

Esta ruta está implicada en varias actividades celulares como son determinación, proliferación, migración y diferenciación durante el desarrollo embrionario e incluso en la homeostasis adulta. Es esencial en la inducción de la cresta neural y por lo tanto en el desarrollo de los melanocitos, tanto en la inducción de los melanoblastos como en su diferenciación.

La señalización de esta ruta comienza con la unión de Wnt a sus receptores, conocidos como receptores de la familia Frizzled. Estos receptores presentan 7 dominios transmembrana acoplados a una proteína G. Es el extremo amino terminal del receptor el que interacciona con Wnt. Existen unos co-receptores Frizzled, también llamados proteínas LRP (LRP 5/6) con un solo dominio transmembrana, esenciales en la señalización por Wnt, formando un complejo trimérico.

Tras la unión de Wnt a su receptor Frizzled, y a los co-receptores LRP5/6, se produce la estabilización y acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma. La  $\beta$ -catenina libre en el citoplasma, se transloca al núcleo de la célula e interacciona con miembros de la familia de factores de transcripción de LEF-1/ TCF (lymphoid enhancer-binding factor/T-cell factor) (Hecht y Kemler, 2000; Godman y Smolik, 2000), los cuales modulan la transcripción de diferentes genes que controlan entre otras actividades el crecimiento y la proliferación (Giles y cols., 2003; Logan y Nusse, 2004). En este sentido, la ruta canónica regula la expresión de genes diana a través del factor de transcripción TCF/  $\beta$ -catenina. Se han encontrado muchas dianas de este complejo transcripcional tanto en el desarrollo como en la tumorigénesis (Morin, 1999)

La proteína  $\beta$ -catenina es un componente central de la ruta de señalización Wnt, y juega un importante papel tanto en el desarrollo como en la tumorigénesis (Barker y Clevers, 2000) además de tener un papel crucial en la adhesión intercelular (Morin, 1999). Un complejo multiproteico compuesto por la proteína supresora de tumores APC, axina, glicogeno sintetasa kinasa (GSK) regula los niveles intracelulares de  $\beta$ -catenina (Seidensticker y Behrens., 2000; Behrens y cols., 1998). En ausencia de señalización Wnt, este complejo promueve la fosforilación de residuos serina y treonina en la región amino terminal de la  $\beta$ -catenina que posteriormente es degradada en el proteasoma, mediante la vía mediada por ubiquitina (Hart y cols., 1999; Jiang y Struhl, 1998).

La activación de los receptores Frizzled inhiben el complejo proteico GSK, lo que provoca una acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma para posteriormente translocarse al núcleo. Dentro del núcleo celular, la actividad del complejo  $\beta$ -catenina-TCF/LEF-1, puede ser inhibida por la proteína ICAT (inhibidor de  $\beta$ -catenina y TCF), la cual bloquea las interacciones entre la  $\beta$ -catenina y TCF y de ese modo interfiere en la ruta de señalización Wnt. Los niveles nucleares de  $\beta$ -catenina también son modulados tanto por APC, que puede exportar esta proteína al citoplasma para su degradación, y por LEF1 que la retiene en el núcleo.

En las células epiteliales la mayor parte de la  $\beta$ -catenina, además de ser importante en la ruta de señalización Wnt, se asocia con la molécula de adhesión célula-célula, E-caderina, en un tipo de uniones llamadas uniones adherentes. En el complejo de adhesión la  $\beta$ -catenina se une a la E-caderina vía  $\alpha$ -catenina al citoesqueleto de actina. Cualquier  $\beta$ -catenina libre, no unida E-caderina se une a ubiquitina, como hemos dicho antes, y se degrada en el proteasoma. Teniendo esto en cuenta podemos decir que las caderinas juegan un papel muy importante en la regulación de los niveles de  $\beta$ -catenina en el citoplasma (Bienz, 2005).

Al ser las caderinas moléculas que intervienen en la adhesión intercelular, es lógico pensar que son esenciales en la migración celular de muchos tipos celulares, por lo que una disminución de caderinas promueve la migración de los melanoblastos primero dentro de la dermis y después en la epidermis y los folículos pilosos. Las caderinas, tanto de tipo I como de tipo II presentan un patrón de expresión dinámico durante la inducción de los melanocitos. La progresión del melanoma esta asociada con la expresión de diferentes caderinas y la perdida de las interacciones mediadas por E-caderina entre melanocitos y queratinocitos es un paso muy importante en la transformación maligna de los melanocitos (Silye y cols., 1998).

#### 4.4.- Proteínas Wnt y la cresta neural

Las familias de proteínas involucradas en la inducción de la cresta neural y la migración incluyen proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), factor de crecimiento de fibroblastos, proteínas Notch y finalmente proteínas Wnts (Weeraratna, 2005).

Las proteínas Wnts desempeñan múltiples papeles en la formación de la cresta neural, desde la inducción hasta la migración, proliferación y diferenciación (Wu y cols., 2003). Los miembros de la familia Wnt y sus receptores se expresan con un patrón espacio-temporal. En nuestro caso estos ligandos extracelulares están expresados en la parte dorsal del tubo neural.

La señalización Wnt, concretamente Wnt1 y Wnt3a, controla el desarrollo de los melanoblastos (carentes de tirosinasa funcional, enzima necesaria para la producción de melanina) a partir de la cresta neural. Los melanoblastos sufren una proliferación masiva, y migran bajo el ectodermo a lo largo de la vía dorso-lateral (Dunn y cols., 2000).

Estos genes actúan de forma conjunta regulando la expresión de diferentes marcadores melanocíticos como son MITF, SRY, SOX10. La señalización de Wnt es responsable de la expresión inicial de SOX10 durante la inducción de la cresta neural (Honore y cols., 2003), y este gen es luego responsable de dirigir el destino de las células de la cresta neural para convertirse en células pigmentadas mediante la vía de regulación de la dopacromo tautomerasa (DCT)(otro regulador importante de la pigmentación), y MITF (Potterf y cols., 2001. Potterf y cols., 2000)

#### 4.5.- Señalización Wnt en el desarrollo y progresión del melanoma

La señalización de Wnt más estudiada en cáncer es la ruta Wnt/  $\beta$ -catenina. Al igual que en el desarrollo, en la tumorigénesis también se da morfogénesis, movimiento y proliferación. El aumento de la actividad o fallos en la regulación de la ruta Wnt/  $\beta$ -catenina esta asociado a un aumento en la proliferación celular y formación de tumores en humanos (Nusse y Varmus, 1982; Rubinfeld y cols., 1997).

Se ha visto que la activación de la ruta Wnt/  $\beta$ -catenina es frecuente en melanoma (Rimm y cols., 1999), y por ello es interesante estudiar modificaciones y cambios de los componentes de esta ruta. Algunos de estos componentes, tales como APC, ICAT, LEF1 y  $\beta$ -catenina se expresan y están modificados en tumores de melanoma, conduciendo a la activación desregulada de esta ruta y favoreciendo, como hemos dicho anteriormente, la progresión de esta enfermedad.

En melanomas primarios, ya se han detectado mutaciones en APC (Worm y cols., 2004) y también se han visto activaciones oncogénicas de  $\beta$ -catenina por sustitución de aminoácidos o deleciones en un elevado número de líneas de melanoma (Rubinfeld y cols., 1997).

A pesar de que mutaciones de  $\beta$ -catenina no se han detectado de forma frecuente en melanoma (Omholt y cols., 2001), la acumulación nuclear y/o citoplasmática de ésta si que se observa en este tipo de tumor, debido como se ha dicho anteriormente, a la activación constitutiva de la ruta, sin evidencias de mutaciones directas dentro del gen  $\beta$ -catenina o APC en la mayoría de los casos (Reifenberger y cols., 2002). Esta activación puede ser debida a cambios en la expresión de genes implicados bien en la misma ruta de señalización o bien en la regulación de esta.

La acumulación de  $\beta$ -catenina en núcleo y citoplasma en melanomas metastáticos provoca un incrementó de la transcripción dependiente de TCF/LEF (Murakami y cols., 2001), que activa el promotor MITF en células de melanoma y modula la viabilidad mediante la inducción de la proteína antiapoptótica bcl2 (McGill y cols., 2002). La  $\beta$ -catenina activada, o la fosfo $\beta$ -catenina aparece más frecuentemente en lesiones metastáticas. Se ha visto que niveles elevados de ésta en el núcleo están asociados con un peor pronostico de supervivencia (Kielhorn y cols., 2003), estando implicada además en la invasión y metástasis del tumor a través de su papel en la adhesión intercelular.

Recientemente ICAT se ha identificado como un gen capaz de regular la vía de señalización Wnt. La desregulación de ICAT puede llevar a la activación de la ruta  $\beta$ -catenina y a la tumorigénesis (Reifenberger y cols., 2002). ICAT inhibe la asociación de  $\beta$ -catenina con TCF en el núcleo celular reprimiendo la activación de sus genes diana de manera dosis-dependiente. Por lo tanto, ICAT puede funcionar como supresor de tumores y su inactivación puede conducir a la tumorigénesis (Tago y cols., 2000). Esto sugiere que la perdida de expresión de

ICAT puede influir en la progresión y metástasis del melanoma (Reifenberger y cols., 2002).

En los melanocitos, en la señalización Wnt se produce la activación del promotor del gen que codifica para MITF, esencial para el desarrollo de la línea melanocítica ya que controla la proliferación, supervivencia y diferenciación celular. Se ha visto que la contribución de  $\beta$ -catenina en el crecimiento de las células de melanoma depende de su diana MITF, y representa una ruta específica de tejido que influye en el comportamiento del crecimiento y supervivencia de este neoplasma resistente al tratamiento (Widlund y cols., 2002).

La molécula de señalización Wnt5a se ha identificado como marcador de comportamiento altamente agresivo del melanoma, cuyos niveles de RNAm se encuentra sobreexpresado en tejidos tumorales (Bittner y cols., 2000). La expresión de la proteína Wnt5a en biopsias de este tumor se correlaciona con el grado del tumor, movilidad celular, e invasión del melanoma metastático (Weeraratna y cols., 2002) y disminuye la esperanza de vida del paciente (Bittner y cols., 2000). La expresión de Wnt5a, a diferencia de otras moléculas de señalización de la misma familia, no afecta a la estabilización de  $\beta$ -catenina, sino que activa a la proteína quinasa C (PKC) (Kuhl y cols., 2000), contribuyendo al fenotipo invasivo de las células de melanoma. El incremento de los niveles de Wnt5a se correlaciona con la activación de PKC y el incremento de movilidad e invasibilidad de las células de melanoma y una disminución de la diferenciación celular, por lo que PKC se ha identificado como un factor contribuyente en la tumorigénesis de la piel. La expresión de Wnt5 es localizada, es decir, lo encontramos en lugares de invasión activa y en células que muestran rasgos morfológicos asociados con un comportamiento metastático del melanoma.

## 5.- MITF

Parece ser que el factor de transcripción asociado con la microftalmia (MITF, microphthalmia-associated transcription factor), fue el primer marcador que se conoció de la estirpe melanocítica, implicado en la determinación, supervivencia, proliferación y diferenciación de los melanocitos y melanoblastos. Juega un papel muy importante como regulador de muchos procesos, ya que es capaz de modular los promotores de los genes que codifican la tirosinasa y otras proteínas importantes de la melanogénesis (Fisher y cols., 2006). También es importante para el mantenimiento del estado diferenciado de los melanocitos.

Además, recientemente se ha observado que el MITF interviene en la pigmentación inducida por la radiación ultravioleta y estimula la viabilidad de las células de melanoma y de los melanocitos, al aumentar la expresión de la proteína antiapoptótica bcl2 (McGill y cols., 2002).

Tiene un sitio de unión funcional para LEF-1, marcándolo como un lugar principal de la ruta de señalización beta/catenina (Takeda y cols. 2000) y controla la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de los melanocitos.

Una vez que las células se convierten en pigmentadas, su posicionamiento en la piel esta mediado por E-caderinas (Herlyn y cols., 2000), cuya expresión parece crucial para la adhesión de los melanocitos a los queratinocitos (Pla y cols., 2001).

## 5.1.- Regulación de MITF

La actividad de MITF puede estar regulada por dos vías: una dependiente de AMPc que aumenta la transcripción, y puede estar inducida por la MSH- $\alpha$ . La otra vía es la propia fosforilación de MITF dependiente de la proteína cinasa activada por un mitógeno (MAPK). Esta última se puede estimular a través de la vía de señalización c-kit. Además, el promotor de MITF esta regulado por diferentes factores de transcripción tales como CREB, LEF-1/TCF, SOX10 y PAX3.

Explicaremos a grandes rasgos la regulación de MITF por cada uno de estos factores de transcripción.

- Regulación por CREB

MITF es un mediador de la pigmentación en los melanocitos, en los cuales se une y modula los promotores de muchos de los enzimas implicados en la pigmentación en respuesta a diferentes estímulos (Bentley y cols., 1994). Uno de ellos es la hormona estimuladora de melanocitos MSH $\alpha$  ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone), que tras la unión con su receptor de Melanocortina1, proteínas transmembrana (MC1R) con 7 dominios, induce un aumento de AMPc intracelular (Mountjoy y cols., 1992), fosforilación final y activación de CREB, que inicia la transcripción de MITF (Price, 1998).

- Regulación por SOX10

SOX10 es un miembro de SRY box-containing (SOX), se expresa en derivados de la cresta neural y aunque no es esencial durante la migración temprana de la cresta neural si lo es más adelante (Mollaaghbababa y Pavan, 2003). SOX10 es un regulador directo de MITF, ya que el promotor de MITF presenta elementos de unión para SOX10 y juega un papel muy importante en la diferenciación de los melanocitos (Potterf y cols., 2000).

- Regulación por PAX3

El promotor de MITF también esta regulado por PAX3 en los melanoblastos, melanocitos y células de melanoma vía interleukina-6 receptor/interleukina-6 (IL6/IL6R) (Kamaraju y cols., 2002)



- Regulación por LEF-1/TCF

Estos factores de transcripción son proteínas nucleares que median la señalización Wnt vía interacción con  $\beta$ -catenina, tal y como hemos explicado en apartados anteriores. En presencia de señales Wnt, la ruta canónica permite la acumulación de  $\beta$ -catenina por inhibición de GSK-3 $\beta$ . La  $\beta$ -catenina acumulada migra hacia el núcleo, donde funciona como coactivador de factores de unión al DNA de la familia LEF-1/TCF activándose la expresión de genes entre ellos *mitf*. MITF es una de las dianas de Wnt, en concreto de Wnt1 y Wnt3a. El promotor MITF contiene sitios de unión para LEF-1/TCF y esta directamente regulado Wnt/  $\beta$ -catenina (Dorsky y cols., 2000).

## 5.2.- MITF y cáncer

Una de las características típicas de los tumores es la desregulación de los factores de transcripción, por lo que es muy importante que los niveles y actividad de éstos este muy controlada.

En nuestro caso hay una correlación entre la expresión de *mitf* y el desarrollo de melanoma en humanos. Los niveles de MITF decrecen siempre durante la progresión del melanoma, y por lo tanto también la expresión de sus genes diana. Parece ser que la expresión disminuida de MITF, puede estar asociada con un fenotipo menos diferenciado (Miettinen y cols., 2001). Ya sabemos que MITF es capaz de regular el gen antiapoptótico *bcl2*, de ahí la importancia de MITF en la supervivencia de los melanocitos, y su participación en la resistencia del melanoma a los tratamientos quimioterapéuticos.

Las células de melanoma y los melanocitos en desarrollo, comparten un montón de similitudes, ambos tienen comportamientos similares como es la disociación de un ambiente epitelial, la invasión de tejidos adyacentes y la migración a lugares lejanos. Ambos responden a señales microambientales que regulan su crecimiento, y ambas expresan marcadores moleculares comunes, incluido el factor de transcripción MITF, que se relaciona con vías de señalización extracelulares esenciales para la supervivencia celular.

## 6.- MELANOGÉNESIS

Como ya hemos comentado, la pigmentación es una de las características más llamativas tanto en los seres humanos como en otros organismos. Esta pigmentación tiene un componente genético, pero también está sometida a regulación por otros factores, que pueden ser tanto endocrinos como ambientales, y que controlan finalmente, tanto la cantidad como la distribución de la melanina en el organismo.

La melanogénesis es un proceso bioquímico mediante el cual se sintetiza la melanina, pigmento quinoideo, químicamente inerte y estable, que tiene como función principal la protección frente a cambios ambientales y a la radiación UV,

mediante dispersión, fotoabsorción y retirada de radicales libres de oxígeno liberados por las células que han sufrido daño por la radiación solar, además del camuflaje y regulación del calor. La síntesis de melanina es inducida por los rayos UV del sol, principalmente los de tipo A.

Aunque la síntesis de melanina es un mecanismo de protección frente a las quemaduras solares, hay que tener cuidado, ya que ésta no evita daños en la piel a largo plazo, como consecuencia de los rayos del sol, por lo que estar moreno no es ninguna garantía. Además de la melanina existen otros mecanismos de protección como son el sudor, ya que contiene ácido urocánico, capaz de absorber la radiación UV y el engrosamiento de la capa córnea, inducido por la radiación solar, dificultando la penetración de los rayos UV. El proceso de pigmentación, es un proceso complejo, asociado a otros cambios celulares tales como aumento del tamaño celular, producción de dendritas y alteraciones en la síntesis de proteínas específicas y RNAm.

### 6.1.- Maduración de los melanosomas

La síntesis de la melanina en los melanocitos se da en unos orgánulos denominados melanosomas. Estos orgánulos presentan una morfología elíptica, asociada a membrana y con un alto nivel de organización. Los melanosomas se transfieren a los queratinocitos por medio de las dendritas donde desempeñan su papel de fotoprotección (Fitzpatrick y cols., 1979)

Los melanosomas presentan 4 etapas de maduración en función de su estructura y cantidad, cualidad y disposición de la melanina que se produce.

- I. En principio los melanosomas se encuentran en la región perinuclear cercanos al Aparato de Golgi, recibiendo todas las proteínas enzimáticas y estructurales necesarias para la síntesis de melanina. Se presentan como vacuolas esféricas carentes de actividad tirosinasa y componentes estructurales internos (Hirobe, 1982).
- II. En esta etapa tiene importancia la proteína estructural Pmel17, que transforma los melanosomas de la etapa I en melanosomas más alargados y fibrilados conocidos como melanosomas en estadio II. Estos poseen tirosina y cierta cantidad de melanina.
- III. Comienza la síntesis de melanina.
- IV. Los encontramos en melanocitos altamente pigmentados y pueden ser elípticos y elipsoidales.

## 6.2.- Bioquímica de la melanogénesis

Las reacciones de la síntesis de melanina están catalizadas enzimáticamente. Anomalías en estos procesos están asociadas a enfermedades de la piel como puede ser el melanoma.

Existen dos tipos de melanina que se diferencian además de por sus propiedades bioquímicas, por su capacidad fotoprotectora:

- Eumelanina (marrón-negra).
- Feomelanina (amarilla-naranja).

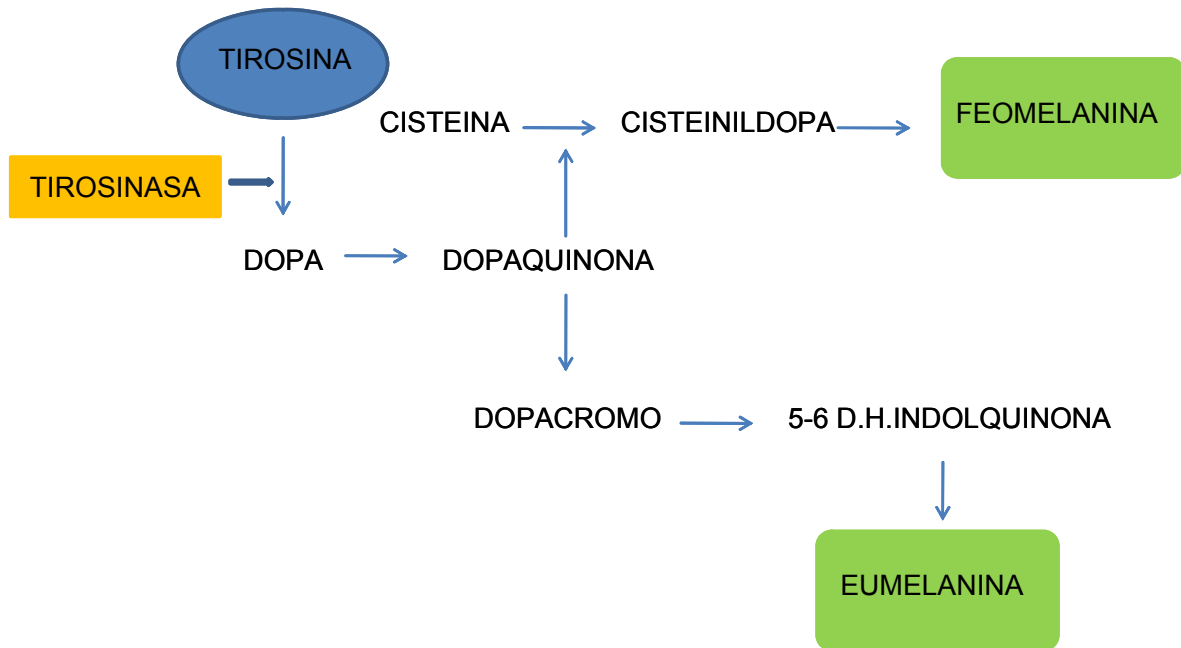
Se puede decir que la melanogénesis comienza con la síntesis de los constituyentes de los melanosomas, como las enzimas y las proteínas estructurales entre otros. Más tarde se forman los melanosomas con la consiguiente melanización. Hay una transferencia de los melanosomas a los queratinocitos adyacentes. Los melanocitos junto con los queratinocitos forman lo que llamamos unidades pigmentarias. Por último, se produce la degradación de los melanosomas eliminándose la melanina. Tras la liberación de la melanina esta se dispone envolviendo a los núcleos, y de esta manera protege al DNA.

La melanina se acumula en el interior de los melanosomas, y de su tamaño, número y disposición dentro de los melanocitos dependen las diferencias interraciales, todo ello programado genéticamente. Sin embargo, la cantidad de melanina sintetizada, depende sobre todo del sol.

La producción de los dos tipos de melanina se da a partir del aminoácido tirosina. La mayor parte de las reacciones ocurren de manera espontánea, excepto el primer y segundo paso que requieren ser acelerados por el enzima melanosomal tirosinasa, dependiente de cobre, a través de sus dos actividades (Lerch, 1981):

- a) Actividad monofenolasa (EC 1.14.18.1), que cataliza la reacción de tirosina a dopa (Tirosina → Dihidroxifenilalanina).
- b) Actividad difenolasa (EC 1.10.3.1) (Dopa → Dopaquinona). Esta enzima también acelera pasos posteriores en la síntesis de melanina.

La síntesis de melanina (Figura 2) comienza con la oxidación de la tirosina por la tirosinasa a 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA). Aunque esta reacción es lenta, puede verse acelerada por el efecto catalítico de la DOPA que se forma. En un segundo paso, la DOPA se deshidrogena para formar la dopaquinona. Este paso es algo más rápido y esta también catalizado por la tirosinasa. En este punto de la ruta es donde se produce la bifurcación de la ruta para la síntesis de los dos tipos de melanina, la feomelanina y la eumelanina. Hay evidencias de la participación de un enzima más en la síntesis de eumelanina, la dopacromo oxidasa (DCOR), que cataliza el paso de dopacromo a 5,6 dihidroxiindol (Barber y cols., 1985)



**Figura 2:** Esquema básico de la ruta de síntesis de melanina.

Además de por el sol, la formación de melanina está estimulada por los estrógenos (hormonas sexuales femeninas) o factores hormonales como la hormona activadora de la melanina (MSH), que incrementa la concentración de adenilato ciclasa intracelular, aumentando los niveles de AMPc que actúa como segundo mensajero induciendo la pigmentación (Friedman y cols., 1990).

La disminución de la síntesis de melanina aumenta la probabilidad de padecer cáncer. Las células de melanoma han sido inducidas a sintetizar melanina rápidamente, mientras que los melanocitos han desarrollado pigmento espontánea y lentamente. Por ello, las células de melanoma pueden verse dañadas por la rápida acumulación de precursores de melanina, de los cuales al menos el dihidroxiindol puede ser tóxico para las células de melanoma.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA:

Barber JI, Townsend D, Olds DP, and King RA. Decreased dopachrome oxidoreductase activity in yellow mice. *J. Heredity*. 1985. 76:59-60.

Barker N, Clevers H. Catenins, Wnt signalling and cancer. *Bioessays*. 2000. 22:961-965.

Behrens J, Jerchow BA, Würtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kühl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*. 1998. 280(5363):596-9

Bentley NJ, Eisen T, Goding CR. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol*. 1994. 14(12):7996-8006.

Bienz M. Beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol*. 2005. Jan 26;15(2):R64-7. Review.

Bittner, M., P. Meltzer, Y. Chen, Y. Jiang, E. Seftor, M. Hendrix, M. Radmacher, R. Simon, Z. Yakhini, A. Ben-Dor, N. Sampas, E. Dougherty, E. Wang, F. Marincola, C. Gooden, J. Lueders, A. Glatfelter, P. Pollock, J. Carpten, E. Gillanders, D. Leja, K. Dietrich, C. Beaudry, M. Berens, D. Alberts, and V. Sondak. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*. 2000. 406:536-540.

Brennan K, Gonzalez-Sancho JM, Castelo-Soccio LA, Howe LR, Brown AM. Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize beta-catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene*. 2004. 23(28):4873-84.

Cadigan KM., Nusse R. Wnt signalling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 1997. 11: 3286-3305.

Costin G-E, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 2007. 21: 976-994

Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*. 2006. 12(9):406-14.

Clark EA., Golub TR., Lander ES., and Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*. 2000. 406:532-535.

Dorsky, R.I., D.W. Raible, and R.T. Moon. Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway. *Genes Dev*. 2000. 14:158-162.

Dunn KJ, Williams BO, Li Y, Pavan WJ. Neural:Crest-directed gene transfer demonstrates Wnt1 role in melanocyte expansion and differentiation during mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2000. 97:10050-10055.

Dupin E., N.M. Le Douarin. Development of melanocyte precursors from the vertebrate neural crest. *Oncogene*. 2003. 22:3016-3023.

Fitzpatrick TB, Szabó G, Seiji M, and Quevedo WC. Biology of the melanin pigmentary system. *Dermatology in General Medicine*, 2<sup>nd</sup> ed. (TB Fitzpatrick, AZ Eisen, K Wolff, IM Freedberg and KF Austen, Eds.) McGraw-Hill, New York. 1979. pp. 131-163.

Friedmann PS, Wren F, Buffey J, Macneil S. Alpha-MSH causes a small rise in cAMP but has no effect on basal or ultraviolet-stimulated melanogenesis in human melanocytes. *Br J Dermatol*. 1990. 123:145-151.

Gammill, L.S., and M. Bronner-Fraser. Genomic analysis of neural crest induction. *Development*. 2002. 129:5731-5741.

Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jun 5;1653(1):1-24. Review.

Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*. 2000.14:1553-1577.

Gutman, M., Singh, R.K., Radinsky, R., and Bar-Eli, M. Intertumoral heterogeneity of receptor-tyrosine kinases expression in human melanoma cell lines with different metastatic capabilities. *Anticancer Res*. 1994.14:1759-1766.

Harris ML, Erickson CA. Lineage specification in neural crest cell pathfinding. *Dev. Dyn*. 2007. 236:1-19.

Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, Polakis P. The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol*. 1999. 9(4):207-210.

Hecht A, Kemler R. Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over WNT target gene expression. *EMBO*. 2000. Rep 1:24-28.

Herlyn M, Berking C, Li G, Satyamoorthy K. Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res*. 2000. 10:303-312.

Hirobe T. Genes involved in regulating the melanocyte and melanoblast-melanocyte populations in the epidermis of newborn mouse skin. *J Exp. Zool*. 1982. 223:257-264.

Honore SM, Aybar MJ; Mayor R. Sox10 is required for the early development of prospective neural crest in *Xenopus* embryos. *Dev Biol*. 2003 260:79-96.

Huang S., Luca M., Gutman M., McConkey D.J., Langley KE, Lyman SD, Bar-Eli M. Enforced c-KIT expression renders highly metastatic human melanoma cells susceptible to stem cell factor-induced apoptosis and inhibits their tumorigenic and metastatic potential. *Oncogene*. 1996.5;13(11):2339-47.

Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2003.19;22(20):3099-112.

Jiang J, Struhl G. Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature*. 1998. 391(6666):493-6.

Jue SF, Bradley RS, Rudnicki JA, Varmus HE, Brown AM. The mouse Wnt-1 gene can act via a paracrine mechanism in transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 1992.12(1):321-8

Kamaraju AK, Bertolotto C, Chebath J, Revel M. Pax3 down-regulation and shut-off of melanogenesis in melanoma B16/F10.9 by interleukin-6 receptor signaling. *J Biol Chem*. 2002. 277(17):15132-41.

Kaskel P, Sander S, Kron M, Kind P, Peter RU and Krahn G. Outdoor activities in childhood: a protective factor for cutaneous melanoma? Results of a case-control study in 271 matched pairs. *Br J Dermatol*. 2001. 145(4):602-9.

Khul M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signalling pathway takes shape. *Trends Genet*. 2000.16:279-283.

Kielhorn E, Provost E, Olsen D, et al. Tissue microarray-based análisis shows phospho-beta-catenin expresión in malignant melanoma is associated with poor outcome. *Int J Cancer*.2003.103:652-656.

Lahav R, Lecoin L, Ziller C, Nataf V, Carnahan JF., Martin FH. and Le Douarin NM. Effect of the steel gene producton melanogenesis in avian neural crest cell cultures. *Differentiation*. 1994. 58:133-139.

Lahav R, Ziller C, Dupin E and Le Douarin NM. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture.*Proc.Natl. Acad. Sci. USA*.1996. 93:3892-3897.

Lahav R, Dupin E, Lecoin L, Glavieux C, Champeval D, Ziller C, Le Douarin NM. Endothelin 3 selectively promotes survival and proliferation of neural crest-derived glial and melanocytic precursors in vitro.*Proc.Natl. Acad. Sci. USA*.1998. 95(24):14214-14219.

Lassam N, Bickford S. Loss of c-kit expresión in cultured melanoma cells.*Oncogene*.1992. 7:51-56.

Lerch K. Coper monooxygenases: Tyrosinase and dopamine beta-monooxygenase. *Metal Ions Biol Sys*. 1981.13:143-186.

Lecoin L., Lahav R., Dupin E. and Le Douarin NM. Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis. CM Chuong (ed).RG Landes Company: Georgetown, USA. 1998.131-154.

Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease.*Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810. Review.

Le Douarin NM., Kalcheim C. *The neural crest*. Cambridge: Cmbridge University Press.1999

McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR, Fisher DE. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*.2002 Jun 14;109(6):707-18.

Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, Gatalica Z, Lasota J, Sarlomo-Rikala M. Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers.*Am J Surg Pathol*.2001. 25(2):205-11.

Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*. 2002;3(1). Review.

Mollaaghababa R, Pavan WJ. The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene*.2003. 22(20):3024-34.

Montoe KT, van Belle P, Elenistas R, Elder DE. Proto-oncogene c-kit expresión in malignant melanoma: proteína loss with tumor progresión. *Mod Pathol*. 1997.10:939-946.

Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer.*Bioessays*1999.21(12):1021-30.

Morin PJ, Weeraratna AT. The APC tumor suppressor pathway. *Methods Mol Biol*. 2003. 222:21-40

Morrison-Graham K and Weston JA. Transient steel factor dependence by neural crest-derived melanocyte precursors.*Dev.Biol*.1993.159:346-352.

Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*.1992. 257(5074):1248-51.

Murakami, T., S. Toda, M. Fujimoto, M. Ohtsuki, H.R. Byers, T. Etoh, and H. Nakagawa. Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun.*2001.288:8-15.

Murphy M, Reid K, Williams DE, Lyman SD, Bartlett PF. Steel factor is required for maintenance, but not differentiation, of melanocyte precursors in the neural crest. *Dev Biol.* 1992.153(2):396-401

Natali PG., Nicotra M.R., Winkler A.B., Cavaliere R., Bigotti A., Ullrich A. Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit protooncogene receptor. *Int J Cancer.* 1992. 52:197

Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 1982. 31(1):99-109.

Omholt K, Platz A, Ringborg U, Hansson J. Cytoplasmic and nuclear accumulation of beta-catenin is rarely caused by CTNNB1 exon 3 mutations in cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer.*2001.92:839-842.

Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature.*2000.407(6803):535-8.

Pla P, Moore R, Morali OG, Grille S, Martinuzzi S, Delmas V, Larure L. Cadherins in neural crest cell development and transformation. *J Cell Physiol.*2001.189:121-132.

Potterf SB, Furumura M, Dunn KJ, Arnheiter H, Pavan WJ. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: Regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. 2000. *Hum Genet.*2000.107: 1-6.

Potterf SB, Mollaaghababa R, Hou L, Southard-Smith EM, Hornyak TJ, Arnheiter H, Pavan WJ. Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. *Dev Biol.*2001. 237:245-257.

Price ER, Horstmann MA, Wells AG, Weilbaecher KN, Takemoto CM, Landis MW, Fisher DE. Alpha-Melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome. *J Biol Chem.*1998.273(49):33042-7.

Reid K, Nishikawa S, Bartlett PF, Murphy M. Steel factor directs melanocyte development in vitro through selective regulation of the number of c-kit+ progenitors. *Dev Biol.*1995. 169(2):568-79.

Reid K, Turnley AM, Maxwell GD, Kurihara Y, Kurihara H, Bartlett PF, and Murphy M. Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development.*1996.122:3911-3919.

Reifenberger J, Knobbe CB, Wolter M, et al. Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the WNT signaling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. *Int J Cancer.*2002.100:549-556.

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell.*1987.14;50(4):649-57

Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol.*1999.154(2):325-9



Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*. 1997. Mar 21;275(5307):1790-2.

Seebetzija GN., Bronner-Fraser M., and Fraser SE. Developmental potential of trunk neural crest cells in the mouse. *Development*. 1994. 120:1709-1718.

Segal NH, Pavlidis P., Noble WS., Antonescu CR., Viale A., Wesley UV., Busam K., Gallardo H., DeSantis D., Brennan MF., Condor. Cardo C., Wolchok JD. and Houghton AN. Classification of clear-cell sarcoma as subtype of melanoma by genomic profiling. *J. Clin. Oncol.* 2003. 21:1775-1781.

Seidensticker MJ, Behrens J. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2000. 1495(2):168-82.

Shin M.K, Levorse JM, Ingram RS and Tilghman SM. The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature*. 1999. 402:496-501.

Silye R, Karayiannakis JA, Syrigos N, Poole S, Van Noorden S, Batchelor W, Regele H, Segal W, Boesmueller H, Krausz T, Pignatelli M. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol*. 1998. 186:350-355.

Slusarski DC, Corces VG, Moon RT. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature*. 1998. 390(6658):410-3.

Smolich BD, McMahon JA, McMahon AP, Papkoff J. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol Biol Cell*. 1993. 4(12):1267-75.

Tago K, Nakamura T, Nishita M, et al. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev*. 2000. 14:1741-1749.

Takeda, K., Yasumoto, R. Takada, S. Takada, K. Watanabe, T. Udono, H. Saito, K. Takahashi, and S. Shibahara. Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem*. 2000. 275:14013-14016.

Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*. 2000. 407:530-5.

Teillet MA, Le Douarin N. The migration of pigmentary cells studied by the method of heterospecific grafts of neural tube in bird embryo. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci*. 1970. 270(25):3095-3098.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 2003 Sep; 5(3):367-77. Review.

Wakamatsu, Y., Mochii, K.S. Vogel, and J.A. Weston. Avian neural crest-derived neurogenic precursors undergo apoptosis in the lateral migration pathway. *Development*. 1998. 125:4205-4213.

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostteter G, et al. Wnt5a signalling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*. 2002. 1:279-288.

Weeraratna AT. A Wnt-er wonderland--the complexity of Wnt signaling in melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2005. 24(2):237-50.

Widlund HR, Horstmann MA, Price ER et al. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol*. 2002. 158:1079-1087.

- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*.2003. 22;423(6938):448-52.
- Worm J, Christensen C, Gronbaek K, Tulchinsky E, Guldberg P. genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. *Oncogene*.2004. 23:5215-5226.
- Wu J, Saint-Jeannet JP; Klein PS. Wnt-frizzled signalling in neural crest formation. *Trends Neurosci*.2003. 26:40-45.
- Xu YK, Nusse R. The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases. *Curr Biol*.1998.8(12):R405-406.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*.1998. 332(6163):411-415.
- Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ, Moon RT. A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. *Curr Biol*.1996. 1;6(10):1302-6.
- Yoshida H, Kunisada T, Kusakabe M, Nishikawa S, Nishikawa SI. Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development*.1996.122(4):1207-1214.
- Zacut R, Perlis R, Eliyahu S, Yarden Y, Givol D, Lyman SD et al. KIT ligand (mast cell growth factor) inhibits the growth of KIT-expressing melanoma cells. *Oncogene*.1993. 8: 2221-2229.

## CAPÍTULO 11:

# IMPLICACIÓN DEL MICROAMBIENTE Y EL CAMBIO DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN LA PROGRESIÓN DEL MELANOMA CUTÁNEO HUMANO

Yoana Arroyo Berdugo

## Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	250
2. MELANOMA MALIGNO HUMANO .....	250
2.1. Etapas en la progresión del melanoma.....	251
3. INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE EN EL DESTINO DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA .....	251
3.1. Respuesta celular en un microambiente hipóxico.....	252
3.2. Acidificación del microambiente tumoral.....	254
3.3. Pérdida de adhesión celular en la progresión tumoral.....	254
4. INTEGRINAS.....	255
4.1. Activación de las integrinas.....	255
4.2. Vías de señalización de las integrinas .....	257
4.2.1. Activación del complejo FAK-Src.....	259
4.2.2. Activación del complejo Grb2-SOS.....	261
4.2.3. Activación del complejo IPP.....	262
4.3. Implicación de FAK en la progresión tumoral.....	263
4.3.1. Proliferación .....	263
4.3.2. Supervivencia.....	264
4.3.3. Migración.....	265
4.3.4. Invasión.....	266
4.3.5. Angiogénesis.....	266
4.4. Implicación de ILK en la progresión tumoral .....	266
4.5. Relación entre integrinas y receptores de factores de crecimiento .....	267
5. SEÑALIZACIÓN DE INTEGRINAS EN EL MELANOMA.....	268
5.1. Detección de subunidades de integrinas en melanoma .....	269
5.2. Detección de integrinas heterodiméricas en melanoma .....	269
6. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE CADHERINAS.....	270
7. SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS.....	272
8. METALOPROTEASAS.....	273
8.1. Regulación de la expresión y la activación de MMPs.....	274
8.1.1. Activación post-traducciona l de MMP-2.....	275
8.2. Efecto de MEC sobre la actividad de las MMPs en la invasión tumoral .....	276
8.3. MMPs en la progresión del melanoma.....	277
8.4. Interacción de MMPs con moléculas de adhesión en el melanoma cutáneo humano.....	278
9. CONCLUSIONES.....	279
10. BIBLIOGRAFÍA.....	280

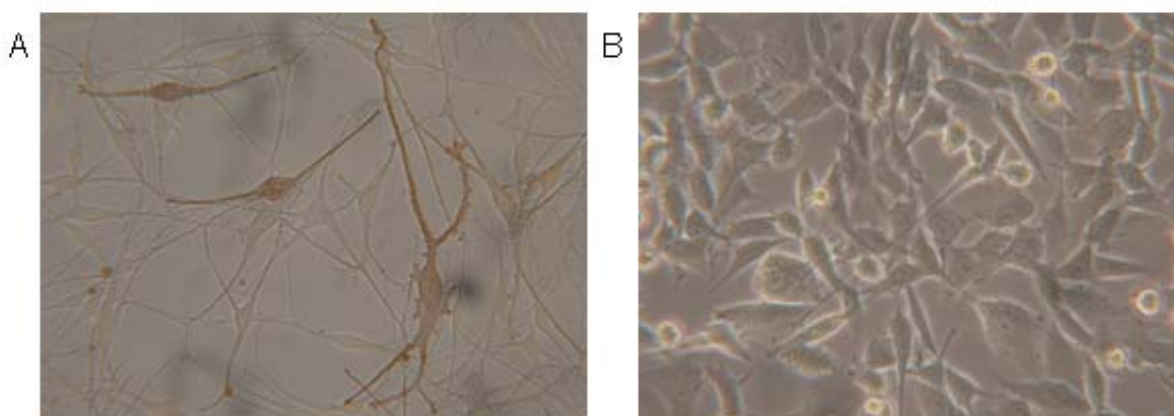
## 1. INTRODUCCIÓN

Las células tumorales se comunican bidireccionalmente con el microambiente que las rodea, enviando y recibiendo señales topográficas y moleculares que dirigen diversos fenómenos celulares, como la diferenciación, crecimiento e invasión. Se ha reconocido al microambiente como un mediador de la progresión de melanoma, y estudios recientes han mostrado que factores asociados al tumor como la hipoxia y la matriz extracelular pueden ser mediadores importantes en la transformación del melanocito y su transdiferenciación (Postovit y cols., 2006), por tanto la aportación de ambos factores se revisará en este trabajo.

## 2. MELANOMA MALIGNO HUMANO

El melanoma maligno se origina a partir de los melanocitos diseminados en las capas basales de la epidermis. Los melanocitos son responsables de la síntesis de melanina, pigmento que nos protege de los daños que puede producir la radiación ultravioleta, y que después, transfieren a los queratinocitos adyacentes a través de sus finas prolongaciones citoplasmáticas. En la piel normal los queratinocitos conviven con los melanocitos en una formación celular denominada “unidad melánica epidérmica” (UME) (Planas, 2003). Cada melanocito penetra con sus dendritas a las capas superiores del epitelio, transportando melanosomas que contienen pigmento melánico, para aproximadamente 35 queratinocitos (Planas, 2003).

El melanoma es un tipo de cáncer cutáneo poco frecuente, sólo representan el 4% del total de los cánceres de piel, aunque es el más agresivo con el 80% de muertes, por tratarse de un cáncer muy metastático.



**Figura 1.** Fotografías al microscopio invertido de cultivos de líneas celulares: A) Cultivo de melanocitos. B) Cultivo de células de melanoma cutáneo humano.

## 2.1. Etapas en la progresión del melanoma

Un tumor es definido como maligno cuando las células neoplásicas adquieren la habilidad de moverse desde su contexto natural hacia áreas circundantes y colonizar tejidos y órganos que distan del lugar original de crecimiento. La progresión del melanoma se clasifica según las siguientes etapas o "estadios":

([http://cancer.nccs.drango.com/411es.asp?article=melanoma\\_general&type=tnpv&style=default.css&navType=1&lid=2&otherParams=](http://cancer.nccs.drango.com/411es.asp?article=melanoma_general&type=tnpv&style=default.css&navType=1&lid=2&otherParams=))

- **Etapas 0.** Las células anormales se encuentran solamente en la capa exterior de células de la piel y no invaden los tejidos más profundos.
- **Etapas I.** El cáncer se encuentra en la capa exterior de la piel (epidermis) y/o en la parte superior de la capa interna de la piel (dermis). El tumor tiene un grosor de menos de 1,5 mm.
- **Etapas II.** El tumor tiene un grosor de 1,5 mm a 4 mm. Se ha diseminado a la parte inferior de la capa interna de la piel (dermis), pero no al tejido situado debajo de la piel ni a los ganglios linfáticos vecinos.
- **Etapas III.** Cualquiera de las situaciones siguientes significa que el tumor se halla en la etapa III:
  - El tumor es de más de 4 mm de espesor.
  - El tumor se ha diseminado al tejido corporal situado debajo de la piel.
  - Hay tumores adicionales que han crecido a un centímetro del tumor original (tumores satélites).
  - El tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos del área, o bien existen tumores satélites que han crecido entre el tumor original y los ganglios linfáticos del área.
- **Etapas IV.** El tumor se ha diseminado a otros órganos o a ganglios linfáticos alejados del tumor original.
- **Recurrente.** Enfermedad recurrente significa que el cáncer ha vuelto a aparecer (recurrir) después de haber sido tratado. Puede reaparecer en el sitio original o en otra parte del cuerpo.

## 3. INFLUENCIA DEL MICROAMBIENTE EN EL DESTINO DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA

El microambiente tumoral es muy complejo, consistiendo en elementos diversos entre los que se encuentran: la matriz extracelular (MEC), el estroma compuesto por fibroblastos, células adiposas y células vasculares, también están presentes numerosas citocinas y factores de crecimiento, además de nutrientes como la glucosa y la variación de la concentración de oxígeno (Postovit y cols., 2006).

La matriz extracelular se define como una mezcla compleja de proteínas, proteoglicanos y glicoproteínas de adhesión que proporciona soporte estructural y mecánico a las células y a los tejidos. Cada tipo celular expone receptores de superficie apropiados para el ambiente tisular en que se encuentra, y la interacción de estos receptores con los componentes de MEC influye en la forma celular y en su comportamiento, además de en su respuesta a moléculas solubles como son las citocinas y los factores de crecimiento.

### 3.1. Respuesta celular en un microambiente hipóxico

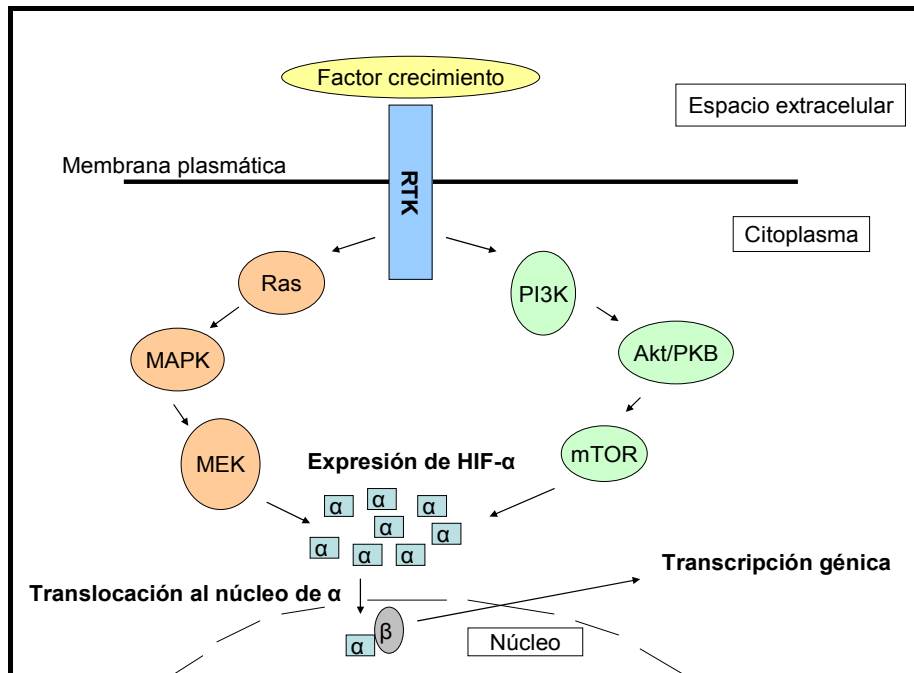
El oxígeno ( $O_2$ ) es requerido en el metabolismo aerobio para mantener el balance energético intracelular. La hipoxia se define como un estado donde las condiciones de  $O_2$  están reducidas, lo cual frecuentemente se ha visto en tumores sólidos, y juega un papel importante en la tumorigénesis (Liu y Simon, 2004). La tensión de  $O_2$  es alrededor de 0-20 mmHg en tumores hipóxicos comparado con 24-66 mmHg en tejidos normales humanos. Aunque las células de tumores hipóxicos necesitan  $O_2$  y nutrientes para crecer y la falta de  $O_2$  mata a las células por apoptosis, células tumorales agresivas aisladas lejos de vasos sanguíneos pueden sobrevivir con bajos niveles de  $O_2$ , por alteraciones en su metabolismo. Se ha comprobado que la hipoxia puede incrementar el ratio de mutación mediante la inducción de cambios en el proteasoma y el genoma de las células neoplásicas. Se piensa que la hipoxia puede elevar los niveles de superóxido y otros radicales de oxígeno que pueden provocar rupturas cromosomales, inducir reordenamientos en los cromosomas o también puede tener efecto en la replicación del ADN. De hecho, en algunos estudios se ha observado que la frecuencia de puntos de mutaciones en células tumorales en cultivo bajo condiciones de hipoxia aumenta 3-4 veces con respecto a la encontrada en células oxigenadas.

En un tumor en crecimiento, la hipoxia puede inducir cambios morfológicos celulares, los cuales pueden guiar a fenotipos clínicos más agresivos. En respuesta a esta situación, tienen lugar cambios en la transcripción génica, los cuales están mediados en un primer momento por la activación de HIF (del inglés hypoxia-inducible factor).

En presencia de oxígeno, la subunidad  $\alpha$  del HIF-1 (HIF-1 $\alpha$ ) se modifica por las hidroxilasas, que constituyen el punto central del mecanismo sensor, induciendo su catabolismo por el proteosoma. Por el contrario, en hipoxia, o en presencia de algunos factores de crecimiento que incrementan su síntesis, HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo, donde unido a HIF-1 $\beta$ , cuya expresión es constitutiva, actúa como factor transcripcional de genes con elementos de respuesta hipóxica (HRE) en su promotor (Caramelo y cols., 2006). Por lo tanto durante la hipoxia, la síntesis de proteína global se reduce para conservar el ATP, mientras que la traducción de factores como HIF-1 se mantienen para activar la transcripción de genes implicados en la angiogénesis, metabolismo energético, eritropoyesis, proliferación y viabilidad celular, remodelado vascular y apoptosis, para facilitar la supervivencia celular y restablecer la homeostasis de oxígeno (Caramelo y cols., 2006).

Una de las funciones más estudiada de HIF es su implicación en la estimulación de la formación de nuevos vasos que migran al interior de la masa tumoral, en un proceso denominado angiogénesis. Sin embargo, los nuevos vasos formados a menudo son defectuosos y poseen una estructura anormal, lo cual suele favorecer el retorno a condiciones de hipoxia (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2006).

La hipoxia no es el único estímulo que incrementa los niveles de HIF-1 $\alpha$ . En condiciones de normoxia muchas citocinas y factores de crecimiento activadores de Receptores del tipo Tirosina Quinasa (RTKs) son también capaces de inducir HIF-1 $\alpha$ , repercutiendo sobre un incremento en los niveles de este factor transcripcional. Entre éstos se incluyen: insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), factor de crecimiento epidérmico (EGF), trombina, endotelina 1 (ET-1) y heregulina (HER2) (Caramelo y cols., 2006). De manera general, el mecanismo por el cual todos ellos inducen HIF-1 $\alpha$  incluye un incremento en la síntesis de la proteína, a diferencia de lo que ocurre en hipoxia, en la que la estabilidad del factor está asociada a una disminución en su tasa de degradación. En la figura 2 se muestran las vías principales de señalización descritas hasta el momento, que participan en la inducción de HIF-1 $\alpha$  a partir de estos factores de crecimiento, incluyen PI3K, Akt, Ras, MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), y MEK (quinasa de MAPK) (Caramelo y cols., 2006).



**Figura 2.** Mecanismo de inducción de HIF- $\alpha$  a través de RTKs. (Modificado de Caramelo y cols., 2006).

### 3.2. Acidificación del microambiente tumoral

Los tumores poseen un pH extracelular más ácido que el presente en tejidos normales (6,2-6,8 vs 7,2-7,4), como consecuencia de un incremento en el consumo y metabolismo de glucosa. Las células tumorales en condiciones de hipoxia incrementan la vía glicolítica a través de la activación de HIF que induce la expresión de transportadores de glucosa como GLUT1 y enzimas implicadas en dicha ruta, además de guiar la conversión reversible de piruvato a lactato mediante LDH-A (del inglés HIF-target gene lactate dehydrogenase A), para la obtención de ATP sin la necesidad de oxígeno. Pero como consecuencia, se produce un aumento en la producción de lactato y de CO<sub>2</sub> que contribuyen a que tenga lugar una disminución del pH extracelular, ya que el lactato se excreta de las células a través del co-transporte H<sup>+</sup>/lactato y MCT (del inglés monocarboxylate transporter) (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2006).

También se ha observado que modificaciones en el oncogen c-myc y en la vía Akt activan el metabolismo de glucosa. El oncogen c-myc induce una sobreexpresión de GLUT1, de enzimas glicolíticas y de LDH-A, dando como resultado una sobre-producción de lactato. El oncogen Akt también induce el metabolismo de glucosa (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2006).

### 3.3. Pérdida de adhesión celular en la progresión tumoral

MEC es una barrera a la migración celular. Las células que se adhieren a MEC tienen que cambiar de un fenotipo adherente a un fenotipo migratorio antes de que se puedan mover. Estos cambios requieren muchos componentes: activación de la función motora del citoesqueleto para permitir el movimiento celular, modulación de los sitios de adhesión y de las moléculas de adhesión de la superficie celular para permitir la tracción, romper la barrera fisiológica que constituye MEC y la presencia de quimioatrayentes que guíen la migración (Vu y Werb, 2000).

El crecimiento de las células de un cáncer es generalmente independiente no sólo de la presencia de suero o de factores de crecimiento, sino también de la adhesión con MEC, la cual normalmente regula el movimiento celular, el crecimiento y el remodelado tisular. Se sabe que la supervivencia de muchos tipos celulares requiere la adhesión mediada por integrinas a proteínas de la matriz extracelular, y la pérdida de esta interacción es un marcador de las células neoplásicas. Las integrinas son las principales proteínas que median la migración celular y la invasión. También desencadenan una amplia variedad de vías de traducción de señales y regulación de la organización del citoesqueleto, la expresión de genes específicos, control del crecimiento y la apoptosis, por lo que se cree que las integrinas tienen un papel en la biología de los cánceres.

Las células requieren algunas adhesiones con MEC para generar la tracción necesaria para invadir, produciéndose una sustitución de adhesiones estables por adhesiones transitorias que permitan la migración. Como consecuencia, son muchos los grupos que han estudiado los cambios que tienen lugar en la



expresión de moléculas de adhesión para permitir dicho movimiento y con ello la aparición de metástasis.

## 4. INTEGRINAS

La familia de las integrinas incluye un amplio grupo de proteínas heterodiméricas de membrana formadas por dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ , que se unen de forma no covalente a través de puentes disulfuro en las regiones ricas en cisteína. Las cadenas  $\alpha$  contienen aproximadamente entre 1000 y 1200 residuos, en cambio las cadenas  $\beta$  son glicoproteínas que tienen entre 760 y 790 residuos (<http://es.wikipedia.org/wiki/Integrina>).

Ambas cadenas del heterodímero atraviesan la membrana y poseen un dominio extracelular relativamente grande y otro citoplásmico más pequeño que se une a diversas proteínas intracelulares como vinculina, paxilina, tensina,  $\alpha$ -actinina y talina, que a su vez conectan con enzimas que desencadenan cascadas de señalización y con el citoesqueleto, principalmente se ligan a moléculas de actina, excepto las integrinas que poseen la cadena  $\beta 4$  que pueden unirse a los filamentos intermedios, como la queratina.

Se han descubierto hasta el momento 18 cadenas  $\alpha$  y 8  $\beta$ , que en conjunto pueden formar unas 25 integrinas conocidas (Kuphal y cols., 2005). Participan mayormente en la unión de las células con la matriz extracelular, aunque hay algunas que también participan en la unión célula-célula. Además, pueden ser específicas para una sola molécula o reconocer diferentes ligandos. En la tabla 1 tenemos una recopilación de las diferentes integrinas.

### 4.1. Activación de las integrinas

Las integrinas oscilan entre una conformación inactiva y otra activa. Muchas integrinas se encuentran presentes en la superficie celular en una conformación inactiva, sin estar unidas a MEC porque los lugares de unión se encuentran inaccesibles. Señales intracelulares como la estimulación de proteína quinasa C o el agrupamiento y unión a las colas de integrinas  $\beta$  a talina tras su activación por la asociación de una molécula de talina con PIPK1 $\gamma$  (del inglés phosphatidylinositol phosphate kinase type-1 $\gamma$ ), producen cambios conformacionales en las integrinas que dejan al descubierto los lugares de unión, consiguiendo una conformación activa (Legate y cols., 2006). Esta secuencia de sucesos queda resumida en la figura 3.

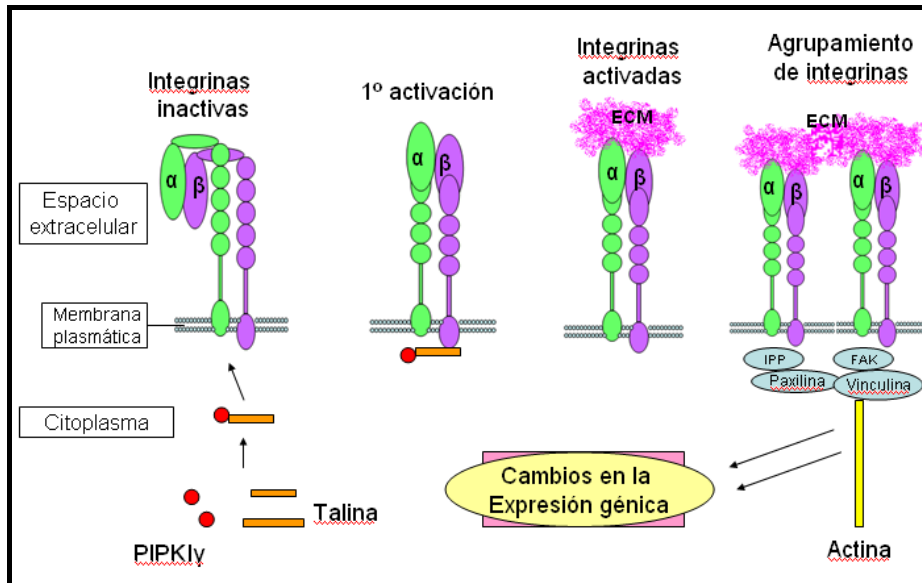
Además, la afinidad de las integrinas por sus ligandos varía y depende principalmente del estado conformacional del heterodímero que puede ser modificado por la presencia de cationes divalentes que se pueden unir en algunos casos al extremo amino terminal de la cadena  $\alpha$ , y la densidad y localización de las integrinas en la membrana.

**Tabla 1.** Lista de integrinas.

<b>Integrinas</b>	<b>Sinónimo</b>	<b>Ligando</b>
$\alpha 1\beta 1$	VLA-1, CD49a/CD29	Laminina, colágeno
$\alpha 2\beta 1$	VLA-2, GPIa-IIa, ECMRII, CD49b/CD29	Laminina, colágeno, $\alpha 3\beta 1$
$\alpha 3\beta 1$	VLA-3, VCA-2, ECMRI, CD49c/CD29	Laminina, colágeno, fibronectina, epiligrina, entactina, $\alpha 2\beta 1$
$\alpha 4\beta 1$	VLA-4, LPAM-2, CD49d/CD29	Fibronectina (CS-1), VCAM
$\alpha 5\beta 1$	VLA-5, FNR, GPIc-IIA, ECMRVI, CD49e/CD29	Fibronectina (RGD), L1-CAM, fibrinógeno
$\alpha 6\beta 1$	VLA-6, EA-I, CD49f/CD29	Laminina, merosina, kalinina
$\alpha 7\beta 1$	VLA-7, CD29	Laminina
$\alpha 8\beta 1$	VLA-8, NR	Fibronectina
$\alpha 9\beta 1$		Tenascina, VCAM-1
$\alpha 10\beta 1$		Colágeno tipo II
$\alpha 11\beta 1$		Colágeno
$\alpha v\beta 1$	VNR, CD51/CD29	Fibronectina, vitronectina
$\alpha D\beta 2$		ICAM-2, 3, 4, 5
$\alpha L\beta 2$	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha M\beta 2$	MAC-1, CD11b/CD18	iC3b, fibrinógeno, Factor X, ICAM-1
$\alpha X\beta 2$	p150, 95, CD11c/CD18	iC3b, fibrinógeno
$\alpha v\beta 3$	VNR, CD51/CD61	Vitronectina, fibronectina, factor von Willebrand, colágeno desnaturalizado, trombospondina, MMP-2, trombina, tenascina, laminina, fibrinógeno, Fisp, Del 1, Cyr 61
$\alpha IIb\beta 3$	GPIIb-IIIa, CD41/CD61	Fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand, vitronectina
$\alpha 6\beta 4$	VLA-6 <sub>alt</sub> , CD49f/CD104	Laminina
$\alpha v\beta 5$	VNR <sub>alt</sub> , CD51/CD19	Vitronectina, osteopontina, Del 1
$\alpha v\beta 6$	VNR- $\beta$ , CD51/CD61	Fibronectina
$\alpha 4\beta 7$		VCAM, MADCAM, fibronectina (CS-1)
$\alpha E\beta 7$		
$\alpha v\beta 8$		Fibronectina

## 4.2. Vías de señalización de las integrinas

Las integrinas se agrupan en los denominados complejos de adhesión focal (FA) para conducir señales bi-direccionalmente a través de la membrana celular. Se ha visto que el reclutamiento de integrinas específicas en los FA depende de la composición de MEC, sugiriendo que cambios conformacionales asociados con la unión de ligando, ayudan a regular las interacciones citoplasmáticas de las integrinas (Wozniak y cols., 2004).



**Figura 3.** Mecanismo de activación de las integrinas. Modificado de Legate y cols., 2006.

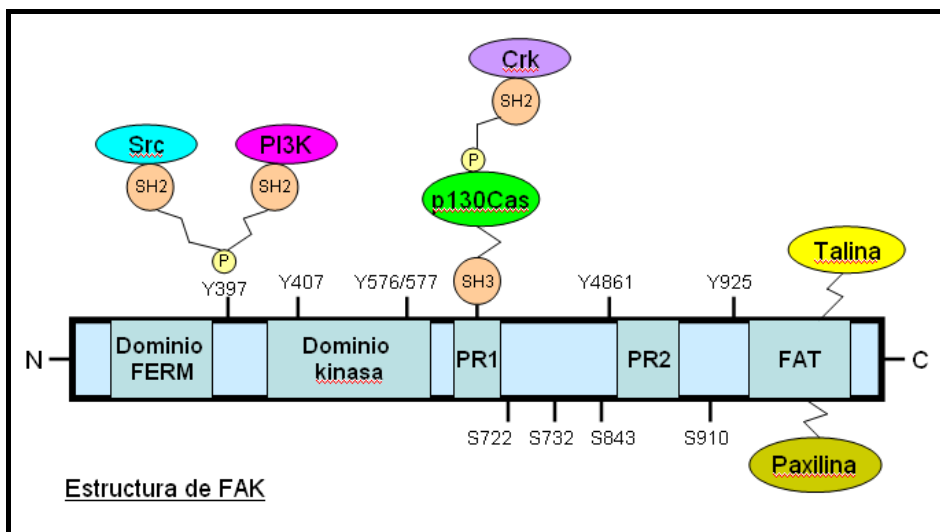
Estos FA contienen numerosas proteínas que interactúan con las integrinas y transducen las señales al interior celular, ya que las integrinas no poseen actividad catalítica intrínseca y las señales que se originan de las interacciones MEC-integrina son transducidas al interior celular a través de la activación de proteínas tirosina kinasas (PTKs). A continuación se hace una breve descripción de las diferentes proteínas que se agrupan en los FA (figura 3) para la transducción de las señales (Wozniak y cols., 2004):

- **Paxilina:** está formada por un motivo rico en prolina que se une al dominio SH3 de Src, cinco motivos LD responsables de las interacciones con proteínas como FAK y PKL, y cuatro dominios LIM en el extremo carboxilo terminal para unirse a la membrana e interactuar con fosfatasa como PTP-PEST. También puede unirse directamente a la cola citoplasmática de las integrinas  $\beta 1$  y  $\alpha 4$ . La unión de la paxilina a la subunidad  $\alpha 4$  inhibe la migración dependiente de  $\alpha 4\beta 1$ .

Los lugares de fosforilación de la paxilina son Tyr31 y Tyr118. Dependiendo del tipo celular y de la interacción con Crk, la fosforilación de la paxilina puede producir un incremento de la migración celular o una disminución de la misma (Wozniak y cols., 2004).

- **Talina:** se une a través de su dominio FERM (Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin), presente en el extremo N-terminal, a los motivos conservados NPXY (donde X es cualquier aminoácido), presentes en las colas de la integrina  $\beta$ , lo que regula la fosforilación de esta integrina por Src, que produce una pérdida de unión de la integrina con la talina. La presencia de talina es necesaria para el reclutamiento de paxilina en los sitios de adhesión, pero no es necesaria para la fosforilación de FAK y Src. La talina se une y activa isoformas específicas de PIPK1 $\gamma$  (del inglés phosphatidylinositol(4) phosphate 5 kinase type 1 $\gamma$ ). La asociación entre la talina y PIPK1 $\gamma$  produce PtdInsP2 (del inglés phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), que se piensa incrementa el agrupamiento de integrinas. PIPK1 $\gamma$  y las integrinas se unen en el mismo sitio a la talina. Por tanto se cree, que Src puede regular las adhesiones focales mediante la modulación de la unión de la talina con PIPK1 $\gamma$  o con las colas de la integrina  $\beta$  (Wozniak y cols., 2004).
- **Vinculina:** contiene un extremo amino terminal ácido y un extremo carboxilo terminal básico, separados por un segmento rico en prolina. El dominio globular contiene sitios de unión a talina y  $\alpha$ -actinina, así como un residuo de tirosina susceptible de fosforilación, mientras que la región de la cola tiene sitios de unión para la actina F, paxilina y lípidos.
- **Kinasa de adhesión focal (FAK):** es una tirosina quinasa de 125KDa, localizada en las adhesiones focales mediante su dominio diana de adhesión focal (FAT) en el carboxilo terminal. Además del dominio FAT, FAK contiene un dominio FERM en el extremo amino terminal y dos motivos ricos en prolina, los cuales permiten a la proteína interactuar con múltiples vías de señalización, como se muestra en la figura 4.

El dominio FERM juega un papel autoinhibitorio que es suprimido mediante la interacción con la cola citoplasmática de la integrina  $\beta 1$ . A través de los motivos ricos en prolina, FAK se une al dominio SH3 de p130Cas y el dominio LD2 de la paxilina, para la fosforilación de ambas.



**Figura 4.** Dominios de FAK y su interacción con otras proteínas. Modificado de Cox y cols., 2006.

- **Src:** se activa cuando se une mediante su dominio SH2 al residuo fosforilado Y397 de FAK (figura 3). Una vez activada, Src fosforila varios componentes de los complejos focales incluyendo FAK, p130Cas y paxilina, con los que interacciona a través de su dominio SH3. Recientemente, se ha visto que quinasas de la familia Src se unen directamente a los dominios citoplasmáticos de las integrinas  $\beta$ , lo que promueve un mecanismo para la activación de Src por integrinas (Wozniak y cols., 2004).
- **P130Cas:** es una gran molécula adaptadora que contiene un dominio SH3 seguido de una región de prolina, un dominio sustrato compuesto por 15 motivos YXXP, un dominio rico en serina y un dominio carboxilo terminal con una secuencia consenso para la unión del dominio SH2 de Src (figura 3). P130Cas se localiza en las adhesiones focales mediante su asociación con Fak a través de su dominio SH3, así como por unión a Src a través del motivo YDYV. La fosforilación de los motivos YXXP, son sitios de unión para diversas moléculas como Crk, Nck y PTP-PEST (Wozniak y cols., 2004).
- **Crk:** interacciona mediante su dominio SH2 con p130Cas fosforilada (figura 3). La fosforilación de Crk en la tirosina 221 es importante para la localización de la proteína en la membrana así como para la activación de Rac.

#### 4.2.1. Activación del complejo FAK-Src

Tras la unión del ligando a la integrina, FAK es reclutada en los lugares de agrupamiento de los dominios citoplasmáticos de las integrina- $\beta$ , ayudada por la asociación de proteínas de unión a integrinas, talina y paxilina. La cola citoplasmática de las integrinas  $\beta$ , estimula la autofosforilación de FAK en el residuo Y397, creando un sitio de alta afinidad para el dominio SH2 de SFKs, lo que produce la unión de Src a FAK.

Src y p130Cas contienen dominios de interacción SH2 y SH3 que reconocen, respectivamente, tirosinas fosforiladas y motivos ricos en prolina (PR1 y PR2). El dominio SH2 de Src se une al residuo Y397 fosforilado de FAK, lo que produce una activación máxima de FAK al fosforilarla dentro de su dominio quinaasa en los residuos Y576, Y577, y dentro del dominio carboxilo terminal en los residuos Y861 e Y925. La fosforilación de los residuos Y861 e Y925, crea lugares de unión para otras moléculas que contienen dominios SH2 como Grb2, los que comunican a FAK con la activación de las vías Ras y MAPK. La regulación de la actividad de Src viene dada por fosforilación del residuo Y416 que la activa o por fosforilación en Y527 que la inhibe (Mittra y Schlaepfer, 2006).

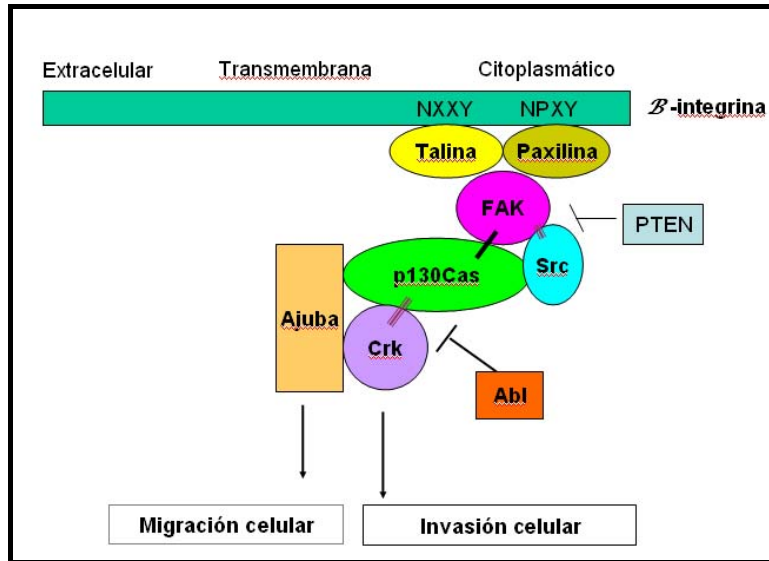
El dominio SH3 de p130Cas se une a los dominios PR1 y PR2 en el dominio terminal de FAK, así como al dominio de unión a Src (SBD) se une a Src a través de su dominio SH3. Ambas proteínas, FAK y Src pueden fosforilar a p130Cas dentro de su dominio sustrato (SD) en múltiples sitios que promueven la

unión de Crk a p130Cas. El dominio sustrato de p130Cas contiene 15 motivos YXXP, que son sitios de unión para el dominio SH2 de la proteína adaptador Crk.

Estas interacciones entre FAK, Src y p130Cas estabilizan el complejo de señalización FAK-Src (figura 5), mientras que la fosforilación de Crk en el residuo Y221 por la proteína Abl previene la unión de Crk a p130Cas, pudiendo ser una regulación negativa de la señalización p130Cas-Crk (Mitra y Schlaepfer, 2006). Recientemente, se han encontrado otras dos proteínas que se unen y regulan el funcionamiento de p130Cas, que son p140Cap y Ajuba (Mitra y Schlaepfer, 2006). Mientras que el mecanismo por el que p140Cap inhibe la expansión celular es aún desconocido, se sabe que la expresión de Ajuba estabiliza a p130Cas en los lugares de agrupamiento de integrinas y ayuda a una unión efectiva entre p130Cas-Crk para la activación de Rac dando lugar a la migración celular y/o para la activación de JNK y ERK2 implicadas en la activación de metaloproteinasas de la matriz que promueven la invasión celular (Khupad y cols., 2005; Mitra y Schlaepfer, 2006).

Las funciones de las integrinas también pueden ser negativamente reguladas por PTEN (del inglés phosphatase and tensin homologue deleted on the cromosoma 10) (Tamura y cols., 1999). PTEN inhibe la migración celular y la invasión mediante antagonización de las interacciones de las integrinas con MEC y las vías de señalización desencadenadas (Tamura y cols., 1999). Sin embargo, debemos tener en cuenta que PTEN se encuentra frecuentemente mutada en el melanoma maligno humano, por lo que perdería su capacidad inhibitoria de la migración e invasión celular.

Dos sustratos de PTEN son la quinasa de adhesión focal (FAK) y la proteína adaptadora Shc (Tamura y cols., 1999). PTEN desfosforila a FAK en condiciones normales (figura 5), produciéndose como consecuencia la inhibición de la extensión celular mediada por las integrinas, la migración y la invasión. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, PTEN se encuentra mutado en el melanoma maligno humano con elevada frecuencia, dando lugar a una proteína inactiva que no es capaz de llevar a cabo la desfosforilación de FAK. Esto conlleva su activación constitutiva y el consecuente aumento de la migración y supervivencia celular, a través de la activación de PI3K/Akt (Tamura y cols., 1999), que protege de la apoptosis y es una ruta de señalización para la síntesis de HIF-1 $\alpha$  y por lo tanto la transcripción de genes relacionados con la hipoxia como genes angiogénicos y de remodelado vascular que junto a la capacidad migratoria de las células tumorales favorecería la metástasis.



**Figura 5.** Señalización a través de FAK-Src. Modificado de Mitra y cols., 2006.

#### 4.2.2. Activación del complejo Grb2-SOS

La fosforilación de FAK en el residuo Y925 genera un sitio de unión en el dominio SH2 de la proteína adaptadora Grb2 (del inglés growth factor receptor bound-2) (Mitra y cols., 2006), iniciándose otra vía de señalización que comunica a FAK con la activación de las vías Ras y MAPK como se ha mencionado anteriormente. Grb2 está formada de un dominio central SH2, conocido para unir residuos de fosfotirosina y dos dominios SH3 amino y carboxilo- terminal. El dominio SH3 de Grb2 interactúa con la proteína SOS (del inglés Ras guanine nucleotide Exchange factor), la cual modula la actividad de Ras, finalmente resultando en la activación de Raf-1 y las MAPKs (Mitra y Schlaepfer, 2006).

Otra vía para la activación de Ras es a través de Shc (del inglés SH2 containing proto-oncogene involved in growth factor signaling) (Ravichandran, 2001). Se han identificado tres genes en mamíferos y sus productos se denominan ShcA, ShcB y ShcC. En mamíferos la expresión de ShcA es ubicua, mientras que la expresión de ShcB y ShcC parece estar limitada a células neuronales (Ravichandran, 2001). Existen tres isoformas de ShcA de 46, 52 y 66 kDa (todas generadas del mismo mensajero que sufre splicing del RNA o comienza por un punto alternativo de iniciación de la transcripción) (Ravichandran, 2001).

La fosforilación de Shc por parte de FAK facilita su interacción con Grb2, y como consecuencia Grb2 se une a SOS. El complejo Shc-Grb2-SOS se localiza en la membrana a través de la unión de Shc con el receptor fosforilado (Ravichandran, 2001).

### 4.2.3. Activación del complejo IPP

El complejo IPP es un importante regulador de las señales mediadas por integrinas, y está formado por ILK (del inglés integrin-linked kinase), la proteína adaptadora PINCH y parvina. A continuación se detallan algunas características de cada componente del complejo antes de explicar el funcionamiento del mismo (Kyle y cols., 2005):

- **ILK:** es una serina/treonina kinasa que se expresa de forma ubicua y se une directamente al dominio citoplasmático de la subunidad  $\beta$  de las integrinas. El dominio amino terminal contiene tres ANK (del inglés ankyrin repeats) esenciales para la unión a las proteínas PINCH-1 y PINCH-2, ILKAP (del inglés ILK-associated protein serine/threonine phosphatase of the PP2C family), y para la localización de ILK en las adhesiones focales. El dominio catalítico con actividad kinasa del extremo carboxilo terminal de ILK media la interacción con las subunidades de la integrina  $\beta$ , con las proteínas de unión a  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -parvina, con lo que establecen conexión con el citoesqueleto de actina y con el motivo LD1 de la paxilina. Y entre ambos extremos se encuentra el dominio PH (del inglés pleckstrin homology domain). Cultivos celulares han permitido determinar que el ligando del dominio PH de ILK es PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (del inglés phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) (Kyle y cols., 2005).
- **PINCH:** existen dos isoformas PINCH1 y PINCH2, ambas proteínas adaptadoras formadas por señales de localización nuclear en tandem y cinco dominios LIM (motivos en tandem de dedos de zinc ricos en cisteína), que les permiten unirse a ILK de manera mutuamente excluyente (Kyle y cols., 2005).
- **Parvinas:** familia de proteínas con tres miembros:  $\alpha$ -parvina (actopaxin/CH-ILKBP/ $\alpha$ -parvin),  $\beta$ -parvina (affixin/ $\beta$ -parvin) y  $\gamma$ -parvina. Se unen a ILK a través del segundo de sus dos dominios CH (del inglés calponin homology domain) (Kyle y cols., 2005):

Zhang y cols. (2002) determinaron que el complejo IPP se forma en el citosol independientemente de señales de adhesión. Y después, alcanzan su localización final en las adhesiones focales a través de su unión directa mediante ILK a las colas citoplasmáticas de las integrinas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 3, o de manera indirecta según describió Nikolopoulos y cols. (2000) mediante la proteína adaptadora paxilina, que a su vez se une a  $\alpha$ -parvina y vinculina conectando el complejo IPP con los filamentos de actina del citoesqueleto.

La formación del complejo ILK-PINCH-parvina es esencial para su localización en FAs y estabiliza las proteínas protegiéndolas de la degradación en el proteosoma.

La activación del complejo IPP puede tener lugar por diferentes desencadenantes:



- Activación de integrinas por unión de su ligando.
- Activación de receptores tirosina quinasa tras la unión del correspondiente factor de crecimiento.
- Fosforilación del componente ILK del complejo IPP a través de PI3K.
- Mediante unión a ILK de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>.

Una vez activado, son varias las vías de señalización afectadas por el complejo IPP entre las que se encuentran la vía de señalización GSK3 $\beta$  (del inglés glicogen sintasa quinasa-3 $\beta$ ), de Akt/PKB, de JNK (del inglés, Jun N-terminal kinase) y reguladores de GTPasas de bajo peso molecular entre las que se ven afectados Rac1 y Cdc42, ambas GTPasas que regulan la polimerización de la actina (Kyle y cols., 2005).

### 4.3. Implicación de FAK en la progresión tumoral

#### 4.3.1. Proliferación

Se ha comprobado que FAK tiene un papel importante en la regulación de la progresión del ciclo celular. El paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular está regulado por inhibidores de cdk, ciclinas y genes supresores de tumores de la familia Ink4 (Chatzizacharias y cols., 2008).

Zhao y su equipo observaron que FAK incrementa la transcripción del gen de la ciclina D1, lo cual tiene lugar por un incremento en la unión entre el factor de transcripción Ets y el elemento Ets B presente en el promotor de la ciclina D1 (Zhao y cols., 2001). Esto tiene lugar cuando FAK a través de la proteína adaptadora Grb2 activa secuencialmente a Ras/Raf1/MEK1/Erk2, y Erk2 fosforila al factor de transcripción Ets activándole e induciendo la transcripción de la ciclina D1 y el consecuente incremento de la proliferación celular (Cox y cols., 2006).

Esta misma vía para la activación de Erk2 también puede ser inducida por Nck, la cual es activada por Crk tras la unión de Fak activada con p130Cas. Y a través de la activación de PI3K por FAK y la subsecuente activación de Rac que activa la ruta a nivel de MEK (Sheta y cols., 2000).

Además, el mismo grupo de Zhao describió en 2003 que FAK también regula la expresión de KLF8, que a su vez activa directamente la transcripción de la ciclina D1 mediante unión directa con la caja GT del promotor de dicha ciclina (Zhao y cols., 2003).

Así, FAK regula la progresión del ciclo celular en células normales y tumorales a través del control transcripcional de la ciclina D1 mediante un aumento en la unión al promotor o expresión de los factores de transcripción Ets B y KLF8, respectivamente (Cox y cols., 2006). Adicionalmente al incremento en la expresión de ciclina D1, una sobreexpresión de FAK produce una disminución de los inhibidores de cdk, p27<sup>Kip1</sup> y P21<sup>Waf1</sup>, lo que conjuntamente facilita la progresión del ciclo celular. (Cox y cols., 2006).

Una explicación para el crecimiento celular independiente de anclaje, la dio Novak y su equipo en 1998, al observar que GSK-3 $\beta$  es un regulador negativo de la vía Wnt y que la inactivación de esta ruta provoca la estabilización e incremento de los niveles de  $\beta$ -catenina (Novak y cols., 1998). El aumento de  $\beta$ -catenina permite la translocación de dicha molécula al núcleo donde se asocia con los factores de transcripción Lef-1/Tcf para la activación de genes como c-myc y la ciclina D1, lo que de nuevo permitiría de progresión del ciclo celular (Chatzizacharias y cols., 2008).

#### 4.3.2. Supervivencia

Las células están adheridas entre sí y a la ECM, cuando estos contactos se pierden se activa una forma de apoptosis denominada anoikis, con el fin de prevenir la diseminación de células y con ello la aparición de cáncer.

Sin embargo, se sabe que FAK puede promover la supervivencia celular a través de diferentes mecanismos (Chatzizacharias y cols., 2008):

1. Mediante unión del dominio de transactivación de p53 con la secuencia de aminoácidos 206-422 del extremo amino terminal de FAK.
2. Mediante un incremento en la activación de AKT mediada por la unión del producto de PI3-K (del inglés, phosphatidylinositol 3-kinase), PIP3, lo que produce una supresión en los niveles de caspasas y promueve una elevación en el ratio Bcl-2/Bax, además de suprimir la apoptosis mediada por p53 (Schlaepfer y cols., 2004) y de inhibe directamente la apoptosis mediante fosforilación e inactivación de la proteína pro-apoptótica Bad. La completa activación de Akt requiere la fosforilación de la treonina 308 por PDK1 (del inglés, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-dependent kinase-1) y en el residuo de serina 473 por PDK2.
3. Melkougian y su equipo en el año 2005 describieron la existencia de una vía a través de la cual FAK puede inhibir la función de p53 de manera independiente de la vía PI3-K, mediante la asociación con la proteína FIP200 (del inglés FAK-interacting protein 200 kDa) (Melkougian y cols., 2005). Esta proteína se puede unir a p53 y aumentar su vida media, produciendo una sobreexpresión de FIP200 un aumento en los niveles de p21<sup>Waf1</sup> que llevan a la parada del ciclo celular en la fase G1 (Melkougian y cols., 2005). Es posible que la asociación FIP200/FAK compita con la unión FIP200/p53, y bajo una expresión limitada de FAK, FIP200 se une a p53 lo cual podría actuar aumentando la expresión de p53. En el caso contrario, si la expresión de FAK es elevada podría incrementar las señales de supervivencia celular mediante su unión a FIP200, lo que limitaría la posibilidad de interacción entre FIP200 y p53 (Mitra y Schlaepfer, 2006).

### 4.3.3. Migración

Las células cancerosas tienen la capacidad de migrar y establecerse en sitios alejados del foco primario formando con ello las denominadas metástasis. Se ha comprobado que FAK regula la migración celular a través de diferentes mecanismos (Chatzizacharias y cols., 2008):

1. Fosforilación mediada por Src de p130Cas, en la tirosina que le permite la unión a FAK. Esto produce la activación de la ruta Crk/DOCK180/Rac y con ello la formación de lamelipodios (Mittra y Schlaepfer, 2006).
2. Rac también puede ser activada a través de PI3K tras su unión a FAK.
3. Activación de Pak1, que es la diana cascada debajo de Rac. La activación de Ets mediante interacción directa con FAK, permite que Ets se una y active a Pak1 induciendo la migración celular.

Las Rho GTPasas pueden ser clasificadas en cinco subfamilias: Rho, Rac, Cdc42, Rnd y RhoBTB. Existen otras tres Rho GTPasas, denominadas RhoD, Rif y RhoH/TTF, que no pueden ser incluidas en ninguna subfamilia debido a la escasa información que se tiene de ellas.

Las Rho GTPasas están continuamente ciclando entre un estado inactivo, cuando se encuentran unidas a GDP, y un estado activo cuando tienen unido GTP que les permite reorganizar el citoesqueleto celular para que tenga lugar la migración. Rac se sitúa en el frente celular para regular la polimerización de actina que dará lugar a la formación de lamelipodios, por lo que es la encargada de inducir la formación de una morfología polarizada. Rho por su parte es requerida para regular las fuerzas de contracción y de retracción en la parte trasera de la célula mediante la formación de fibras de estrés. Cdc42 se sitúa en el frente de avance junto a Rac, para inducir la polimerización de la actina en la formación de filopodios (Nobes y Hall, 1995).

Las integrinas pueden estimular la activación de la vía Rho GTPasas a través de diferentes rutas. La más importante parece ser la activación mediante FAK a través de diferentes vías (Brakebusch y Fässler, 2003):

1. El complejo p130Cas-Crk-DOCK180 puede activar a Rac1 promoviendo la formación de lamelipodios.
2. PI3K puede estimular la activación de moléculas de GEF necesarias a su vez para la activación de las Rho GTPasas a través de la formación de PIP3, que estimula a su vez a las Rho GTPasas.
3. FAK puede interaccionar directa o indirectamente mediante la paxilina con la molécula adaptadora GIT1 y con GEFs que activan a Rac1 y a Cdc42.
4. Las quinasas Src son capaces de activar a GEFs mediante fosforilación.

Sin embargo, recientemente se han observado indicios de que las Rho GTPasas también son estimuladas por ILK y por ICAP-1 (del inglés integrin cytoplasmatic domain-associated protein-1). Se ha visto que ICAP-1 se une a Rac1 y a Cdc42 secuestrándolas en su forma inactiva en el citoplasma. Bajo ciertas condiciones, ICAP-1 se une a la integrina  $\beta 1$ , liberando la inhibición de las Rho GTPasas promoviendo la migración celular.

#### 4.3.4. Invasión

Las células cancerosas tienen la capacidad de invadir a través de dos mecanismos (Chatzizacharias y cols., 2008):

1. Mediante la secreción, tras la activación de Erk, de  $\mu$ -calpaina y la secreción inducida por JNK de las metaloproteasas de la matriz MMP-9, MMP-2 y uPA (del inglés urokinase proteolytic activator), que provocan un incremento en la actividad proteolítica de la matriz y por lo tanto facilitan la invasión celular.  
Además, Zend y cols. (2006) sugirieron que la activación de PI3K inducida por FAK, da lugar a la formación de PIP3, lo que activa a PKC (del inglés protein kinase C) dando como resultado la secreción de MMP-1 y la invasión de las células cancerosas.
2. Mediante disminución de moléculas de adhesión en la superficie celular.

#### 4.3.5. Angiogénesis

Además de la capacidad de invasión de las células cancerosas, otro parámetro importante para el crecimiento tumoral y la metástasis es el crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes, proceso denominado angiogénesis. Algunos datos sugieren que FAK promueve la angiogénesis, al menos en parte, promoviendo la migración de células endoteliales. Siendo también importante la activación de Erk a través de las diferentes vías anteriormente descritas, ya que se ha demostrado que Erk promueve la transcripción de VEGF (del inglés vascular endotelial growth factor), que estimula la división y la migración de células endoteliales (Mitra y Schlaepfer, 2006; Sheta y cols., 2001).

#### 4.4. Implicación de ILK en la progresión tumoral

La actividad quinasa de ILK es dependiente de PI3K e implica la unión de PIP3 con el dominio de homología central pleckstrina. ILK fosforila AKT en la serina 473 en células tumorales e inhibe a GSK3 $\beta$  a través de la fosforilación en la serina 9. La actividad de ILK está regulada negativamente por ILKAP (del inglés ILK-associated protein phosphatase) y PTEN (Hehlgans y cols., 2006).

La activación transcripcional de ILK y su posterior actividad quinasa, activa AKT y promueve la supervivencia de las células. Después de AKT, ILK también controla a GSK3 $\beta$  está implicada en la regulación del ciclo celular a través de la proteólisis de la ciclina D1 dependiente de GSK3 $\beta$  y la activación transcripcional dependiente de AP-1. La regulación adicional de la expresión de la ciclina D1 es mediada directamente por ILK mediante la translocación al núcleo de  $\beta$ -catenina lo que produce la activación transcripcional de la ciclina D1 a través Lef/Tcf (Brakebusch y Fässler, 2003).

Otro gen que parece ser regulado transcripcionalmente por ILK es el que codifica para MMP-9 (metaloproteínasa de la matriz 9). Si se incrementan los niveles de ILK, se aumenta la transcripción de MMP-9 a través de la activación del factor de transcripción AP-1 (Hehlhans y cols., 2006).

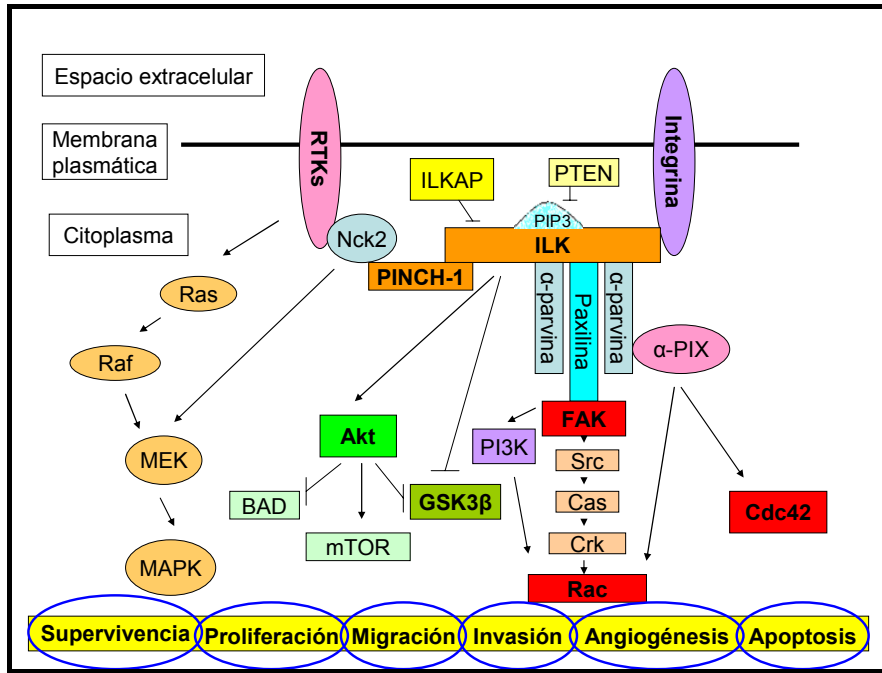
ILK también regula la organización del citoesqueleto, la morfología celular y la migración, mediante la unión de  $\beta$ -parvina a  $\alpha$ -PIX (Kyle y cols., 2005), se establece una conexión entre el complejo IPP y las GTPasas Rac1 y Cdc42, capaces de modificar la organización del citoesqueleto de actina para facilitar la migración celular.

Por último, se ha observado que ILK también regula la angiogénesis a través de la estimulación de la expresión de VEGF.

Con todo lo que se ha expuesto, parece claro que ILK está implicada en la supervivencia celular, y por lo tanto, es obvio que también tiene un papel importante en cáncer. De hecho, se ha visto nivel elevados en la expresión de ILK en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el melanoma maligno, frecuentemente asociado con sucesos de metástasis.

#### 4.5. Relación entre integrinas y receptores de factores de crecimiento

Las integrinas y los receptores de factores de crecimiento pueden activar vías paralelas que se cruzan a nivel de fosforilación de algunas proteínas señalizadoras cascada abajo. Además, la adhesión mediada por integrinas puede agrupar y transactivar algunos receptores tirosina kinasa (RTKs) como PDGFR y EGFR y VEGFR. Por tanto la transactivación de RTKs mediada por integrinas puede suceder en ausencia de factor de crecimiento (Danen y Sonnenberg, 2003).



**Figura 6.** Interacción entre las vías de señalización activadas por receptores de factores de crecimiento e integrinas. Modificado de Hehlhans y cols., 2006.

La conexión entre las vías de señalización mediadas por integrinas y las mediadas por receptores de factores de crecimiento es a través de la proteína Nck2, ya que esta proteína reconoce los receptores de factores de crecimiento EGFR y PDGFR a través de su dominio SH2 en el carboxilo termina (Brakebusch y Fässler, 2003).

En resumen, la estructura y señalización de la proteína ILK sirve como unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto vía integrinas, paxilina y parvitas, y junto con las proteínas adaptadoras PINCH y Nck2, entre las integrinas y receptores tirosina kinasa.

## 5. SEÑALIZACIÓN DE INTEGRINAS EN EL MELANOMA

Las interacciones entre célula-matriz cambian cuando estudiamos el tipo de adhesiones que encontramos en melanocitos normales comparado con las que se encontramos en las células de melanoma. En melanocitos normales la adhesión a la matriz tiene lugar mediante colágeno IV y laminina, mientras que en el caso de melanoma predominan receptores de unión a colágeno I y vitronectina. Los cambios en la composición de receptores de adhesión a la matriz suelen reflejar la capacidad de las células de melanoma de invadir la dermis desde su posición en la epidermis.

## 5.1. Detección de subunidades de integrinas en melanoma

El estudio de melanomas primarios y metastáticos *in situ* ha permitido observar un aumento de los niveles de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ , mientras que los niveles de  $\alpha 6$  están disminuidos. Ziober y cols. (1999) demostraron que en células en cultivo con bajo potencial metastático, los niveles de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 6$  son indetectables. Sin embargo, cuando se estudian secciones de tejido de pacientes con melanoma con elevada capacidad metastático, se observa un incremento de los niveles de  $\alpha 1$  y  $\alpha 6$  (Khupad y cols., 2005).

En el caso de integrinas  $\beta$ , se ha observado que los niveles de  $\beta 1$  y  $\beta 3$  están incrementados en melanoma humano metastático comparado con melanocitos normales. De hecho,  $\beta 3$  se considera uno de los marcadores más específicos en la transición de la fase de crecimiento radial a la fase de crecimiento vertical (Khupad y cols., 2005).

## 5.2. Detección de integrinas heterodiméricas en melanoma

Algunas integrinas aumentan su expresión mientras otras disminuyen sus niveles durante la progresión tumoral, y otras cambian su patrón de fosforilación afectando a sus propiedades en la unión a ligandos extracelulares así como a la unión con el citoesqueleto (Mizejewski. 1999). Además, las células metastáticas de diferentes tejidos de origen pueden utilizar distinta combinación de integrinas-ligando para colonizar el mismo órgano diana. Por ejemplo, para colonizar el nódulo linfático las células de melanoma unen  $\alpha \beta 3$  a vitronectina, mientras que las células de cáncer de mama unen  $\alpha 3 \beta 1$  a fibronectina (Felding-Habermann, 2003).

La progresión del melanoma maligno humano está correlacionada con un aumento en la expresión de las integrinas  $\alpha 3 \beta 1$ ,  $\alpha 4 \beta 1$ ,  $\alpha 5 \beta 1$   $\alpha \beta 3$  en los melanomas primarios y metastáticos, además de asociarse con cambios en la expresión de  $\alpha 6 \beta 1$ . La integrina  $\alpha 3 \beta 1$  se ha observado cambia el patrón de glicosilación durante la progresión tumoral en la línea celular tumoral de melanoma A375 para adquirir mayor capacidad invasiva. En el caso de  $\alpha 4 \beta 1$ , parece que es una integrina que inicia el crecimiento y expansión de las células de melanoma e incrementa su expresión junto a  $\alpha 6 \beta 1$  que se ha demostrado estimula la producción de MMP-2, correlacionándose ambas integrinas con la aparición de metástasis (Mizejewski. 1999). Una vez desarrollados melanomas metastáticos, hay una disminución en los niveles de las integrinas  $\alpha 1 \beta 1$ ,  $\alpha 2 \beta 1$  y  $\alpha 6 \beta 1$  comparado con los melanomas primarios (Khupad y cols., 2005).

Las integrinas  $\alpha 5 \beta 1$  y  $\alpha \beta 3$  no están presentes en melanocitos normales según se ha podido determinar en análisis *in situ*, sin embargo, se expresan en melanomas avanzados y metástasis, sugiriendo que estas integrinas pueden tener valor pronóstico (Mizejewski. 1999). La integrina  $\alpha 5 \beta 1$  previene del proceso apoptótico al activar la vía Bcl-2 cuando las células están unidas a fibronectina. La integrina  $\alpha \beta 3$  también es importante para la adhesión de las células de melanoma al colágeno y la supresión de la apoptosis mediante la

alteración del ratio Bcl-2:Bax. Cuando se cultivan células de melanoma que sobre-expresan  $\alpha_v\beta_3$  sobre una capa de vitronectina, hay un incremento en la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) y Src, que produce un aumento de la supervivencia celular y de la migración, confiriéndoles mayor capacidad metastático (Haass y cols., 2005). Además, cuando a  $\alpha_v\beta_3$  se le une alguno de sus ligandos, fibronectina y vitronectina, esta integrina induce la expresión de MMP-2 en las células de melanoma, siendo esta metaloproteasa capaz de degradar el colágeno de la membrana basal lo que facilita la migración e invasión de las células tumorales (Khupad y cols., 2005).

Por otra parte, se ha comprobado que la expresión de la integrina  $\alpha_6\beta_4$  incrementa la transcripción y traducción de VEGF, por mediación de la habilidad de  $\alpha_6\beta_4$  para activar la vía de señalización PI3K/Akt (Felding-Habermann, 2003). Actuando la producción de VEGF no sólo como promotor de la angiogénesis, sino también como estimulador del crecimiento de las células tumorales de manera autocrina.

## 6. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE CADHERINAS

En condiciones normales, la homeostasis determina si la célula debe quedarse en estado quiescente, proliferar, diferenciarse o entrar en apoptosis. En este estado de homeostasis, como se ha comentado al comienzo del trabajo, además del microambiente que rodea a las células tumorales, también las células vecinas, en este caso los queratinocitos, controlan el crecimiento de los melanocitos y su comportamiento a través de un complejo sistema de factores de crecimiento paracrinos y de moléculas de adhesión célula-célula denominadas cadherinas.

Las cadherinas son glicoproteína transmembrana monopaso responsables de las uniones célula-célula mediante la creación de uniones hemofílicas dependientes de  $Ca^{2+}$ , lo cual significa que se unen preferentemente a otras células que expresan la misma cadherina. Son específicas del tipo celular, existiendo varios tipos de cadherinas divididas en dos grandes grupos ([http://es.wikipedia.org/wiki/Mol%C3%A9cula\\_de\\_adhesi%C3%B3n\\_celular](http://es.wikipedia.org/wiki/Mol%C3%A9cula_de_adhesi%C3%B3n_celular)):

### 1º Cadherinas clásicas o tradicionales:

- Cadherina-E. Presente en hígado, en los epitelios y en el embrión de mamíferos antes de su nidación en el útero.
- Cadherina-N. En células nerviosas, corazón, músculo esquelético, fibroblastos y en células del cristalino.
- Cadherina-P. Epidérmica, placentaria y en algunos organismos en tejidos embrionarios.
- Cadherina-V. Presente en células epiteliales que revisten a los vasos sanguíneos.



## 2º Cadherinas no-clásicas o no tradicionales:

- Demogleína y desmocolina. Aparecen en células epiteliales de la piel (en desmosomas).
- Cadherina-T. Aparece en neuronas y en células musculares.
- Protocadherina. Aparecen en neuronas.

Alteraciones en este delicado balance homeostático, puede llevar a una expresión diferente de moléculas de adhesión célula-célula y moléculas de comunicación celular, que puede ser el comienzo del melanoma.

En la piel humana, la E-cadherina se localiza en los bordes intercelulares entre los melanocitos y los queratinocitos. Los niveles de E-cadherina en melanocitos pueden ser regulados por la exposición de la piel a la radiación ultravioleta (UV), ya que se ha observado en diversos experimentos, que la UV que incide sobre los queratinocitos guía la liberación paracrina de endotelina-1, la cual puede reducir la expresión de E-cadherina en los melanocitos. La pérdida de E-cadherina parece ser uno de los pasos críticos para que los melanocitos escapen al control del crecimiento ejercido por los queratinocitos y que las células tumorales escapen del foco primario (Haass y cols., 2004).

Durante el desarrollo y progresión del melanoma maligno humano, la expresión de E-cadherina desaparece, apareciendo una sobreexpresión de N-cadherina. Este cambio en la expresión de cadherinas produce un cambio en el patrón de unión de los melanocitos a los queratinocitos, que ahora tienen preferencia por asociarse con fibroblasto y células endoteliales vasculares. Adicionalmente, el incremento de N-cadherina se ha visto media la supervivencia a través de la activación de la vía PI3K que produce una disminución del factor pro-apoptótico Bad. De hecho, se ha visto que cuando se bloquea la N-cadherina se produce un incremento en el número de células de melanoma apoptóticas (Haass y cols., 2004).

Además, la E-cadherina está implicada en la inhibición por contacto del crecimiento celular a través de la inducción de la parada del ciclo celular. Parece que la E-cadherina tiene la capacidad de parar el ciclo celular a través de p27, un inhibidor quinasa dependiente de ciclina, aunque no se conoce el mecanismo por el que actúa (Wijnhoven y cols., 2000). Se cree que puede ser a través de la vía mitogénica activada por EGFR (del inglés epidermal growth factor receptor) que regula los niveles de p27. Pero al perder las células de melanoma la expresión de E-cadherina, también se pierde este mecanismo de inhibición del crecimiento por contacto.

Las células de melanoma escapan a este control por parte de los queratinocitos a través de tres mecanismos principales (Haass y cols., 2005):

1. Mediante una menor regulación de los receptores implicados en la comunicación con los queratinocitos, como puede ser la E-cadherina, P-cadherina, desmogleina y conexasinas, las cuales están controladas a su vez por factores de crecimiento producidos por los fibroblastos o los queratinocitos.

2. La presencia de receptores y moléculas de señalización que no están presentes en melanocitos normales pero son importantes en las interacciones entre células de melanoma o entre células de melanoma y fibroblastos, como pudiendo mencionar N-cadherina, Mel-CAM y ZO-1 (del inglés zonula occludens protein-1).

3. Pérdida de anclaje a la membrana basal por la alteración de la expresión de la familia de las integrinas de unión a la matriz extracelular.

Los receptores de adhesión célula-célula muestran cambios durante la progresión tumoral. En los melanocitos normales encontramos que la unión con los queratinocitos tiene lugar mediante E-cadherina, mientras que en melanoma predomina la N-cadherina. Incluso si las células de melanoma expresan E-cadherina, ésta suele ser no funcional.

## 7. SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Esta superfamilia comprende aquellas proteínas que tienen uno o más dominios extracelulares homólogos a las inmunoglobulinas. Pueden subdividirse en dos tipos (<http://encolombia.com/alergia8399molculas18.htm>):

- Tipo C1: involucradas en el reconocimiento de los antígenos; se incluyen aquí los receptores antigénicos de los linfocitos T y B, los anticuerpos, y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.
- Tipo C2: proteínas de adhesión celular y fijadoras del complemento, incluye moléculas de acciones muy diversas, desde adhesión neuronal (NCAM), coestimulación celular (CD28, CD80, CD86, CTLA-4) y moléculas de adhesión que en algunos casos son ligandos para las integrinas (aunque en algunos casos realizan interacciones homofílicas, como el CD31).

**Tabla 2.** Principales moléculas de adhesión dentro de la familia de inmunoglobulinas

Inmunoglobulina	Sinónimo	Ligando
ICAM-1	CD54	LFA-1, Mac-1, CD43
ICAM-2	CD102	LFA-1
ICAM-3	CD50	LFA-1
ICAM-4	Gp. De LW	LFA-1
ICAM-5	Telencefalina	LFA-1
VCAM-1	CD106, INCAM-110	VLA-4, LPAM-1
NCAM-1	CD56, D2CAM, NKH1	N-CAM, heparan sulfato
LFA-2	CD2, T11	LFA-3, CD59
LFA-3	CD58	LFA-2
PECAM-1	CD31	PECAM-1, Vitronectina
MADCAM-1	---	LPAM-1, L-Selectina

Las células de melanoma muestran un incremento gradual en la expresión de Mel-CAM, encontrándola por primera vez en nevi, cuando las células se separan de los queratinocitos epidérmicos y migran a la dermis. Y su nivel de expresión es máximo en las células de melanoma con capacidad metastático. La expresión forzada de Mel-CAM en células de melanoma humanas influye en los estadios del proceso metastático de extravasación y el establecimiento de nuevos focos de crecimiento, al producirse un incremento en la expresión del gen colagenasa (Haass y cols., 2005).

Por otro lado, se ha observado que la neutralización con anticuerpo de Mel-CAM bloquea las metástasis de melanoma in vivo y la interacción entre células de melanoma y células endoteliales, además de bloquear la actividad colagenasa de la metaloproteinasa-2 (MMP-2) (Haass y cols., 2005).

También la expresión de ALCAM parece relacionarse con la progresión del tumor, ya que ALCAM se expresa en células de melanoma metastáticas, mientras que está ausente en células no-metastáticas (Haass y cols., 2005).

ICAM-1 también se correlaciona con la progresión en melanoma y su expresión incrementa el riesgo de metástasis. ICAM-1 puede ser inducida dependiendo el tipo celular por varias citocinas, como por ejemplo: factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Haass y cols., 2005). Parece que la expresión de ICAM-1 puede promover la formación de agregados con leucocitos, lo cual puede incrementar la supervivencia en el sistema vascular y la capacidad de extravasación de las células de melanoma.

Una vez las células tienen capacidad de migración es importante su interacción con las células endoteliales. VCAM-1 es una molécula de adhesión celular inducida por citocina, que fue encontrada por primera vez en células del endotelio vascular. Es un receptor para la integrina  $\alpha 4\beta 1$  expresada en células de melanoma malignas, que facilita la unión de las células de melanoma al endotelio vascular para su extravasación (Haass y cols., 2005).

## 8. METALOPROTEASAS

Como hemos ido citando, en la progresión del melanoma cutáneo humano están implicados diferentes sistemas de enzimas proteolíticos entre los que comentaremos por su importancia las metaloproteasas (MMPs).

Las metaloproteinasas es una familia multigénica de endopeptidasas dependientes de calcio y de zinc, implicadas en la degradación de componentes de MEC tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. En este momento se conocen al menos 25 miembros de la familia de MMPs en humanos, que se pueden clasificar atendiendo a su especificidad de sustrato y su estructura, secretadas o ancladas a la membrana celular por un dominio transmembrana (MT-MMP), en colagenasas, gelatinasas, estromelisinias, matrilisinias, metaloproteinasas de membrana y un grupo heterogéneo de metaloproteasas (Polette y cols., 2004).

Colagenasa-1 (MMP-1), -2 (MMP-8), -3 (MMP-13), -4 (MMP-18) son las proteinasas principales con capacidad para degradar colágenos fibrilares tipo I, II, III y VII, dando gelatinas que sirven como sustratos al siguiente grupo formado por la gelatinasa A (MMP-2) y B (MMP-9), capaces además de degradar colágeno tipo IV y V de la membrana basal.

La estromelina-1 (MMP-3), -2 (MMP-10) pueden degradar un amplio rango de sustratos entre los que se encuentran colágeno tipo IV, V, IX y X, fibronectina, laminina, elastina, gelatina y proteínas con el núcleo de proteoglicano. La estromelina-3 (MMP-11) es una de las MMPs con menor potencial de degradación de componentes de MEC, aunque posee la capacidad de inactivar mediante ruptura inhibidores de serina proteinasas.

Las metaloproteasas matrilisina-1 (MMP-7) y matrilisina-2 (MMP-26) son expresadas específicamente por células tumorales de origen epitelial, cuyos espectros proteolíticos son divergentes pero incluyen fibronectina y gelatinasa (Marchenko y cols., 2001).

Dentro de las MMPs ancladas a la membrana existen dos subgrupos: las que están ancladas a la membrana celular por un dominio transmembrana en el extremo carboxilo terminal que son MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16) y MT5-MMP (MMP-24), y las que se encuentran unidas a la superficie celular a través de un glicosilfosfatidil-inositol (GPI) en el carboxilo terminal que son MT4-MMP (MMP-17) Y MT6-MMP (MMP-25).

Y el último grupo donde tenemos diversas metaloproteasas cuyo papel en el desarrollo del cáncer no está claro, incluye MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23/B y MMP-28 (Hofmann y cols., 2005). La metaloproteasa MMP-12, también denominada metalo-elastasa, es secretada por macrófagos y aunque la elastina es el sustrato por el que tiene mayor afinidad, también es capaz de actuar sobre colágeno IV, fibronectina, vitronectina y laminina. En el caso de MMP-20 o enamilina, es una metaloproteasa que interviene en la formación del esmalte dentario.

## 8.1. Regulación de la expresión y la activación de MMPs

La expresión de las MMPs esta regulada a nivel transcripcional, de activación enzimática y por la inhibición de su actividad proteolítica a través del inhibidor general de proteinasas  $\alpha$ -2-macroglobulina o por los inhibidores tisulares de metaloproteinasas denominados TIMPs (del inglés tissue inhibitors of matrix metalloproteinases) (Martin y Matrisian., 2007).

La expresión de mRNA de MMPs está regulada por diferentes factores de crecimiento y citocinas, hormonas, oncogenes y promotores tumorales. El análisis de la secuencia promotora de MMPs en humanos para el inicio de la transcripción, muestra sitios de unión para la proteína activadora 1 (AP-1), la cual es reconocida por factores de transcripción de las familias Jun y Fos (Hofmann y cols., 2005). Los factores de crecimiento y las citocinas inducen la fosforilación y posterior translocación de estos factores de transcripción.

A nivel de proteína, la actividad biológica de las MMPs está determinada por su estado de activación. La mayoría de MMPs son secretadas por las células en forma de zimógenos inactivos, donde varios residuos de cisteínas en el pro-dominio forman una unión coordinada con los iones zinc localizados en el sitio activo. En el ambiente pericelular, otras MMPs o serina proteinasas como la plasmina inician un proceso de proteólisis en el pro-dominio, cuyo corte resulta en la ruptura de la unión zinc-cisteína, pérdida del pro-dominio y accesibilidad del sitio activo (Hofmann y cols., 2005).

La actividad de MMP está modulada por una familia de inhibidores titulares de metaloproteasas de la matriz (TIMPs), de los cuales se han identificado al menos cuatro miembros. Los TIMPs se unen tanto a pro-MMPs como a MMPs activos por lo que inhiben la activación catalítica de las enzimas latentes así como la capacidad proteolítica de las proteinasas activas. La inactivación de MMPs por TIMPs puede ser modificada por SIBLING no sólo guiando la activación de pro-MMPs sino también reactivando MMPs asociadas a TIMPs (Hofmann y cols., 2005).

Los diferentes TIMPs pueden estar implicados en la activación y en la inactivación de MMPs. Siendo por ejemplo TIMP-2 el mayor inhibidor de MT1-MMP. Bajas concentraciones de TIMP-2 promueven la formación del complejo pr-MMP-2 y MT1-MMP en la superficie celular para la activación de MMP-2, pero altas concentraciones de TIMP-2 inhibe dicha activación. Por lo tanto, el balance entre los niveles de MMP activo y el inhibidor libre parece ser importante para la actividad de MMP (Hofmann y cols., 2005).

### 8.1.1. Activación post-traducciona de MMP-2

La activación de MMP-2 es posiblemente el más extensamente estudiado. La pro-MT1-MMP es activada de manera intracelular a través de la proteinasa parecida a furina o extracelularmente una vez se encuentra anclada a la membrana por la plasmina. MT1-MMP activa una molécula de TIMP-2, formando un complejo que sirve de receptor para pro-MMP-2 en la superficie celular. Una segunda molécula de MT1-MMP corta y activa a pro-MMP-2 unida al complejo. MMP-2 activa puede quedar unida a la membrana a través de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Pasco y cols., 2003), o quedar libre en el espacio extracelular. En ambos casos, es capaz de degradar la matriz y su actividad puede ser inhibida cuando se le une una molécula de TIMP-2.

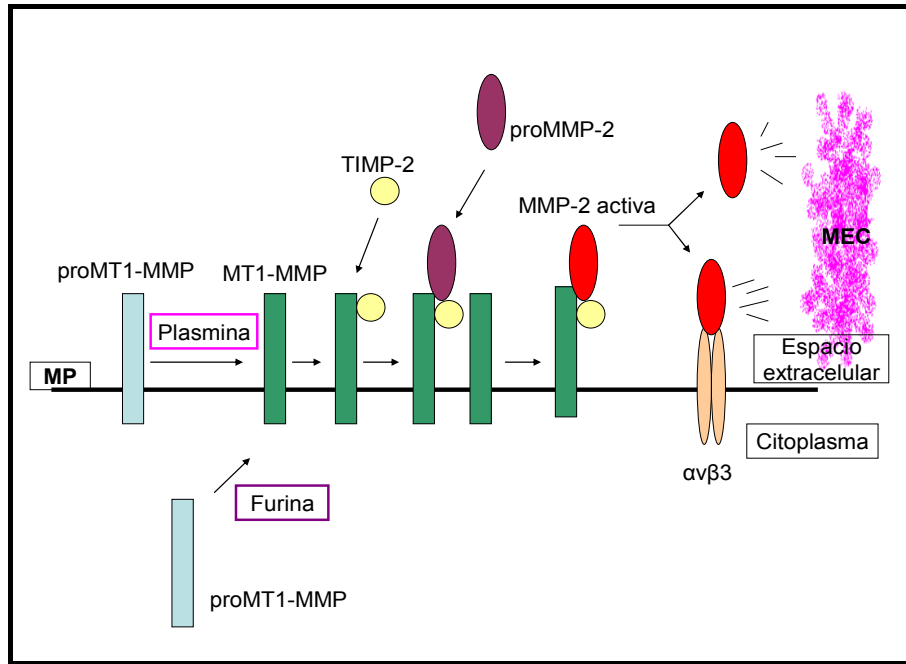


Figura 7. Activación de MMP-2. Modificado de Hofmann y cols., 2000.

Recientemente se ha observado, que la activación de MMPs también puede tener lugar sin modificación proteolítica. Pro-MMP-2, Pro-MMP-3 y Pro-MMP-9 pueden ser activados reversiblemente sólo mediante la unión de su correspondiente glicoproteína de enlace al ligando-N de unión a integrina (SIBLING) (Hofmann y cols., 2005).

## 8.2. Efecto de MEC sobre la actividad de las MMPs en la invasión tumoral

Los mecanismos por los cuales el MEC influye en el comportamiento metastático de las células tumorales son variados e incluye:

1. Cambios en la composición de glicoproteínas de la matriz extracelular, los cuales pueden alterar la adhesión celular, motilidad, proliferación y apoptosis. Por ejemplo, el inductor de las metaloproteasas de MEC es una glicoproteína intrínseca de la membrana plasmática, que se produce a elevados niveles por células cancerosas, y que estimula a las células estromales adyacentes para la síntesis de metaloproteasas (MMPs).
2. Alteración de la actividad de las proteasas que degradan MEC, lo cual posiblemente facilite el movimiento de las células tumorales mediante eliminación de las barreras estromales. Las proteínas encargadas de degradar MEC son las metaloproteasas, cuya expresión pasa a ser regulada por células tumorales.
3. Liberación de fragmentos MEC bioactivos y/o factores de crecimiento que pueden promover o suprimir la progresión neoplásica de las células tumorales. Muchas citocinas miembros de las familias EGF, TGF- $\beta$ ,

PDGF, IFN- $\gamma$  y b-FGF se unen a varios componentes de MEC en los tejidos normales, donde son guardados como una forma inactiva hasta su liberación y activación por proteasas de MEC cuando se necesitan. Un incremento de la actividad proteasa en MEC durante el remodelado de la matriz tumoral puede desencadenar la liberación de estos factores de crecimiento, los cuales pueden estimular a las células tumorales.

Se ha visto que los fragmentos liberados tras la degradación de la MEC así como los sitios libres que quedan entre macromoléculas de MEC, denominados matriquinas, pueden actuar como moduladores de la respuesta celular. Dentro de estas macromoléculas de MEC, la laminina-5 es un factor capaz de estimular la invasión celular. Así, se ha demostrado que MMP-2 y MMP-14 cortan selectivamente la cadena  $\gamma 2$  de la laminina-5, la cual tiene propiedades quimiotácticas estimula la migración celular *in vitro* (Polette y cols., 2004). Esta isoforma de la laminina es detectada frecuentemente en el frente de invasión tumoral *in vivo*.

La degradación de microfibrillas asociadas a elastina (fibrillina) por plasmina, elastasas, catepsina G, MMP-2, MMP-9 y MMP-12 seguido de una hidrólisis parcial de la elastina liberada o de los sitios que contienen el péptido derivado de elastina con el motivo XGXXPG accesible, dan a su vez péptidos que cuando se unen a un receptor de 67 kDa estimulan la quimiotaxis, la proliferación y la migración de las células tumorales, así como la producción de MMP-2 por los fibroblastos, según se ha observado *in Vitro* (Polette y cols., 2004).

### 8.3. MMPs en la progresión del melanoma

En un primer momento se pensó que las MMPs encontradas en tumores eran expresadas sólo por las células tumorales. Sin embargo, se ha comprobado que muchas MMPs presentes en el microambiente son expresadas por las células estromales de alrededor. Se sabe que las células malignas producen factores paracrinos que inducen la expresión de proteasas en las células estromales. Dentro de los factores implicados en la co-operación entre células tumorales y del huésped, el inductor de metaloproteasas de la matriz extracelular denominado EMMPRIN (del inglés extracellular matrix metalloproteinase inducer) producido por las células tumorales se ha demostrado es capaz de estimular la expresión de MMPs en fibroblastos, células endoteliales así como en las propias células tumorales (Hofmann y cols., 2005). Este factor es una glicoproteína de membrana de 58 kDa, producida en grandes cantidades por las células tumorales, estimulando la síntesis de MMP-1, MMP-2 y MMP-3 por parte de los fibroblastos cercanos. Es de destacar, que EMMPRIN además de inducir la producción de metaloproteasas también induce la angiogénesis a través de la estimulación de VEGF, todo para facilitar la invasión de las células tumorales.

Las células de melanoma cutáneo humano expresan MMP-1, -2, -9, -13 y MT1-MMP así como TIMP-1, -2 y -3. Väisänen y cols. (1996) demostraron un incremento en la expresión de MMP-2 asociado a un desorden estructural y la progresión tumoral, además de con un bajo ratio de supervivencia que es independiente de los estadios de Clark y Breslow. Esta sobreexpresión de

MMP-2 va acompañada de un incremento de MT1-MMP que induce su activación. Las células tumorales positivas para MMP-2 y MT1-MMP se localizan frecuentemente en la interfase entre el estroma y el frente de invasión del tumor (Hofmann y cols., 2005).

La inducción de MMP-1 también se correlaciona con la progresión del melanoma cutáneo humano, mediante la degradación de los colágenos tipo I y IV que favorece la invasión de las células tumorales.

En el caso de MMP-9, los resultados son contradictorios. Se ha visto que MMP-9 se expresa exclusivamente en fase de crecimiento horizontal y no en fase de crecimiento vertical en los melanomas primarios (Hofmann y cols., 2005). En el caso de metástasis espontáneas de nódulo linfático y pulmón, la mayoría de las células tumorales expresan MMP-9, mientras que en metástasis experimentales se encuentra ausente.

Por otra parte, hay metaloproteasas que inducen un aumento de la actividad biológica de citocinas y de factores de crecimiento como fue demostrado para el caso de la interleucina-8, en la cual su actividad aumentó en un valor de 10 veces después de la digestión por la MMP-9 (Arvelo y Cotte, 2006).

#### 8.4. Interacción de MMPs con moléculas de adhesión en el melanoma cutáneo humano

La formación de contactos de adhesión focal es un prerrequisito para la adhesión, propagación y migración a través de MEC. La expresión de la integrina unida a vitronectina,  $\alpha_v\beta_3$ , se ha relacionado con la tumorigénesis, invasibilidad y potencial metastático. Brooks y cols. demostró que MMP-2 activa se une directamente a la integrina  $\alpha_v\beta_3$  mediante el dominio hemopexina (PEX) en el carboxilo terminal de la enzima, facilitando la degradación de la matriz y la invasión celular.  $\alpha_v\beta_3$  puede interaccionar con MMP-2 activa o inactiva, pero sólo la unión de MMP-2 activa a  $\alpha_v\beta_3$  en la superficie de las células endoteliales parece facilitar la invasión vascular durante la angiogénesis (Hofmann y cols., 2005).

Las metaloproteasas también actúan sobre la proliferación de las células tumorales por las modificaciones estructurales que inducen en las proteínas de MEC, como la degradación del colágeno fibrilar que permiten, a células de melanoma, activar la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , disminuir la expresión de la proteína p27 para estimular, de esta manera, la proliferación celular. Además, experimentos *in vitro* han demostrado que  $\alpha_2\beta_1$  se une al colágeno tipo I modulando la expresión de MMP-1 y MMP-14, lo que contribuye a amplificar la activación de pro-MMP-2 e induce la migración de células de melanoma.

Además, metaloproteasas como MMP-3 y MMP-7 están implicadas en la pérdida de adhesión celular, ya que son capaces de digerir la E-cadherina presente en la superficie celular y liberarla al medio, provocando la ruptura de las adherencias intercelulares de los epitelios. La E-cadherina soluble inhibe la agregación celular mediada por esta cadherina de forma paracrina y por lo tanto las funciones que desencadena (Polette y cols., 2004).



## 9. CONCLUSIONES

1. Se ha reconocido al microambiente como un mediador de la progresión de melanoma, incluyendo la hipoxia y la matriz extracelular como factores implicados en la transformación del melanocito.
2. La hipoxia incrementa el ratio de mutaciones y produce cambios en la transcripción génica mediada por HIF.
3. PTEN es una de los genes frecuentemente mutado en melanoma que facilita la migración celular.
4. HIF activa como procesos importantes la angiogénesis y el remodelado vascular, que abastece de vasos sanguíneos al tumor y facilita el acceso de las células de melanoma a la circulación y posterior diseminación a otras regiones corporales.
5. Un cambio en el balance homeostático que rodea al melanocito, produce un cambio en la expresión de las diferentes moléculas de adhesión, que favorece la migración celular y la capacidad metastática.
6. Las integrinas tienen un papel crítico en la progresión tumoral, ya que están implicadas en muchas vías de señalización que afectan a diferentes procesos biológicos.
7. La E-cadherina es la molécula de adhesión más importante entre melanocitos y queratinocitos. En la progresión del melanoma cutáneo humano la E-cadherina desaparece en melanocitos, apareciendo una sobreexpresión de N-cadherina.
8. Las metaloproteasas son enzimas proteolíticas que degradan MEC, un paso imprescindible para que tenga lugar el proceso metastático.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Arvelo F, Cotte C. Metaloproteasas en la progresión tumoral. Revisión. *Invest. clín* 2006; v.47 n.2

Brakebusch C, Fässler R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.* 2003 May; 22(10): 2324-2333. Review.

Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 786-95.

Carlos Caramelo, Juan J. Peña Deudero, Ángeles Castilla, Soledad Justo, Alain J. de Solís, Fernando Neria, Silvia Peñate, Francisco R. González-Pacheco. Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina (Buenos Aires)* 2006, 66: 155-164.

Chatzizacharias NA, Kouraklis GP, Theocharis SE. Clinical significance of FAK expression in human neoplasia. *Histol Histopathol.* 2008 May; 23(5): 629-650.

Christiane Brahim-Horn, Jacques Pouyssegur. The role of hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer.* 2006; 93(8): 73-80.

Cox B.D., Natarajan M., Stettner M.R. and Gladson C.L. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J. Cell. Biochem.* 2006; 99: 35-52.

Danen EH, Sonnenberg A. Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol.* 2003; 200(4): 471-480.

Felding-Habermann B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2003; 20(3): 203-13. Review.

Guillermo Planas Girón. Melanoma Maligno: Relación con el estroma y la dinámica de su comunicación intercelular. *Dermatología Venezolana.* 2003; Vol. 41, N° 4, 4-14.

Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol.* 2004 Mar; 35(3): 309-318. Review.

Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 2005; 18(3): 150-159.

Hehlgans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jan; 1775(1): 163-180.

Hofmann UB, Houben R, Bröcker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie.* 2005 Mar-Apr; 87(3-4): 307-314.

Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signalling in malignant melanoma. *Cancer and metastasis reviews* 2005; 24: 195-222.

Kyle R. Legate, Eloi Montañez, Oliver Kudlacek and Reinhard Fässler. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nature* 2006; 7: 20-31.

Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* 1999 Apr; 9(4): 125-128.

Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec; 26(3-4): 717-724. Review.

Melkounian Z.K., Peng X., Gan B., Wu X. and Guan J.L. Mechanism of cell cycle regulation by FIP200 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 6676-6684.

Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18(5): 516-523. Review.

Mizejewski GJ. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222(2): 124-138.

Nikolopoulos, S. N. & Turner, C. E. Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J. Cell Biol.* 2000; 151: 1435-1448.

Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signalling pathways. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998 Apr 14; 95 (8): 4374-9.

Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Mar; 49(3): 221-233.

Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Mar; 49(3): 179-86.

Postovit LM, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. *Cancer Res.* 2006; 66(16): 7833-7836.

Ravichandran KS. Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene.* 2001; 20(44): 6322-6330.

Schlaepfer D.D., Mitra S.K. and Ilic D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1692: 77-102.

Sheta E.A., Harding M.A., Conaway M.R., and Theodorescu D. Focal adhesion kinase, Rap1, and transcriptional induction of vascular endothelial growth factor. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; 92: 1065-1073.

Symons M, Settleman J. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol.* 2000 Oct; 10(10): 415-419.

Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Nov; 91(21): 1820-1828. Review.

Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000 Sep 1; 14(17): 2123-2133.

Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg.* 2000;87(8): 992-1005.

Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1692(2-3): 103-119.

Yuqing Zhang, Min Li, Qizhi Yao, Changyi Chen. Recent advances in tumor hypoxia: Tumor progression, molecular mechanisms and therapeutic implications. *Med Sci Monit.* 2007; 13(10): 175-180.

Zhang, Y., Guo, L., Chen, K. & Wu, C. A critical role of the PINCH integrin-linked kinase interaction in the regulation of cell shape change and migration. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 318-326.

Zhao J, Bian ZC, Yee K, Chen BP, Chien S, Guan JL. Identification of transcription factor KLF8 as a downstream target of focal adhesion kinase in its regulation of cyclin D1 and cell cycle progression. *Mol Cell*. 2003 Jun; 11(6): 1503-15.

Zhao J, Pestell R, Guan JL. Transcriptional activation of cyclin D1 promoter by FAK contributes to cell cycle progression. *Mol Biol Cell*. 2001 Dec; 12 (12): 4066-77.

Ziober BL, Chen YQ, Ramos DM, Waleh N, Kramer RH: Expression of the alpha7beta1 laminin receptor suppresses melanoma growth and metastatic potential. *Cell Growth Differ*. 1999; 10: 479-490.

([http://cancer.nccs.drango.com/411es.asp?article=melanoma\\_general&type=tnpv&style=default.css&navType=1&lid=2&otherParams=](http://cancer.nccs.drango.com/411es.asp?article=melanoma_general&type=tnpv&style=default.css&navType=1&lid=2&otherParams=))

(<http://encolombia.com/alergia8399moleculas18.htm>)

(<http://es.wikipedia.org/wiki/Integrina>)

([http://es.wikipedia.org/wiki/Mol%C3%A9cula\\_de\\_adhesi%C3%B3n\\_celular](http://es.wikipedia.org/wiki/Mol%C3%A9cula_de_adhesi%C3%B3n_celular))

## CAPÍTULO 12:

### DIAGNOSTICO DEL CANCER COLORRECTAL

Ana Freije León y Felipe Goñi de Cerio

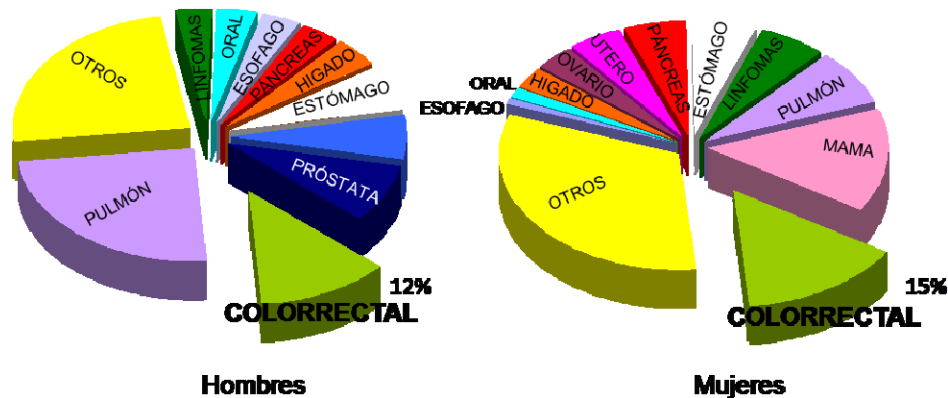
#### Índice

1.- CÁNCER COLORRECTAL .....	284
1.1.- Epidemiología y Etiología .....	284
1.2.- Tipos de Cáncer Colorrectal .....	285
1.3.- Progresión tumoral del Cáncer Colorrectal Esporádico .....	287
1.4.- Estadiaje. ....	289
1.5.- Marcadores Tumorales .....	292
1.5.1.- Marcadores de suero .....	293
1.5.2.- Marcadores detectados en heces .....	294
1.5.3.- Marcadores tumorales de tejido .....	294
1.5.4.- Diagnóstico del cancer colorrectal.....	295
2.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HELIX-LOOP-HELIX: PROTEÍNAS ID.....	296
2.1 Proteína ID1 y Cáncer .....	298
3.- BIBLIOGRAFIA .....	300

## 1.- CÁNCER COLORRECTAL

### 1.1.- Epidemiología y Etiología

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes en los países industrializados, constituyendo a nivel mundial la tercera causa de muerte en hombres, por detrás del cáncer de pulmón y del cáncer de próstata y es el segundo en frecuencia entre las mujeres, después del cáncer de mama. Representa el 9,5% de todos los tumores, con aproximadamente 1 millón de nuevos casos y 530.000 muertes al año en todo el mundo (datos del 2002). En España se diagnostican aproximadamente 25.000 nuevos casos cada año, lo que constituye una incidencia de 50 nuevos casos por cada 100.000 habitantes y año, siendo en un contexto europeo una tasa media-baja, en parte gracias a la dieta mediterránea (Fini y cols., 2007). En la Comunidad Autónoma Vasca, según datos de mortalidad del año 2004, el cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte en varones, con un 12% de los casos, y la primera junto con el cáncer de mama en mujeres, con una tasa del 15% (Fig.1). El 54% de pacientes diagnosticados de CCR en España sobreviven más de 5 años, por encima de la media europea (en torno al 50%), aunque se contabilizan alrededor de 12.500 muertes anuales.



**Fig.1. Tasas de mortalidad según los diferentes tipos de cáncer en el País Vasco** (Informe de mortalidad en la comunidad del País Vasco 2004, Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco).

La etiología del CCR implica la interacción entre los factores genéticos y otros de tipo ambiental. Varios estudios han mostrado que dietas con una elevada dosis calórica y altos niveles de colesterol constituyen un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer colorrectal, especialmente la ingestión de grasas, proteínas e hidratos de carbono refinados, así como la deficiencia en fibra (Boyle y cols., 2000; Key y cols., 2002). Además de la dieta, la inactividad física, el consumo de tabaco y alcohol, la edad, la historia personal o familiar de pólipos o de cáncer colorrectal y enfermedades inflamatorias intestinales también constituyen factores de riesgo (Bagnardi y cols., 2001; Giovannucci, 2001).

A nivel general, existen tres tipos de genes cuyas variaciones en la expresión se encuentran relacionadas con el cáncer:

- Genes supresores de tumores: actúan protegiendo a la célula cuando existen daños en el DNA, deteniendo la división celular y en último término llevando a la célula a la apoptosis. Si se produce la inactivación de estos genes, se genera un desequilibrio entre proliferación, muerte celular y diferenciación. Los primeros genes supresores identificados fueron el gen del retinoblastoma (Knudson, 1971) y el factor de transcripción p53 (Linzer y cols., 1979).
- Proto-oncogenes: promueven la división celular, de manera que si por alguna mutación estos genes quedan permanentemente activados se produce una división incontrolada. Las formas mutantes de los proto-oncogenes se denominan oncogenes (Reddy y cols., 1982).
- Genes de reparación de DNA y del ciclo celular (genes mutadores): son los genes responsables de subsanar los errores producidos en la incorporación de los nucleótidos durante la replicación del DNA, y reparar las alteraciones inducidas en el DNA por radiaciones y agentes químicos. Las mutaciones producidas en los genes de reparación de errores conducen a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma, las cuales tendrán efectos cancerígenos cuando impliquen a proto-oncogenes o genes supresores de tumores (Ionov y cols., 1993; Loeb y cols., 2000).

## 1.2.- Tipos de Cáncer Colorrectal

El cáncer colorrectal se clasifica generalmente en tres tipos: hereditario, familiar y esporádico (Calvert y cols., 2002).

El 5% de los enfermos presentan una predisposición heredada a la enfermedad, desarrollando síndromes que incluyen la presencia de pólipos como los síndromes de poliposis de tipo hamartomatoso y síndromes que no van asociados a desarrollo de pólipos. Dentro de los síndromes que presentan pólipos asociados el más conocido es la poliposis adenomatosa familiar (FAP). En 1925 Lockhart Mummery reconoció una predisposición hereditaria en la aparición de pólipos y cáncer en la poliposis adenomatosa familiar y en 1991 se determinó que el desarrollo de este síndrome se debe a la mutación en el gen supresor de tumores APC (adenomatous polyposis coli), localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21) (Grodin y cols., 1991). El cáncer colorrectal hereditario no asociado a pólipos (CCHNP) o síndrome de Lynch I se trata de una patología autosómica dominante causada por la mutación en genes que codifican proteínas de reparación del DNA (mismatch repair genes, MMR), como hMLH1 o hMLH2 (Davidson, 2007).

El tipo de CCR menos conocido es el cáncer de colon familiar (25% de los casos diagnosticados) (Bodmer, 2006). Las familias afectadas no presentan patrones relacionados con los síndromes hereditarios pero presentan un índice de la enfermedad muy alto para ser considerado esporádico. En un estudio con familias judías Askenazies se propuso que este tipo de cáncer puede estar causado por cambios genéticos muy sutiles que no afectan a la estructura de la proteína APC (Laken y cols., 1997).

El CCR esporádico, al cual pertenecen la mayoría de los casos diagnosticados (70%), se caracteriza por no presentar ningún tipo de herencia o predisposición familiar y suele desarrollarse en personas mayores de 50 años. Se ha determinado que intervienen tanto factores ambientales como genéticos (Calvert y cols., 2002) y su desarrollo resulta de la acumulación de múltiples mutaciones somáticas. Los genes mutados suelen corresponder tanto a oncogenes, como a genes supresores de tumores o genes reparadores (Tabla 1) (Weinberg, 1994).

**Tabla 1. Mutaciones genéticas que causan el desarrollo de cáncer colorrectal.**

APC= *adenomatous polyposis coli*; DCC= *Deleted in colon cancer*; MMR= *mismatch repair*

Tipo de mutación	Genes Implicados			Tipos de Cáncer
Línea Germinal	APC MMR			FAP CCHNP
Somáticas	<u>Oncogenes</u> Myc Ras Src Erb2	<u>Supresores de tumores</u> P53 DCC APC	<u>MMR</u> hMSH2 hMLH1 hPMS1 hPMS2 hMSH6 hMSH3	Cáncer Esporádico
Polimorfismo genético	APC			Cáncer de colon familiar en judíos asquenazies



### 1.3.- Progresión tumoral del Cáncer Colorrectal Esporádico

En el CCR esporádico, a diferencia de los síndromes hereditarios de cáncer colorrectal, es necesaria la acumulación en una célula de múltiples mutaciones somáticas, que incluyen activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores. Gran cantidad de datos clínicos e histopatológicos sugieren que la mayoría de los tumores colorrectales (carcinomas) surgen a partir de tumores benignos (adenomas) preexistentes (Sugarbaker, J.P., y cols., 1985).

Uno de los genes supresores de tumores más conocidos en el CCR es el gen *APC*, localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q) y cuya alteración se ha detectado en aproximadamente el 80% de los carcinomas colorrectales humanos (Kinzler y cols., 1996). La proteína que codifica, el gen *AP*, está unida al citoesqueleto de la célula y actúa en procesos de adhesión celular y en las conexiones entre células, tiene un papel regulador en el ciclo celular y participa en procesos de muerte por apoptosis necesarios para la renovación del epitelio de colon (Abad Esteve, 2000; Cole y cols., 2000; Fearnhead y cols., 2001). La proteína  $\beta$ -Catenina mutada también parece ser oncogénica, ya que no responde a la acción regulatoria de *APC*, y como resultado se acumula en el citoplasma y núcleo de la célula (Behrens, 2005), siendo esta última acumulación considerada un factor de pronóstico de la enfermedad en estadios avanzados (Elzagheid y cols., 2008).

Junto al *APC* el siguiente gen supresor de tumores más importante en el desarrollo de cáncer colorrectal es el gen *p53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p). Este gen se halla mutado en más del 50% de los tumores humanos, y un 70-80% de los tumores colorrectales presentan pérdidas alélicas en este cromosoma. Las alteraciones de *p53* son eventos tardíos en el proceso carcinogénico, probablemente en la transición de adenoma a carcinoma. La proteína nuclear *p53* interviene en el control del ciclo celular y de la replicación, así como en la reparación del DNA. Además, esta proteína actúa como factor de transcripción, mantiene la estabilidad genética, activa la apoptosis y participa en la respuesta a agentes nocivos externos (Prives y cols., 1999; Abad Esteve, 2000).

Otros genes supresores de tumores alterados en CCR son el *MCC* (*Mutated in Colorectal Cancer*), localizado en el cromosoma 5q, el *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*), localizado en el cromosoma 18q y deleciónado en el 70% de los CCR, en el 50% de los adenomas avanzados y en el 100% de las metástasis hepáticas; y el *NM23* (*Non Metastatic Clone 23*), localizado en el cromosoma 17, codificador de proteínas con actividad quinasa y cuya ausencia se ha observado que confiere a los tumores mayor capacidad metastásica (Fearon y cols., 1990; Abad Esteve, 2000). El oncogén que aparece alterado con más frecuencia en el CCR es *K-ras*, con un 50% de mutaciones en adenomas mayores de 1 cm. y adenocarcinomas (Bos y cols., 1987; Vogelstein y cols., 1988; Okamoto y cols., 1994). *K-ras* codifica para una proteína G involucrada en procesos de transducción de señales y parece que sus alteraciones se presentan en etapas tempranas de la progresión tumoral,

anteriores a la mutación de *DCC* y *p53*, pero posteriores a la alteración de *APC*.

Otros oncogenes involucrados en la carcinogénesis de colon y recto son *myc*, *myb* y *her2/neu*. El gen *c-myc* (localizado en el cromosoma 8q) codifica una proteína nuclear implicada en la reparación de DNA y suele estar alterado en etapas tempranas del desarrollo del cáncer, ya que está implicado en la iniciación del ciclo celular (Rothberg y cols., 1985; Stewart y cols., 1986).

Por otra parte entre un 13-28% de los tumores colorrectales presentan errores múltiples de replicación del DNA en secuencias cortas repetidas [(A)<sub>n</sub> y (CAG)<sub>n</sub>] (Ionov y cols., 1993). Estas alteraciones ocurren en los estadios iniciales de la carcinogénesis, son seleccionadas a través de las distintas etapas de progresión y diseminación tumoral y constituyen la primera evidencia de la existencia de un fenotipo mutado de cáncer. La acumulación de estos errores múltiples de replicación parece ser secundaria a alteraciones en genes implicados en la reparación de errores simples de apareamiento (*mismatch repair genes*, como *hMSH2*, *hPMS1* y *hPMS2*) durante la replicación del DNA o en las DNA polimerasas.

Integrando los resultados de las mutaciones en los genes mencionados, Fearon y Vogelstein propusieron en 1990 un modelo genético para la progresión del cáncer colorrectal, el cual incluye una serie de pasos (Fearon y cols., 1990):

1. Los tumores colorrectales surgen como resultado de la activación de oncogenes, junto con la inactivación de genes supresores de tumores.
2. Se requieren mutaciones en al menos 4 o 5 genes para que se forme el tumor maligno. Un número menor de mutaciones conllevaría a una tumorigénesis benigna.
3. A pesar de que las alteraciones genéticas tienen lugar siguiendo una secuencia concreta, la responsabilidad en último término del desarrollo tumoral se debe a la acumulación total de cambios genéticos más que el orden en el que éstos tiene lugar.
4. Algunos genes supresores de tumores pueden no presentar un comportamiento recesivo a nivel celular.

En la mayoría de los casos la primera mutación ocurre en el gen supresor de tumores *APC*, lo que provoca el paso de un epitelio colónico normal a hiperplásico y posteriormente a adenoma temprano. Esto produce alteraciones en la adhesión celular y transducción de señales y posiblemente también afecta a los factores de crecimiento. El adenoma progresa pasando por las fases intermedia y tardía debido a mutaciones ocurridas en el gen *K-ras*, persistiendo las alteraciones anteriores y afectando además a la apoptosis. Después, el adenoma evoluciona a carcinoma con capacidad metastásica debido a mutaciones del gen supresor *p53* e incluso de los genes reparadores *hMSH2* y *hMLH1*, comenzando la angiogénesis y desarrollando mecanismos de resistencia a fármacos. Existen dudas sobre el papel concreto que juegan en

este proceso algunos genes como *DCC* y *MCC*. Aunque, se conoce que la acumulación de las mutaciones mencionadas, junto con numerosas otras, conlleva el desarrollo de la malignidad tumoral, lo que da vigencia a este modelo propuesto hace casi dos décadas.

#### 1.4.- Estadíaaje.

La supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal viene determinada principalmente por la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico, por lo que es importante un diagnóstico y estadíaaje preciso.

Las paredes del colon y del recto están constituidas por una serie de tejidos, cuya invasión se produce progresivamente a medida que el cáncer se expande. La pared del colon posee cinco capas funcionales que, comenzando por la más interna son:

1. Mucosa plana, formada por unas glándulas rectas tubulares simples que se extienden hacia dentro desde la superficie y a través del espesor de la mucosa.
2. *Muscularis mucosae*, una serie de prolongaciones musculares finas dentro de la mucosa que mediante su contracción facilitan la expulsión de moco a la luz intestinal.
3. Submucosa, capa de tejido conectivo laxo que se interpone entre la mucosa y la capa muscular, y que contiene los nervios, vasos sanguíneos y linfáticos.
4. *Muscularis propia*, formada por músculo liso dispuesto en una capa circular interna y una capa longitudinal externa, responsable de los movimientos peristálticos del intestino grueso;
5. Serosa, capa externa de tejido conectivo que lleva los vasos mayores y nervios.

Existen varios sistemas de estadificación del Cáncer Colorrectal entre ellos los que se encuentran los sistemas Dukes, Astler-Coller, AJCC y TNM (Tabla 2):

- El método de clasificación de Dukes inicialmente comprendía 3 estadios A, B y C (Dukes, 1932). En el estadio A el tumor se encuentra limitado a la pared intestinal, en el estadio B el tumor se extiende a través de la pared intestinal a la capa subserosa y en el estadio C aparece la metástasis de nódulos linfáticos. El propio Dukes dividió posteriormente el estadio C en C1, en el que la metástasis se desarrolla en los nódulos perirrectales positivos y C2 en el que se encuentran implicados los nódulos apicales. Además, añadió el estadio D, en el que desarrolla una metástasis peritoneal o a distancia (Fig. 1) (Gabriel y cols., 1935).

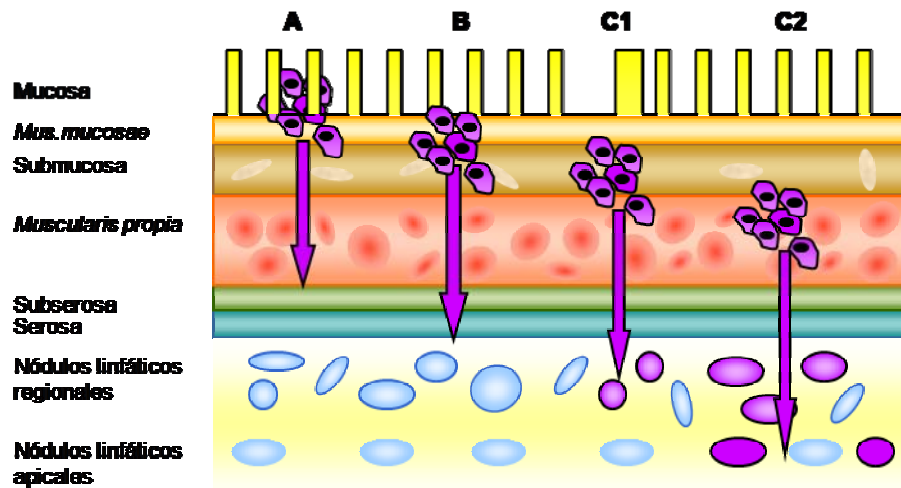


Fig.2. Clasificación del cáncer colorrectal en diferentes estadios según el sistema Dukes (DUKES, 1932; GABRIEL *et al.*, 1935).

- El sistema de estadiaje de Astler-Coller propuesto en 1954 (Astler y cols., 1954) estaba originalmente compuesto por 5 estadios: A, B1, B2, C1 y C2 (Fig. 2). En el estadio A, el tumor se encuentra limitado a la mucosa, en el B1 el tumor implica a la *muscularis propia*, pero no invade, y en el B2 el tumor penetra en la *muscularis propia*. Los estadios C1 y C2 son homólogos a B1 y B2, pero con metástasis en nódulos. Posteriormente, se añadieron 3 estadios más: B3, en el que se implican estructuras adyacentes, C3, homólogo a B3 pero con metástasis en nódulos y D en el que se desarrolla metástasis a distancia.

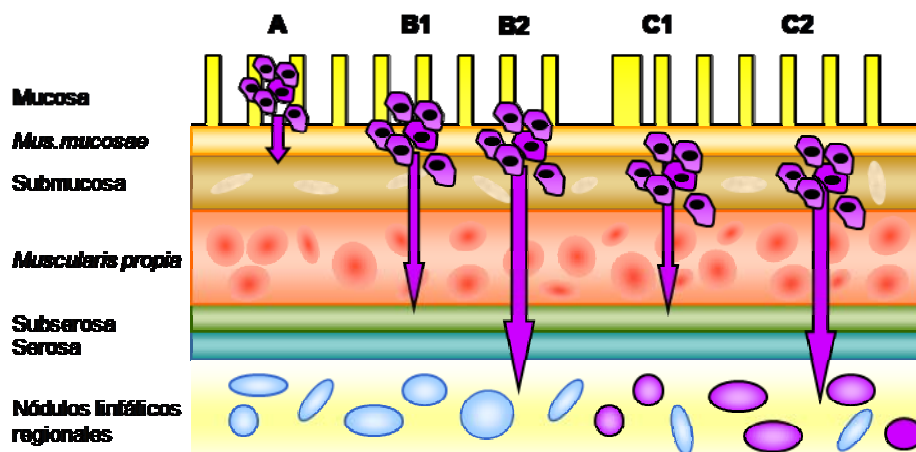


Fig.3. Clasificación del cáncer colorrectal en diferentes estadios según el sistema Astler-Coller (Astler y cols., 1954).

- La clasificación TNM (tumor, nódulos, metástasis) clasifica los carcinomas de acuerdo a la profundidad que alcanza el tumor primario (T), la presencia o ausencia de metástasis en nódulos linfáticos regionales (N) y la existencia o no de metástasis distal (M) (Sobin y cols., 1988; Greene y cols., 2002; Greene y cols., 2004) (Fig. 3):
  - Tx: No se puede determinar el tumor primario.
  - T0: Tumor primario no identificable.
  - Tis: Carcinoma *in situ* (tumor limitado a la mucosa).
  - T1: Implicación de la submucosa, pero no hay penetración a través de la *muscularis propia*.
  - T2: Invasión, pero no penetración a través de la *muscularis propia*.
  - T3: Penetración a través de la *muscularis propia* a la capa subserosa, pero no hacia otros órganos.
  - T4: Perforación del peritoneo visceral o invasión de otros órganos o tejidos
- Nx: No se puede determinar metástasis en nódulos.
- N0: Metástasis en nódulos no identificable.
- N1: Implicados entre 1 y 3 nódulos.
- N2: Implicados 4 o más nódulos.
- MX: No se puede determinar una metástasis distal.
- M0: Metástasis distal no identificada.
- M1: Metástasis distal.

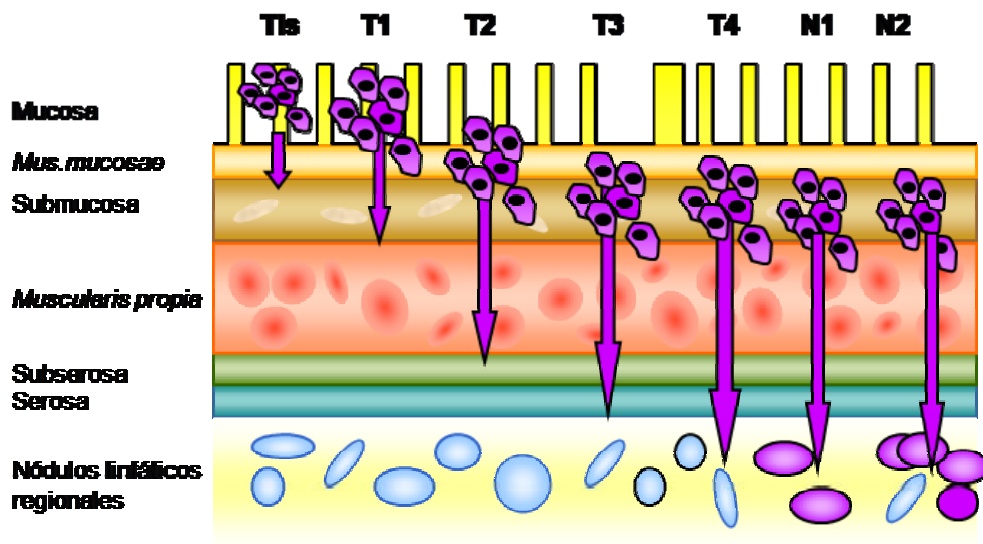


Fig.4. Clasificación del cáncer colorrectal según el sistema TNM (Sobin y cols., 1988; Greene y cols., 2002; Greene y cols., 2004).

- La AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) utilizando la nomenclatura del sistema TNM estableció 5 grupos o estadios. En el estadio 0 (cáncer *in situ*) el cáncer se encuentra en el

revestimiento más interno del colon, en el Estadio I el cáncer se ha extendido más allá del revestimiento interno del colon hasta la segunda y tercera capa y la pared interna del colon, pero no se ha extendido a la pared exterior del colon ni a la parte externa del colon. En el Estadio II, el cáncer se ha extendido a la parte externa del colon hasta el tejido adyacente, aunque, los ganglios linfáticos no están comprometidos. En el Estadio III, el cáncer se ha extendido a la parte externa del colon hasta el tejido adyacente y los ganglios linfáticos se encuentran afectados. Y en el Estadio IV, el tumor ha metastatizado llegando a otros órganos, principalmente al hígado, y la enfermedad es considerada generalmente como incurable (Greene y cols., 2002).

**Tabla 2. Clasificación del Cáncer Colorrectal según estadios y su correlación entre las nomenclaturas de Dukes, Astler-Coller, TNM y AJCC.**

AJCC/TNM	Dukes	Astler-Coller
Estadio 0 TisNOMO		
Estadio I T1NOMO T2NOMO	A	A B1
Estadio II Estadio IIA T3N0M0 Estadio IIIB T4N0M0	B	B2 B3
Estadio III Estadio IIIA T1T2N1M0 Estadio IIIB T3T4N1M0 Estadio IIIC TN2M	B	C1 C2/C3 C1/C2/C3
Estadio IV TNM1	D	D

### 1.5.- Marcadores Tumorales

Se consideran marcadores tumorales todas las sustancias producidas o inducidas por la célula neoplásica que reflejen su crecimiento y/o actividad y que permitan conocer la presencia, la evolución o la respuesta terapéutica de un tumor maligno. La mayoría están basados en mutaciones de genes o cambios en el RNA, proteínas y/o metabolitos. Mientras que los cambios moleculares que ocurren durante el desarrollo del tumor pueden tardar años en ser detectados, los biomarcadores del cáncer se caracterizan porque pueden

ser potencialmente utilizados para detectar la enfermedad en los estadios tempranos. Idealmente, los marcadores tumorales deben ser específicos de la enfermedad y reconocibles en suero, plasma y/o orina de forma que sean fácilmente aplicables a la clínica rutinaria y pueden tener gran utilidad en (Duffy, 2001):

- Chequeo para la búsqueda de una enfermedad de aparición temprana.
- Actuar como soporte diagnóstico.
- Determinación de la prognosis de una enfermedad.
- Predecir la eficacia terapéutica.
- Mantener la supervisión del paciente tras ser sometido a una intervención quirúrgica.

En función del uso clínico, los marcadores se pueden clasificar en varios tipos:

- Marcadores tumorales de diagnóstico: sirven para la detección temprana de la enfermedad en un individuo y deben ser específicos del tejido correspondiente y no estar influenciados por enfermedades benignas de ese tejido u órgano en particular. Además, deben tener una alta sensibilidad y especificidad, especialmente para ser empleados en el cribado de la población sana.
- Marcadores tumorales de pronóstico: se utilizan para estimar el riesgo de recurrencia o mortalidad de un paciente en relación a la patología. Los marcadores predictivos proporcionan información sobre la respuesta a un tratamiento, mientras que los marcadores de seguimiento o monitorización permiten controlar la evolución de un paciente e identificar recidivas y metástasis (Schrohl y cols., 2003).

A pesar de la investigación llevada a cabo en este tema, actualmente existen pocos marcadores tumorales que sean útiles desde el punto de vista clínico. En los últimos años se han propuesto un gran número de marcadores para el cáncer colorrectal que pueden detectarse en suero, tejido o heces aunque de momento no se han llevado a la clínica rutinaria (Crawford y cols., 2003; Allen y cols., 2005).

### 1.5.1.- Marcadores de suero

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es el marcador de suero más utilizado en el CCR. Fue descrito por Gold y Freedman (1965) a partir de homogeneizado de CCR, y recibió su nombre debido a que también fue detectado en células mucosas del intestino en su estadio fetal. Su baja sensibilidad en el diagnóstico de estadios tempranos, junto con su baja especificidad, hacen que su utilidad se limite principalmente al ámbito del pronóstico y monitorización, ya que indica la presencia de una posible metástasis y ha sido señalado como un factor pronóstico de recaída y supervivencia (Téllez-Ávila y cols., 2005).

### 1.5.2.- Marcadores detectados en heces

La determinación de sangre oculta en heces (SOH) es el método más utilizado para la exploración del CCR. Existen dos tipos de pruebas para detectar la presencia de sangre en las heces, una basada en la actividad peroxidasa y la otra basada en una reacción inmunoquímica. Se ha mostrado que la detección de SOH reduce la incidencia del cáncer colorrectal en aproximadamente un 20% y su mortalidad en un 16% (Vogel y cols., 2005).

Por otra parte, los *tests* de detección de DNA en heces determinan la presencia de DNA eliminado debido a las lesiones neoplásicas y expulsado a través de las heces. En estos casos, se suele utilizar un panel de varios marcadores, siendo los más frecuentes los genes mutados de *k-ras*, *APC*, *p53*, *BAT-26* y DNA de cadena larga (Ahlquist y cols., 2000; Dong y cols., 2001). Haug y Brenner (2005) indicaron que los paneles de marcadores de DNA detectaban el cáncer colorrectal con una especificidad igual o superior al 95% y una sensibilidad variable entre 60-90%. Para poder comparar el uso de los paneles de DNA con la determinación de SOH, Imperiale y colaboradores (2004) llevaron a cabo un estudio en el que concluyeron que, a pesar de que ninguna de las técnicas detectaba la mayoría de las neoplasias, el panel de DNA mostraba una mayor sensibilidad que la determinación de SOH. Sin embargo, el elevado coste y complejidad de esta técnica hacen que sea muy difícil que reemplace a la detección fecal de sangre en un futuro próximo.

### 1.5.3.- Marcadores tumorales de tejido

Mientras que los macadores de suero se utilizan principalmente en la supervisión post-operativa y los marcadores de heces son más recomendables para la exploración del CCR, los marcadores tumorales tisulares han sido estudiados con el objetivo de poder considerarlos de valor pronóstico y predictivo.

El descubrimiento en 1993 del fenómeno conocido como “inestabilidad de microsatélites” (MSI, *Microsatellite Instability*) observado tanto en el cáncer de colon hereditario como en el esporádico, permitió la identificación de una vía alternativa en el desarrollo del cáncer (Lothe y cols, 1993). Los microsatélites son repeticiones de DNA de longitud variable (de 1 a 5 bases de DNA) “en tándem”, que tienen lugar principalmente en regiones no codificantes. Existe aproximadamente medio millón de loci de microsatélites repartidos por todo el genoma humano, lo que les convierte en la clase de DNA repetitivo más abundante. El fenómeno MSI se define como un cambio en la longitud debido a inserciones o deleciones de las unidades de repetición de un microsatélite dentro de un tumor, cuando éste se compara con su tejido normal correspondiente. El MSI está causado por un defecto subyacente en el sistema de reparación de errores (MMR, *Mismatch repair system*). En humanos, el



sistema MMR incluye las proteínas hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 y hPMS2 y es el responsable de la identificación y eliminación de las anomalías que tienen lugar durante la replicación del DNA o como resultado de daños físicos o químicos. Un fallo en la supresión de estos errores de replicación puede producir mutaciones en la pauta de lectura o proteínas incompletas, lo cual afecta generalmente a los genes que incluyen o que tienen vinculadas regiones de repeticiones de microsatélites.

El gen supresor de tumores *p53* codifica un factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en apoptosis, angiogénesis, ciclo celular y mantenimiento del genoma (el-Deiry, 1998). *p53* ha sido investigado tanto como marcador de pronóstico como de terapia para el CCR y aunque varios estudios sugieren que *p53* alterado puede tener un impacto en el desarrollo de la enfermedad, esta relación ha sido considerada como moderada. Por lo que, actualmente, la determinación de *p53* no se recomienda ni para el asesoramiento de la prognosis y para la predicción de respuesta a la terapia en CCR (Duffy y cols., 2007).

*K-ras* es uno de los oncogenes que aparece más veces mutado en todos los tipos de cáncer en humanos. Codifica para una proteína de unión a nucleótidos de guanina implicada en la transducción de señales. Dicha señalización puede resultar en un aumento de la proliferación celular, supervivencia o inducción de apoptosis (Castagnola y cols., 2005). Se conoce que el 50% de los CCR presentan mutación en *K-Ras*, aunque existen datos conflictivos sobre la relación entre la presencia de la mutación y la prognosis de los pacientes, lo que hace que no exista unanimidad en su uso como marcador tumoral del CCR.

#### 1.5.4.- Diagnóstico del cancer colorrectal

El cribado o *screening* de CCR consiste en un método de control del cáncer que intenta seleccionar personas con enfermedad premaligna o localizada, con el objetivo de proporcionarle un tratamiento precoz, antes de que el tumor llegue a ser invasivo. Este cribado se suele llevar a cabo en personas mayores de 50 años, así como en aquellas que pertenecen a alguno de los grupos de riesgo como presencia de historia familiar de CCR en diversos grados, determinadas etnias o historia personal de pólipos, entre otros.

En la actualidad, los métodos empleados en el cribado del CCR consisten en la detección de sangre oculta en heces, sigmoidoscopia flexible y la colonoscopia. Estos métodos son costosos y efectivos, a pesar de que estudios realizados no han permitido determinar cuál de ellos es el más adecuado, ni tampoco la periodicidad con la que debería llevarse a cabo (Ouyang y cols., 2005). En la Unión Europea se recomienda llevar a cabo la determinación de sangre oculta en heces en hombres y mujeres con edades comprendidas entre 50 y 74 años.

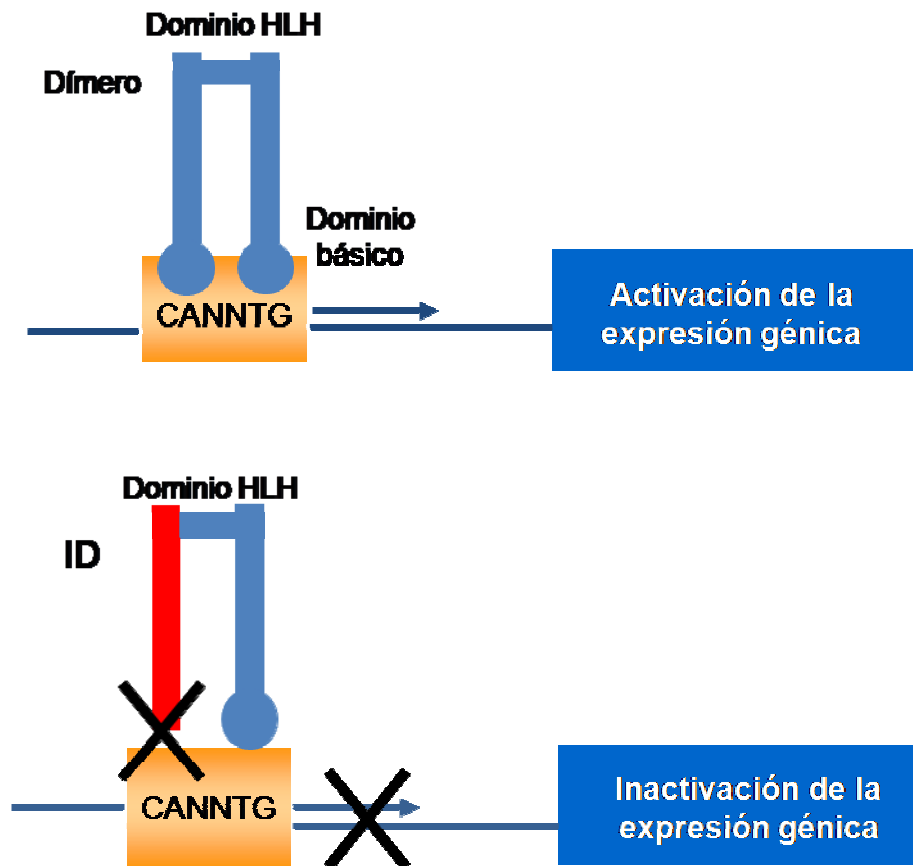
En general, la diagnosis se realiza una vez que el cáncer ya ha comenzado a invadir los tejidos, debido a los síntomas que ocasiona (cambios de hábitos intestinales o sangrado rectal, entre otros). El diagnóstico es establecido a partir de la historia médica, la exploración física y diferentes técnicas de apoyo como la detección de SOH, la sigmoidoscopia, el enema de bario, la colonoscopia, pruebas sanguíneas para la valoración de marcadores y biopsia.

La prevención primaria del cáncer colorrectal consiste en el diagnóstico de adenomas o carcinomas en estadios tempranos y en su eliminación, impidiendo de esta forma su desarrollo. Así, diagnosticar el CCR en estadios tempranos es crucial para la efectividad de los tratamientos (Ramírez Armengol y cols., 2004).

## 2.- FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN HELIX-LOOP-HELIX: PROTEÍNAS ID

La superfamilia de factores de transcripción *Helix-Loop-Helix* (HLH) comprende más de 240 proteínas que participan en un amplio número de procesos del desarrollo (Atchley y cols., 1997). En organismos pluricelulares se ha comprobado que los factores HLH son necesarios para procesos importantes del desarrollo como neurogénesis, miogénesis, hematopoyesis y desarrollo pancreático (Bain y cols., 1994; Zhuang y cols., 1994; Lee y cols., 1995; Porcher y cols., 1996).

Los factores de transcripción básicos HLH (bHLH) tienen un dominio estructural HLH altamente conservado que consiste en dos  $\alpha$ -hélices separadas por un bucle y una región adyacente rica en aminoácidos básicos. El dominio HLH es responsable de la dimerización mientras que el dominio básico N-Terminal es responsable de la unión al DNA y de la activación de los genes (Kadesch, 1993; Ma y cols., 1994). Los factores HLH se unen como homo o heterodímeros a una secuencia de DNA conocida como caja-E (CANNTG) o a una secuencia homóloga conocida como caja-N (CACNAG) (Massari y Murre, 2000) activando la transcripción *in vivo* (Lassar y cols., 1991). Las proteínas bHLH actúan promoviendo la diferenciación e inhibiendo la proliferación, por lo que su actividad se encuentra altamente regulada, siendo inhibidos por las proteínas ID (Inhibidor de la Diferenciación o Inhibidor de la unión al DNA). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia bHLH pero funcionan como reguladores dominantes negativos de algunos factores bHLH al formar heterodímeros no funcionales ID-bHLH que impiden a los bHLH unirse al DNA (Fig. 5) (Benezra, 2001).



**Fig.5. Representación gráfica del efecto de la unión de las proteínas ID a los factores de transcripción básicos bHLH.** En ausencia de las proteínas ID, los factores bHLH forman homo- o heterodímeros y el complejo formado se une a secuencias concretas del DNA, promoviendo la transcripción génica (superior). Sin embargo, cuando aparecen las proteínas ID, se unen a uno de los factores de transcripción, de manera que no se forma el complejo de unión al DNA (inferior).

Dentro de la familia de proteínas ID se conocen 4 miembros ID1, ID2, ID3 e ID4 todos ellos con un tamaño similar (13-20 KDa) y cada uno codificado por un gen individual, localizados en humanos en los cromosomas 20q11 (ID1), 2p25 (ID2), 1p36.1 (ID3) y 6p21-22 (ID4). Al margen del dominio HLH altamente conservado, sus secuencias divergen excepto cuatro dominios más pequeños que presentan homología y muestran una clara diferencia en su patrón de expresión y función (Riechmann y cols., 1994; Riechmann y cols., 1995). Además de su papel como reguladores negativos de la diferenciación celular, posteriormente, se ha observado que las proteínas ID desempeñan otros muchos papeles dentro de la biología del desarrollo, el ciclo celular o la biología tumoral (Tabla 3).

**Tabla 3. Funciones biológicas de las proteínas ID.**

<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
Reguladores del destino celular	Ellis y cols., 1990; Martinsen y cols., 1998; Blom y cols., 1999; Jaleco y cols., 1999; Lyden y cols., 1999; Yokota y cols., 1999; Janatpour y cols., 2000; Rivera y cols., 2000
Actúa en la embriogénesis/organogénesis	Ellis y cols., 1990; Garrell y cols., 1990; Jen y cols., 1992; Lyden y cols., 1999; Yokota y cols., 1999; Maeda y cols., 2004
Promoción del crecimiento celular y paro en la diferenciación celular	Jen y cols., 1992; Iavarone y cols., 1994; Sun, 1994; Desprez y cols., 1995; Atherton y cols., 1996; Morrow y cols., 1999; Kondo y cols., 2000; Agnew y cols., 2004; Suh y cols., 2008
Progresión del ciclo celular	Barone y cols., 1994; Hara y cols., 1994; Peverali y cols., 1994; Cummings y cols., 2008
Inducción de apoptosis	Florio y cols., 1998; Norton y cols., 1998; Alani y cols., 1999; Kim y cols., 1999; Yang y cols., 2008
Inmortalización de células primarias	Norton y cols., 1998; Alani y cols., 1999
Oncoproteínas in vivo	Wice y cols., 1998; Kim y cols., 1999; Morrow y cols., 1999
Angiogénesis in vivo y promoción de la invasión tumoral	Desprez y cols., 1998; Lyden y cols., 1999; Lin y cols., 2000; Swarbrick y cols., 2008

## 2.1 Proteína ID1 y Cáncer

El gen *ID1* ha sido propuesto como un potencial oncogén cooperante que regula la supervivencia celular (Ling y cols., 2003), el crecimiento celular (Ling y cols., 2002; Swarbrick y cols., 2005) y la senescencia (Alani y cols., 1999; Ohtani y cols., 2001). La sobre-expresión de ID1 se encuentra relacionada con una mayor invasividad de las células tumorales, estadios más avanzados y peor pronóstico en varios tipos de cáncer humano (Lin y cols., 2000). Además, en varios tipos de cáncer la expresión de ID1 se ha asociado con la activación de la angiogénesis (Lee y cols., 2004; Ling y cols., 2004) y la inducción de la invasión celular (Lin y cols., 2000; Takai y cols., 2001).

El gen *ID1* ha sido propuesto como marcador molecular de la progresión del cáncer de próstata (Coppé y cols., 2004) y se ha observado que su expresión se encuentra elevada durante el desarrollo y progresión tumoral en epidermis (Langlands y cols., 2000), páncreas (Sato y cols., 2007) y pulmón (Kamalian y cols., 2008).

El Dr. Desprez y colaboradores sugirieron que las proteínas ID1, ID2 y el gen *ITF-2* formaban una especie de red de proteínas HLH que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis en epitelio de mama (Parrinello y cols., 2001). En una serie de líneas celulares de mama mostraron que niveles elevados de la proteína ID1 se correlacionaban con el proceso de invasión y la transfección de líneas celulares de cáncer de mama no invasivas con *ID1*, aumentaba su invasividad (Lin y cols., 2000). En estudios con ratones, se observó que reduciendo la expresión de *ID1* mediante la tecnología antisentido las células mamarias cancerosas disminuían su invasividad *in vitro* y reducían la metástasis *in vivo* (Fong y cols., 2003).

En cuanto a la presencia de las proteínas ID en el cáncer colorrectal, se ha observado que tanto ID1 como ID2 e ID3 muestran un aumento en su expresión en adenocarcinoma de colon humanos al compararlos con su expresión en la mucosa normal. Además, dicha expresión de la proteína ID1 se encuentra correlacionada con una pérdida en la funcionalidad de *p53* y un aumento en el índice mitótico (Wilson y cols., 2001). Adicionalmente, ID1 ha sido propuesto como una potencial diana terapéutica así como un regulador del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en cáncer colorrectal (Meteoglu y cols., 2008). Recientemente, se ha sugerido que la proteína ID1 podría estar implicada en el desarrollo del CCR y que la sobre-expresión detectada en este tejido puede ser considerada como un marcador de la progresión tumoral (Zhao y cols., 2008).

### 3.- BIBLIOGRAFIA

Abad Esteve A. Cáncer de colon y recto. En: Manual de Oncología Clínica y Molecular. (R. Rosell, A. Abad. M. Monzó. A. Barnadas). Arán Ediciones, Madrid. 2000:295-308.

Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000; 119: 1219-1927.

Alani RM, Hasskarl J, Grace M, Hernandez MC, Israel MA, Münger K. Immortalization of primary human keratinocytes by the helix-loop-helix protein, Id-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(17): 9637-9641.

Allen WL, Johnston PG. Role of genomic markers in colorectal cancer treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4545-4552.

Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954;139(6):846-52.

Atchley WR, Fitch WM. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(10): 5172-5176.

Atherton GT, Travers H, Deed R, Norton JD. Regulation of cell differentiation in C2C12 myoblasts by the Id3 helix-loop-helix protein. *Cell Growth Differ* 1996; 7(8): 1059-1066.

Bagnardi V, Bangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *BJC* 2001; 85: 1700-1705.

Bain G, Maandag EC, Izon DJ, Amsen D, Kruisbeek AM, Weintraub BC, Krop I, Schlissel MS, Feeney AJ, van Roon M. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 1994; 79(5): 885-892.

Barone MV, Pepperkok R, Peverali FA, Philipson L. Id proteins control growth induction in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(11): 4985-4988.

Behrens J. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem. Soc. Trans* 2005; 33: 672-675.

Benezra R. Preface: Regulation by Id. *Oncogene* 2001; 20: 8288-8289.

Blom B, Heemskerk MH, Verschuren MC, van Dongen JJ, Stegmann AP, Bakker AQ, Couwenberg F, Res PC, Spits H. Disruption of alpha beta but not of gamma delta T cell development by overexpression of the helix-loop-helix protein Id3 in committed T cell progenitors. *Embo J* 1999; 18(10): 2793-2802.

Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 2006; 51(5): 391-396.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Vries MV, Van Boom JH, Van Der Eb JH, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancer. *Nature* 1987; 327: 293-297.

Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: epidemiology. *BMJ* 2000; 321: 805-808.

Calvert PM, Frucht H. The Genetics of colorectal cancer. *Ann Inter Med* 2002; 137: 603-612.

Castagnola P, Giaretti W. Mutant KRAS, chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1756(2): 115-125.

- Cole A., Ji H, Simpson RJ. Proteomic analysis of colonic crypts from normal, multiple intestinal neoplasia and p53-null mice: a comparison with colonic polyps. *Electrophoresis* 2000; 21: 1772-1781.
- Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, Bennington JL, Desprez PY. Id-1 and Id-2 Proteins as Molecular Markers for Human Prostate Cancer Progression. *Clin Cancer Res* 2004; 10(6): 2044-2051.
- Crawford NP, Colliver DW, Galandiuk S. Tumor markers and colorectal cancer: utility in management. *J Surg Oncol* 2003; 84: 239-248.
- Cummings SD, Ryu B, Samuels MA, Yu X, Meeker AK, Healey MA, Alani RM. Id1 delays senescence of primary human melanocytes. *Mol Carcinog* 2008; 47(9): 653-659.
- Davidson NO. Genetic testing in colorectal cancer: who, when, how and why. *Keio J Med* 2007; 56(1): 14-20.
- Desprez PY, Hara E, Bissell MJ, Campisi J. Suppression of Mammary Epithelial Cell Differentiation by the Helix-loop-Helix Protein Id-1. *Mol Cell Biol* 1995; 15(6): 3398-3404.
- Desprez PY, Lin CQ, Thomasset N, Sympson CJ, Bissell MJ, Campisi J. A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the Helix-loop-Helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* 1998; 18(8):4577-4588.
- Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, Hibi K, Goodman SN, D'Allesio M, Paty P, Hamilton SR, Sidransky D, Barany F, Levin B, Shuber A, Kinzler KW, Vogelstein B, Jen J. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic target. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(11): 858-865.
- Duffy MJ. Clinical uses of tumor markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001; 38(3): 225-262.
- Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, Lamerz R, Peltomaki P, Sturgeon C, Topolcan O. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43(9):1348-60.
- Dukes, CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* 1932; 35: 323-332.
- el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 1998; 8(5):345-57.
- Elzagheid A, Buhmeida A, Korkeila E, Collan Y, Syrjänen K, Pyrhönen S. Nuclear  $\beta$ -catenin expression as a prognostic factor in advanced colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14(24): 3866-3871.
- Ellis HM, Spann DR, Posakony JW. extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 1990; 61(1): 27-38.
- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7): 721-733.
- Fearon ER, Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
- Fini L, Hotchkiss E, Fogliano V, Graziani G, Romano M, De Vol EB, Qin H, Selgrad M, Boland CR, Ricciardiello L. Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2008; 29(1):139-146.

Florio M, Hernandez MC, Yang H, Shu HK, Cleveland JL, Israel MA. Id2 promotes apoptosis by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol* 1998; 18(9): 5435-5444.

Fong S, Itahana Y, Sumida T, Singh J, Coppe JP, Liu Y, Richards PC, Bennington JL, Lee NM, Debs RJ, Desprez PY. Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23): 13543-13548.

Gabriel VB, Dukes CE, Bussey HJR. Lymphatic spread in cancer of the rectum. *Br J Surg* 1935; 23: 395-413.

Garrell J, Modolell J. The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* 1990; 61(1): 39-48.

Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *CEBP* 2001; 10(7):725-31.

Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-481.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. Colon and Rectum. En: *AJCC Cancer Staging Handbook* (Greene FL, Balch CM, Fleming ID, Fritz AG Eds.) Springer-Verlag, New York. 2002: 83-90.

Greene FL, Stewart AK, Norton HJ. New tumor-node-metastasis staging strategy for node-positive (stage III) rectal cancer: an analysis. *J Clin Oncol* 2004; 22(10): 1778-1784.

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis gene. *Cell* 1991; 66(3): 589-600.

Hara E, Yamaguchi T, Nojima H, Ide T, Campisi J, Okayama H, Oda K. Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* 1994; 269(3): 2139-2145.

Haug U, Brenner H. New stool test for colorectal cancer screening: a systematic review focusing on performance characteristics and practicalness. *Int J Cancer* 2005; 117(2): 169-176.

Iavarone A, Garg P, Lasorella A, Hsu J, Israel MA. The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 1994; 8(11): 1270-1284.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME. Faecal DNA versus faecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average risk population. *N Engl J Med* 2004; 351(26): 2704-2714.

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429): 558-561.

Jaleco AC, Stegmann AP, Heemskerk MH, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Spits H. Genetic modification of human B-cell development: B-cell development is inhibited by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *Blood* 1999; 94(8): 2637-2646.

Janatpour MJ, McMaster MT, Genbacev O, Zhou Y, Dong J, Cross JC, Israel MA, Fisher SJ. Id-2 regulates critical aspects of human cytotrophoblast differentiation, invasion and migration. *Development* 2000; 127(3): 549-558.



Jen Y, Weintraub H, Benezra R. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. *Genes Dev* 1992; 6(8): 1466-1479.

Kadesch T. Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ* 1993; 4(1): 49-55.

Kamalian L, Gosney JR, Forootan SS, Foster CS, Bao ZZ, Beesley C, Ke Y. Increased expression of Id family proteins in small cell lung cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res* 2008; 14(8): 2318-2325.

Key TJ, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. The effect of diet on risk of cancer. *Lancet* 2002; 360(9336): 861-868.

Kim D, Peng XC, Sun H. Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1999; 19(12): 8240-8253.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87(2): 159-170.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68(4): 820-823.

Kondo T, Raff M. The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* 2000; 19(9): 1998-2007.

Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostres H, Giardello FM. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nature Genetics* 1997; 17(1): 79-83.

Langlands K, Down GA, Kealey T. Id proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 2000; 60(21): 5929-5933.

Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 1991; 66(2): 305-315.

Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by neuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 1995; 268(5212): 836-844.

Lee KT, Lee YW, Lee JK, Choi SH, Rhee JC, Paik SS, Kong G. Overexpression of Id-1 is significantly associated with tumour angiogenesis in human pancreas cancers. *Br J Cancer* 2004; 90(6):1198-1203.

Lin CQ, Singh J, Murata K, Itahana Y, Parrinello S, Liang SH, Gillett CE, Campisi J, Desprez PY. A role for Id-1 in the Aggressive Phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60(5): 1332-1240.

Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Lee TK, Fan TY, Xu K, Tsao SW, Wong YC. Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* 2002; 21(55):8498-8505.

Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Xu K, Tsao SW, Wong YC. Id-1 expression promotes cell survival through activation of NF- $\kappa$ B signalling pathway in prostate cancer cells. *Oncogene* 2003; 22(29):4498-4508.

Ling MT, Wang X, Lee DT, Tam PC, Tsao SW, Wong YC. Id-1 expression induces androgen-independent prostate cancer cell growth through activation of epidermal growth factor receptor (EGF-R). *Carcinogenesis* 2004; 25(4): 517-525.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17(1): 43-52.

Lockhart-Mummery A. Cancer and heredity. *Lancet* 1925; 1: 427-429.

Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 379-385.

Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Pylkkänen L, Heimdal K, Andersen TI, Møller P, Rognum TO. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53(24):5849-5852.

Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 1999; 401(6754): 670-677.

Ma PC, Rould MA, Weintraub H, Pabo CO. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on ADN recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 1994; 77(3): 451-459.

Maeda Y, Tsuji K, Nifuji A, Noda M. Inhibitory helix-loop-helix transcription factors Id1/Id3 promote bone formation in vivo. *J Cell Biochem* 2004; 93(2): 337-344.

Martinsen BJ, Bronner-Fraser M. Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science* 1998; 281(5379): 988-991.

Massari M, Murre C. Helix-loop-helix Proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 2000; 20(2): 429-440.

Meteoglu I, Meydan N, Erkus M. Id-1: regulator of EGFR and VEGF and potential target for colorectal cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27(1):69.

Morrow MA, Mayer EW, Perez CA, Adlam M, Siu G. Overexpression of the Helix-Loop-Helix protein Id2 blocks T cell development at multiple stages. *Mol Immunol* 1999; 36(8): 491-503.

Norton JD, Atherton GT. Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol Cell Biol* 1998; 18(4): 2371-2381.

Ohtani N, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohashi Y, Sharrocks AD, Peters G, Hara E. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* 2001; 409(6823): 1067-70.

Okamoto AD, Demetrick DJ, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Bennet WP, Forrester K, Gerwin B, Serrano M, Beach DH, Harris CC. Mutations and altered expression of p16ink4 in human cancer. *PNAS* 1994; 91(23): 11045-11049.

Ouyang DL, Chen JJ, Getzenberg RH, Schoen RE. Noninvasive testing for colorectal cancer: A review. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(6): 1393-1403.

Parrinello S, Lin CQ, Murata K, Itahana Y, Singh J, Krtolica A, Campisi J, Desprez PY. Id-1, ITF-2 and Id-2 Comprise a Network of Helix-loop-Helix Proteins that Regulate Mammary Epithelial Cell Proliferation, Differentiation and Apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 39213-39219.

Peverali FA, Ramqvist T, Saffrich R, Pepperkok R, Barone MV, Philipson L. Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins. *Embo J* 1994; 13(18): 4291-4301.

Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 1996; 86(1): 47-57.

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J. Pathol* 1999; 187(1): 112-126.

Ramirez-Armengol JA, Fernandez Díez S. Diagnóstico precoz del cáncer de colon. *Revis Can* 2004; 18(3): 133-140.

Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982; 300(5888): 149-152.

Riechmann V, van Crüchten I, Sablitzky F. The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(5): 749-755.

Riechmann V, Sablitzky F. Mutually exclusive expression of two dominant-negative helix-loop-helix (dnHLH) genes, Id4 and Id3, in the developing brain of the mouse suggests distinct regulatory roles of these dnHLH proteins during cellular proliferation and differentiation of the nervous system. *Cell Growth Differ* 1995; 6(7): 837-843.

Rivera RR, Johns CP, Quan J, Johnson RS, Murre C. Thymocyte selection is regulated by the helix-loop-helix inhibitor protein, Id3. *Immunity* 2000; 12(1): 17-26.

Rothberg PG, Spandorfer HM, Erisman MD, Staroscik RN, Sears HF, Peterson RO, Peterson RO, Astrin SM. Evidence that c-myc expression defines two genetically distinct forms of colorectal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 1985; 52(4): 629-632.

Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, Takagi H, Sogabe Y, Sasaki Y, Idogawa M, Sonoda T, Mori M, Imai K, Tokino T, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis* 2007; 28(12):2459-2466.

Schrohl AS, Holten-Andersen M, Sweep F, Schmitt M, Harbeck N, Foekens J, Brunner N. C. Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol. Cell. Proteomics* 2003; 2(6): 378-387.

Sobin LH, Hermanek P, Hutter RV. TNM classification of malignant tumors. A comparison between the new (1987) and the old editions. *Cancer* 1988; 61(11): 2310-2314.

Stewart J, Evan G, Watson J, Sikora K. Detection of the c-myc oncogene product in colonic polyps and carcinomas. *Brit. J. Cancer* 1986; 53(1): 1-6.

Sugarbaker PH, Macdonald JS and Gunderson LL. Colorectal cancer. En: *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (DeVita VT, Hellman S and Roseberg SA eds) JB Lippincott, Philadelphia.1982: 799–800.

Suh HC, Leraanansaksiri W, Ji M, Klarmann KD, Renn K, Gooya J, Smith D, McNiece I, Lugthart S, Valk PJ, Delwel R, Keller JR. Id1 immortalizes hematopoietic progenitors in vitro and promotes a myeloproliferative disease in vivo. *Oncogene* 2008; 27: 5612–5623

Sun XH. Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* 1994; 79(5): 893-900.

Swarbrick A, Akerfeldt MC, Lee CS, Sergio CM, Caldon CE, Hunter LJ, Sutherland RL, Musgrove EA. Regulation of cyclin expression and cell cycle progression in breast epithelial cells by the helix–loop–helix protein Id1. *Oncogene* 2005; 24(3): 381-389.

Swarbrick A, Roy E, Allen T, Bishop JM. Id1 cooperates with oncogenic Ras to induce metastatic mammary carcinoma by subversion of the cellular senescence response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(14): 5402-5407.

Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I. Id1 expression is associated with histological grade and invasive behavior in endometrial carcinoma. *Cancer Letters* 2001; 165(2):185-193.

Télez-Ávila FI, Garcia-Osogobio SM. El antígeno carcinoembrionario: a propósito de un viejo conocido. *Revista de Investigación Clínica* 2005; 57(6): 814-819.

Vogel TW, Zhuang Z, Li J, Okamoto H, Furuta M, Lee YS, Zeng W, Oldfield EH, Vortmeyer AO, Weil RJ. Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2005; 11(10): 3264-3632.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Presinger AC, Leppert M, Nakamura R, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9): 525-32.

Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin* 1994; 44(3): 160-170.

Wice BM, Gordon JI. Forced expression of Id-1 in the adult mouse small intestinal epithelium is associated with development of adenomas. *J Biol Chem* 1998; 273(39): 25310-25319.

Wilson JW, Deed RW, Inoue T, Balzi M, Becciolini A, Faraoni P, Potten CS, Norton JD. Expression of Id Helix-Loop-Helix Proteins in Colorectal Adenocarcinoma Correlates with p53 Expression and Mitotic Index. *Cancer Res* 2001; 61(24): 8803-8810.

Yang Y, Wang HC, Sun XH. Id1 induces apoptosis through inhibition of RORgammat expression. *BMC Immunol* 2008; 9(20): 1-13.

Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugawara S, Adachi S, Nishikawa S, Gruss P. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 1999; 397(6721): 702-726.

Zhao ZR, Zhang ZY, Zhang H, Jiang L, Wang MW, Sun XF. Overexpression of Id-1 protein is a marker in colorectal cancer progression. *Oncol Rep* 2008; 19(2): 419-424.

Zhuang Y, Soriano P, Weintraub H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 1994; 79(5): 875-884.

## **CAPÍTULO 13:**

### **DIFERENCIACIÓN ENDOTELIAL EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO DEL HEPATOCARCINOMA.**

Joana Marquez Clavijo

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	308
2.- EL ENDOTELIO Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES .....	308
3.- DEFINICIÓN Y ANGIOGENESIS EN GENERAL .....	309
4.- ANGIOGENESIS TUMORAL DEL HEPATOCARCINOMA.....	311
4.1.- El hígado .....	311
4.2.- Hepatocarcinoma .....	313
5.- DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES EN EL HCC.....	314
6.- CONCLUSIONES .....	316
7.- BIBLIOGRAFIA .....	318

## 1.- INTRODUCCIÓN

El endotelio, que está formando la parte interior de los vasos sanguíneos, juega un importante papel en muchas funciones fisiológicas, por lo que las células endoteliales (CE), que constituyen el endotelio poseen no solo un metabolismo muy activo sino también diferentes fenotipos (William C, 2007), diferenciándose en células endoteliales venosas, arteriales, del pulmón, cerebro, sistema reproductivo e hígado (William C, 2007).

Estas células cumplen una serie de funciones entre las que se encuentra la angiogénesis, que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos, a partir de los ya preexistentes (Liekens S. y De Clercq, 2001). Durante la progresión de los hepatocarcinomas (HCC) las células endoteliales hepáticas, también denominadas células endoteliales de sinusoide hepático (CESH), van a participar activamente en este proceso (Das SK y Vasudevan. D.M., 2007), migran, proliferan y se diferencian en células endoteliales vasculares, favoreciendo así la creación de nuevos vasos sanguíneos mediante los cuales el tumor puede aumentar de tamaño y facilitar su diseminación (Paku S, 1998).

## 2.- EL ENDOTELIO Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

Las células endoteliales forman el endotelio vascular, un epitelio plano simple (de una sola capa de células) que recubre la cara interna de los vasos sanguíneos y el corazón. El endotelio proviene de la diferenciación de los hemangioblastos y/o angioblastos del mesodermo (William C, 2007). Las CE pueden diferenciarse en otras líneas celulares así como otros linajes celulares pueden diferenciarse a CE. Se ha visto *in vivo*, como células de linajes adiposos, tienen el potencial de diferenciarse en células endoteliales y así participar en la formación de vasos sanguíneos (Planat-Benard V. y Silvestre J. 2004).

La forma de estas células varía a través de la red vascular. Normalmente son planas, pero en las vénulas, adquieren una forma cuboidal, pueden variar desde 0,1 µm de los capilares y venas a 1 µm en la Aorta (William C, 2007). Las CE y sus núcleos, se sitúan alineados en dirección al flujo sanguíneo en los segmentos estrechos de las arterias, no siendo así en los puntos de ramificación. Este alineamiento de las células depende del flujo y puede ser reversible y remodelado en respuesta a un estrés hemodinámico (William C, 2007). En cuanto a la ultraestructura de estas células se han descrito, hendiduras y vesículas con revestimiento de clatrina, cuerpos multivesiculares y lisosomas, lo que representa un juego estructural para la ruta endocítica (William C, 2007).

Las células endoteliales están implicadas en multitud de funciones, entre ellas destaca su papel en la homeostasis, (del griego *homeo* que significa “similar” y *estasis* “posición” “estabilidad”). Mediante esta función, se mantiene la sangre en un estado líquido, y se impide la formación de coágulos, en caso de haber una rotura en la pared del endotelio (William C, 2007).

Entre las numerosas funciones que cumplen estas células figuran las siguientes (Michiels C, 2003):

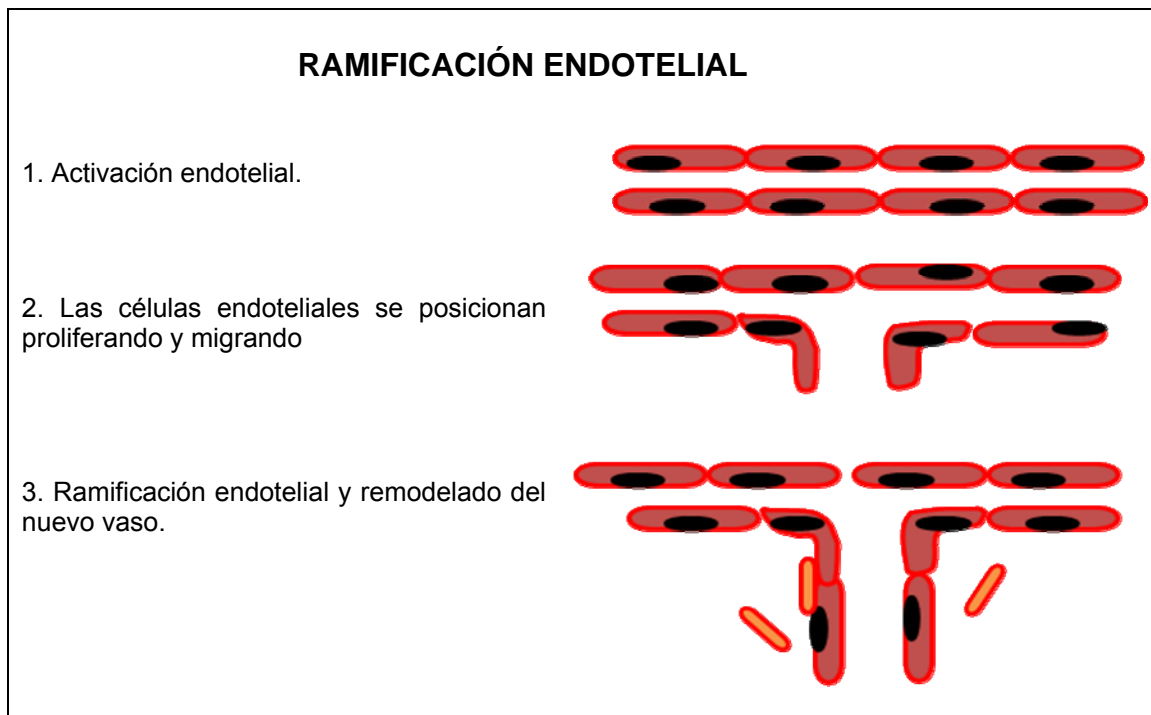
1. Forman una superficie lisa que facilita el flujo laminar de la sangre y previenen la adherencia de las células sanguíneas.
2. Forman una barrera de permeabilidad para el intercambio de nutrientes entre el plasma y el intersticio celular, regulando al mismo tiempo el transporte de sustancias entre ambos (Michiels C, 2003). Esta permeabilidad se puede separar en 2 tipos, la basal y la inducible. En condiciones basales, existe un flujo continuo de material entre la sangre y el intersticio, regulado fisiológicamente. Esto ocurre en los capilares que son los vasos con mayor capacidad de intercambio de la circulación. Por otro lado, la permeabilidad inducible se da en casos de inflamación aguda o crónica, principalmente en vénulas post-capilares (William C, 2007).
3. Regulan la angiogenesis y el remodelado vascular.
4. Contribuyen a la formación y mantenimiento de la matriz extracelular.
5. Producen factores de crecimiento en respuesta al daño vascular, influyendo especialmente en la proliferación del músculo liso vascular.
6. Producen sustancias como la prostaciclina ( $PGI_2$ ) y el óxido nítrico (NO) que regulan la agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis.
7. Sintetizan y degradan diversas hormonas.
8. Participan en la respuesta inmune generando citoquinas que modulan la actividad de los linfocitos.
9. Producir y liberar agentes vasodilatadoras y vasoconstrictoras que actúan de forma paracrina sobre las células musculares lisas adyacentes, regulando su contracción. Entre las sustancias vasodilatadoras figuran: el óxido nítrico (NO) (antiguamente conocido como factor relajador derivado del endotelio o EDRF), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y prostaciclina. Entre las sustancias vasoconstrictoras figuran: las endotelinas y el tromboxano A2 (Michiels C, 2003).

### 3.- DEFINICIÓN Y ANGIOGENESIS EN GENERAL

Como ya hemos mencionado, la angiogénesis es un proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos a partir de los ya preexistentes. Este mecanismo normalmente se produce durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas. Cuando los vasos sanguíneos crecen indefinidamente, la angiogénesis se convierte en patológica y sostiene la progresión de muchas enfermedades neoplásicas y no neoplásicas (Folkman, 1995).

Este mecanismo se produce mediante una serie de pasos secuenciados (Figura 1 1), como son:

1. La degradación de la membrana basal (MB), formada por una red continua de colágeno tipo IV, glucoproteínas (laminina, entactina) y proteoglicanos (heparán sulfato), sintetizada por las EC que rodean el vaso sanguíneo.
2. La migración de las células endoteliales al espacio intersticial.
3. La proliferación de estas células.
4. Su diferenciación para obtener vasos sanguíneos maduros.



**Figura 1;** Muestra el proceso que realizan las células endoteliales durante la ramificación endotelial de la angiogenesis. (Basado en Liekens S. y De Clercq, 2001).

Este proceso está regulado mediante la producción de factores angiogénicos como, FGF, TGF  $\alpha$  y  $\beta$  y proteasas (colagenasas de diversos tipos) (Wang X y Sheibani N, 2005). Algunos factores angiogénicos actúan directamente sobre las células endoteliales, mientras que otros activan las células inflamatorias locales.

La angiogénesis inducida por los tumores posee 2 efectos malignos, por una parte provee al tumor de vasos sanguíneos incrementando la probabilidad de la su diseminación, y a su vez permite un aumento del tamaño del tumor, ya que, generalmente estos no pueden crecer más de 2 mm de diámetro si no es acompañado de un desarrollo angiogénico paralelo, debido a la carencia de oxígeno y de otros nutrientes esenciales. (Paku S, 1998),



## 4.- ANGIOGENESIS TUMORAL DEL HEPATOCARCINOMA

### 4.1.- El hígado

El hígado es un órgano que cumple un gran número de de funciones, entre las que se encuentran (Krstić RV, 1991);

1. El metabolismo intermediario de proteínas, carbohidratos y lípidos.
2. Sintetiza proteínas plasmáticas como la albúmina y el fibrinógeno.
3. Fabrica la bilis.
4. Es el máximo responsable de la desintoxicación de los productos de desechos endógenos y exógenos.
5. Almacena una serie de compuestos tales como glucógeno, vitaminas y minerales.
6. En el periodo fetal cumple una función hematopoyética. (Ploemacher y Soest 1977).

Histológicamente está dividido en 4 lóbulos (Krstić RV, 1991).

- El lóbulo derecho, el más voluminoso.
- El lóbulo izquierdo, extendido sobre el estomago.
- El lóbulo cuadrado.
- El lóbulo caudado o lóbulo de Spiegel.

El sistema circulatorio hepático, está formado por el sistema portal y arteria hepática. El sistema portal lleva sangre poco oxigenada pero muy rica en nutrientes mientras que la circulación general depende de la arteria hepática que se encarga del transporte de la sangre oxigenada.

En cuanto al parénquima hepático está compuesto por;

**Lóbulos hepáticos:** Unidades hexagonales formadas por hepatocitos dispuestos alrededor de una vena central o centrolobulillar.

**Espacio portal:** Áreas triangulares situadas en los ángulos de los lóbulos hepáticos. En su interior contiene ramificaciones de la arteria hepática, ramificaciones de la vena porta, capilares linfáticos y el ducto biliar.

**Sinusoides hepáticos:** Consisten en unos canalículos que se disponen entre las láminas de hepatocitos y donde confluyen desde la periferia de los lobulillos las ramas de la arteria hepática y vena porta. La sangre fluye desde las tríadas a la vena central, circulando en forma centrípeta. La pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas que carecen de membrana basal. En los sinusoides confluyen la circulación hepática y portal, estos drenan su contenido a la vena hepática central, de ésta pasa a las venas hepáticas derecha e izquierda, y finalmente a la vena cava inferior.

**Espacio de Disse:** Es un estrecho espacio perisinusoidal, que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos, ocupada por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña libremente la superficie

de los hepatocitos. En el espacio de Disse se produce el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el plasma donde se forma la abundante linfa hepática. En este espacio también se encuentran las células almacenadoras de grasa, células de Ito, o células estrelladas hepáticas (CEHs).

**Células de Kupffer:** Son los macrófagos residentes en el hígado, pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear, que se encuentran adheridos al endotelio y emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Su función es fagocitar eritrocitos envejecidos y otros cuerpos, actuando además como células presentadoras de antígenos.

**Hepatocitos:** Constituyen alrededor del 80% de la población celular del tejido hepático. Son células poliédricas con 1 o 2 núcleos esféricos poliploides y nucléolo prominente. Presentan el citoplasma acidófilo con cuerpos basófilos y son muy ricos en orgánulos. Además, en su citoplasma contienen inclusiones de glucógeno y grasa. La membrana plasmática de los hepatocitos presenta un dominio sinusoidal con microvellosidades que miran hacia el espacio de Disse, y un dominio lateral que mira hacia el hepatocito vecino. Las membranas plasmáticas de dos hepatocitos contiguos delimitan un canalículo donde será secretada la bilis. La presencia de múltiples orgánulos en los hepatocitos se relaciona con sus múltiples funciones, como son la síntesis de proteínas (albúmina, fibrinógeno y lipoproteínas del plasma), el metabolismo de hidratos de carbono, la formación de la bilis, el catabolismo de fármacos y tóxicos y el metabolismo de lípidos, purinas y gluconeogénesis.

**Células estrelladas del hígado:** Las CEH representan entre el 5 y el 8% del total de las células del hígado, y son vitales para mantener la homeostasis en el microambiente del sinusoides hepático. Así, las CEH juegan un papel crucial en el almacenamiento y el metabolismo de la vitamina A. Estas células contienen aproximadamente el 95% de los depósitos de retinoides del cuerpo. Los retinoides de los alimentos son absorbidos en el intestino y transportados en forma de ésteres en los quilomicrones hacia el hígado. Allí son captados por los hepatocitos en los cuales se hidroliza el éster y nuevamente se forma retinol, que es transferido a la célula estrellada, en donde nuevamente es reesterificado (Arthur y cols., 1994). La CEH también desempeña un papel muy importante a nivel histológico, ya que por un lado mantiene el equilibrio en la composición de la matriz extracelular hepática al ser uno de los mayores productores de colágeno y de metaloproteinasas de matriz (MMP) y además es el soporte sobre el que se asientan las células endoteliales del sinusoides hepático (CESH),

**Células endoteliales del sinusoides (CESH):** Son células endoteliales que inervan la compleja red del circuito vascular del hígado y se encuentran alineando el sinusoides hepático. Estas células son diferentes a las células endoteliales vasculares tanto funcional como morfológicamente dado que carecen de membrana basal (Nakamura S. y Muro H., 1997), poseen la fenestra o pequeños poros que actúan como un filtro dinámico (Smedsrod B y, Pertoft H., 1990), ya que filtra fluidos, solutos y partículas que se intercambian entre el lumen del sinusoides y el espacio de Disse (Brael F y Wisse E, 2002), y juegan un papel importante en la eliminación mediada por receptor de varias macromoléculas de la sangre, incluyendo pequeñas partículas (Smedsrod B y,

Pertoft H., 1990). Por otra parte también pueden endocitar y degradar IgG-ICc soluble (Ito I y Muro H, 1990), ya que las CESH expresan en su membrana antígenos generalmente asociados a células presentadoras de antígenos tales como el receptor del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CD4) (Nakamura S. y Muro H., 1997), el receptor del complejo de unión de lipopolisacáridos (CD14) (Nakamura S. y Muro H., 1997), el receptor de la trombospondina (CD36) (Nakamura S. y Muro H., 1997) y el receptor de tipo II Fc  $\gamma$  (CD32) (Nakamura S. y Muro H., 1997).

El hígado es el lugar más común para las metástasis distantes y nódulos secundarios, en primer lugar porque filtra el drenaje venoso de la viscera intra-abdominal incluyendo, el esófago distal, el estómago, el bazo, el intestino delgado, colon, recto, glándulas adrenales, páncreas, vesícula biliar y árbol biliar (Takeda A. y Stoeltzing O., 2002). Además de recibir el 30% del rendimiento cardiaco. En segundo lugar, fisiológicamente está ocupado por numerosos tipos celulares que proveen un rico microambiente para el crecimiento tumoral.

## 4.2.- Hepatocarcinoma

El hepatocarcinoma (HCC) es un tumor con alto grado de malignidad que se caracteriza por tener un alto grado de neovascularización (Poon RTP y Ho JW, 2004). El mal pronóstico de esta enfermedad está asociada con la tendencia para la invasión vascular y la metástasis (Tang ZY, 2001). La metástasis consiste en una compleja serie de pasos secuenciales. Una vez las células tumorales escapan del tumor primario, deben diseminarse, vía sanguínea o linfática, o hacia cavidades internas donde sobrevivir tanto a trauma mecánico (turbulencia sanguínea) como a sistemas de defensa endógenos (células inmunes y no inmunes: células endoteliales, óxido nítrico) o exógenos (drogas terapéuticas, cirugía). Una vez establecida como metástasis, parasitan el territorio invadido, donde producen efectos dañinos diversos.

La supervivencia de las células cancerígenas a través de cada uno de estos pasos es completamente necesaria para el éxito de la metástasis y el fallo de uno solo de ellos conlleva la ineficacia total del proceso (Weiss, 1994). Por lo que se ha demostrado que la angiogenesis tiene una importante contribución en el crecimiento del tumor, la invasividad y el potencial metastático del HCC (Poon RTP y Ng IO, 2002). Para que esto tenga lugar, la angiogenesis está regulada por una serie de factores angiogénicos que incluyen, factores de crecimiento (VEGF) (Michiels C, 2003), quimiocinas (IL-18) (Michiels C, 2003), enzimas angiogénicas (NO sintasa) (NOs) (Michiels C, 2003), receptores específicos endoteliales y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) (Michiels C, 2003).

La angiogenesis tumoral de HCC requiere una reprogramación extensiva de las CESH a nivel transcripcional y post-transcripcional (Bohman s. y Matsumoto T., 2005). Tras la degradación proteolítica de la matriz extracelular por varias proteasas y glucosidasas (Liekens S. y De Clercq, 2001), las células endoteliales comienzan a proliferar y migrar a través de la matriz y se diferencian formando el vaso sanguíneo nuevo (Liekens S. y De Clercq, 2001). Todo esto tiene lugar bajo los estímulos de diferentes factores de

crecimiento, de los cuales muchos serán liberados durante la degradación de la matriz extracelular (Liekens S. y De Clercq, 2001).

El proceso angiogénico se encuentra altamente regulado por el balance entre factores de crecimiento pro-angiogénicos, anti-angiogénicos y citocinas (tabla 1).

Se ha postulado que bajos niveles de oxígeno, no solo contribuyen a dañar el hígado, sino que también inducen la expresión de numerosos factores involucrados en la angiogénesis (Bardag- Gorce F.y French B.A., 2002). El factor de crecimiento vascular (VEGF) es uno de los primeros péptidos angiogénicos que se han aislado (Pang importante papel que juega en el desarrollo del sistema vascular (Ferrara N y Carver-Moore K, 1996). Algunos estudios sugieren, que las células tumorales secretan este factor (Ferrara N y Carver-Moore K, 1996) que también puede actuar de forma autocrina, estimulando la proliferación de las células tumorales (Masood R. y Cai J., 2001).

Ante la hipoxia las células tumorales inducen la expresión del VEGF y su receptor mediante la vía del factor inducible de hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) (Liekens S. y De Clercq, 2001). El HIF-1 $\alpha$  es un factor de transcripción sensible a los niveles de oxígeno que facilita la adaptación celular ante la deprivación del oxígeno (Das SK y Vasudevan D.M., 2007). HIF consta de dos subunidades, la subunidad-alfa sensible al oxígeno (HIF-alfa) y la subunidad beta (HIF-beta) que se expresa constitutivamente (Das SK y Vasudevan D.M., 2007). Cuando las células experimentan la hipoxia la subunidad HIF-alfa se estabiliza y dimeriza en el núcleo con la subunidad HIF-beta para formar un factor de transcripción activo (Hease 2006). Además del VEGF existen numerosos factores implicados (Das SK y Vasudevan D.M., 2007). R. y Ronnie T.P. 2006) siendo el factor angiogénico mejor estudiado (Pang R. y Ronnie T.P. 2006).

## 5.- DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES EN EL HCC.

Las células endoteliales sinusoidales (CESH), bajo los diferentes estímulos van a diferenciarse para crear los vasos sanguíneos maduros. En este proceso de diferenciación van a padecer una serie de cambios morfológicos y funcionales. Por otra parte no solo las CESH van a participar en el proceso angiogénico, ya que en el torrente sanguíneo, encontramos células progenitoras endoteliales (CPE) que también van a pasar por el proceso de diferenciación para crear el vaso (Das SK y Vasudevan D.M., 2007).

Tabla 1. Moléculas que participan en la angiogénesis

Activadores de la angiogénesis	Efecto
NO	Estimula la vasodilatación, Aumenta la permeabilidad vascular
Familia VEGF	Aumenta la permeabilidad vascular, induce la proliferación de células endoteliales (CE), adhesión de leucocitos, regula el lumen vascular
VEGF-R, NRP-1	Integra las señales angiogénicas y de supervivencia
Integrinas $\alpha v\beta 3$ , $\alpha v\beta 5$ , $\alpha 6\beta 1$	Receptores de MEC, comunicación intercelular, regulan lumen celular
uPA	Remodelación MEC, liberación y activación factores de crecimiento
PAI-1	Estabiliza los vasos nacientes
MMPs	Remodelación de MEC, liberación y activación de factores de crecimiento
PlGF, aFGF, bFGF, HGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$	Inducen proliferación de CE
MCP-1 y otras quimiocinas	Papel pleiotrópico en angiogénesis
MEF2C	Regulación del diámetro de los vasos
Efrinas	Determina la ramificación y la especificidad arterial/venosa
PDGF-B y receptores	Reclutamiento de pericitos
Ang-1	Estabilización de contactos intercelulares, inhibe la permeabilidad
Tie-2	Receptor de Ang-1 y Ang-2
Ang-2	Antagonista de Ang-1 (desestabiliza los vasos, causa muerte de CE)
TGF- $\beta 1$ , endoglina	Promueve la maduración vascular, estimula la generación de MEC, induce la diferenciación de células mesenquimales a pericitos
Cyr61, Fisp12	Estimula la migración dirigida de las CE por una vía dependiente de $\alpha v\beta 3$ , modificadores de la MEC, promueve la supervivencia de CE

Inhibidores de la angiogénesis	Efecto
VE-cadherina, PECAM-1, $\beta$ -catenina	Moléculas de uniones adherentes, adhesión intercelular, proporciona rigidez vascular
Claudinas, ocludina, JAM-1, -2, -3	Moléculas de uniones estrechas, adhesión intercelular, proporciona rigidez vascular
Conexinas	Moléculas de uniones GAP, facilitan la comunicación intercelular
Integrinas $\alpha v\beta 3$ , $\alpha v\beta 5$	Suprime la supervivencia de CE mediada por VEGF y Flk-1
TIMPs	Inhiben la degradación de MEC por las MMPs, inhibe la proliferación de CE
Angiostatina y fragmentos del plasminógeno relacionados	Suprimen la angiogénesis tumoral
Endostatina, IFN- $\beta$ , LIF	Suprime la proliferación de CE
TSP-1	Inhiben la formación de lumen
Ang-1 (en exceso)	Vuelve los vasos demasiado rígidos e inhibe la formación de brotes
Ang-2	Facilita la formación de brotes en presencia de VEGF

Este patrón de diferenciación de las CESH depende de factores del microambiente específicos del tejido hepático (Gouysse G. y Frachon S, 2004). Durante el proceso de diferenciación de las CESH en los hepatocarcinomas tempranos o de baja malignidad, mantienen el mismo fenotipo que las CESH en hígado normal, sin embargo, durante la progresión del tumor las CESH pierden gradualmente su fenotipo peculiar, es decir, la expresión de CD4, CD14, CD36, CD32 y van adquiriendo características de células endoteliales capilares que carecen de la expresión de dichas moléculas (Nakamura S. y Muro H., 1997).

En este proceso de diferenciación, las CESH que normalmente poseen fenestra y carecen de membrana basal, con la progresión del tumor van perdiendo la fenestra y adquiriendo paulatinamente la membrana basal, donde se deposita laminina, y se expresa el antígeno relacionado al factor VIII de coagulación (FVIII RAg). Así mismo se expresa el lugar de unión de la lectina *Ulex europaeus* aglutinin I (UEA-1) que son característicos de las células endoteliales capilares pero no de las CESH en hígados normales (no dañados) (Nakamura S. y Muro H., 1997). La expresión de CD4, CD34, CD32 y CD36 típica de las CESH se va perdiendo con la progresión del tumor y una vez diferenciadas en células endoteliales vasculares no muestran este marcaje (Nakamura S. y Muro H., 1997).

Por otro lado, se ha observado que las células progenitoras de endoteliales (CPE) (células muy proliferativas, que provienen de la medula ósea y están en el torrente sanguíneo), también pasan por un proceso de diferenciación convirtiéndose en células endoteliales maduras que formaran el vaso sanguíneo (Gouysse G. y Frachon S, 2004). Las CPEs se reconocen por la expresión de CD34, FLK-1, CD133, CXCR4, CD 146 y c-KIT. La expresión de CD133 va desapareciendo según las CPEs se van alejando de la medula ósea. Estas células contribuyen en los primeros estadios del crecimiento del tumor aunque se desconoce porqué son requeridas para mantener la integridad del tumor y establecer los vasos tumorales (Richter-Ehrenstein C. y Rentzsch J., 2007).

## 6.- CONCLUSIONES

1. Las células endoteliales que forman el endotelio vascular tienen varias funciones como son, formar una superficie lisa y barrera de permeabilidad, contribuir a la formación y mantenimiento de la matriz extracelular, regular la angiogénesis y el remodelado vascular entre otras. Por lo que poseen un metabolismo muy activo.
2. Estas células no solo cumplen numerosas funciones y poseen un metabolismo muy activo sino que también muestran una gran heterogeneidad fenotípica dada su función y localización.
3. La angiogenesis es un proceso fisiológico normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y en la cicatrización de las heridas, el cual también se da en procesos patológicos como el crecimiento y el desarrollo tumoral.
4. Durante el proceso angiogénico del HCC, las CESH juegan un papel primordial en la formación de los nuevos vasos sanguíneos al participar en la degradación de la matriz extracelular y por su posterior proliferación, migración y diferenciación, formando así el nuevo vaso sanguíneo.
5. Durante el proceso de diferenciación las CESH muestran cambios genéticos, morfológicos y funcionales, derivando en células endoteliales capilares.

6. Además de las CESH, las CPEs también participan en el proceso angiogénico al diferenciarse en células endoteliales maduras que ayudaran en la formación del vaso.

7. Todo este proceso está regulado por una serie de factores tanto pro-angiogénicos como anti-angiogénicos.

## 7.- BIBLIOGRAFIA

- Bardag- Gorce F., French B.A., Li J., Riley N.E., Yuan Q.X., Valinluck V., Fu P., Ingelma-Sundberg M., Yoon S., French S.W., The importance of cycling of blood alcohol levels in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease in rats. (2002) *Gastroenterology* 123; 325-335.
- Bohman S, Matsumoto T, Suh K, Dimberg A, Jakobsson L, Yuspa S and Claesson-Welsh L. Proteomic Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor induced Endothelial Cell Differentiation Reveals a Role for Chloride Intracellular Channel 4 (CLIC4) in Tubular Morphogenesis. *The journal of biological chemistry* Vol 280. (2005); No 51:42397-42404
- Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comparative Hepatology* (2002).
- Christiane Richter-Ehrenstein, Jörn Rentzsch, Sanyukta Runkel, Achim Schneider, Gilbert Schönfelder. Endothelial progenitor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (2007) 106:343-349.
- Das S.K., Vasudevan DM. Essential factors associated with hepatic angiogenesis. *Life Sciences* 81 (2007) 1555-1564.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* (1996) 380:439-42.
- Folkam J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995; 333:1757-1763
- Geraldine Gouysse, Sophie Frachon, Valerie Hervieu, Michelangelo Fiorentino, Antonia d'Errico, Jérôme Dumortier, Olivier Boillot, Christian Partensky, Walter F. Grigioni, Jean-Yves Scoazec. Endothelial cell differentiation in hepatocellular adenomas: implications for histopathological diagnosis. *Journal of Hepatology* 41. (2004) 259-266.
- Ito I, Muro H, Kosugi I, Shirasawa H. Alterations in Fc receptor activity in sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells during D-galactosamine (GalN)- induced liver injury in rats. A histological study. *Virchow Arch B Cell Pathol* (1990); 58:417-425.
- Krstić RV. *Human Microscopic Anatomy.* Springer-Verlag. 1991; 224-239
- Liekens s., De Clercq E., Neyts J.. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 61 (2001) 253-270.
- Masood R., J. Cai, T. Zheng, D.L. Smith, D.R. Hinton, P.S. Gill, Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 98 (2001) 1904-1913.
- Michiels C. Endothelial Cell Functions. *Journal of Cellular Physiology* (2003) 196:430-443.
- Nakamura S, Muro H, Suzuki S, Sakaguchi T, Konno H, Baba S and Syed A. Immunohistochemical Studies on Endothelial Cell Phenotype in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* (1997); 26:407-415.
- Paku S. Current Concepts of Tumor-Induced Angiogenesis. *Pathology Oncology Research* Vol4, No1, 62-75 (1998).
- Pang R, Ronnie T.P. Poon. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 242 (2006) 151-167.
- Planat-Benard V., Silvestre J., Cousin B., André M., Nibbelink M., Tamarat R., Clergue M., Manneville C., Saillan-Barreau C., Duriez M., Tedgui A., Levy B., Pénicaud L., Casteilla L.,



Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells: Physiological and Therapeutic Perspectives. *Circulation* (2004) 109; 656-663.

Poon RTP, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* (2004);91:1354-60.

Poon RTP, Ng IO, Lau C, et al. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* (2002); 20:1775-85.

Smedsrød B, Pertoft H, Gustafson S, Lauren TC. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J.* (1990) 266(2) 313-27.

Takeda A, MD, Stoeltzing O, MD, Ahmad SA, Reinmuth N, MD, Liu W, MD, Parikh A, MD, Fan F, BS, Akagi M, MD, and Ellis LM, MD. Role of Angiogenesis in the Development and Growth of Liver Metastasis. *Annals of Surgical Oncology* (2002); 9(7):610-616.

Tang ZY, Hepatocellular carcinoma-cause, treatment, and metastasis. *World J Gastroenterol* (2001);7; 445-54.

Wang X, Sheibani N, Watson JC. Modulation of tumor endothelial cell marker 7 expression during endothelial cell capillary morphogenesis. *Microvascular Research* 70 (2005); 189-197.

Widman JJ, Cotran RS, Fahimi HD. Mononuclear phagocytes [Kupffer cells] and endothelial cells: identification of two functional cell types in rat liver sinusoids by endogenous peroxidase activity. *J Cell Biol* (1972); 52:159-170.

William C. Aird. Phenotypic heterogeneity of the Endothelium: I. Structure, Function, and Mechanisms. (2007) 100; 158-173.

## **CAPÍTULO 14:**

### **DESDIFERENCIACIÓN: UNA ALTERNATIVA PARA FUTURAS TERAPIAS.**

Iker Badiola Etxaburu

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	321
2.- CÉLULAS MADRE.....	321
3.- CÉLULAS MADRE EN LA INVESTIGACIÓN.....	322
4.- ¿CÓMO SE DESDIFERENCIA UNA CÉLULA SOMÁTICA? .....	323
4.1.- c-Myc .....	324
4.2.- Klf4.....	326
4.3.- Oct3/4 – Sox 2 .....	327
4.4.- Combinación de los diferentes factores de transcripción.....	328
5.- PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	329
6.- BIBLIOGRAFÍA: .....	330

## 1.- INTRODUCCIÓN

La diferenciación celular, es el proceso por el cual, las células adquieren una forma y una función determinada durante el desarrollo embrionario o la vida de un organismo pluricelular especializándose en un tipo celular. La morfología de las células cambia notablemente durante la diferenciación, pero el genoma queda inalterable excepto en algunos casos puntuales. El hecho de que todas las células compartan el mismo genoma dentro de un organismo, independientemente del tipo celular, abre muchas puertas para la investigación en la búsqueda de técnicas y mecanismos que puedan revertir la diferenciación celular. La desdiferenciación celular o reversión del proceso de diferenciación, puede ser una herramienta muy útil para la obtención de células madre, evitando problemas bioéticos. Pero antes que nada, aclaremos ciertos conceptos relacionados con la diferenciación.

## 2.- CÉLULAS MADRE

Una célula madre o célula troncal, es una célula con capacidad de renovarse mediante divisiones mitóticas, o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada, y por lo tanto, producir uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad (López Guerrero, 2003). La mayoría de tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células madre, que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce algún daño tisular. Algunas células madre son capaces de diferenciarse en más de un tipo celular; como las células madre mesenquimales y las células hematopoyéticas, mientras que otras se cree que son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran, como las células madre de la piel o las células madre gonadales (células madre germinales). Las células madre las podemos clasificar de muchas formas y una puede ser en función de las capacidades que pueden tener:

- La **célula madre totipotente** puede crecer y formar un organismo completo, tanto los componentes embrionarios (las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino), como los extraembrionarios (la placenta). Cuando hablamos de célula madre totipotente nos referimos al cigoto.
- La **célula madre pluripotente** no puede formar un organismo completo, pero puede formar cualquier otro tipo de célula proveniente de los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo), así como el germinal y el saco vitelino.
- Las **células madre multipotentes** son aquellas que solo pueden generar células de su propia capa o linaje embrionario de origen. Por ejemplo: una célula madre mesenquimal de médula ósea, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de esa capa como miocitos, adipocitos u osteocitos, entre otras.

- Las **células madre unipotentes** pueden formar únicamente un tipo de célula particular.

### 3.- CÉLULAS MADRE EN LA INVESTIGACIÓN

Desde el descubrimiento de las células madre, se ha visto que podían ser una herramienta muy útil para el estudio del desarrollo y la diferenciación, así como para posibles aplicaciones terapéuticas en las patologías que presentasen deterioros celulares. Pero las posibles aplicaciones terapéuticas de estas células no han estado exentas de polémicas bioéticas por su origen embrionario. Hoy en día la investigación biomédica se ha centrado en el estudio de dos tipos de células madre: las **células madre embrionarias** y las **células madre adultas** (Bueno 2007).

La **célula madre embrionaria** es pluripotente, y en la actualidad se usa como modelo para estudiar el desarrollo embrionario, y para entender cuáles son los mecanismos y las señales que permiten a una célula pluripotente llegar a formar cualquier célula plenamente diferenciada del organismo.

En cambio las **células madre adultas**, que se encuentran en “nichos” específicos de determinados órganos; son las encargadas de regenerar tejidos en continuo desgaste como la piel o la sangre, o tejidos dañados como el hígado. Las células madre hematopoyéticas de médula ósea, las encargadas de la formación de la sangre son las más conocidas y empleadas en la clínica.

Pero es obvio que la potencialidad de una célula madre embrionaria no la posee una célula madre adulta. El desarrollo mismo de un embrión fecundado que empieza en el cigoto o célula madre por excelencia (totipotente) capaz de formar un organismo completo (feto y embrión), progresivamente va perdiendo esa capacidad de crear cualquier tipo celular. Por ejemplo, en la fase blástula o blastocito, las células son pluripotentes porque pueden diferenciarse en cualquier célula del organismo, salvo en la parte embrionaria de la placenta. Conforme avanza el desarrollo embrionario se forman diferentes poblaciones de células madre con una potencialidad de regenerar tejidos cada vez más restringida, y ya en la edad adulta, se localizan en zonas específicas llamados nichos, que se localizan en zonas concretas de los tejidos del organismo que solo son capaces de diferenciarse en un tipo celular en concreto. Dependiendo del estudio, nos interesarán más unos u otros tipos de células madre, pero en general las células madre embrionarias son las más interesantes por su amplio abanico de aplicaciones y su pluripotencialidad. Así, hoy en día, la comunidad científica se ha volcado en la obtención de estos tipos celulares para el estudio y la terapia de patologías que implican un severo deterioro celular. Pero las técnicas para la obtención de las células madre embrionarias para su posterior uso en la investigación no están exentas de problemas bioéticos, puesto que estas células se obtienen de embriones. Cuando hablamos de células madre embrionarias humanas (que hay que obtenerlas de embriones humanos), la problemática todavía es mayor y los diferentes matices que pueda tener la definición de organismo vivo dificultan todavía más el estudio en este campo. Por esta razón, y con la intención de buscar una alternativa a las dificultades

legales que derivan de la moral y la ética, en los últimos años, varios grupos de investigación punteros han pretendido plantear el problema desde otro punto de vista: revertir el proceso de pérdida progresiva de potencialidad buscando los mecanismos que desdiferencien la célula diferenciada (López–Moratalla 2006). Es decir, de una célula adulta que está diferenciada, por manipulación genética, obtener una célula pluripotente desdiferenciada y con alta capacidad proliferativa. La obtención de la célula diferenciada puede ser sumamente sencilla; un pellizco en la piel nos puede proporcionar células sin causar ninguna lesión en el individuo por lo que nos evitaríamos cualquier problema bioético.

#### 4.- ¿CÓMO SE DESDIFERENCIA UNA CÉLULA SOMÁTICA?

Son varios los grupos que han trabajado en la desdiferenciación de células somáticas, pero nos centraremos en el trabajo realizado por Takahashi y Yamanaka (2006) en la Universidad de Kyoto. Hasta el momento se había introducido el ADN de células somáticas en ovocitos, es decir huevos no fertilizados; incluso se habían fusionado células madre con el material genético proveniente de las células somáticas. De este modo se habían estudiado los factores de transcripción que conferirían totipotencialidad o pluripotencialidad al material genético de las células somáticas diferenciadas. Pero el grupo japonés ha ido más allá para conseguir células madre. Valiéndose de la literatura, el grupo de Yamanaka hizo una lista de 24 factores de transcripción implicados en la diferenciación como por ejemplo: Oct3/4, Sox-2, Nanog, Stat-3, c-myc y E-ras entre otros. Aislaron fibroblastos de embrión de ratón como células diferenciadas, e infectaron estas células por retrovirus con cada uno de los factores, para luego observar el cambio morfológico que experimentaban. En los experimentos que se insertaron los genes para los factores de transcripción individualmente no se consiguió ningún clon que tuviese las características morfológicas de una célula indiferenciada. En cambio en las transfecciones que se realizaron masivamente con los 24 factores, se seleccionaron hasta 6 clones, los cuales tenían una morfología clásica de una célula desdiferenciada. El estudio de estos 6 clones les llevó a la conclusión de que los cuatro factores de transcripción comunes en los 6 casos eran Oct 3/4, Sox2, c-Myc y Klf4. Una de las sorpresas de este trabajo fue la ausencia de Nanong como factor de transcripción esencial en la desdiferenciación celular. El factor de transcripción Nanong es un factor muy estudiado en el mantenimiento de la indiferenciación (Okita y cols. 2007). Pero se sabe que el factor Klf4 puede actuar indirectamente a través de la supresión de p53 en la activación de Nanong (Maherali y cols. 2007).

A continuación transfectaron los fibroblastos con estos 4 factores de transcripción y obtuvieron la desdiferenciación de los fibroblastos. Así se comprobó que cada uno de los cuatro factores con sus diferentes características pueden contribuir a la desdiferenciación:

-c-Myc: Es un factor que aparece mucho en los tumores, y se le atribuye capacidad para producir proliferación. También está muy relacionado con la acetilación de las histonas, y se piensa que esta acetilación de las histonas

puede permitir que Oct3/4 y Sox2 puedan unirse a sus respectivos sitios de unión.

-Klf4: Este factor reprime la actuación de p53. A su vez p53 es el factor que reprime Nanog durante el proceso de diferenciación.

-Oct 3/4 y Sox2 son los desencadenantes de cascadas que activan la actuación de otros factores como Fgf4 o Fbx15, que se han visto que son esenciales en el mantenimiento de la indiferenciación.

Esto no son más que pequeñas reseñas de las actividades que se les atribuyen a estos cuatro factores de transcripción, así como la conexión existente entre estos cuatro y otros factores (Werning y cols. 2007). En realidad, a estos factores se les atribuyen muchas otras actividades y las conexiones son mucho más complejas, y en muchos casos todavía no se conocen las interacciones entre las diferentes cascadas.

Profundicemos más en las características de estos cuatro factores para comprender mejor los mecanismos que están implicados en el proceso de desdiferenciación:

#### 4.1.- c-Myc

Se trata de un factor de transcripción que está codificado por el gen *c-myc*. En células sanas la expresión de este gen está regulada por señales externas como pueden ser factores de crecimiento, contacto con compuestos de la matriz extracelular o por controles internos como puede ser el ciclo celular. Cuando la célula se encuentra en estado quiescente expresa niveles basales muy bajos de c-Myc, pero cuando es estimulada por factores de crecimiento y entra en el ciclo celular, la expresión de la proteína se dispara, pero cuando la célula vuelve al estado quiescente se vuelve a los niveles normales de c-Myc (Luscher, 2001). Se han hecho experimentos sobreexpresando c-Myc en células normales y se ha observado que el organismo responde eliminando estas células que tienden a crecer incontroladamente. Este hecho se asocia con un mecanismo de defensa del organismo frente a un futuro evento neoplásico (Nilsson y Cleveland, 2004). El estudio de animales transgénicos deficientes para dicho gen no ha podido llevarse a cabo porque el intento de crear dichos organismos no ha sido posible. Los embriones que no tenían este gen no eran viables y se morían, claro indicativo de que estamos tratando con una proteína crucial en el desarrollo. En la misma dirección, fibroblastos de ratón deficientes para dicho gen apenas proliferaban y se volvían inviables (Sakar y Sharmar, 2002). En cambio la delección del gen en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) no los transformaba en organismos inviables pero el tamaño de dichos individuos era mucho menor y su esperanza de vida se reducía (Benassayag y cols., 2005). En conclusión este gen es esencial para el desarrollo embrionario y está implicado en los procesos de proliferación celular.

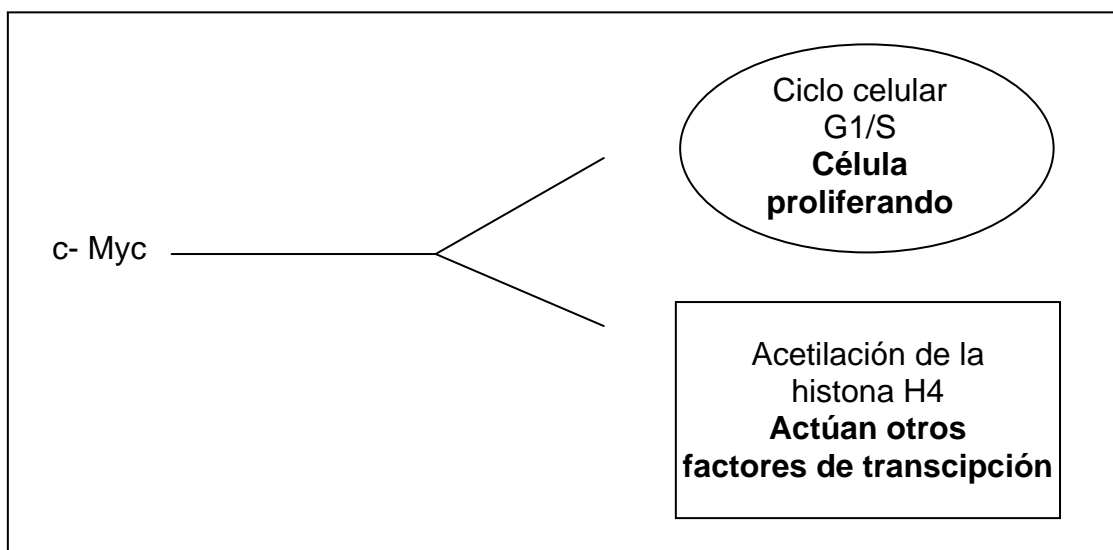
Hasta ahora hemos descrito lo que ocurre cuando nos enfrentamos con la delección del gen *c-myc* que conlleva la ausencia de la proteína. ¿Pero qué ocurre cuando dicho gen posee un exceso de copias? En ese caso nos

podemos encontrar con una sobreproducción de la proteína c-Myc y mayores tasas de proliferación celular. Y este es el caso del linfoma de Burkitt en el cual se da una translocación cromosomal y la copia del gen *c-myc* se ve aumentada con la subsiguiente sobreproducción de la proteína y una proliferación celular exacerbada. El exceso de copias del gen *c-myc* también se ha detectado en otros tipos de tumores como pueden ser algunos neuroblastomas, tumores de pulmón o colocalcinomas. Estos hechos nos muestran claramente que nos encontramos ante un oncogen (Ruf y cols., 2002).

Estudios recientes apuntan a que este oncogen regula procesos de proliferación celular, desregulación metabólica, apoptosis e inestabilidad genómica. En un modelo se propone que *c-myc* produce proliferación celular e inestabilidad cromosómica actuando en las fases G1 y S del ciclo celular. En el caso de las células en que se silencia la expresión de este gen se ha observado que dichas células tienen problemas para entrar en el ciclo celular. El paso de la fase G1 a S está regulado por Kinasas Dependientes de Ciclinas (CDK). Se ha visto que el c-Myc actúa como factor de transcripción para las ciclinas D1, D2 ciclina E, CDK4 y *cdc25A*; y se ha visto que inhibe indirectamente el inhibidor de las ciclinas. (Skouteris y Schroeder, 1996)

Otra función importante de la proteína c-Myc es su capacidad para acetilar la histona H4. La acetilación hace que ciertas regiones del genoma se vean expuestas a otros factores de transcripción que puedan actuar sobre estas regiones. Así la proteína c-Myc puede actuar indirectamente en otras funciones celulares (Scott y cols., 2001).

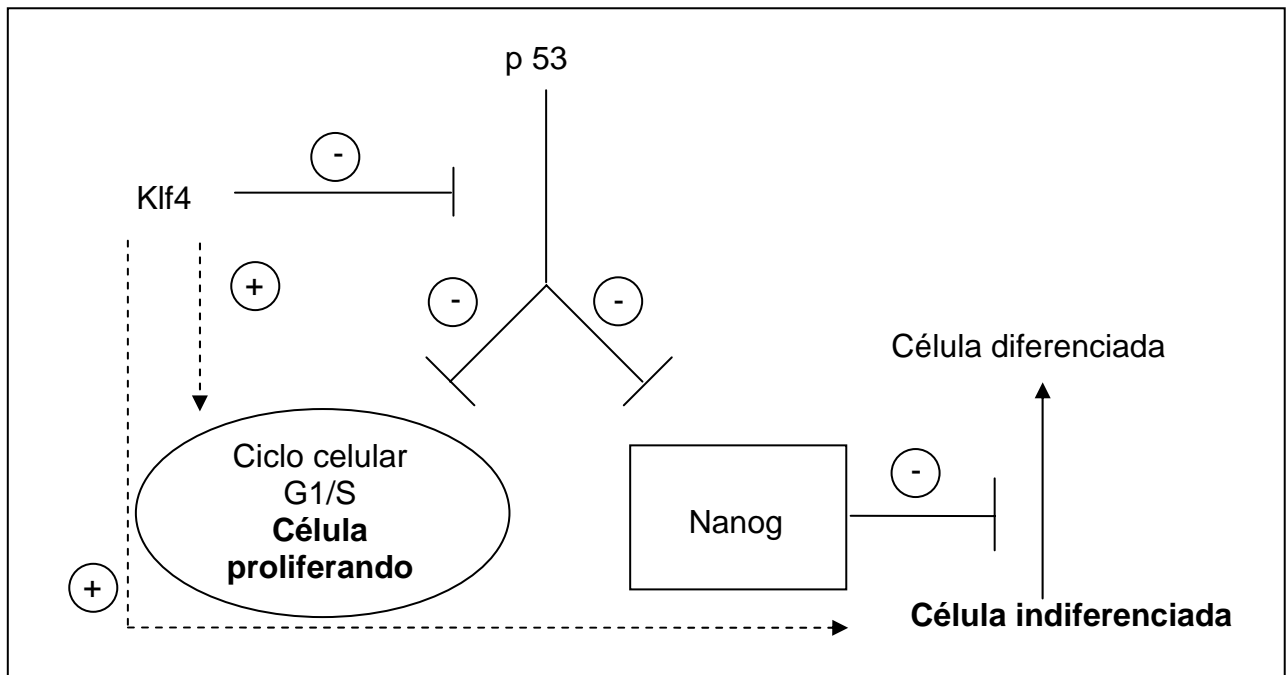
En resumen *c-myc* es un gen que codifica la proteína c-Myc que está implicada en la proliferación celular actuando en la transición G1-S sobre las ciclinas. Una sobreexpresión de dicho gen provoca una proliferación incontrolada de células y una represión conlleva problemas en el desarrollo del organismo porque las células pierden su capacidad proliferativa.



**Fig.1.** Actividad de c-Myc en la proliferación y la acetilación de las histonas.

## 4.2.- Klf4

*Krupple like factor 4* (Klf4) es un factor de transcripción que puede actuar como activador o represor dependiendo del promotor y las relaciones de cooperación que pueda entablar con otros factores de transcripción (Rowland y cols., 2005). Así por ejemplo puede transactivar el promotor iNOS en cooperación con p65, y el promotor p21Cip1/Waf 1 en cooperación con p53, pero directamente es supresor del promotor p53 (Zhang y cols., 2000). p53 es una proteína que se le ha definido como el guardián del genoma. Una de sus funciones principales es detener el ciclo celular en el punto de control G1/S. Por la capacidad que tiene de detener la proliferación celular la proteína p53 actúa como supresora de tumores; ante cualquier daño en el genoma, el p53 detiene el ciclo celular y evita que el proceso neoplásico avance, de ahí el sobrenombre de policía o guardián del genoma. Si el factor de transcripción Klf4 está sobreexpresado bloqueará la expresión de p53, con lo cual la célula podrá saltar uno de los puntos de regulación de su ciclo celular, produciéndose una proliferación celular sin control. Como en el caso anterior este factor de transcripción propicia un crecimiento sin control que es una característica de las células madre. Pero las células madre no solo tienen que tener capacidad proliferativa sino que tienen que ser pluripotentes y por lo tanto desdiferenciadas, y es en este punto donde también entra la proteína Klf4 a tomar parte a través del p53 (Flandez y cols., 2008)



**Fig.2.** Actividad de Klf4 en la proliferación y la diferenciación celular a través del bloqueo del factor de transcripción p53.



Nanog es una proteína que actúa como factor de transcripción en las células madre embrionarias, manteniendo la tasa de renovación de dichas células y evitando su desdiferenciación. Por lo tanto la presencia de esta proteína bloquea el proceso de diferenciación celular. Se ha observado que una de las proteínas que regula negativamente Nanog es la proteína p53. Por lo tanto en presencia de p53 no se produce Nanog por lo que la célula es libre para que se diferencie y pierda la pluripotencialidad. Como hemos apuntado anteriormente, Klf4 regula negativamente p53, y ésta a su vez actúa negativamente sobre Nanog; así la presencia de Klf4 actuará positivamente sobre Nanog, dando lugar al fenotipo indiferenciado de la célula (Pang y Thomson , 2007).

#### 4.3.- Oct3/4 – Sox 2

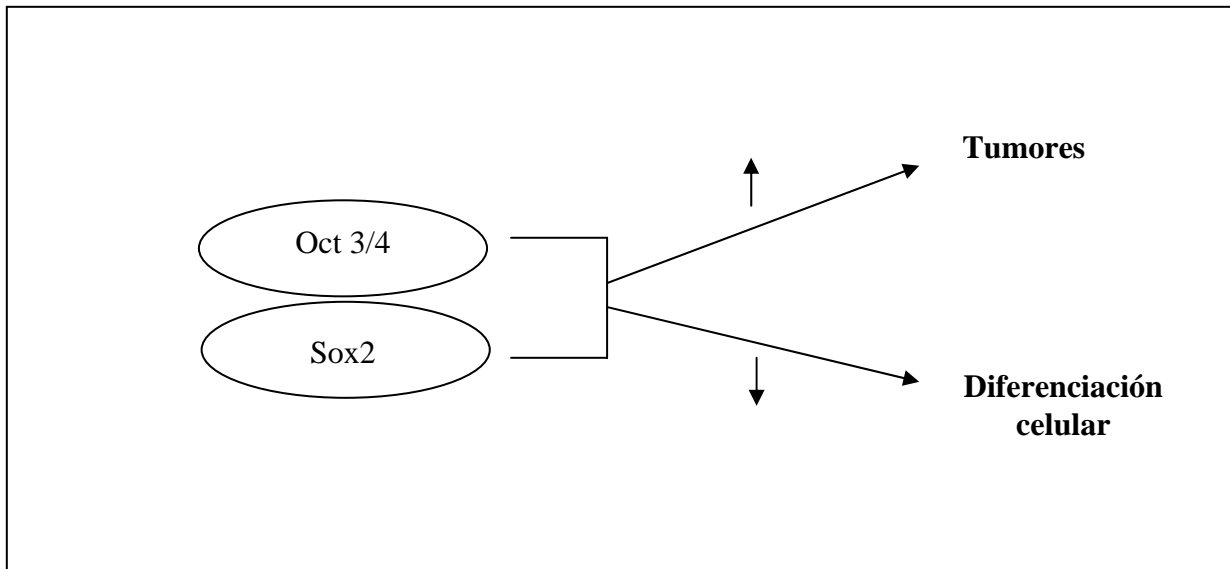
A pesar de que Oct3/4 y Sox 2 son dos factores de transcripción totalmente diferentes se les considera como un complejo por la relación que tienen entre sí ( Masui y cols., 2007). El complejo que forman estos dos factores de transcripción se ve sobreexpresado en células indiferenciadas y en ciertos tumores (Chen y cols., 2008). De hecho se ha demostrado la relación directa que guarda Oct3/4 con la diferenciación celular silenciando este gen en células madre embrionarias (Zangrossi y cols., 2007). La ausencia de este factor hace que la célula madre adopte un fenotipo diferenciado. También se ha observado que las tasas de renovación celular de las células madre embrionarias decae cuando se silencia este gen. En los embriones de ratón con este gen silenciado se ha observado que tienen problemas para formar la masa celular interna, pierden la pluripotencialidad y sufren una diferenciación celular prematura (Kageyama y cols., 2006). De estos hechos se deduce que este factor es esencial para el mantenimiento de la indiferenciación celular. Una sobreexpresión de este factor en ratones producía tumores de piel y estómago. En estas células tumorales se observaba una sobreexpresión de beta catenina que a su vez provocaba la inhibición de la diferenciación celular ( Palma y cols., 2008).

El factor de transcripción Sox 2 codificado por el gen *sox 2* se ha descrito como un factor esencial para el mantenimiento y renovación de las células madre embrionarias. (Choo y cols., 2004)

Estudios recientes sobre diferenciación celular y mantenimiento de células madre en la etapa embrionaria apuntan a que son los dos factores de transcripción Oct3/4 y Sox 2 los que actúan conjuntamente formando un complejo que activa una batería de genes que se encargan de mantener la pluripotencialidad celular en las primeras etapas del desarrollo embrionario (Masui y cols., 2007).

El complejo Oct 3/4 Sox 2 también actúa indirectamente en el mantenimiento de la indiferenciación celular, actuando sobre Nanog, que a su vez bloquea la diferenciación celular como vimos en el apartado anterior (Takao y cols., 2007). Esta actuación indirecta del complejo Oct 3/4 Sox 2 no es más que un pequeño botón de muestra de la complejidad que se esconde detrás de las interacciones y las rutas de señalización que regulan la diferenciación celular tanto de forma

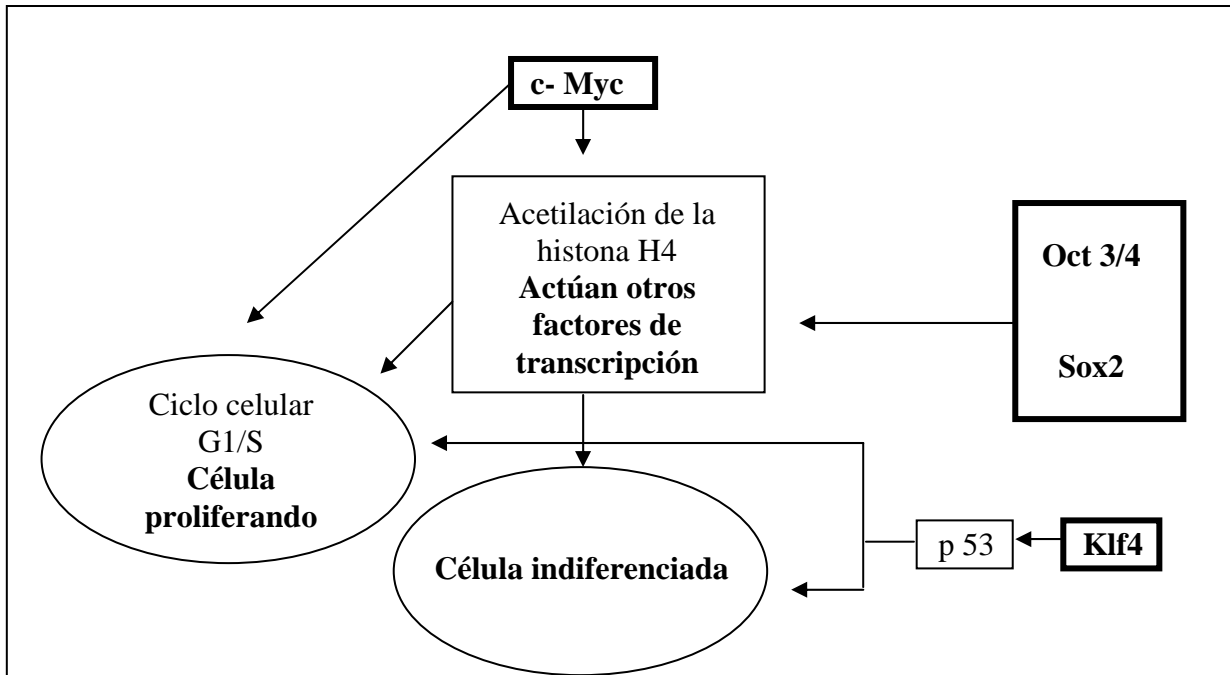
directa como indirecta. Todos estos procesos nos ayudan a comprender los diferentes mecanismos de compensación que se pueden dar ante la ausencia o la sobreexpresión de alguno de ellos, así como los resultados contradictorios que nos podemos encontrar ante un experimento de silenciamiento de un determinado factor de transcripción; y el motivo no es otro que las ramificaciones y los efectos indirectos que puede tener una proteína en la expresión de otros genes que a su vez están implicados en dichos procesos.



**Fig.3.** Experimentos realizados sobreexpresando los factores de transcripción.

#### 4.4.- Combinación de los diferentes factores de transcripción

Resumiendo las implicaciones de los cuatro factores de transcripción relacionados en la desdiferenciación celular, todos ellos están implicados en las dos principales capacidades de las células madre totipotentes: proliferación celular y desdiferenciación. Aunque no son los únicos factores implicados en la proliferación celular y en la desdiferenciación, es la combinación de estos cuatro lo que revierte el proceso de diferenciación. Por otra parte, ninguno de los cuatro independientemente tiene la capacidad de inducir la desdiferenciación celular y producir células madre desdiferenciadas, por lo que la importancia del proceso radica en la interrelación que se da entre las diferentes activaciones de los genes. En estas interrelaciones también se da una potenciación de ciertas señales como puede ser el caso de Nanog que se ve implicado tanto en el caso de Klf4 como de Oct 3/4 Sox 2. Otro hecho importante que se ha observado en los experimentos de desdiferenciación ha sido que se han obtenido resultados positivos sin la implicación directa de Nanog que se suponía que era crucial para el mantenimiento de la indiferenciación, y aparecía sobreexpresado en las células indiferenciadas. Pero indirectamente casi todas las rutas de los cuatro factores actúan sobre Nanog, siendo este factor crucial alrededor del cual parece que pivota el proceso. En realidad no se ha descubierto ningún factor nuevo ni exclusivo del proceso, el verdadero logro de este trabajo ha sido encontrar la combinación perfecta de las rutas que dan el grado de expresión proteico adecuado para que se pueda revertir la diferenciación.



**Fig.4** Relación de los cuatro factores de transcripción descritos en el artículo de Takahashi y Yamanaka y las implicaciones en diferentes actividades celulares.

## 5.- PERSPECTIVAS DE FUTURO

Este trabajo y varios más que se han hecho en cuanto a la desdiferenciación celular no son más que el comienzo en el estudio en este campo que se presenta muy esperanzador, aunque todavía hay mucho campo para explorar. Por ejemplo, en este mismo trabajo se inyectaron estas células indiferenciadas en ratones, y se observó que tienen una alta capacidad para producir tumores, por lo que sería imposible aplicar esta técnica tal cual en terapias de regeneración de tejidos. El hecho de la aparición de procesos neoplásicos es algo que se esperaba porque los genes implicados en los diferentes procesos son oncogenes y genes supresores de tumores presentes en casi todos los tumores. Por otra parte la implicación de estos factores también era algo esperable puesto que las características de la célula madre son la proliferación celular y la desdiferenciación, las dos características más importantes que adopta una célula durante la tumorigénesis, con la salvedad que las células madre responden a los estímulos externos y no se descontrolan. Lo interesante sería poder mantener estas dos características pudiendo bloquear la malignidad que es la que da las neoplasias por su carácter invasivo. Todavía son muchas las preguntas que quedan por responder, así como los problemas a resolver en este campo de la desdiferenciación con posibles aplicaciones terapéuticas. Tal como se han descrito las rutas metabólicas, en un futuro no muy lejano se describirán todas las rutas que impliquen la participación de los factores de transcripción en la regulación del genoma. En esas condiciones seremos capaces de hacer un seguimiento de las relaciones directas e indirectas de estos cuatro factores de transcripción y su implicación en la desdiferenciación celular.

## 6.- BIBLIOGRAFÍA:

- Benassayag C, Montero L, Colombie N, Morello D (2005) "Human c-Myc isoforms differentially regulate cell growth and apoptosis in *Drosophila melanogaster*" *Molecular and Cellular Biology Now* p 9897-9909 Vol 25 No 22.
- Bueno D. "Organos a la carta, células madre y clonación terapéutica". Publicacions y Edicions UB. 2007/1ª.
- Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, Sun L, Yang X, Wang Y, Zhang Y, Shang Y. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of Sox-2 in breast cancer. *J. Biol Chem* 2008. 283: 17969-17978.
- Choo AB, Padmanabhan J, Chin AC, Oh SK. Expansion of pluripotent human embryonic stem cell on human feeders. *Biotechnol Bioeng* 2004. 88: 321-331.
- Flandez M, Guilmean S, Blache P, Augenlicht L.H. KLF4 regulation in intestinal epithelial cell maturation. *Exp. Cell Res.* 2008. 20: 3712-3723.
- Kageyama S, Liu H, Nagata M, Aoki F. The role of ETS transcription factors in the transcription and development of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006. 344:675-679.
- López-Guerrero J.A, Célula madre: la madre de todas las células. Ed. Hélice 2003.
- López-Moratalla N. Racionalidad de la investigación con células troncales embrionarias. *Cuad. Bioét.*XVII, 327-347, 2006/3ª.
- Lüscher B. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network.. *Gene* 2001. 277: 1–14.
- Maherali, N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, M. Stadtfeld R, Yachechko J, Tchieu R, Jaenisch K, Plath. K Hochedlinger L. Global epigenetic remodeling in directly reprogrammed fibroblasts. *Stem Cell* 2007, 55–70.
- Masui S, Nakataka Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko Ms, Niwa H. Pluripotency governed by Sox-2 via regulation of Oct 3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007. 6: 625-35.
- Nilsson JA, Cleveland JL (2004). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22 (56): 9007–21.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Germline competency of mouse induced pluripotent stem cells selected for Nanog expression. *Nature* 2007 10: 1038-05934.
- Palma I, Peña RY, Contreras A, Ceballos-Reyes G, Participation of Oct3/4 and beta-catenin during dysgenetic gonadal malignamant transformation. *Cancer Lett.* 2008. 263: 204-11.
- Pang G and Thomson JA Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 2007 :42-49 Review.
- Rowland BD, Bernard R, Peeper DS. The KLF4 tumor suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogen. *Nat Cell Biol.*2005. Nov 7:1074-82.
- Ruf IK, Rhyne PW, Yang H. (2002). EBV regulates c-MYC, apoptosis, and tumorigenicity in Burkitt's lymphoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 258: 153–160.
- Sarkar SA, Sharma RP (2002). Modulation of c-myc, max and mad gene expression during neural differentiation of embryon. *Gene Expr* 2002. 10: 125-35.

-Scott R. F, Schroeder M, Fernandez P, Taubert S, Amati B. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes and Development*. 2001 Vol. 15, No. 16, pp. 2069-2082.

-Skouteris G and Schröder C H. C-myc is required for the G0/G1-S transition of primary hepatocytes stimulated with a deleted form of hepatocyte growth factor. *Biochem J*. 1996. 316: 879-886.

-Takahashi K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblastcultures by defined factors. *Cell*. 2006.126, 663–676.

-Takao Y, Yokota T, Koide H. Beta-catening up-regulates Nanog expresión through interaction with Oct 3/4 in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Feb. 16; 353(3):699-705.

-Wernig M. A, Meissner R, Foreman T, Brambrink M, Ku K, Hochedlinger B, Bernstein E, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007. 10:1038.5944.

-Zangrossi S, Marabose M, Broggin M, Giordano R, D`Erasmus M, Montelatici E, Intini D, Nevi A, Pesce M, Rebull P, Lazzari L. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cell*. 2007. 25:1675-1680.

-Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW. J. The gut-enriched Kruppel-like factor (Klf 4) mediates the transactivating effect Owaf 1/Cip 1 promoter. *Biol. Chem*. 2000. 275:18391-18398.

## **CAPÍTULO 15:**

### **HISTAMINA Y ANTIHISTAMÍNICOS EN LA BIOLOGÍA TUMORAL. APLICACIÓN TERAPÉUTICA**

Nicolau-Galmés F, Asumendi A, Pérez-Yarza G, Andollo N, Jangi Sh-M, Boyano MD.

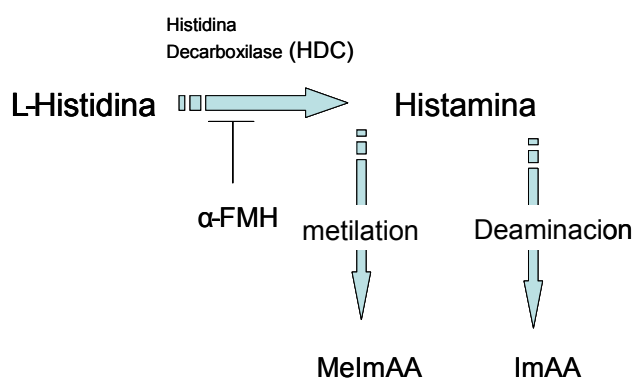
#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	333
2.- RECEPTORES DE HISTAMINA Y MECANISMOS INTRACELULARES ACTIVADOS POR LA HISTAMINA.....	334
3.- PAPEL DE LA HISTAMINA EN LA RESPUESTA INMUNE.....	335
4.- ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR H1 DE LA HISTAMINA.....	336
5.- PAPEL DE LA HISTAMINA Y DE LOS ANTIHISTAMÍNICOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. APLICACIÓN TERAPÉUTICA.....	337
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	343

## 1.- INTRODUCCIÓN

La histamina (2-[4-imidazolil]etilamina) es una amina biogénica descubierta por Dale y Laidlaw en 1910. Principalmente la producen los mastocitos y los basófilos e interviene en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. La histamina interviene en la inflamación, en la modulación de la respuesta inmune, en la secreción gástrica y en la transmisión neural. Cuando se inyecta la histamina a nivel intradérmico, se produce enrojecimiento de la piel, vasodilatación e incremento de la permeabilidad (Parson y Ganellin, 2006). La histamina se sintetiza a partir del aminoácido histidina por la enzima L-histidina decarboxilasa (HDC) en el aparato de Golgi. Se sintetiza principalmente en los mastocitos, basófilos, neuronas histaminérgicas y células enterocromafines. En estas células la histamina está almacenada en gránulos citoplasmáticos y es liberada al exterior tras una estimulación adecuada. Los linfocitos T, monocitos, macrófagos y plaquetas también contienen HDC y niveles bajos de histamina, pero a diferencia de los mastocitos, los monocitos, macrófagos y linfocitos T no contienen gránulos de secreción y liberan la histamina de forma continua (Sasaguri y Tanimoto, 2004).

La histamina es abundante en la piel, tejido conectivo, pulmón y tracto gastrointestinal, donde los mastocitos son la fuente más importante. El contenido de histamina en estas células situadas en el pulmón y en la piel es de 2 a 5 pg/célula (Xie y He, 2005). La histamina secretada es metabolizada rápidamente en metabolitos inactivos por la acción de la enzima deaminooxidasa (DAO) o por metilación a través de la acción de la histamina-N-metiltransferasa (HNMT) (Figura 1). La enzima DAO se almacena en vesículas dentro de las células epiteliales y se libera a la circulación sanguínea. La enzima HNMT es una proteína citosólica que sólo puede metabolizar a la histamina en el espacio intracelular (Maintz y Novak, 2007; Ogasawara y cols, 2006).



**Figura 1. Síntesis de histamina y metabolismo.** La histamina se sintetiza a partir del aminoácido histidina por la acción de la enzima Histidina decarboxilasa (HDC), la única enzima responsable de la síntesis de histamina. La HDC puede ser inhibida por la acción de la alfa-fluorometil histidina ( $\alpha$ -FMH). Una vez sintetizada, la histamina se almacena en gránulos de secreción en mastocitos y basófilos fundamentalmente. Tras liberarse por exocitosis, puede ser metabolizada por metilación y oxidación o deaminación dando lugar a ácido acético telemetilimidazol y ácido acético imidazol respectivamente.

## 2.- RECEPTORES DE HISTAMINA Y MECANISMOS INTRACELULARES ACTIVADOS POR LA HISTAMINA

El efecto de la histamina está mediado por la presencia en las células de cuatro receptores de membrana diferentes acoplados a proteínas G: los receptores H1, H2, H3 y H4. Existe un quinto receptor de la histamina denominado HIC de localización intracelular presente en las células hematopoyéticas. Los receptores H1 y H2 de la histamina fueron los primeros identificados en 1966 por Ash y Schild y se clonaron en 1991 (Yamashita y cols, 1991). El receptor H3 de la histamina fue clonado por Lovenberg en 1999 y el receptor H4 fue descrito y clonado por Oda y cols en el año 2000. Los genes que codifican para el receptor H1 y H2 de la histamina contienen tan solo un exon, no contienen intrones y no presentan apenas homología con el gen del receptor H3. Los genes que codifican para el receptor H3 y H4 comparten una estructura genómica similar ya que están constituidos por tres exones y dos intrones (Bakker, 2004). La histamina se une a sus receptores con diferente afinidad: la  $K_d$  de los receptores H1, H2 y HIC se encuentra entre 10-100  $\mu\text{M}$ ; mientras que la  $K_d$  de los receptores H3 y H4 es aproximadamente de 5-15 nM (Hannele y cols, 2007).

El receptor H1 de la histamina está acoplado a las proteínas  $G_{q/11}$ , a través de la cual activa a la fosfolipasa C (PLC) y la ruta del inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El receptor H1 de la histamina puede también inducir la producción de GMP cíclico (GMPc), la activación de la fosfolipasa A2 y la activación de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (Zhang y cols, 2007). El receptor H1 de la histamina se expresa en células nerviosas, músculo liso vascular y bronquial, hepatocitos, condrocitos, células endoteliales, células epiteliales, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, células dendríticas y linfocitos T y B (Akdis y Simons, 2006). La histamina produce muchos de los síntomas y signos de la alergia a través del receptor H1 de la histamina; así como la contracción del músculo liso vascular, vasodilatación por la estimulación de la síntesis de óxido nítrico por las células endoteliales, incremento de la permeabilidad vascular, broncoconstricción y prurito (Togias, 2003). En el sistema nervioso central la activación del receptor H1 de la histamina estimula la vigilia y el estado de alerta. En el corazón, la histamina disminuye el tiempo de conducción del nodo atrio-ventricular. Además, la histamina juega un importante papel como moderador en el sistema inmune a través del receptor H1 de la histamina.

El receptor H2 de la histamina se une a proteínas  $G_s$  para activar a la enzima adenilato ciclasa (AC) e incrementar la producción del AMPc. También ha sido relacionado con la activación de la ruta del fosfoinositol y se expresa en las mismas células que el receptor H1. La histamina aumenta la secreción de ácido gástrico, la permeabilidad vascular, la relajación del músculo liso vascular, broncodilatación y producción de moco a través del receptor H2. La histamina también modula la respuesta inmune a través del receptor H2 (Zhang y cols, 2007; del Valle y Gantz, 1997).

Los receptores de la histamina H3 y H4 se unen a proteínas  $G_{i/o}$  para inhibir la actividad adenilato ciclasa y suprimir la producción de AMPc. El receptor H3 de



la histamina se expresa fundamentalmente en neuronas histaminérgicas y ha sido identificado como un receptor presináptico que disminuye la liberación de histamina y de otros neurotransmisores. Se ha propuesto que está implicado en los procesos de razonamiento y de la memoria. El receptor H3 de la histamina se expresa en eosinófilos, células dendríticas y monocitos y el receptor H4 de la histamina en las células de la médula ósea y células hematopoiéticas periféricas incluyendo a eosinófilos, células dendríticas, células T, basófilos y mastocitos. La activación del receptor H4 de la histamina induce la acumulación de las células migratorias en los lugares de inflamación (Zhang y cols, 2007, Akdis y Simons, 2006).

### 3.- PAPEL DE LA HISTAMINA EN LA RESPUESTA INMUNE

La histamina está implicada en los procesos inflamatorios agudos y crónicos, en enfermedades alérgicas y autoinmunes y en otras respuestas inmunológicas. Ya que la histamina se produce y almacena en los mastocitos y basófilos es liberada tras la estimulación antigénica mediada por IgE y otros estímulos y representa un componente fundamental en la modulación de la respuesta inmune. Sin embargo, la producción continua de histamina por otros tipos celulares como los linfocitos T, monocitos, macrófagos y plaquetas también desempeña un papel importante. En general, la histamina estimula el sistema inmune a través del receptor H1 de la histamina aumentando la actividad pro-inflamatoria. Por el contrario, la histamina a través del receptor H2 actúa como supresor de la inflamación (Akdis y Simons, 2006; Takahasi y cols, 2002). El receptor H4 de la histamina está implicado en la migración de los eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas y mastocitos (Zhang y cols, 2007).

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos que derivan de los monocitos y de precursores linfoides y adquieren los fenotipos 1 y 2 para dar lugar a las células Th1 y Th2 respectivamente. Se ha demostrado que la histamina suprime la producción del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y la Interleucina-12 (IL-12) y aumenta la síntesis de IL-10 por los monocitos humanos actuando a través del receptor H2 de la histamina. La histamina también aumenta la producción de IL-10 y suprime la producción de IL-12 a través del receptor H2 en las células dendríticas humanas y como consecuencia polarizan la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia linfocitos Th2, los cuales favorecen la producción de IgE. Por el contrario, la activación de los receptores H1 y H3 de la histamina incrementan la capacidad de presentación antigénica y la producción de citocinas inflamatorias en las células dendríticas derivadas de los monocitos (Masón y cols, 2001; Tanaka y Ichikawa, 2006). Los linfocitos Th1 expresan predominantemente los receptores H1 de la histamina, mientras que los linfocitos Th2 presentan altos niveles del receptor H2. Por ello, la histamina promueve la respuesta inmune tipo Th1 mediante el receptor H1 y suprime las respuestas inmunes Th1 y Th2 a través del receptor H2 (Jutel y cols, 2001).

#### 4.- ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR H1 DE LA HISTAMINA

A partir de aquí se generaron los primeros antihistamínicos para el tratamiento de las enfermedades alérgicas. Aunque han sido ampliamente utilizados, sus efectos adversos más importantes se producen sobre el Sistema Nervioso Central, como sedación y actividad anticolinérgica, por lo que se investigaron nuevos antihistamínicos con menos efectos secundarios y la segunda generación de antihistamínicos H1 con menos efectos secundarios se desarrolló rápidamente.

Los antihistamínicos H1 suprimen la respuesta de la histamina porque bloquean la unión de la histamina a sus receptores específicos que se expresan en nervios, músculo liso, células glandulares, endotelio y mastocitos. Antagonizan de forma competitiva a los receptores H1 de la Histamina.

Los antihistamínicos H1 son las drogas más ampliamente utilizadas en el mundo. Se utilizan en el tratamiento de la rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis de contacto, urticaria, edema, prurito, dermatitis atópica, picaduras de insectos, reacciones anafilácticas, náuseas y vómitos. También han sido utilizados en el tratamiento de la gripe y ciertos tipos de dolores de cabeza, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple aguda y algunas alteraciones gástricas.

Los antihistamínicos pueden ser aplicados de forma local o sistémica, en función de la naturaleza del proceso alérgico. Se absorben bien en el intestino y se metabolizan en el hígado, la duración de su efecto en el organismo es de 4 a 6 horas.

Los antihistamínicos H1 denominados clásicamente de primera generación no son muy específicos y producen muchos efectos secundarios. Pueden ser clasificados en los siguientes grupos: Etilenediaminas: mepiramina y antazolina; Etanolaminas: difenidramina, doxilamina, clemastina y dimenidrinato; Alquilaminas: feniramina, clorfeniramina, dexclorfeniramina y triprolidina; Piperazinas: Hidroxizina y meclizina; Piperidina: Cyproheptadina, ketotifen, diphenylpyralina y azatadina; Tricíclicos: prometazina y alimemazina; Otros: doxepin.

La selectividad de los antihistamínicos H1 de la segunda generación se debe a la incapacidad de estas drogas para atravesar la barrera hematoencefálica reduciéndose así la mayoría de sus efectos adversos. Este grupo incluye: Acrivastina (grupo de alquilaminas), astemizol, loratadina, mizolastina, terfenadina y cetirizina del grupo de piperazina, azelastina, emedastina y epinastina.

La Terfenadina no presenta efectos adversos centrales como la sedación, pero tiene efectos cardiacos ya que alarga el intervalo QT del electrocardiograma, pudiendo causar arritmia ventricular. También la terfenadina bloquea los canales iónicos dependientes de voltaje y revierte la resistencia a drogas en

diferentes tipos celulares a través de su interacción con la Glicoproteína P (Díaz-Trelles et al, 2000).

Los antagonistas del receptor H<sub>2</sub> de la histamina denominados antihistamínicos H<sub>2</sub> son un grupo de drogas que bloquean la acción de la histamina en células diana, como las células parietales del estómago disminuyendo la producción de ácido clorhídrico por estas células. Estos fármacos se usan en el tratamiento de la dispepsia y de la úlcera péptica. En este grupo se incluyen: cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina.

Al igual que los antagonistas H<sub>1</sub>, los antagonistas H<sub>2</sub> son agonistas inversos, en lugar de verdaderos antagonistas del receptor. Los antagonistas H<sub>2</sub> son generalmente bien tolerados, excepto la cimetidina, que presenta serios efectos adversos como hipotensión, dolor de cabeza, confusión, diarrea, rash cutáneo y ginecomastia.

Los antagonistas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> de la histamina están siendo investigados a nivel experimental en la actualidad por lo que no tienen todavía utilización clínica. Los antagonistas del receptor H<sub>3</sub> más conocidos son: tioperamida que también antagoniza al receptor H<sub>4</sub>, clobenpropit y impromidina.

## 5.- PAPEL DE LA HISTAMINA Y DE LOS ANTIHISTAMÍNICOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. APLICACIÓN TERAPÉUTICA

La relación entre histamina y cáncer está siendo estudiada intensamente en los últimos años. Kahlson & Rosengren fueron los primeros autores en describir la histamina como un modulador de la proliferación de las células tumorales en el año 1960. A partir de este momento se han realizado numerosos estudios, pero se han obtenido resultados contradictorios. En la Tabla 1 se resumen algunas de las aportaciones bibliográficas más interesantes de los últimos tres años.

Se ha sugerido que la histamina está implicada en el crecimiento tumoral debido a que se han detectados niveles elevados de histamina o de la enzima HDC en diferentes tejidos altamente proliferativos como en la cicatrización de las heridas y en tejidos embrionarios, además de en diferentes tumores humanos y experimentales (Nissinen y cols, 1995; Fitzpatrick y Fisher, 1982; Bartholeyns y Fozard, 1985).

Existen claras evidencias experimentales que establecen una relación directa entre la actividad de la enzima HDC y el crecimiento tumoral. Esta relación se ha demostrado en algunas leucemias, melanomas, carcinoma de mama y carcinoma colorrectal (Masini y cols, 2005; Cianchi y cols, 2005, Medina y cols, 1999). En estudios realizados *in vitro* con líneas celulares tumorales, se demuestra que la histamina es un factor mitogénico, como es el caso de las células de melanoma humano (Molnar y cols, 2001; Tilly y cols, 1990; Reynolds y cols, 1996)), en células de astrocitoma (Hernandez-Angeles y cols, 2001) o en células leucémicas (Malaviya y Uckun, 2000). Por el contrario, en líneas

celulares de carcinoma hepatocelular, la histamina disminuye la proliferación y la viabilidad celular (Lampiasi y cols, 2007).

**Tabla 1. Efecto de la histamina y de los antihistamínicos en la biología de las células tumorales**

Tipo tumoral	Tratamiento con Histamina/ antihistamina	Respuesta biológica	Tipo de receptor	Autores
Carcinoma de mama <sup>(2)</sup>	Famotidina (antagonista H2)	Aumento de linfocitos intratumorales y de la supervivencia libre de enfermedad	H2	Parshad y cols, 2005
Carcinoma hepatocelular: <sup>(1)</sup> - Línea HA22T/VGH (baja diferenciación) - Línea HuH-6 (bien diferenciada)	Histamina 0,01 - 1 µM (efecto dosis dependiente) o Liberación total de gránulos de secreción	Aumento proliferación en HA22T/VGH (revierte con ranitidina, antagonista H2) Disminución proliferación y viabilidad en HuH-6 (revierte con terfenadina, antagonista H1)	- H2 - H1	Lampiasi y cols, 2007
Carcinoma renal metastático (ensayo clínico Fase II) <sup>(2)</sup>	IL-2 + Histamina (1 mg) tres veces al día	Aumento en el número de células NK y linfocitos T		Donskov y cols, 2006
Cáncer de próstata <sup>(2)</sup>	Cimetidina diaria (antagonista H2) durante 10 años	Aumenta el riesgo de cáncer de próstata	H2	Velicer y cols, 2006
Carcinoma de páncreas PANC-1 <sup>(1)</sup>	Histamina 10 µM H1 agonista HTMT 10 µM H2 agonista dimaprit 10 µM H1 antagonista pirlamina 10 µM H2 antagonista famotidina 10 µM Pirilamina + famotidina	Histamina: Efecto antiproliferativo (parada en fase G0/G1) Modulación proteínas Bcl-2 Progresión metastática	H2 H2 H1 and H2	Cricco y cols, 2006a Cricco y cols, 2006b
Melanoma humano: VM35 y WM983 (primarios), HT-168 and HT-168/M1 (metastáticos) <sup>(1)</sup>	Histamina 1 µM	Aumento de expresión de Ets-1 (inductor de angiogénesis, invasión y metástasis)	H2	Hegyesi y cols, 2005
Melanomas A375, Hs294T HT144 <sup>(1)</sup>	Terfenadina, difenidramina, triprolidina, astemizol	Apoptosis de células tumorales	¿?	Jangi y cols, 2006
Cáncer de colon con diferente expresión de COX-2: Caco-2 (alta), HT29 (normal) y HCT116 (baja) <sup>(1)</sup>	Histamina 1 µM	Efecto proliferativo y angiogénico por activación de COX-2. (COX-2 produce prostaglandina E2 (PGE2), que promueve la proliferación y la angiogénesis)	H2, H4	Cianchi y cols, 2005
Cáncer colorrectal <sup>(2)</sup>	Famotidina preoperatoria (40 mg/día), 1 semana antes de la resección	Aumento de la infiltración linfocitaria intratumoral. Pocas recurrencias y aumento de la supervivencia	H2	Kapoor y cols, 2005
Mieloma y leucemia <sup>(1,2)</sup>	Ciproheptadina (antagonista H1)	Disminuye la expresión de ciclinas, parada de ciclo en G0/G1 e inhibe el crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	¿?	Mao y cols, 2008

(1) Resultados obtenidos en líneas celulares. (2) Resultados obtenidos en tumores *in vivo*

En otros estudios se describe que la histamina no ejerce un efecto significativo en la proliferación de células de carcinoma de mama, carcinoma de próstata e incluso en alguna línea celular de melanoma humano (Cricco y cols, 2000). Finalmente, se ha descrito que el efecto de la histamina en el crecimiento *in vitro* de células tumorales parece ser específico de línea celular y dependiente de la dosis de histamina. Así, se ha mostrado que en células de un cáncer de mama, la histamina a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  inhibe la proliferación y reduce la viabilidad, mientras que a concentraciones de 0,01  $\mu\text{M}$  la histamina aumenta la proliferación celular (Medina y cols, 2006). Por otra parte, manipulando la producción endógena de histamina en un modelo de melanoma experimental se identifica al receptor H2 de la histamina y la expresión de rho-C como marcadores de progresión tumoral (Pos y cols, 2005).

La mayor parte de la histamina se almacena en gránulos de secreción en el citoplasma de mastocitos, basófilos y puede ser liberada por diferentes estímulos externos de origen inmune o por factores no inmunológicos. Además, la expresión del gen de la enzima HDC o su actividad biológica ha sido detectada en otras muchas células presentes en tejidos proliferantes normales o tumorales (Rivera y cols, 2000). Se han detectado concentraciones muy elevadas de histamina en el tejido tumoral en relación al tejido normal que rodea al tumor en algunas neoplasias humanas tipo melanomas, carcinoma de colón y carcinoma de mama, además de en algunos tumores experimentales (Sieja y cols, 2005; Aichberger y cols, 2006). En consonancia con estos resultados, se ha demostrado que las células tumorales producen grandes cantidades de histamina endógena, la cual es liberada activamente al espacio extracelular interactuando con los receptores de membrana y activando así una respuesta biológica. En este contexto, estudios clínicos han sugerido que los antagonistas del receptor H2 de la histamina tienen un efecto beneficioso en el tratamiento de pacientes en estadios avanzados de cáncer colorrectal, cáncer gástrico, metástasis hepáticas, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica y melanoma (Tomita y cols, 2003; Nielsen y cols, 2002).

Uno de los mecanismos por los cuales las células tumorales se dividen sin control es a través de la producción autocrina de factores mitogénicos, por ello una producción elevada de histamina endógena en las neoplasias humanas puede jugar un papel importante como factor de crecimiento autocrino. Además, la histamina liberada al medio extracelular puede producir cambios en la expresión de sus receptores H1 y H2 modulando diferentes rutas intracelulares aparte de los mecanismos de proliferación autocrina que se producen a través de las proteínas G. En un modelo experimental de carcinoma de mama en ratas se ha demostrado que dependiendo de la concentración de histamina o de agonistas de la histamina se produce un aumento o disminución de la masa tumoral. Dosis bajas de histamina activan el receptor H2 de la histamina y aumenta la proliferación de las células tumorales, mientras que dosis altas de histamina actúan sobre el receptor H1 inhibiendo el crecimiento tumoral (Rivera y cols, 2000).

Por todo ello, parece probable, que el efecto de la histamina sobre el crecimiento tumoral depende del tipo de receptores funcionales de la histamina

que expresen las células tumorales y en este sentido, los antagonistas de la histamina podrían modificar también la proliferación celular.

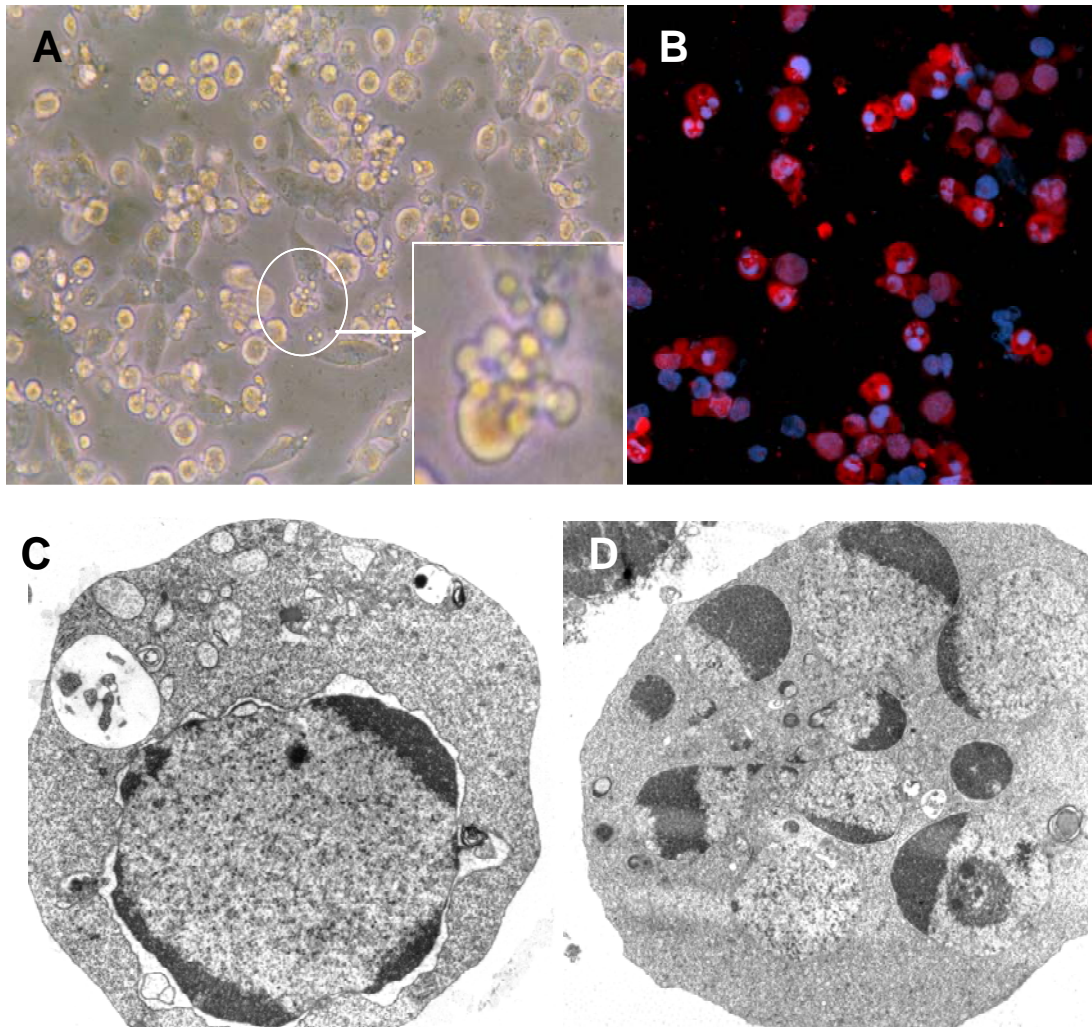
En este contexto, existen trabajos recientes que demuestran que los antagonistas del receptor H<sub>2</sub> de la histamina como la Cimetidina, inhiben la proliferación e inducen apoptosis en tumores gastrointestinales y de glándula salivar humanos (Watson y cols, 1993; Rajendra y cols, 2004; Fukuda y cols, 2007). Nosotros en nuestro laboratorio, hemos demostrado que los antagonistas del receptor H<sub>1</sub> de la histamina como la difenidramina, triprolidina, terfenadina y astemizol inhiben la proliferación e inducen apoptosis en diferentes líneas celulares de leucemia linfocítica aguda (LLA) (Jangi y cols, 2004) y melanoma humano, pero no afecta a células normales como fibroblastos embrionarios y melanocitos (Jangi y cols, 2006). En la Figura 2 se observa un cultivo de células de melanoma humano tratadas con terfenadina, un antihistamínico H<sub>1</sub> altamente selectivo, que induce apoptosis en estas células. Se puede observar como las células tumorales se redondean, emiten prolongaciones citoplasmáticas típicas de apoptosis y fragmentación celular en cuerpos apoptóticos (Figura 2A). También se detecta la activación de la caspasa-3 ejecutora del proceso de muerte celular (Figura 2B). En la Figura 2C y 2D se presentan imágenes de microscopia electrónica obtenidas de las células de la línea de LLA denominada Yurkat tratadas con difenidramina, antagonistas del receptor H<sub>1</sub> de la histamina. En las microfotografías se pueden observar diferentes cambios celulares típicos descritos en el proceso de muerte celular por apoptosis como condensación y marginación de la cromatina, polarización de los orgánulos citoplasmáticos, dilatación de la cisterna perinuclear y formación de micronúcleos.

En el proceso de muerte celular por apoptosis en las células de melanoma humano, los antihistamínicos H<sub>1</sub> producen daño en el DNA y activación de las caspasas-2 y caspasa-4, estrés reticular y salida de Ca<sup>2+</sup> al citosol activando la ruta intrínseca o mitocondrial de la apoptosis. Además, utilizando técnicas de RNA interferencia comprobamos que la inducción de apoptosis es independiente de la expresión del receptor H<sub>1</sub> de la histamina en las células de melanoma y que está implicada la actividad tirosina-quinasa (Jangi y cols, 2008). Estos resultados sugieren que los antihistamínicos H<sub>1</sub> podrían ejercer su acción antitumoral a través de otros receptores de membrana.

En este sentido Ramos-Jimenez y cols (2007) han descrito recientemente que la histamina exógena actúa sobre las células de un cáncer de próstata humano denominando DU-145 aumentando la acumulación de AMPc, independientemente de los receptores conocidos de la histamina. También se ha publicado que la ciproheptadina, un antagonista del receptor H<sub>1</sub> de la histamina, disminuyen la actividad proliferativa de un mieloma múltiple humano y que presenta actividad antitumoral *in vivo* (Mao y cols, 2008). Estos efectos parecen estar mediados por otras rutas celulares independientes del receptor H<sub>1</sub>.

Otro papel importante atribuido a la histamina y que interviene en el desarrollo y progresión tumoral es el de factor angiogénico. Parece ser que la síntesis de histamina endógena desempeña un papel dual en la angiogénesis,

comportándose como un modulador pro- o anti-angiogénico dependiendo del tipo de receptor al que se una (Medina y cols, 1999).



**Figura 2. Apoptosis inducida por el tratamiento *in vitro* con antagonistas H1 de la histamina en líneas celulares de melanoma humano y leucemia linfoide aguda. A.** Microfotografía de un cultivo de células del melanoma humano A375 tratadas con terfenadina (antagonista específico del receptor H1 de la histamina) durante 2 horas. Se observan los cambios morfológicos propios del proceso apoptótico y la formación de cuerpos apoptóticos. **B.** Inmunofluorescencia para la detección de la actividad de la caspasa-3 en las células A375 tratadas con terfenadina. Los núcleos están contrastados con la tinción DAPI. En rojo se observa como el citoplasma de las células presentan activada la caspasa-3 ejecutora del proceso apoptótico, además de las alteraciones nucleares propios de la apoptosis en azul. **C y D.** Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión obtenidas de células de una leucemia linfoide aguda tratadas con difenidramina, antagonista del receptor H1 de la histamina. En C se observa la marginación de la cromatina, dilatación de la cisterna perinuclear y polarización de los orgánulos celulares que se produce en las primeras etapas del proceso apoptótico. En la Figura D se observan micronúcleos en el interior celular.

Todos estos resultados ponen de manifiesto la participación directa de la histamina en diferentes funciones de las células tumorales y de la progresión maligna. Por otra parte, la histamina indirectamente también puede modular el crecimiento tumoral a través de su efecto sobre el sistema inmune (Tomita y Okabe, 2005). Por esta razón, el papel potencial de la histamina en el tratamiento inmunoterapéutico del cáncer está siendo estudiado en profundidad durante esta última década.

Los estudios realizados *in vitro* indican que la histamina inhibe la generación y liberación de radicales libres derivados del oxígeno (ROS) por los monocitos y macrófagos (Hellstrand y cols, 1994; Hansson y cols, 1996; Drabikova y cols, 2002). En una respuesta inmunológica antitumoral se liberan ROS que impiden la activación de las células Natural Killer (NK) y de los linfocitos T situados en la zona peritumoral o intratumoral induciendo incluso la muerte de estas células. Se ha demostrado que la histamina inhibe la producción de ROS, permitiendo así la activación de los linfocitos y de las células NK y restaurar su capacidad citotóxica (Hanson y cols, 1996). Basándose en este hecho, la histamina está siendo utilizada en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos en el tratamiento de diferentes enfermedades malignas. Así la histamina actúa de forma sinérgica con la IL-2 en el tratamiento de las metástasis de melanoma, carcinoma renal y leucemia mieloide aguda (Donskov y cols, 2006; Brune y cols, 2006; Asemissen y cols, 2005).

A pesar de que se ha demostrado que la histamina sola puede actuar como un factor de crecimiento para las células de melanoma y leucémicas humanas, estos resultados sugieren que la adición de histamina a la terapia con IL-2 podría mejorar los índices de respuesta y la supervivencia libre de enfermedad debido a su efecto protector sobre las células del sistema inmune del estrés oxidativo generado en la respuesta inmune celular (Donskov y cols, 2002; Agarwala y cols, 2002). Sin embargo, a nivel sistémico se ha descrito que la histamina tiene un efecto bivalente actuando como inmunosupresor a través de la activación del receptor H2 de la histamina en las células inmunes o como estimulador de la respuesta inmune a través de su receptor H1. Así, un bloqueo selectivo del receptor H1 o H2 podría dar lugar a un aumento o a una disminución del crecimiento tumoral respectivamente. Debido a la dualidad en el comportamiento celular de la histamina, la administración crónica de antihistamínicos en pacientes con alergia o con enfermedades gástricas podría elevar el riesgo de cáncer y deberían ser utilizados con precaución (Velicer y cols, 2006). Una investigación mucho más profunda será necesaria en el futuro para definir el papel que desempeña la histamina y sus antagonistas en el tratamiento del cáncer.



## 6.- BIBLIOGRAFÍA

Agarwala SS, Glaspy J, O'Day SJ, Mitchell M, Gutheil J, Whitman E, Gonzalez R, Hersh E, Feun L, Belt R, Meyskens F, Hellstrand K, Wood D, Kirkwood JM, Gehlsen KR, Naredi P. Results from a randomized phase III study comparing combined treatment with histamine dihydrochloride plus interleukin-2 versus interleukin-2 alone in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2002; 20 (1): 125-133

Aichberger KJ, Mayerhofer M, Vales A, Krauth MT, Gleixner KV, Bilban M, Esterbauer H, Sonneck K, Florian S, Derdak S, Pickl WF, Agis H, Falus A, Sillaber C, Valent P. The CML-related oncoprotein BCR/ABL induces expression of histidine decarboxylase (HDC) and the synthesis of histamine in leukemic cells. *Blood* 2006;108(10): 3538-47

Akdis CA, Simons FE. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol* 2006; 533; 69-76

Asemissen AM, Scheibenbogen C, Letsch A, Hellstrand K, Thorén F, Gehlsen K, Schmittel A, Thiel E, Keilholz U. Addition of histamine to interleukin 2 treatment augments type 1 T-cell responses in patients with melanoma in vivo: immunologic results from a randomized clinical trial of interleukin 2 with or without histamine (MP 104). *Clin Cancer Res* 2005; 11(1):290-7

Ash ASF, Schild HO. Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol* 1966; 27,427-439

Bakker RA. Histamine H3-receptor isoforms. *Inflamm Res* 2004; 53; 509-516

Bartholeyns J, Fozard JR. Role of histamine in tumour development. *Trends Pharmacol. Sci.* 1985; 6:123-125.

Brune M, Castaigne S, Catalano J, Gehlsen K, Ho AD, Hofmann WK, Hogge DE, Nilsson B, Or R, Romero AI, Rowe JM, Simonsson B, Spearing R, Stadtmauer EA, Szer J, Wallhult E, Hellstrand K. Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial. *Blood* 2006; 108(1): 88-96

Cianchi F, Cortesini C, Schiavone N, Perna F, Magnelli L, Fanti E, Bani D, Messerini L, Fabbroni V, Perigli G, Capaccioli S, Masini E. The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(19 Pt 1): 6807-15.

Cricco G, Martin G, Labombarda F, Cocca C, Bergoc R, Rivera E. Human pancreatic carcinoma cell line Panc-I and the role of histamine in growth regulation. *Inflammation Res* 2000; 49:S68-S69.

Cricco G, Martín G, Medina V, Núñez M, Mohamad N, Croci M, Crescenti E, Bergoc R, Rivera E. Histamine inhibits cell proliferation and modulates the expression of Bcl-2 family proteins via the H2 receptor in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 2006a; 26(6B): 4443-50

Cricco G, Núñez M, Medina V, Garbarino G, Mohamad N, Gutiérrez A, Cocca C, Bergoc R, Rivera E, Martín G. Histamine modulates cellular events involved in tumour invasiveness in pancreatic carcinoma cells. *Inflamm Res* 2006b; 55 Suppl 1:S83-4

Dale HD, Laidlaw PD. The physiological action of  $\beta$ -imidazolyl-ethylamine. *J Physiol (Lond)* 1910; 41:318-44

Del Valle J, Gantz I. Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol* 1997; 273; G987-G996

Donskov F, Hokland M, Marcussenn N, Torp Madsen H, von der Maase H. Monocytes and neutrophils as “bad guys” for the outcome of interleukin-2 with and without histamine in metastatic renal cell carcinoma- results from a randomised phase II trial. *Br J Cancer* 2006; 94: 218-226

Donskov F, von der Maase H, Henriksson R, Stiemer U, Wersäll P, Nellesmann H, Hellstrand K, Engman K, Naredi P. Outpatient treatment with subcutaneous histamine dihydrochloride in combination with interleukin-2 and interferon- $\alpha$  in patients with metastatic renal cell carcinoma: results of an open single-armed multicentre phase II study. *Ann. Oncol* 2002; 13: 441-49

Drabikova K, Nosal R, Jancinova V, Ciz M, Lojek A. Reactive oxygen metabolite production is inhibited by histamine and H1-antagonist dithiaden in human PMN leukocytes. *Free Radic Res* 2002; 36: 975-80.

Fitzpatrick DW, Fisher H. Histamine synthesis, imidazole dipeptides, and wound healing. *Surgery* 1982; 91: 430-4

Fukuda M, Tanaka S, Suzuki S, Kusama K, Kaneko T, Sakashita H. Cimetidine induces apoptosis of human salivary gland tumor cells. *Oncol Rep* 2007; 17: 673-8.

Gantz I, Schaffer M, Del Valle J, Logsdon C, Campbell V, Uhler M, Yamada T. (1991) Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88; 429-433

Hansson M, Asea A, Ersson U, Hermodsson S, Hellstrand K. Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J Immunol* 1996; 156: 42-47.

Hegyesi H, Horváth B, Pállinger E, Pós Z, Molnár V, Falus A. Histamine elevates the expression of Ets-1, a protooncogene in human melanoma cell lines through H2 receptor. *FEBS Letters* 2005; 579: 2475-2479.

Hellstrand K, Asea A, Dahlgren, Hermodsson S. Histaminergic regulation of NK cells. Role of monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J Immunol* 1994; 153: 4940-47.

Hernandez-Angeles A, Soria-Jasso LE, Ortega A, Arias-Montero JA. Histamine H1 receptor activation stimulates mitogenesis in human astrocytoma U373 MG cells. *J. Neuro-Onco* 2001; 55:81-89.

Jangi SM, Asumendi A, Arlucea J, Nieto N, Perez-Yarza G, Morales MC, de la Fuente-Pinedo M, Boyano MD. Apoptosis of human T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by diphenhydramine, an H1 histamine receptor antagonist. *Oncol Res* 2004; 14:363-72

Jangi SM, Diaz-Perez JL, Ochoa-Lizarralde B, Martin-Ruiz I, Asumendi A, Perez-Yarza G, Gardeazabal J, Diaz-Ramon JL, Boyano MD. H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Carcinogenesis* 2006; 27:1787-96

Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 2001; 413; 420-425

Kahlson G, Rosengren E. New approaches to the physiology of histamine. *Annu Rev Physiol* 1965; 48; 155-196

Kapoor S, Pal S, Sahni P, Dattagupta S, Kanti Chattopadhyay T. Effect of pre-operative short course famotidine on tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: a double blind, placebo controlled, prospective randomized study. *J Surg Res* 2005; 129(2):172-5

Lampiasi N, Azzolina A, Montalto G, Cervello M. Histamine and spontaneously released mast cell granules affect the cell growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Experimental and Molecular Medicine* 2007; 39 (3): 284-294.

Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol. Pharmacol* 1999; 55: 1101-1107

Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:1185-96

Malaviya R, Uckun FM. Histamine as an autocrine regulator of leukemic cell proliferation. *Leukemia and Lymphoma* 2000; 36 (3-4): 367-373

Mao X, Liang S, Hurren R, y cols. Cyproheptadine displays preclinical activity in myeloma and leukaemia. *Blood* 2008; 112: 760-769

Masini E, Fabbroni V, Giannini L, Vannacci A, Messerini L, Perna F, Cortesini C, Cianchi F. Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage. *Inflamm Res* 2005; 54 Suppl 1: S80-1

Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A, Segal DM. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered Tcell polarization. *J Clin Invest.* 2001; 108: 1865-1873

Medina MA, Rodriguez-Quesada A, Nuñez de Castro I, Sanchez-Jimenez F. Histamine, polyamines and cancer. *Biochem Pharmacol* 1999; 57; 1341-1344.

Medina V, Cricco G, Nuñez M, Martin G, Mohamad N, Correa-Fiz F, Sanchez-Jimenez F, Bergoc R, Rivera ES. Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(11): 1462-1571.

Molnar EL, Cricco G, Martin G, Darvas Z, Hegyesi H, Fitzsimons C, Bergoc R, Falus A, Rivera E. Histamine as a potential autocrine regulator of melanoma. *Inflamm Res* 2001; 50 Suppl 2:S102-3.

Nielsen HJ, Christensen IJ, Moesgaard F, Kehlet H. Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. Ranitidine as adjuvant treatment in colorectal cancer. *Br J Surg* 2002; 89(11): 1416-22

Nissinen MJ, Karlstedt K, Castren E, Panula P. Expression of histidine decarboxylase and cellular histamine-like immunoreactivity in rat embryogenesis. *J Histochem Cytochem* 1995; 43:1241-52.

Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 2000; 275; 36781-36786

Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K. Recent advances in Molecular Pharmacology of the Histamine Systems: Organic Cation Transporters as a Histamine Transporter and Histamine metabolism. *J Pharmacol Sci* 2006; 101:24-30

Parshad R, Hazrah P, Kumar S, Datta-Gupta S, Ray R and Bal S. Effect of preoperative short-course famotidine on TILs and survival in breast cancer. *Indian J Cancer* 2005; 42 (4): 185-190

Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol* 2006; 147: S127-S135

- Pos Z, Safrany G, Muller K, Toth S, Falus A, Hegyesi H. Phenotypic profiling of engineered mouse melanomas with manipulated histamine production identifies histamine H2 receptor and rho-C as histamine-regulated melanoma progression markers. *Cancer Res* 2005; 65(10): 4458-66
- Rajendra S, Mulcahy H, Patchett S, Kumar P. The effect of H2 antagonists on proliferation and apoptosis in human colorectal cancer cell lines. *Dig Dis Sci* 2004; 49(10): 1634-40
- Ramos-Jimenez J, Soria-Jasso LE, Lopez-Colombo AL, Reyes-Esparza JA, Camacho J, Arias-Montaño JA. Histamine augments  $\beta$ 2-adrenoceptor-induced cyclic AMP accumulation in human prostate cancer cells DU-145 independently of known histamine receptors. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 814-823
- Reynolds JL, Akhter J, Morris DL. In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1996; 6: 95-99
- Rivera ES, Cricco GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martín GA, Bergoc RM. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 15-23.
- Sasaguri Y, Tanimoto A. Role of Macrophage-derived Histamine in Atherosclerosis –Chronic Participation in the Inflammatory Response–. *J Ather Throm* 2004; 11(3):122-130
- Sieja K, Stanosz S, von Mach-Szczypinski J, Olewniczak S, Stanosz M. Concentration of histamine in serum and tissues of the primary ductal breast cancers in women. *Breast* 2005; 14 (3): 236-241
- Takahashi K, Tanaka S, Furuta K, Ichikawa A. Histamine H2 receptor-mediated modulation of local cytokine expression in a mouse experimental tumor model. *Biochem Biophys Res Communications* 2002; 297: 1205-1210
- Tanaka S, Ichikawa A. Recent Advances in Molecular Pharmacology of Histamine Systems: Immune Regulatory Roles of Histamine Produced by Leukocytes. *J Pharmacol Sci* 2006;101: 19-23
- Tilly BC, Tertoolen LG, Remorie R, Ladoux A, Verlaan I, de Laat SW, Moolenaar WH. Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca<sup>2+</sup>-mobilizing H1 receptors. *J Cell Biol* 1990; 110:1211-15.
- Togias A. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112; S60-S68
- Tomita K, Izumi K, Okabe S. Roxatidine- and cimetidine-induced angiogenesis inhibition suppresses growth of colon cancer implants in syngeneic mice. *J Pharmacol Sci* 2003; 93(3): 321-30
- Tomita K, Okabe S. Exogenous histamine stimulates colorectal cancer implant growth via immunosuppression in mice. *J Pharmacol Sci* 2005; 97(1): 116-23
- Velicer M, Dublin S, White E. Cimetidine use and the risk for prostate cancer: results from the VITAL cohort study. *AEP* 2006; 16 (12): 895-900
- Watson SA, Wilkinson LJ, Robertson JF, Hardcastle JD. Effect of histamine on the growth of human gastrointestinal tumours: reversal by cimetidine. *Gut*; 1993; 34:1091-6
- Xie H, He SH. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(19):2851-2857

Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88; 11515-11519

Zhang M, Thurmond RL, Dunford PJ. The histamine H4 receptor: A novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharmacol Therapeutical* 2007; 113; 594-606

## **CAPÍTULO 16:**

### **SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: DESARROLLO Y PLASTICIDAD**

Idoia Lara Celador

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	349
2.- SINAPSIS: Características y clasificación .....	349
3.- FORMACIÓN DE SINAPSIS: Factores difusibles .....	351
4.- DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	351
4.1.- Proliferación neuroblástica .....	352
4.2.- Migración y diferenciación de neuroblastos .....	353
4.3.- Formación de conexiones interneuronales.....	354
4.4.- Diferenciación celular .....	354
4.5.- Sinaptogénesis .....	355
5.- PLASTICIDAD.....	357
5.1.- Tipos de neuroplasticidad.....	357
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	359

## 1.- INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso se compone fundamentalmente de dos tipos celulares, las células gliales y las neuronas. Las células gliales, pueden subdividirse en tres grandes grupos, astrocitos, oligodendrocitos y microglía, y tienen como función ser el soporte funcional de las neuronas. Por su parte, las neuronas, son el elemento principal, y su característica más importante es que se trata de una célula con alto grado de especialización tanto a la hora de recibir estímulos como de conducir los impulsos nerviosos.

El funcionamiento del sistema nervioso esta basado en la conectividad o sinapsis, entre sus elementos básicos, las neuronas. La formación de las sinapsis en vertebrados, ocurre desde el desarrollo embrionario, y se extiende hasta la etapa postnatal temprana (Waites y cols. 2005). En vertebrados, la formación de sinapsis ocurre durante los dos últimos trimestres de la gestación en el desarrollo del embrión y se extiende hasta la etapa postnatal temprana (Waites y cols., 2005). Así mismo, tenemos que tener en cuenta, que la formación de sinapsis también ocurre en adultos, donde se considera que contribuye con el aprendizaje y la memoria, lo que nos da referencia al concepto de plasticidad del que trataremos mas adelante.

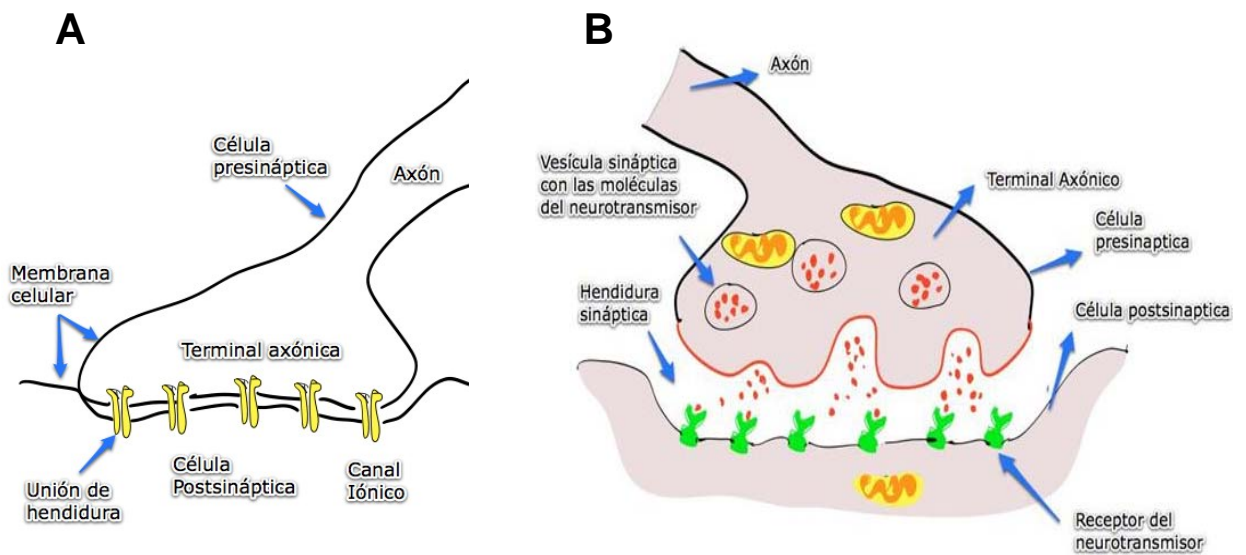
## 2.- SINAPSIS: Características y clasificación

El cerebro humano es un órgano complejo compuesto por millones de neuronas, que se encargan de transmitir las señales de unas células a otras. Denominamos sinapsis al sitio de contacto entre las neuronas donde ocurren las señales electroquímicas (Gilbert, 2005).

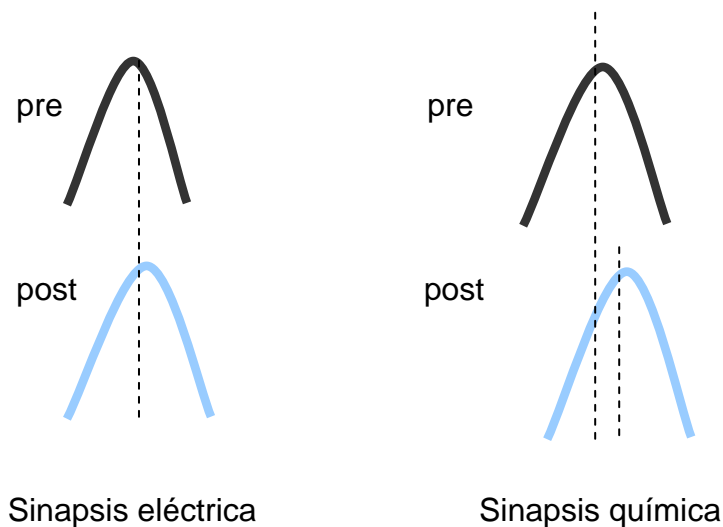
Existen dos tipos de sinapsis, eléctrica y química, que difieren tanto en su estructura y en la forma en que transmiten el impulso nervioso.

Las sinapsis eléctricas se dan gracias a la comunicación entre las membranas plasmáticas de los terminales pre y postsinápticos. Las células están unidas por uniones de tipo hendidura también denominadas GAP junctions, que son canales formados por proteínas de gran tamaño, que unen el citoplasma de una célula con la siguiente, permitiendo así el movimiento de iones entre dos células (Naus y Bani-Yaghoub, 1998). Por tanto, la conducción del impulso eléctrico se da en ambas direcciones y de una forma rápida (Figura 1 A).

Las sinapsis químicas (Figura 1 B), se caracterizan porque las membranas de los terminales pre y postsinápticos se ven engrosadas, y estan separadas por lo que se denomina hendidura sináptica. Al ser estas sinapsis unidireccionales se permite una regulación más precisa. También hay que tener en cuenta, que en este último tipo de sinapsis, se da un leve retraso en el tiempo en la transmisión del impulso nervioso entre la célula pre y en la postsináptica, ilustrado en el esquema de la Figura 2.



**Figura 1:** En el esquema se representan las dos modalidades de sinapsis neuronal: **A:** Sinapsis de tipo eléctrico, donde se aprecian las uniones de tipo hendidura. **B:** Sinapsis química con liberación de neurotransmisores



**Figura 2:** Representación del impulso nervioso en ambos tipos de sinapsis donde se observa el retraso temporal de la sinapsis química.

El proceso comienza, cuando llega el impulso nervioso al terminal presináptico produciéndose una despolarización de la membrana e induciendo así la apertura de los canales de Calcio dependientes de voltaje, que crearán un aumento de la concentración de calcio intracelular. Este aumento de Calcio produce la fusión de las vesículas que se encuentran en el botón presináptico con la membrana plasmática, siendo entonces cuando se libera el contenido de las vesículas llenas de neurotransmisores, a la hendidura sináptica.



### 3.- FORMACIÓN DE SINAPSIS: Factores difusibles

Una de las particularidades más importante de la formación de las diferentes sinapsis es el reconocimiento de la célula diana. Son muchos los casos en los cuales los axones deben atravesar largas distancias y terrenos complejos antes de encontrarse con sus ellas. Durante su trayecto aunque tienen numerosos contactos con diferentes neuronas, no establecen sinapsis si no es con la célula específica.

Factores difusibles: Los factores difusibles, son una clase de proteínas que tienen actividad sinaptogénica, siendo sintetizados tanto por las neuronas diana, como por las células de la glía de su alrededor. Estas moléculas, tienen una amplia variedad de actividades incluyendo entre ellas la habilidad para guiar las proyecciones axonales a sus respectivos destinos, estimular la arborización local, promover la diferenciación neuronal y la maduración, y crear un entorno favorable en el que los contactos entre axones y de dendritas dirijan la formación de uniones sinápticas que sean funcionales.

Algunas de estas moléculas son miembros de la red de señalización Wnt; red compleja de proteínas que tienen importancia en la embriogenesis y el cáncer, y de moléculas de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos FGF, que son secretadas por algunas subpoblaciones neuronales, y que se ha comprobado que inducen la arborización axonal local. Así, el BDNF, factor trófico perteneciente a la clase de las neurotrofinas y que es producido por neuronas, actúa sobre otras células nerviosas, e interacciona con receptores de la familia de las tirosín-quinasas a nivel pre y postsináptico. Este factor, además regula directamente la densidad de innervación de la sinapsis y así se le puede considerar como molécula precursora de formación de sinapsis (Waites,y cols., 2005).

### 4.- DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Durante la formación del tejido nervioso, se producen diferentes procesos de migración y diferenciación celular que tienen como finalidad generar un sistema organizado que es capaz de proporcionar una red de comunicación con una enorme capacidad adaptativa y con la peculiaridad de responder autónomamente a estímulos originados tanto en el medio interno como en el externo. De esta manera, la función principal del sistema nervioso central (SNC) se resumiría como la capacidad de integrar y controlar las diferentes funciones del organismo.

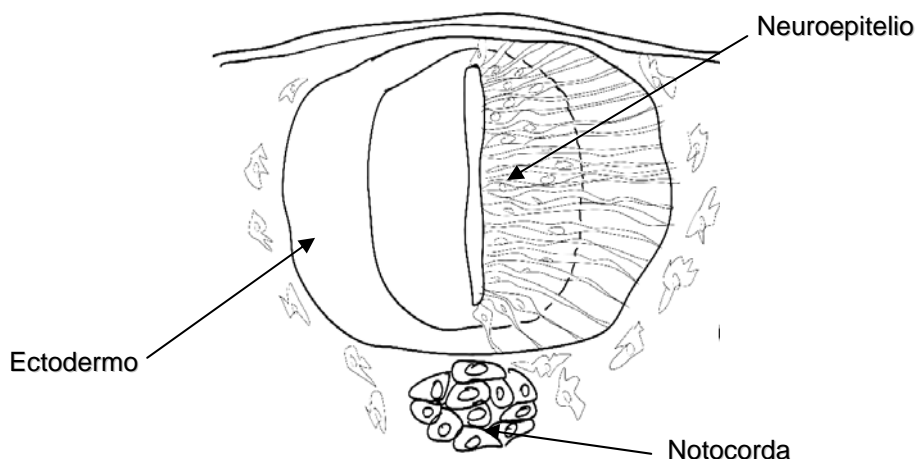
Los cambios en el tejido nervioso comienzan en la tercera semana del desarrollo embrionario. Se inicia con procesos de división y migración celular, etapas que, se detallan a continuación.

#### 4.1.- Proliferación neuroblástica

La primera estructura en formarse en la organogénesis del tejido nervioso es la placa neural, que consiste en una lámina plana de células en la superficie dorsal del embrión en desarrollo. Este tejido se irá plegando paulatinamente hasta finalmente formar una estructura en forma de tubo hueco que recibe el nombre de tubo neural. Está compuesto por una capa de células llamada neuroepitelio (Figura 3) y se trata de un epitelio pseudoestratificado, es decir, que consta de una sola capa celular.

El neuroepitelio es mitotícamente activo mientras se está formando el tubo neural. Es de destacar que las mitosis de estas células neuroepiteliales no ocurren todas a la misma velocidad, es decir que existen ciclos mitóticos de diferente duración. Lo que condiciona el ciclo mitótico de las células neuroepiteliales son las adhesiones que se establecen gracias a los desmosomas de las células. Poco a poco se van formando los neuroblastos y es a partir de esta capa de células desde la que se originarán el resto de células que componen el sistema nervioso central de mamíferos, (Revisado por Barbeitio, 2007).

En cuanto a su diferenciación ocurre simultáneamente en tres grados diferentes, anatómico, histológico y celular. **En el nivel anatómico** destaca que tanto la cavidad del tubo neural como el propio tubo neural, van proyectándose hacia el exterior y se van estrechando hasta formar las cámaras del cerebro y la médula espinal, partes de las que se compone el SNC. Por otro lado, **en el nivel tisular**, las poblaciones celulares situadas en la pared del tubo neural se reorganizan para formar diferentes regiones funcionales, y finalmente **a nivel celular**, las células del neuroepitelio se acaban diferenciando, en los distintos tipos celulares, tanto neuronas como células gliales (Gilbert, 2005).



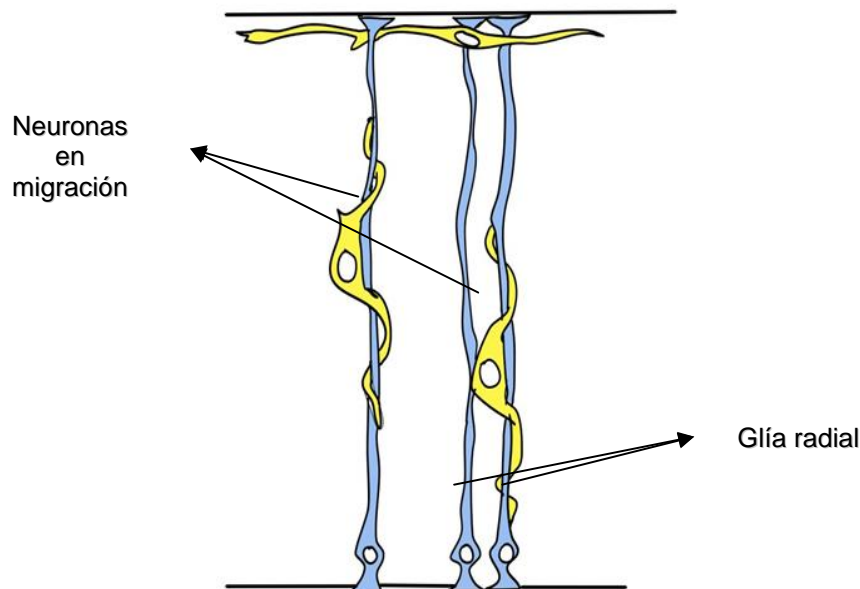
**Figura 3:** Epitelio pseudoestratificado denominado neuroepitelio

## 4.2.- Migración y diferenciación de neuroblastos

El proceso de migración consiste en el desplazamiento de las células nerviosas cuando cesa la proliferación celular, desde el lugar en el que se han formado, la zona ventricular del tubo neural, hasta su destino final. Esta posición final que las neuronas van a ocupar, se cree que puede estar determinada por la posición en la zona generativa, así como el momento en que la célula cesa su ciclo de mitosis. De esta manera las células que se generan las primeras, ocuparán las capas corticales situadas más profundamente, mientras que las células formadas más tarde ocuparán una posición superficial. (Revisado por Barbeito, 2007).

Asimismo, la especificación del tipo de neurona viene determinada por la posición del precursor neuronal en el tubo neural y por fecha en la que se genera (Puelles y Martínez, 2005).

La mayor parte de las células que derivan del tubo neural migran gracias a la denominada glía radial. La función de estas células gliales radiales va a ser la de servir como soporte para las migraciones de las neuronas (Figura 4). Aquí parece jugar un papel importante las moléculas de adhesión celular nerviosa, conocidas con la abreviación N-CAM, que favorecen las interacciones entre las neuronas y las células de la glia radial para que se de así la migración. Cuando finaliza el proceso de gestación del embrión, estas células gliales radiales se transformarán en astrocitos fibrosos.



**Figura 4:** Migración de neuronas gracias a la glía radial

La proliferación y diferenciación de los neuroblastos que formarán el cerebelo se dan ya en la etapa postnatal, exceptuando las células de Purkinje.

Consecuentemente, debe existir una sincronización de los sucesos entre la etapa de proliferación y migración que variará en las distintas zonas del cerebro (Revisado por Barbeito, 2007)

#### 4.3.- Formación de conexiones interneuronales

Las neuronas del cerebro se organizarán en diferentes capas y grupos formando la corteza cerebral cuando finalmente logran llegar a su localización final (Gilbert, 2005). La formación de las capas del adulto no va a finalizar hasta la mitad de la infancia (Revisado por Barbeito, 2007). Cada capa va a tener diferentes propiedades así como distintos tipos de neuronas, incluso existen diferencias en el grupo de conexiones que se producen. Existen clases de moléculas de naturaleza glucoprotéica y glucolípídica que intervienen en las interacciones entre neuronas.

#### 4.4.- Diferenciación celular

En esta etapa las neuronas empiezan a diferenciarse de forma morfológica, es decir, realizan una serie de procesos como el crecimiento del cuerpo celular, la elaboración de dendritas y axones, y se desarrolla la propiedad de propagar potenciales de acción, tan característico de las neuronas. Dentro de esta estructura cambiante, en la neurona existen unas zonas denominadas conos de crecimiento (Figura 5), de donde se originan las múltiples dendritas y los axones. Los conos de crecimiento se mueven por alargamiento y contracción de las microespículas, que son los filopodios puntiagudos de los que consta el cono de crecimiento. Las microespículas esta formadas por microfilamentos dispuestos con una orientación paralela al eje longitudinal del axón (Gilbert, 2005). El movimiento se genera porque las microespículas se enganchan al sustrato y ejercen una fuerza que tira del resto de la célula hacia delante. Los axones no crecerán si el cono de crecimiento fracasa en su avance (Lamoureux y cols. 1989). Además, cada cono de crecimiento presenta en su membrana celular una gran variedad de proteínas de adhesión y de reconocimiento intercelular. Algunas de ellas, como las cadherinas sirven también para mantener juntas las fibras del mismo tipo, produciéndose el fenómeno conocido como fasciculación.

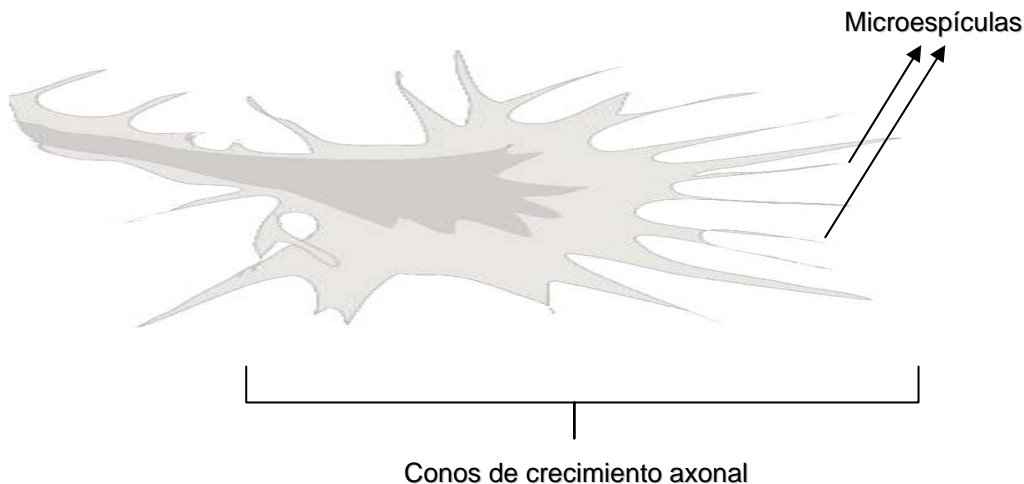
Además de este papel estructural en la migración axonal, las microespículas también tienen una función sensorial. Abriéndose en abanico delante del cono de crecimiento, cada microespícula toma muestras microambiente y envía señales de nuevo al soma.

Los axones de larga proyección tienden a crecer juntos en un fascículo común. La neurona elonga sus axones para formar conexiones aferentes o eferentes según el caso. Finalmente, existe una eliminación selectiva de axones, de

manera que aproximadamente en el adulto existen la mitad de las terminaciones axónicas que en el recién nacido (Puelles y Martínez, 2005).

La regulación de los fenómenos que tienen lugar durante la diferenciación celular no es del todo conocida, aunque está favorecida por la insulina y los factores de crecimiento insulínico, ya que esta estimula la síntesis de proteínas, y favorece la adquisición de la capacidad de neurotransmisión. Por otro lado, se ha comprobado que neuropéptidos como la somatostatina, colecistoquinina, sustancia P ó el polipéptido intestinal vasoactivo, parecen estar estrechamente relacionados con los fenómenos de elongación axónica e interconexión celular. Asimismo, el factor de crecimiento nervioso (NGF) es otra sustancia que posee acciones sobre el crecimiento y desarrollo nervioso. Esta sustancia cuando se encuentra en forma de dímero activo tiene una potente acción neurotrófica sobre aquellas neuronas que contienen catecolaminas. Así, incrementa el número de neuroblastos si actúa en un estadio temprano del desarrollo y por el contrario, incrementa el tamaño neuronal y la producción de neurotransmisores en ganglios cuando actúa después de constituidas las sinapsis y de que hayan dejado de alargarse las prolongaciones (Revisado por Barbeito, 2007).

En la rata, el proceso de diferenciación neuronal es fundamentalmente postnatal (2-3 semanas), aunque el crecimiento axonal comienza prenatalmente y dura también hasta la tercera semana postnatal. Sin embargo, en el hombre, la diferenciación neuronal empieza en el período prenatal y puede durar hasta los cuatro años de edad.



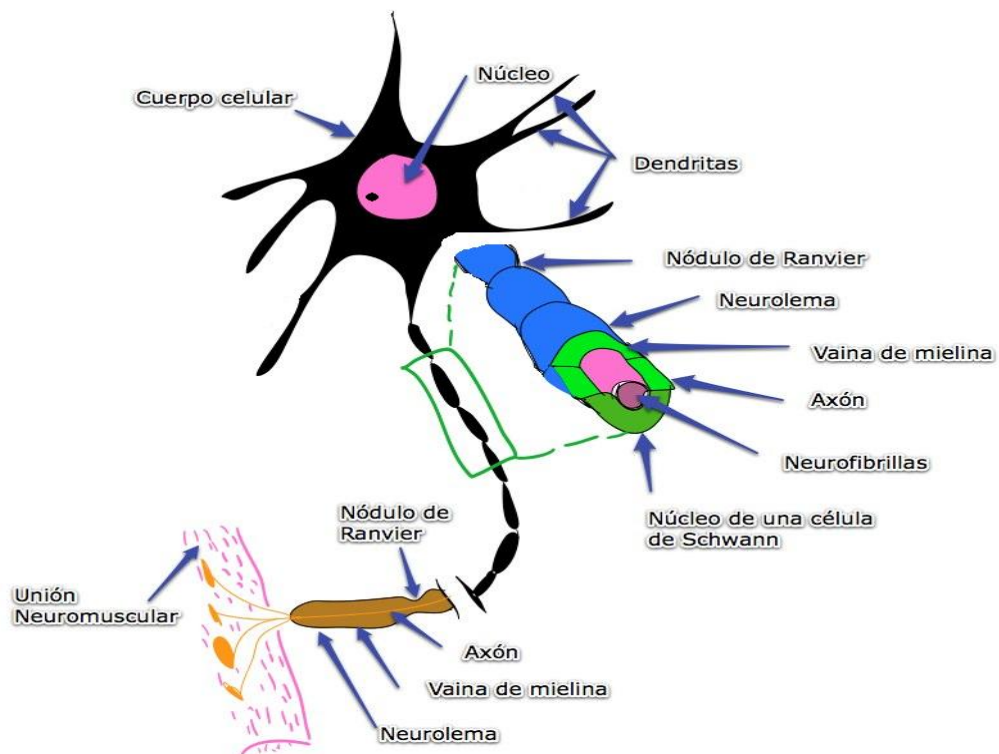
**Figura 5:** En la figura se muestran los conos de crecimiento axonal en una neurona.

#### 4.5.- Sinaptogénesis

Este proceso consiste en la localización por parte de los axones, de lugares adecuados para realizar su arborización terminal sináptica y la correspondiente

interacción con las células receptoras de estos contactos. Es el proceso final en la diferenciación neuronal. Cuando las neuronas han conseguido llegar al destino final, se forman las prolongaciones dendríticas axónicas. Son estas dendritas las que facilitan los contactos de otras células (Puelles y Martínez, 2005).

Los axones en crecimiento presentan en su citoplasma abundantes microtúbulos y son estos, los que parecen ser necesarios para formar el armazón estructural que mantiene la estabilidad del axón (Figura 6) (Revisado por Barbeito 2007).



**Figura 6:** Estructura de la neurona. El axón en crecimiento contiene orgánulos como neurotúbulos, neurofilamentos, mitocondrias, vesículas recubiertas y lisas, retículo endoplásmico y algunos cúmulos de ribosomas

La duda que se plantea es cómo un axón en crecimiento identifica el lugar en que se formará una determinada sinapsis, ya que realmente se conoce poco sobre estos los mecanismos. De una forma general se piensa que en un primer estadio se obtiene un exceso de contactos inmaduros entre el axón y la célula diana; esto requiere de una colaboración mutua entre los elementos de ambas células, donde una proteína, llamada fasciclina II, desempeña un papel importante, ya que parece estar directamente involucrada en este proceso. Más tarde, es la actividad neuronal, la que se va a encargar de seleccionar las sinapsis más adecuadas, desapareciendo las restantes. De esta manera se permite a cada terminal retirarse de los contactos sinápticos menos útiles y

buscar de nuevo los contactos útiles. En este proceso de selección juegan un papel muy importante el AMP cíclico (AMPC) y otra proteína relacionada con él llamada CREB. Esta proteína CREB actúa sobre factores de regulación de la lectura del genoma, e incrementa la producción y el transporte de elementos sinápticos hacia una parte del axón (Puelles y Martínez, 2005).

Existe otra posible hipótesis para explicar cómo el axón en crecimiento identifica el lugar donde se va a crear la sinapsis. Es la **hipótesis de reconocimiento molecular** que sugiere que cada una de las neuronas tiene especificada una identidad de tipo molecular que le permite ser reconocida por las otras neuronas que toman contacto con ella. Esta hipótesis destaca la importancia de la actividad neuronal durante el desarrollo, indicando que el patrón de actividad neuronal generado por los estímulos externos podría cambiar las conexiones en base a que las conexiones que se utilizan queden asentadas, mientras que desaparecen las conexiones menos utilizadas.

Se cree que en la sinapsis existe una importante transferencia bidireccional de sustancias esenciales para la supervivencia y normal funcionamiento de las células presinápticas y postsinápticas, como por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (NGF) (Revisado por Barbeito, 2007).

## 5.- PLASTICIDAD

Durante mucho tiempo el sistema nervioso central ha sido considerado como una estructura completamente inmutable e incluso irreparable desde el punto de vista funcional y anatómico, así como un sistema terminado y definitivo después del desarrollo embrionario. Sin embargo, hoy día estas ideas se ha comprobado que son erróneas y ha surgido el concepto de neuroplasticidad (Ginarte, 2007), que fue definida por Gollin, como el potencial para el cambio, la capacidad de modificar nuestra conducta y adaptarse a las demandas de un contexto particular (Gollin, 1981).

### 5.1.- Tipos de neuroplasticidad

A continuación vamos a mencionar los diferentes tipos fundamentales de neuroplasticidad existentes (Bergado y cols., 2000):

**Plasticidad por crecimiento:** Se considera que este tipo de plasticidad esta subdividida en distintos subtipos como los que enunciamos a continuación.

Regeneración axonal: Se basa en la capacidad de regeneración de los axones del sistema nervioso periférico por crecimiento a partir del cabo proximal, pero esto no se da en el sistema nervioso central que es el que se esta tratando en esta revisión.

Colaterización: en este tipo, el crecimiento ocurre gracias a axones que se encuentran sanos. Este proceso concluye con al formación de nuevas sinapsis y

parece ocupar un papel realmente importante en recuperación de funciones perdidas por consecuencia de la lesión.

**Sinaptogénesis reactiva:** es parte del proceso que comienza con la colateralización y concluye con la formación de nuevos contactos funcionales. Se denomina reactiva para diferenciarla de la sinaptogénesis que se ha hecho mención anterior que es la que ocurre en etapas intermedias durante el desarrollo embrionario.

**Neurogénesis:** diferentes estudios realizados en vertebrados han demostrado la producción de nuevas células nerviosas en el cerebro adulto. En roedores por ejemplo se conocen dos áreas donde ocurre este fenómeno que son la zona subventricular de los ventrículos laterales y el giro dentado del hipocampo. Estas nuevas neuronas podrían jugar un papel importante en el aprendizaje y memoria, así como la modulación de circuitos neurosinápticos y elaboración de nuevas conexiones entre ellos y desarrollo de nuevos circuitos.

**Plasticidad funcional:** **Plasticidad sináptica:** Esta adaptación funcional del sistema nervioso central para minimizar los efectos de las alteraciones estructurales o fisiológicas llamada plasticidad es posible gracias a la capacidad del SNC de cambiar estructural y funcionalmente por influencias endógenas y exógenas (Pascual-Castroviejo,1996).

Las capacidades plásticas de las conexiones sinápticas pueden expresarse de diferentes formas según su duración y los mecanismos implicados. Es decir están por ejemplo los mecanismos que conducen a cambios transitorios de la eficiencia sináptica en cuestión de milisegundos y hay otras formas más duraderas como la llamada potenciación a largo plazo, la cual es considerada como el mejor modelo de cambio funcional en la conectividad sináptica dependiente de la actividad.

Morfológicamente la plasticidad sináptica puede ser inducida en un cerebro dañado. Después del daño se dan cambios rápidos en cuanto al número, tamaño y forma de las espinas dendríticas, posiblemente debido a una síntesis de nuevas proteínas.

Entre los factores que modulan esta plasticidad, está Sinapsina 1, una fosfoproteína específica cuya vía de fosforilación parece ser un componente vital en los mecanismos que intervienen en la plasticidad sináptica y que puede contribuir a la base celular del aprendizaje y de la memoria. También se ha descrito como el flujo presináptico del Calcio, importante mensajero, condiciona algunas formas de plasticidad sináptica, siendo muy importante el papel que juegan las integrinas en la estabilización de los nuevos cambios.



## 6.- BIBLIOGRAFÍA

Barbeito, L. Desarrollo del sistema nervioso, 2007  
<http://fundacionannavazquez.wordpress.com/2007/07/18/desarrollo-del-sistema-nervioso/>

Bergado JA., Almaguer, J. Mecanismos celulares de la neuroplasticidad. Rev Neurol 2000; 31: 1074-95

Duffau,H. Brain plasticity:From pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. Journal of clinical Neuroscience. 2006; 13: 885-897

Gilbert SF. Células de la cresta neural y especificidad axonal. En: Biología del desarrollo. Editorial Médica Panamericana. 2005

Gilbert SF. EL surgimiento del ectodermo:El sistema nervioso central y la epidermis. En: Biología del desarrollo. Editorial Médica Panamericana. 2005

Ginarte, Y. La neuroplasticidad como base biológica de la rehabilitación cognitiva. Geroinfo.RNPS. 2007; 2: 1

Gollin ES. Developmental and plasticity. En: Developmental plasticity: behavioural and biological aspects of variation in developmental. Nueva York: Academic Press. 1981

Lamoureux, P, Buxbaum RE and Heidemann SR. Direct evidence that growth cones pull. Nature 1989; 340: 159-162

Naus,CCG. and Bani-Yaghoub,M.Gap Junctional communication in the developing central nervous system. Cell biology International. 1998; 22, 11/12: 751-763

Pascual-Castroviejo,I. Plasticidad cerebral. Rev.Neurol.1996; 24:1361-1366

Puelles, L, Martinez,S. Ontogenia del sistema nervioso. Master en neurociencias 2005

Waites, CL. Craig, AM and Garner, CG. Mechanisms of Vertebrate Synaptogenesis. Annu.Rev.Neurosci.2005; 28: 251-274.

## **CAPÍTULO 17:**

### **LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL EN PREMATUROS.**

Felipe Goñi de Cerio, Enrique Hilario, Antonia Álvarez

#### Índice

1.- CONCEPTO DE LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA .....	361
2.- ANTECEDENTES DE LA HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL .....	361
3.- BASES CELULARES DEL DAÑO HIPÓXICO-ISQUÉMICO.....	362
3.1.- Excitotoxicidad.....	363
3.2.- Deficiencias en el Suministro Energético .....	364
3.3.- Estrés Oxidativo.....	365
3.4.- Pérdida de la Homeostasis de Calcio.....	366
3.5.- Muerte Neuronal por Apoptosis o Necrosis.....	367
4.- CONSIDERACIONES PATOLÓGICAS .....	368
4.1.- Hemorragias en prematuros .....	369
4.2.- Edema Cerebral.....	370
4.3.- Leucomalacia Periventricular o Infarto Periventricular .....	371
4.4.- Lesiones de la Sustancia Gris .....	372
5.- ENSAYOS TERAPÉUTICOS.....	373
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	376

## 1.- CONCEPTO DE LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA

La lesión cerebral hipóxico-isquémica representa una de las principales causas de mortalidad y morbilidad neurológica tanto en el recién nacido prematuro como en el recién nacido a término. Esta lesión cerebral tiene como antecedente más frecuente la asfixia. Dicha situación clínica implica la existencia de un trastorno en el intercambio de gases, cuyo resultado es el déficit de oxígeno (O<sub>2</sub>) y el exceso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), con la consiguiente acidosis derivada. El mantenimiento de la asfixia casi siempre producirá hipotensión e isquemia. Esta situación puede producirse igualmente intraútero, donde la disminución del intercambio de gases entre la circulación materna y fetal, junto con la reducción de flujo sanguíneo al feto, determinan la asfixia resultante (Volpe, 1995).

En la práctica clínica ha quedado acuñado el término lesión o encefalopatía hipóxico-isquémica, dada la dificultad para establecer con precisión si ha predominado la hipoxemia (disminución del contenido de O<sub>2</sub> de la sangre), o la isquemia (reducción de la perfusión sanguínea en un determinado lecho tisular), como determinante etiopatogénico principal (Volpe, 1995). Seguramente, en la mayoría de los casos una combinación de ambas condiciona la deficiencia de O<sub>2</sub> en los tejidos, determinante de la lesión neurológica causada por la agresión hipóxico-isquémica.

La lesión hipóxico-isquémica, desencadena una serie de reacciones en cascada que continúan y se amplifican durante el periodo de recuperación tras la reanimación del recién nacido, y que conducen al daño del tejido nervioso en forma de infarto tisular necrosis neuronal selectiva y apoptosis. La gravedad y la trascendencia del daño asfíctico dependen de la profundidad de éste, de su duración y de la vulnerabilidad isquémica selectiva. Esta última determina que algunas células mueran y otras permanezcan en estado de penumbra isquémica. Muchas de estas neuronas mueren, a pesar de restablecerse el flujo sanguíneo cerebral. Este fenómeno se denomina muerte celular retrasada, y su expresión celular es la necrosis selectiva y la apoptosis.

## 2.- ANTECEDENTES DE LA HIPOXIA-ISQUEMIA CEREBRAL

Prácticamente el 80% del crecimiento del sistema nervioso central (SNC) en humanos se produce durante los dos últimos trimestres de la gestación y los primeros meses de vida, periodo durante el cual es muy susceptible a los eventos lesivos (Kinney y Armstrong, 1997; du-Plessis y Volpe, 2002), entre los que se incluyen los derivados de un menor aporte sanguíneo. La perfusión del cerebro fetal puede verse comprometida por enfermedades sistémicas, traumatismos, intoxicaciones de la madre, incompatibilidades materno-fetales, desequilibrios circulatorios en las gestaciones monocoriales, por patología placentaria, o incluso del propio corazón fetal (Burke y Tannenberg, 1995; Larroche y cols., 1997; Volpe, 2001; Soehle y cols., 2003).

Estudios neuropatológicos practicados en recién nacidos a término asfícticos fallecidos en la primera semana de vida, revelaron en un 48% lesiones histológicas sugestivas de daño cerebral anterior al parto. Además, se considera

que la mayoría (hasta un 90%) de las lesiones hipóxico-isquémicas neonatales se producen durante el periodo perinatal. Del mismo modo, es un hecho notable que a pesar de la mejoría en la vigilancia fetal intraparto y la disminución del trauma obstétrico, no se haya conseguido reducir la incidencia de parálisis cerebral en los últimos 30 años (Edwards y Azzopardi, 2000). Finalmente, aproximadamente en el 10% de los casos restantes, existen factores de riesgo postnatales que son causa de asfixia y lesión cerebral neonatal, especialmente importantes en la población de recién nacidos prematuros.

El incremento en nacidos prematuros y de gestaciones múltiples, así como la mayor supervivencia de esos niños de alto riesgo, hacen que la prevalencia de las lesiones hipóxico-isquémicas haya aumentado. En la actualidad, entre un 80-85% de los recién nacidos con peso menor de 1500 g. sobreviven, presentando parálisis cerebral un 5-15%. Además, entre un 25 y un 50% presentan otras discapacidades menores del desarrollo nervioso, que afectan no sólo a alteraciones motoras sino también a las áreas del conocimiento y de la conducta (Tabla 1). Así, el aumento de los partos prematuros, gestaciones múltiples y supervivencia de niños de alto riesgo hacen que la prevalencia de las lesiones cerebrales por hipoxia-isquemia sea alta.

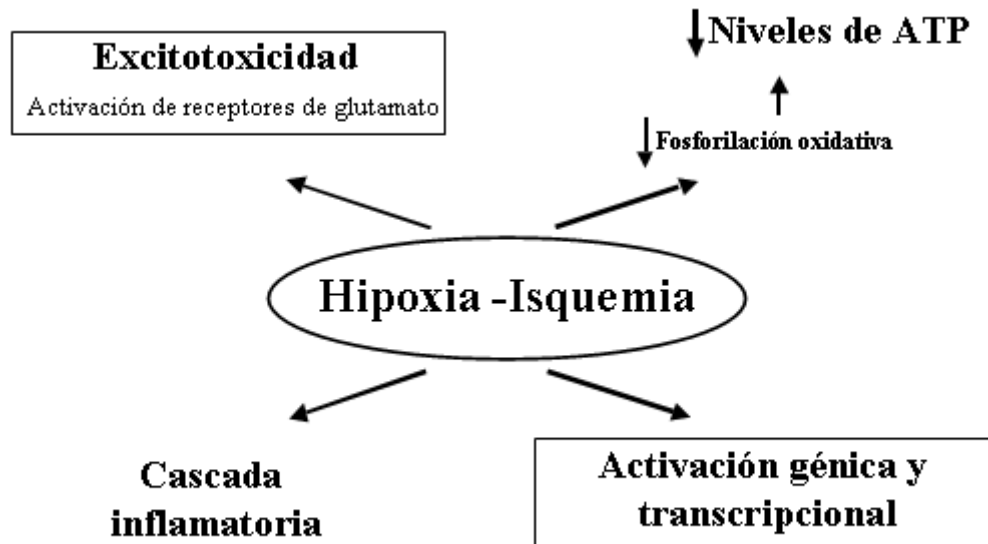
**Tabla 1.** Alteraciones neuropatológicas y patogénesis de la encefalopatía HI neonatal (EP), modificado por Volpe (Volpe, 1995). La encefalopatía puede producirse antes del parto (20%), durante el parto (30%), ambos dos (35%), o posparto (10%).

ALTERACIONES	PERIODO	INCIDENCIA	PATOGÉNESIS	CONSECUENCIAS
<b>Daño parasagital</b>	A término	0.2-0.35 por 1000	Baja presión y flujo sanguíneo cerebral	Cuadriparesia espástica, déficit cognitivo, discapacidad oculomotora
<b>Leucomalacia periventricular</b>	Prematuro < 32 semanas y <1500 g, con soporte ventilatorio	45% pretermino	Combinación de factores vasculares, metabólicos y circulatorios.	Parálisis cerebral, déficit desarrollo e intelectual, disfunción visual
<b>Necrosis neuronal selectiva</b>	Comúnmente en nacidos a término	Variable	Zonas con baja capacidad de metabolismo anaerobio	Déficit cognitivo, cuadriparesis espástica plasia bulbar y pseudobulbar, hiperactividad
<b>Estado marmoratus</b>	Más común en prematuros	5% de los recién nacidos con EP	Receptores de NMDA-glutamato	Descoordinación motora, déficit cognitivo, hipotonía, Cuadriparesia
<b>Necrosis cerebral por isquemia</b>	Prematuros de 28 semanas a término	20% de pre- y perinatal EP	Muerte celular	Hemiparesia espástica, cuadriparesia, déficit cognitivo

### 3.- BASES CELULARES DEL DAÑO HIPÓXICO-ISQUÉMICO

Ante una hipoxia grave el feto reacciona activando del sistema nervioso simpático adrenérgico y redistribuyendo el gasto cardíaco en favor de los órganos principales (cerebro, corazón y suprarrenales) (Behrman y cols., 1997). Tras una etapa inicial reversible y probablemente adaptativa, cuyo correlato neurofisiológico es la inactivación sináptica, sigue, en caso de perpetuarse la

agresión, la lesión celular irreversible, esta lesión a menudo se debe a la puesta en marcha una serie de eventos que a menudo dañan al conjunto del cerebro (Figura 1). Básicamente, la reducción en el aporte de oxígeno provoca excitotoxicidad, disminución en los niveles de ATP, aparición de estrés oxidativo, generando la muerte neuronal por apoptosis o necrosis.



**Figura 1.** Esquema de los principales eventos desencadenados por la hipoxia-isquemia.

### 3.1.- Excitotoxicidad

Término aplicado a la muerte celular, causada por sobreestimulación de receptores de neurotransmisores excitatorios. Tanto determinados circuitos neuronales como varias poblaciones gliales, tales como la oligodendroglia inmadura periventricular, pueden morir por excitotoxicidad mediada por la hipoxia-isquemia (Johnston y cols., 2001).

Los neurotransmisores excitadores más comunes del sistema nervioso central son el aspartato y el glutamato (McGeer, 1989; Thomas, 1995). Cuando estos aminoácidos son liberados desde la terminación presináptica interactúan con la neurona postsináptica a través de dos tipos generales de receptores:

- Los receptores ionotrópicos, como AMPA ó N-Metil-D-Aspartato (NMDA), que están acoplados a canales de compuerta iónica.
- Los receptores metabotrópicos, como el LPA-4 ó el ACPD, que se encuentran acoplados a proteínas G, (Farooqui y Horrocks, 1991).

En ambos casos, los aminoácidos son eliminados de la terminación sináptica mediante un mecanismo de recaptación, llevado a cabo en un 80% por células

neuronales (Shank y Campbell, 1983) y en un 20% por células gliales (Storm-Mathisen e Iversen, 1979).

Hay varias circunstancias que causan sobreestimulación de receptores de neurotransmisores excitatorios, la liberación de neurotransmisores que no pueden ser eliminados mediante mecanismos de recaptación y la consecuente excitotoxicidad. Entre las causas que provocan la liberación de estos aminoácidos, y que terminan desencadenando excitotoxicidad, se han descrito (Olney, 1994; Peinado y cols., 2000):

- La depleción de reservas energéticas
- La pérdida de homeostasis iónica
- Las lesiones traumáticas
- El envejecimiento; enfermedades neurodegenerativas
- Los procesos isquémicos

La excitotoxicidad se llevaría a cabo a través de receptores NMDA (Lynch y Guttman, 2002) mediante dos mecanismos: uno rápido o agudo y otro retardado (Auer, 1991). La excitotoxicidad aguda inducida por agonistas glutamatérgicos implicaría la entrada masiva de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en la células, causando citolisis osmótica y muerte por necrosis (Peinado y cols., 2000). Mientras que la excitotoxicidad retardada estaría mediada por un incremento del calcio citosólico, relacionado con la depleción de ATP. El incremento de calcio citosólico activará una número de enzima calcio-dependientes tales como la fosfolipasa A2 y C, proteasas, endonucleasas y la óxido nítrico sintetasa, que pondrán en marcha diversas cascadas metabólicas que provocarán: La peroxidación de los lípidos de la membrana celular por las fosfolipasas. La generación de radicales libres, sobrepasando la capacidad antioxidante endógena, perpetuando la peroxidación de las membranas celulares. La activación de las proteasas determinando la degradación de las proteínas del citoesqueleto así como las proteínas reguladoras. La activación de determinados sistemas enzimáticos, como la óxido nítrico sintetasa (NOS), el cual produce un incremento de óxido nítrico que inicialmente produce una respuesta vasodilatadora, pero que sin embargo, también dará lugar a un incremento en peroxinitritos, los cuales junto con la acción tóxica del óxido nítrico da lugar a una activación de fosfolipasas con la consiguiente lesión de membranas. Así como a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial con el posterior descenso en el ATP y la apertura del poro mitocondrial, que llevará en último extremo a la muerte celular. (Strolin Benedetti y cols., 1993; Takai y cols., 2003).

### 3.2.- Deficiencias en el Suministro Energético

Las células nerviosas precisan para su homeostasis mantener el potencial de membrana y la integridad de una serie de reacciones intracelulares. Estos procesos requieren energía en forma de ATP, normalmente obtenido mediante el metabolismo aeróbico de la glucosa, que genera 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa metabolizada. Es necesario un aporte continuado de energía a la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana neuronal es clave en la

homeostasis iónica y en el mantenimiento del potencial de membrana, hasta tal punto que casi la mitad del ATP producido en la mitocondria se destina a ello (Ames y cols., 1992). Además, las neuronas no contienen depósitos de glucógeno siendo los astrocitos las células encargadas de proporcionarles glucosa. Así, cuando existe precariedad de oxígeno a nivel tisular el metabolismo de la glucosa es principalmente anaeróbico, generándose por cada molécula de glucosa tan sólo 2 moléculas de ATP (Marks y cols., 1996), y consecuentemente se produce una disminución de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP (Davis y cols., 1997).

Como consecuencia de la pérdida de aporte energético tras la hipoxia-isquemia se producirá una serie de alteraciones celulares secundarias, como es un incremento en la glicólisis anaerobia, un incremento en el calcio citosólico libre, una deficiente ubiquitinización y una acumulación de xantina. Todas estas alteraciones desencadenadas conllevan un incremento en las concentraciones de calcio intracelular, quien a su vez actuará como mensajero intracelular activando señales químicas y enzimas tales como las fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y la NOS. Estas enzimas están implicadas en el programa de muerte celular (Chakraborti, 1999) mediante la activación de genes apoptóticos (Jacotot, 1999; Siesjö, 1999).

Sin embargo, las neuronas son capaces de soportar periodos transitorios de hipoglucemia e hipoxia, aunque cuando ambas causas se producen de forma simultánea el proceso lesivo es más intenso (Kaku y cols., 1991).

### 3.3.- Estrés Oxidativo

El metabolismo oxidativo da lugar a la formación de radicales libres que se generan en mayor cuantía según la tasa metabólica se eleva. Estos radicales libres de oxígeno, también denominados ROS (reactive oxygen species), son átomos o moléculas con un electrón desapareado, lo que les hace altamente reactivos frente a las moléculas vecinas a las que provocan daños oxidativos irreparables. Los radicales libres que producen mayor toxicidad son el ión superóxido ( $O^{\cdot-}$ ), el hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), el agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (Herce-Pagliai y cols., 1998; Hogg, 1998; Suzuki y cols., 2002). Estas especies reactivas del oxígeno dañan las células al oxidar directamente a los lípidos (ácidos poliinsaturados de las membranas principalmente), a las proteínas (sobre todo enzimas) o a los ácidos nucleicos (Floyd y cols. 1992; Wei y cols. 1998). También pueden inhibir la recaptación de aminoácidos excitatorios (Pérez-Velázquez y cols., 1997) y disparar la activación de enzimas proteolíticas como las caspasas o las endonucleasas (Sapolsky 1992; Puka-Sundvall y cols., 2000; Fukuda y cols., 2003). El estrés oxidativo representa una importante causa de apoptosis en las agresiones por isquemia/reperfusión (Lin y cols., 2003).

Los radicales libres con el tiempo se van acumulando en las células del tejido nervioso pudiendo conducir a la muerte neuronal (Knight, 1997; Lin y cols., 2003). Sin embargo, las células poseen mecanismos que les permiten inactivar

radicales libres y sustraerse a su capacidad oxidativa (Yu, 1994; Sarkela y cols., 2001). En este sentido, se ha calculado que las células vienen a recibir diariamente unos 100.000 impactos oxidativos que son neutralizados en gran medida por las defensas antiestrés. Entre los sistemas de inactivación de radicales libres se encuentran el llevado a cabo por la enzima superóxido dismutasa (SOD), que transforma el ión superóxido en agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), y por la enzima glutatión peroxidasa (GSP), que transforma el agua oxigenada en agua (Yu, 1994). Otra de las enzimas integrantes de las defensas antiestrés corresponde a la glutatión S-transferasa (GST) que actúa a través de la inactivación de metabolitos que contienen grupos carbonil, peróxido y epóxido, generados como consecuencia de los impactos oxidativos producidos por los radicales libres (Hayes y Pulford, 1995).

### 3.4.- Pérdida de la Homeostasis de Calcio

Todos los casos anteriores conllevan un incremento en las concentraciones de calcio intracelular, quien a su vez actúa como mensajero intracelular activando señales químicas y enzimas tales como las fosfolipasas, proteasas, endonucleasas y la NOS. Estas enzimas están implicadas en el programa de muerte celular (Chakraborti, 1999) mediante la activación de genes apoptóticos (Jacotot, 1999; Siesjö, 1999).

El incremento en el flujo de calcio libre tanto hacia el interior del núcleo neuronal como hacia la región sinaptosómica que se observa en la agresión hipóxica neuronal estaría mediada por el NO (Mishra y cols., 2002). Los aumentos de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico son causados por la entrada de calcio extracelular a través de canales acoplados a receptores regulados por voltaje o agonistas como es el caso ya comentado de los receptores de glutamato NMDA (Mills, 1996; Peinado y cols, 2000). Una vez que el calcio penetra en el citosol, la célula mediante la activación de bombas  $Ca^{2+}$  ATPasas, tiende a secuestrarlo y almacenarlo en depósitos tales como el retículo endoplasmático, las mitocondrias o incluso uniéndolo a proteínas. No obstante, la captación y almacenaje de calcio por los orgánulos citados puede llegar a ser insuficiente si continúa la entrada de calcio al persistir la causa responsable. Así, en este sentido, la unión de glutamato a receptores NMDA no sólo provoca la apertura de canales de calcio, sino que también activa a la fosfolipasa A2 y C de la membrana que transforman el fosfoinositol bifosfato en fosfoinositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol. El IP3, a su vez, abre canales de calcio en el retículo endoplasmático, y, a su vez, la propia elevación del calcio determina la apertura de nuevos canales en los depósitos de calcio, lo que da lugar a masivas salidas de calcio hacia el citosol, de tal manera que se establece un círculo vicioso autoalimentado que hace que la bomba de  $Ca^{2+}$  ATP-dependiente resulte totalmente ineficaz (Paschen y Doutheil, 1999).

La mitocondria también desempeña un importante papel en el mantenimiento de los niveles elevados de  $Ca^{2+}$  citosólico (Rustin, 2000). En condiciones normales, el calcio citosólico capturado en la mitocondria es utilizado para activar determinadas deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Además, su salida de la mitocondria permite la introducción de  $Na^+$  desde el citoplasma al



interior de la mitocondria, para posteriormente ser devuelto de nuevo al hialoplasma permitiendo la entrada de H<sup>+</sup> al interior mitocondrial. Se crea, de esta forma, un gradiente de H<sup>+</sup> que es imprescindible para el desarrollo del proceso de fosforilación oxidativa. Sin embargo, todo este sistema puede desequilibrarse como consecuencia de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Sugrue y cols., 1999). La apertura más o menos transitoria del poro (MPTP: Mitochondrial Permeability Transition Pore) que de forma inespecífica deje salir hacia el hialoplasma iones y moléculas (entre ellos el calcio), conlleva la pérdida de potencial de membrana, provocando incluso gasto de ATP. Concentraciones elevadas de calcio citosólico y el estrés oxidativo activan la apertura del poro mitocondrial (Cassarino y Bennen, 1999).

Por lo tanto, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial no solamente implica una reducción de los mecanismos productores de energía, sino que supone una pérdida de la homeostasis celular, lo que a su vez implica el que se produzcan nuevos aumentos de calcio citosólico y, por consiguiente, la puesta en marcha de un proceso de autoalimentación que acaba provocando muerte celular mediante necrosis o apoptosis.

### 3.5.- Muerte Neuronal por Apoptosis o Necrosis

Finalmente la hipoxia-isquemia determina dos formas de muerte celular morfológicamente diferentes (Yue y cols., 1997; Inder y Volpe, 2000; Ohyu y cols., 2000). Una de ellas es la muerte por necrosis, caracterizada por el edema celular, ruptura de la membrana celular, y reacción celular inflamatoria. La otra es la apoptosis o muerte celular programada, en cuyo caso la célula aparece retraída, con condensación cromatínica y fragmentación del DNA. Durante la agresión HI cerebral se desencadenan varios mecanismos celulares que contribuyen a la muerte celular por apoptosis o por necrosis, dependiendo de la severidad el daño, el estado madurativo y la región afectada (Sugawara y cols., 2004; Eguchi y cols., 1997; Almeida y Bolaños, 2001; Puka-Sundvall y cols., 2000). La muerte celular comienza inmediatamente y continúa a lo largo de un periodo de días o semanas. El fenotipo de la muerte celular sufre un cambio que va desde una morfología necrótica a una apoptótica. Esta evolución es conocida como un "continuo necrosis-apoptosis". Recientes estudios sugieren que la apoptosis desempeña un papel prominente en la agresión HI en el cerebro neonatal, siendo más importante la apoptosis que la necrosis después de la agresión (Hu y cols., 2000).

En el feto humano, la exposición a un daño hipóxico grave induce la aparición de una proporción significativa de células neuronales susceptibles de sufrir apoptosis (Yakovlev y Faden, 2004). Los niños que mueren después del daño intrauterino presentan un número significativo de células en el cerebro con las características morfológicas de la apoptosis. Así, la apoptosis contribuye significativamente al daño cerebral en el periodo neonatal.

Un segundo daño celular neuronal ocurre durante la fase de reperfusión. Este daño se cree que es causado por la liberación de radicales libres post-isquémicos, la síntesis de óxido nítrico, las reacciones inflamatorias y una

pérdida del equilibrio entre los sistemas neurotransmisores excitador e inhibitor. En el contexto clínico, muchas de las secuelas de la asfixia perinatal suceden por la reperfusión a los órganos tales como el cerebro, riñón, corazón, hígado y pulmones. Un daño severo produce necrosis celular, pero una asfixia moderada puede causar un patrón de muerte neuronal retrasada o apoptosis. Transcurrido el periodo isquémico, la biosíntesis proteica retorna a los niveles pre-isquémicos en las zonas no vulnerables del cerebro, mientras que en las áreas más vulnerables permanece inhibida. Así pues, la inhibición de la síntesis proteica, parece ser un indicador precoz de la subsiguiente muerte celular neuronal.

#### 4.- CONSIDERACIONES PATOLOGICAS

En la encefalopatía hipóxico-isquémica, la extensión y la distribución de las lesiones en el cerebro dependen en gran medida de la duración y severidad de la hipoxia y del tiempo de supervivencia del paciente. Las neuronas son los elementos más vulnerables a la privación de oxígeno, y esto parece depender de factores relacionados con la maduración, factores metabólicos, la tasa metabólica y la densidad de los receptores de glutamato que parecen concentrarse en los núcleos basales durante el periodo neonatal. Pero si el episodio tiene suficiente severidad, también se ven afectadas las células gliales, las terminaciones nerviosas y los vasos sanguíneos.

Después de un episodio de asfixia, hay diversos grados de recuperación neurológica, que varían desde la aparición de alteraciones secundarias como convulsiones, edema e infarto cerebral, hasta la recuperación progresiva de la afectación neurológica.

Teniendo en cuenta esta variabilidad de respuesta, la encefalopatía hipóxico-isquémica es la causa más frecuente de incapacidad neurológica crónica en sus diversas manifestaciones como parálisis cerebral, retraso mental, alteraciones del aprendizaje y epilepsia, entre otras.

A pesar de la gran variedad de causas que producen daño hipóxico cerebral, los cambios neuropatológicos son muy similares. Los mecanismos de adaptación ante la disminución de oxígeno consisten en redistribuir el flujo sanguíneo a órganos vitales como el corazón y el cerebro y también hacia las suprarrenales al ser estas fundamentales en las reacciones ante el estrés. En esta redistribución, la hipoxia y la acumulación de dióxido de carbono actuarán estimulando la vasodilatación cerebral que conservará el aporte del oxígeno, mientras que el aumento de la actividad suprarrenal aumentará la resistencia vascular periférica.

La respuesta cerebral ante la hipoxemia, que conlleva un aumento del flujo, redistribuye este a zonas preferentes como el tronco cerebral, regiones subcorticales mientras que otras como el cerebelo tendrán su perfusión más comprometida.

A la hora de estudiar la afectación clínica de un episodio hipóxico-isquémico es importante tener en cuenta la vulnerabilidad selectiva de las neuronas de

diferentes localizaciones (Mc Gee y cols., 1992). Las neuronas más vulnerables son las del hipocampo, las células granulares y de Purkinje del cerebelo y las de la tercera, quinta y sexta capa de la corteza cerebral. En la corteza cerebral, la necrosis neuronal es normalmente más pronunciada a nivel de los lóbulos occipital y parietal, siendo menor en el temporal y frontal. La corteza parasagital es particularmente sensible ante disminuciones en la concentración sanguínea de oxígeno, quizás por ser una región fronteriza entre la irrigación de las arterias cerebrales anteriores y medias. Además, al ser una zona con gran actividad metabólica durante el desarrollo, puede encontrarse necrosis de la sustancia blanca periventricular.

El daño cerebral puede estar circunscrito, también, a los límites arteriales en la corteza y cerebelo, siendo este patrón de daño el más frecuentemente encontrado cuando hay un episodio de hipotensión y consiguiente caída en la presión de perfusión. El daño hipóxico-isquémico puede también ocurrir a nivel de ciertos núcleos del tálamo, sobre todo en el complejo nuclear anterior y en los núcleos dorsomediales, así como en los núcleos basales, especialmente en el caudado y putamen. El tronco del encéfalo es más vulnerable en niños que en adultos, y el daño hipóxico puede incluir los núcleos del V, VIII y X pares craneales. El hipotálamo y los cuerpos mamilares son muy vulnerables a la hipoxia en niños pequeños y recién nacidos (Mc Gee y cols., 1992).

#### 4.1.- Hemorragias en prematuros

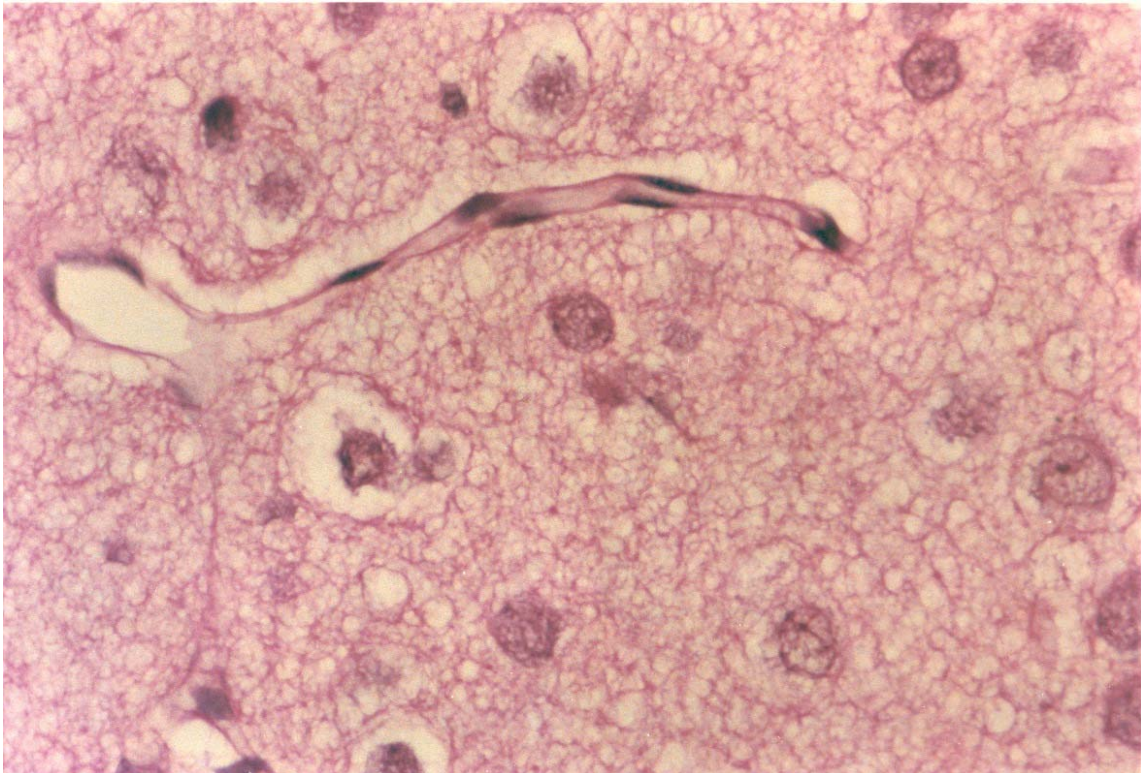
La hemorragia es la lesión cerebral más frecuente en neonatos y los factores significativos que la condicionan pueden preceder al parto (Dooling y Gilles, 1983). La patogénesis de las hemorragias cerebrales es multifactorial, aunque no todos los factores patogénicos actúen en cada caso, sino que son las circunstancias clínicas las que condicionan cual de ellos representa un papel crítico. El aumento de la presión parcial del CO<sub>2</sub> arterial actúa sobre las arteriolas cerebrales aumentando el flujo cerebral y la velocidad del mismo en niños prematuros. La hemorragia subdural suele ser debida a una ruptura de las pequeñas venas que se localizan entre las venas cerebrales y los senos venosos de la duramadre durante los partos traumáticos, pero ocasionalmente forman parte de una alteración hemorrágica generalizada en el neonato.

Los vasos periventriculares inmaduros son grandes e irregulares y están formados por células endoteliales que asientan sobre una lámina basal incompleta (Hambleton y Wigglesworth, 1976; Pape y Wigglesworth, 1979), características que los hacen más susceptibles a la rotura. Además, las células endoteliales de estos vasos son metabólicamente muy activas y especialmente dependientes del metabolismo oxidativo, lo que las hace ser especialmente vulnerables a la hipoxia-isquemia. Todo ello contribuye a que en estas condiciones, y especialmente en la fase de reperfusión, haya un mayor riesgo de hemorragia en la matriz germinal periventricular de las zonas vasculares limítrofes.

## 4.2.- Edema Cerebral

Consiste en un aumento del líquido intersticial en el tejido cerebral, teniendo en cuenta que el cerebro está confinado a un cráneo semirrígido durante el desarrollo pre y postnatal puede soportar incrementos discretos de su volumen antes de que aumente la presión intracraneal de forma significativa.

La disminución en el flujo sanguíneo cerebral conlleva un descenso en el aporte de oxígeno y glucosa cuya privación induce a las células gliales a liberar factores solubles que incrementan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Brillault y cols., 2002), que normalmente está reducida, comparándola con otros órganos. Además, el tejido cerebral carece de un sistema linfático que se encargue con eficacia de retirar cualquier exceso de fluido intersticial acumulado. En principio es un edema de tipo vasogénico (Fischer y cols., 2002) que posteriormente desencadenaría el edema citotóxico consistente en una hinchazón de las células nerviosas con acumulo de sodio y agua intracelular y en consecuencia una reducción del volumen extracelular, estas dos circunstancias aumentarían la presión intracraneal. Además, la falta de oxígeno y glucosa originan daño cerebral isquémico a través de secuencias fisiopatológicas que implican la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, el incremento en el calcio libre mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno, todo lo cual contribuye a la formación de edema cerebral (MacGregor y cols., 2003). El edema extracelular es más frecuente en la sustancia blanca debido a un espacio extracelular más amplio en esta que en la sustancia gris (Figura 2).



**Figura 2.** Edema perivascular e intersticial en corteza temporal, 0 horas después de la lesión HI. Tinción H-E. Objetivo 40x.

#### 4.3.- Leucomalacia Periventricular o Infarto Periventricular

El término leucomalacia periventricular (LPV) fue introducido por Banker y Larroche en 1962 para definir una entidad patológica que implicaba lesiones características de la sustancia blanca vistas en niños de aproximadamente un mes que habían sufrido un periodo de apnea o parada cardíaca requiriendo maniobras de resucitación. Desde el punto de vista clínico, las anomalías neurológicas asociadas con estos episodios asfícticos fueron reconocidas como causantes de retraso mental y de espasticidad simétrica de las extremidades. Entre los factores que predisponen a la LPV se postularon la disfunción/enfermedad cardiopulmonar, las anomalías placentarias y la existencia de un episodio anóxico severo inmediatamente antes o durante el parto.

La leucomalacia periventricular (LPV) es la forma predominante de lesión en la sustancia blanca de niños pretérminos (23-32 semanas de edad gestacional) y recién nacidos. Aunque el término de LPV se utiliza ampliamente y sugiere una lesión difusa de la sustancia blanca realmente se podría considerar como un conjunto de infartos periventriculares. Las lesiones se caracterizan por áreas multifocales de necrosis situadas en la profundidad de la sustancia blanca adyacente a los ventrículos laterales, anterior y lateral a las astas frontales, alrededor del foramen de Monro y a nivel del triángulo (Cruz, 2000). La LPV representa la mayor causa de discapacidades neurológicas a largo plazo que se ven en niños y está particularmente asociada con el subsecuente desarrollo de parálisis cerebral infantil (Volpe, 1992; Fujimoto y cols., 1994; Wilkinson y cols., 1996).

La topografía de las lesiones de la sustancia blanca se correlaciona con la edad del gestacional en el momento del nacimiento (Deguchi et al, 1999; Volpe, 2001; du Plessis y Volpe, 2002), habiéndose catalogado como focal, amplia o difusa (Iida, 1992; Deguchi et al, 1999). Las áreas afectadas son a menudo simétricas y en casos severos puede implicar la existencia de hemorragias (Okoshi y cols., 2001). En raras ocasiones también son detectados focos necróticos en el cuerpo calloso, cápsula interna y en el tálamo (probablemente como resultado de un fenómeno secundario) (Coley y Hogan, 1997; Yokochi, 1997). La necrosis extensa aparece típicamente en los niños de menor edad gestacional, mientras que la necrosis focal se ve en niños de mayor edad (Deguchi y cols., 1997).

Desde el punto de vista histológico, la lesión evoluciona dependiendo de la severidad y duración del evento hipóxico-isquémico, pudiendo ser ya observable como áreas pálidas en las primeras horas después de un episodio de apnea. También se aprecia hinchamiento axonal, sobre todo en la periferia de la zona necrótica, acompañada de infiltración microglial, hiperplasia endotelial, astrocitosis reactiva de carácter hipertrófico y mineralización del neuropilo. La microglia está activada con presencia de macrófagos cargados de lípidos. Finalmente se forman cavidades o quistes (Kinney y Armstrong, 1997; Deguchi y cols., 1997; Dambaska y cols., 1989; Deguchi y cols., 1999; Hirayama y cols., 2001). A los 5-7 días la porción central de la lesión va siendo infiltrada progresivamente por macrófagos espumosos cargados de lípidos cuyo número

en las dos primeras semanas se hace máximo. Posteriormente la lesión se cavita y sus paredes muestra un refuerzo glial.

En estadios crónicos la sustancia blanca puede mostrar múltiples cavidades (extendiéndose a la sustancia blanca central y subcortical) mientras la corteza cerebral y las estructuras de sustancia gris profunda están relativamente bien preservadas. En la sustancia gris hay una pérdida neuronal difusa, siendo evidente sobre todo en las capas corticales inferiores, hipocampo, subículo, núcleo dentado y en la capa de células de Purkinje del cerebelo. Los axones aparecen hinchados y calcificados (probablemente debido la sobreactivación glutamatérgica), pudiendo advertirse depósitos de hierro y signos degenerativos en la periferia de la zona afectada, quedando esta delimitada por los astrocitos reactivos (Rezaie y Dean, 2002).

No es raro que las áreas de infarto periventricular se compliquen con la aparición de hemorragias (Armstrong y Norman, 1974). Esta hemorragia puede ser masiva, sobrepasando el área de leucomalacia y coincidiendo frecuentemente con una hemorragia intraventricular severa.

#### 4.4.- Lesiones de la Sustancia Gris

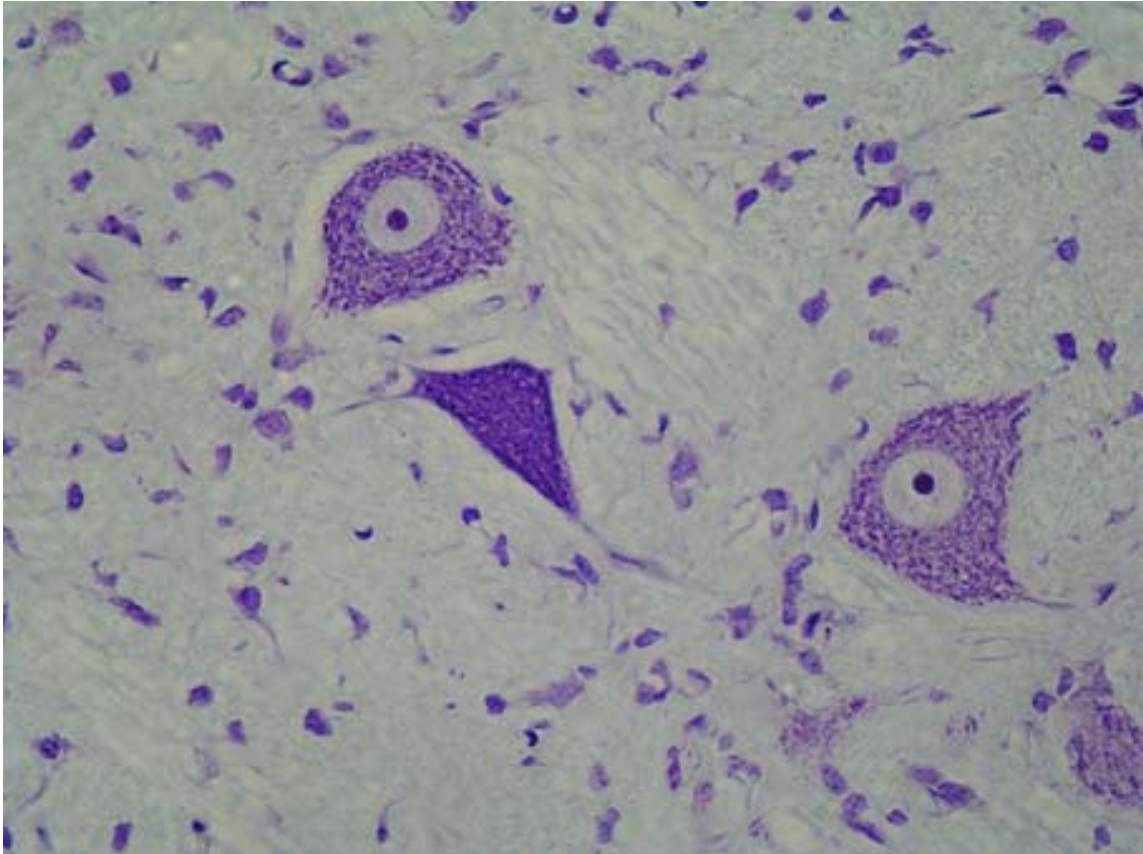
Al igual que en SNC maduro, en el inmaduro se pueden observar infartos en los territorios de las diferentes arterias cerebrales, necrosis cortical en los territorios limítrofes y necrosis cortical laminar, con la única diferencia que la licuefacción suele tener lugar más precozmente que en el SNC maduro (Friede, 1989; Rorke, 1992a; Rorke, 1992b; Volpe, 2001). Así, a diferencia de la mayoría de las lesiones hemorrágicas y de la sustancia blanca que son casi exclusivas del sistema nervioso inmaduro, las lesiones de la sustancia gris son más parecidas a las del niño mayor o incluso a las del adulto (du Plessis y Volpe, 2002).

Los factores vasculares son determinantes en la vulnerabilidad de la sustancia gris del cerebro en desarrollo a la hipoxia-isquemia. Esta es la razón por la cual el daño neuronal es mayor en áreas vasculares frontera entre las arterias cerebrales principales o en el territorio de la cerebral posterior, como consecuencia, probablemente en las situaciones de hinchamiento cerebral. A menudo, la afectación del cerebro es mucho más intensa que la del cerebelo, lo que determina una desproporción entre el tamaño relativo de ambos (Rorke, 1992a; Rorke, 1992b).

Sin embargo, existen otros factores metabólicos locales que desempeñan un papel determinante. El conocimiento de los elementos más importantes en la muerte celular por hipoxia, a través de estudios experimentales, permite pensar que existen diferencias regionales en la capacidad glicolítica en condiciones anaeróbicas, en las necesidades energéticas, en el acúmulo de lactato, en la formación de radicales libres y en el acúmulo de aminoácidos excitotóxicos. Pero la vulnerabilidad neuronal no se explica sólo por esto, sino que depende también, en gran medida, del grado de maduración neuronal.



Todo ello hace que la encefalopatía HI en el recién nacido muestre unas localizaciones preferentes de lesión neuronal, lo que lleva a algunos autores a barajar el concepto de "necrosis neuronal selectiva", y que por orden de frecuencia se localizan en el cortex cerebral (especialmente el hipocampo); diencefalo (sobre todo el tálamo), ganglios basales, mesencéfalo, protuberancia, bulbo cerebral y cerebelo (neuronas de Purkinje) (Figura 3). Aunque la distribución de las lesiones en la sustancia gris resulta imprevisible y con un considerable grado de solapamiento, algunos patrones resultan bastante característicos.



**Figura 3.** Neuronas retraídas con agrupamiento de los gránulos del Nissl en los núcleos basales tras la lesión HI. Tinción de Nissl. Objetivo 40x.

## 5.- ENSAYOS TERAPÉUTICOS

La gravedad y la trascendencia del daño asfíctico dependen de la profundidad de ésta, de su duración y de la vulnerabilidad isquémica selectiva. Esta última determina que algunas células mueran y otras permanezcan en estado de penumbra isquémica. Muchas de estas neuronas mueren, a pesar de restablecerse el flujo sanguíneo cerebral. Este fenómeno se denomina muerte celular retrasada, y su expresión celular es la necrosis selectiva y la apoptosis (Edwards y cols., 1997; Yue y cols., 1997; Esteve y cols., 1999; Taylor y cols., 1999; Ohyu y cols., 2000).

Son estas neuronas las que parecen más susceptibles de ser rescatadas, llevando a una búsqueda de intervenciones terapéuticas que impidan el comienzo o interrumpan la progresión de las cascadas destructivas (Dammann y Leviton, 1999; Dammann y Leviton, 2000). Diversos tipos de estrategias están siendo evaluadas por diferentes grupos de investigación, pero son las aplicadas después de haberse producido la agresión hipóxico-isquémica o tras la reanimación, las que presentan mayor relevancia desde el punto de vista de la práctica clínica (Gunn y cols., 1997; Gunn y cols., 1999). Existe una ventana terapéutica definida como el periodo de tiempo durante el cual el inicio de un tratamiento puede disminuir la lesión cerebral, pero una vez pasado sus límites, el daño es irreversible. En los recién nacidos a término se piensa que cuanto antes se inicie la reperfusión cerebral y los tratamientos de rescate, mayor será la repercusión histológica y clínica (Vannucci y Perlman, 1997; Tan y Parks, 1999). Aunque son los casos más difíciles de pronosticar e identificar precozmente, los niños a término con daño cerebral leve o moderado obtendrían los mayores beneficios terapéuticos dirigidos a prevenir el daño cerebral.

A lo largo del tiempo se han ido proponiendo diversos tipos de terapias, todas ellas dispares, pero con la misma finalidad, bloquear o prevenir las cascadas de muerte celular. Entre ellas la hipotermia es una terapia de rescate neuronal (Nedelcu y cols., 2000), con un uso clínico restringido ya que hay muchas cuestiones sobre este tipo de terapia que deben ser resueltas antes de su utilización como tratamiento. La hipotermia, al parecer, muestra efectos específicos sobre la inhibición de la muerte celular apoptótica y la fragmentación del DNA después de la hipoxia-isquemia (Esteve y cols., 1999; Adachi y cols., 2001), además se supone que participaría en la reducción de la concentración de glutamato en el espacio sináptico, el retraso en la acumulación de  $Ca^{++}$  intracelular y la disminución en la producción de NO (Hashimoto y cols., 2003; Zhu y cols., 2004; Zhu y cols., 2005).

Otras terapias, como la utilización de agentes anti-oxidantes tendrían la finalidad de salvaguardar la función celular y su supervivencia regulando el estado de oxidación-reducción. Las moléculas antioxidantes parecen proteger a las células de los eventos oxidativos y de la resultante inducción de muerte celular. Los antioxidantes como el alopurinol (Palmer y cols., 1993; van Bel y cols., 1998) retienen radicales libres e inhiben la xantina oxidasa. La N-Acetil-L-Cisteína (Olivieri y cols., 2001; Schulz y cols., 2000) al incrementar los niveles de glutatión actúan indirectamente como agente antioxidante (Ferrari y cols., 1995; Yan y cols., 1995).

Otra posible terapia podría ser la administración de magnesio. Al ser el magnesio un elemento esencial en el mantenimiento de muchos procesos celulares como la preservación de la integridad de la membrana celular, síntesis de proteínas, metabolismo energético, mantenimiento de los gradientes de iones, la regulación del transporte de calcio y la reducción de la acumulación de calcio, cambios en los niveles celulares antes, después y durante el daño cerebral pueden tener un profundo efecto en el desarrollo neurológico. De hecho, tras la isquemia y trauma cerebral, en los que hay cambios evidentes en las concentraciones de magnesio libre intracelular y extracelular, estudios clínicos y experimentales han observado un empeoramiento en el desarrollo



neuroológico. El magnesio, además, presenta actividad anti-oxidante bloqueando los canales iónicos de NMDA.

Por lo tanto tras un evento traumático en el cerebro como es la hipoxia-isquemia, la restauración de la homeostasis del magnesio, además de una actividad anti-excitotóxica, hace que la administración de este catión sea una buena terapia neuroprotectora (Van den Bergh y cols., 2002; Gee y cols., 1999).

También se han postulado como posibles agentes terapéuticos inhibidores de Óxido Nítrico Sintetasa (NOS), ya que el NO a altas concentraciones actúa como un potente agente neurotóxico y está involucrado en las cascadas metabólicas que conducen al daño cerebral HI. En esta misma línea, se han probado otras terapias neuroprotectoras que inhiben la producción de NO como la NG-nitro-L-arginina, que ha demostrado reducir las regiones cerebrales infartadas así como prevenir el daño a nivel del hipocampo (Hamada y cols., 1994).

Estas posibles estrategias terapéuticas sólo son un ejemplo de las posibilidades que tenemos actualmente para reducir o evitar el daño cerebral en prematuro, las posibilidades son tan extensas como formas hay de evitar las diferentes vías de muerte celular que se producen en el evento hipóxico-isquémico.

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

- Adachi M, Sohma O, Tsuneishi S, Takada S, Nakamura H. Combination effect of systemic hypothermia and caspase inhibitor administration against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Pediatric Res* 2001; 50: 590-595.
- Almeida A, Bolaños JP. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* 2001; 77: 676-690.
- Ames A 3d, Li YY, Heher EC, Kimble CR. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na<sup>+</sup> transport. *J Neurosci* 1992; 12: 840-853.
- Armstrong D, Norman MG. Periventricular leukomalacia in neonates: complications and sequelae. *Arch Dis Child* 1974; 49: 367-375.
- Auer RN. Excitotoxic mechanisms, and age-related susceptibility to brain damage in ischemia, hypoglycemia and toxic mussel poisoning. *Neurotoxicology* 1991; 12: 541-546.
- Banker BQ, Larroche JC. Periventricular leukomalacia of infancy. A form of neonatal anoxic encephalopathy. *Arch Neurol* 1962; 7: 386-410.
- Behrman RE, Kliegman RM y Arvin AM. Nelson, Tratado de Pediatría. 15ª edición. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid. 1997.
- Brillault J, Berezowski V, Cecchelli R, Dehouck MP. Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem* 2002; 83: 807-817.
- Burke CJ, Tannenberg AE. Prenatal brain damage and placental infarction. An autopsy study. *Developmental Medicine and Child Neurology* 1995; 37: 555-562.
- Cassarino DS, Bennen JP Jr. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 29: 1-25.
- Chakraborti T, Das S, Monda1 M, Roychoudhury S, Chakraborti S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* 1999; 11: 77-85.
- Cruz FF. Neuropatología. Diagnóstico y tratamiento. Edimsa. Madrid. 2000.
- Dambaska M, Laure-Kamionowska M, Schmidt-Sidor B. Early and late neuropathological changes in perinatal white matter damage. *J Child Neurol* 1989; 4: 291-298.
- Dammann O, Leviton A. Brain damage in preterm newborns: biological response modification as a strategy to reduce disabilities. *J Pediatr* 2000; 136: 433-436.
- Dammann O, Leviton A. Brain damage in preterm newborns: might enhancement of developmentally regulated endogenous protection open a door for prevention?. *Pediatrics* 1999; 104: 541-550.
- Davis M, Whitely T, Tumbull DM, Mendelow AD. Selective impairments of mitochondrial respiratory chain activity during aging and ischemic brain damage. *Acta Neurochir* 1997; 70: 56-58.
- Deguchi K, Oguchi K, Matsuura N, Armstrong DD, Takashima S. Periventricular leukomalacia: relation to gestational age and axonal injury. *Pediatr Neurol* 1999; 20: 370-374.

- Deguchi K, Oguchi K, Takashima S. Characteristic neuropathology of leukomalacia in extremely low birth weight infants. *Pediatr Neurol* 1997; 16: 296-300.
- Dooling EC, Gilles FH. Intracranial hemorrhage: Topography. In: Gilles FH, Leviton A, Dooling EC. *The Developing Human Brain: Growth and Epidemiologic Neuropathology*. Boston: John Wright PSG. 1983.
- du-Plessis AJ, Volpe JJ. Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 151-157.
- Edwards AD, Azzopardi DV. Perinatal hypoxia-ischemia and brain injury. *Pediatric Res* 2000; 47: 431-432.
- Edwards AD, Yue X, Cox P, Hope PL, Azzopardi DV, Squier MV, Mehmet H. Apoptosis in the brains of infants suffering intrauterine cerebral injury. *Pediatr Res* 1997; 42: 684-689.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*. 1997; 57: 1835-1840.
- Esteve JM, Mompou J, Garcia de la Asuncion J, Satre J, Asensi M, Boix J, Viña JR, Pallardo FV. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 1999; 13: 1055-1064.
- Farooqui AA, Horrocks LA. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 1991; 16: 171-191.
- Ferrari G, Yan CYI, Greene LA. Acetylcysteine (D- and L- stereoisomers) prevent apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci* 1995; 15: 2857-2866.
- Fischer S, Wobben M, Marti HH, Renz D, Schaper W. Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc Res* 2002; 63: 70-80.
- Floyd RA, Camey JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; 32: S22-S27.
- Friede RL, Porencephaly, Hydranencephaly, Multicystic Encephalopathy. In: Friede RL. *Developmental Neuropathology*. Berlin:Springer-Verlag. 1989.
- Fujimoto S, Yamaguchi N, Togari H, Wada Y, Yokochi K. Cerebral palsy of cystic periventricular leukomalacia in low-birth-weight infants. *Acta Paediatr* 1994; 83: 397-401.
- Fukuda H, Tomimatsu T, Kanagawa T, Mu J, Kohzuki M, Shimoya K, Hosono T, Kanzaki T, Murata Y. Postischemic hyperthermia induced caspase-3 activation in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia and exacerbated the brain damage. *Biol Neonate* 2003; 84: 164-171.
- Gee II JB, Corbett RJT, Perlman JM, García D, Laptook AR. Age-dependent differences in the relationship between plasma and brain extracellular fluid concentrations of magnesium after MgSO<sub>4</sub> infusions in miniswine. *Pediatric Res* 1999; 46: 281-286.
- Gunn AJ, Bennet L, Gunning MI, Gluckman PD, Gunn TR. Cerebral hypothermia is not neuroprotective when started after postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatric Res* 1999; 46: 274-280.
- Gunn AJ, Gunn T, de Haan H, Williams C, Gluckman P. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal sheep. *J Clin Invest* 1997; 99: 248-256.
- Hamada Y, Hayakawa T, Hattori H, Mikawa H. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatric Res* 1994; 35: 10-14.

Hambleton G, Wigglesworth JS. Origin of intraventricular hemorrhage in the preterm infant. *Arch Dis Child* 1976; 51: 651-659.

Hashimoto T, Yonetani M, Nakamura H. Selective brain hypothermia protects against hypoxic-ischemic injury in newborn rats by reducing hydroxyl radical production. *Kobe J Med Sci* 2003; 49: 83-91.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445-600.

Herce-Pagliai C, Kotecha S, Shuker DE. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. *Nitric Oxide* 1998; 2: 324-36.

Hilario E, Alvarez A, Alvarez F.J, Gastiasoro E, Valls-i-Soler A. Cellular Mechanisms in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Current Pediatric Rev* 2006; 2: 131-141.

Hirayama A, Okoshi Y, Hachiya Y, Ozawa Y, Ito M, Kida Y, Imai Y, Kohsaka S, Takashima S. Early immunohistochemical detection of axonal damage and glial activation in extremely immature brains with periventricular leukomalacia. *Clin Neuropathol* 2001; 20: 87-91.

Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16: 241-248.

Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjö BK. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1294-1300.

Inder TE, Volpe JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2000; 5: 2-16.

Jacotot E, Costantini P, Laboureaux E, Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann NY Acad Sci* 1999; 887: 18-30.

Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*. 2001; 49: 735-741.

Kaku DA, Goldberg MP, Choi DW. Antagonism of non-NMDA receptors augments the neuroprotective effects of NMDA receptor blockade in cortical cultures subjected to prolonged deprivation of oxygen and glucose. *Brain Res* 1991; 554: 344-347.

Kinney HC, Armstrong DD. Perinatal neuropathology. In: Graham DI, Lantos PL (eds) *Greenfields Neuropathology*, 6th ed. London: Arnold. vol.1, pp. 537-600. 1997.

Knight JA. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27: 11-25.

Larroche JC, Encha-Razavi F, De Vries L. Central Nervous System. En *Potter's Pathology of the Fetus and Infant*, Gilbert-Barnes E. (Ed) vol. 2, pp 1028-1150, Mosby-Year Book, Inc. St. Louis Missouri, 1997.

Lin AM, Dung SW, Chen CF, Chen WH, Ho LT. Hypoxic preconditioning prevents cortical infarction by transient focal ischemia-reperfusion. *Ann NY Acad Sci* 2003; 993: 168-178.

Lynch DR, Guttman RP. Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 300: 717-723.

MacGregor DG, Avshalumov MV, Rice ME. Brain edema induced by in vitro ischemia: causal factors and neuroprotection. *J Neurochem* 2003; 85: 1402-1411.

Marks DB, Marks AD, Smith Cm. Basic medical biochemistry. A clinical approach. Williams & Wilkins. Baltimore, USA, 1996.

Mc Gee R, Williams S, Feehan M. Attention deficit disorder and age onset of problem behaviours. *J Abnorm Child Psychol* 1992; 20: 487-502.

McGeer EG. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease: idle thoughts on an exciting subject. *Neurobiol Aging* 1989; 10: 614-616.

Mills LR. The sodium-calcium exchanger and glutamate-induced calcium loads in aged hippocampal neurons in vitro. *Ann NY Acad Sci* 1996; 15: 379-390.

Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Nitric oxide-mediated  $Ca^{++}$ -influx in neuronal nuclei and cortical synaptosomes of normoxic and hypoxic newborn piglets. *Neurosci Lett* 2002; 318: 93-97.

Nedelcu J, Klein MA, Aguzzi A, Martin E. Resuscitative hypothermia protects the neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathol* 2000; 10: 61-71.

Ohyu J, Endo A, Itoh M, Takashima S. Hypocapnia under hypotension induces apoptotic neuronal cell death in the hippocampus of newborn rabbits. *Pediatric Res* 2000; 48: 24-29

Olivieri G, Baysang G, Meier F, Müller-Spahn F, Stähelin HB, Brockhaus M, Brack CH. N-Acetyl-L-cysteine protects SHSY5Y neuroblastoma cells from oxidative stress and cell cytotoxicity: effects on  $\beta$ -amyloid secretion and tau phosphorylation. *J Neurochem* 2001; 76: 224-233.

Olney JW. New mechanisms of excitatory transmitter neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 1994; 43: 47-51.

Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing damage with HI reduces brain injury in 7 days-old rats. *Pediatr Res* 1993; 33: 405-411.

Pape KE, Wigglesworth JS. Haemorrhage, ischaemia and the perinatal brain. Philadelphia, JB Lippincott. 1979.

Paschen W, Doutheil J. Disturbance of endoplasmic reticulum functions: a key mechanism underlying cell damage? *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1999; 73: 1-5

Peinado MA, del Moral ML, Esteban FJ, Martínez-Lara E, Siles E, Jiménez A, Hernández-Cobo R, Blanco S, Rodrigo J, Pedrosa JA. Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol* 2000; 31: 1054-1065.

Pérez Velázquez JL, Frantseva MV, Carien PL. In vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 1997; 17: 9085-9094.

Puka-Sundvall M, Wallin C, Gilland E, Hallin U, Wang X, Sandberg M, Karlsson JO, Blomgren K, Hagberg H. Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Dev Brain Res* 2000; 125: 43-50.

Rezaie P, Dean A. Periventricular leukomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing nervous system. *Neuropathology* 2002; 22: 106-132

Rorke LB. Perinatal brain damage. *Greenfield's Neuropathology*, 5.<sup>a</sup> ed, Adams J.H. y Duchen L.W. (Eds), pp. 639-709, Edward Arnold: London, 1992a.

Rorke LB. Anatomical features of the developing brain implicated in pathogenesis of hypoxic-ischemic injury. *Brain Pathol* 1992b; 2: 211-221.

- Rustin P, von Kleist-Retzow J, Vajo Z, Rotig A, Munnich A. For debate; defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or mitochondria? *Mech Aging Dev* 2000; 114: 201-206.
- Sapolsky RM. Stress, the aging brain, and the mechanisms of neurons death. A Bradford Book. 1 ed. Massachusetts, London: The MIT Press Cambridge, pp: 117-268. 1992.
- Sarkela TM, Berthiaume J, Elfering S, Gybina AA, Giulivi C. The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J Biol Chem*. 2001; 276: 6945-6949.
- Shank RP, Campbell GL. Ornithine as a precursor of glutamate and GABA: uptake and metabolism by neuronal and glial enriched cellular material. *J Neurosci Res* 1983; 9: 47-57.
- Siesjö BK, Hu B, Kristian T. Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 19-26.
- Soehle M, Jaeger M, Meixensberger J. Online assessment of brain tissue oxygen autoregulation in traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* 2003; 25: 411-417.
- Storm-Mathisen J, Iversen LL. Uptake of (3H)Glutamic acid in excitatory nerve endings: light and electronmicroscopic observations in the hippocampal formation of the rat. *Neuroscience* 1979; 4: 1237-1253.
- Strolin Benedetti M, Dostert P, Marrari P, Cini M. Effect of ageing on tissue levels of amino acids involved in the nitric oxide pathway in rat brain. *J Neural Transm Gen Sect* 1993; 94: 21-30.
- Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 2004; 1: 17-25
- Sugrue MM, Wang Y, Rideout HJ, Chalmers-Redman RM, Tanon WG. Reduced mitochondrial membranes potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p-53-induced senescence. *Biochem Biophys Commun* 1999; 261: 123-130.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4904-4911.
- Suzuki M, Tabuchi M, Ikeda M, Tomita T. Concurrent formation of peroxynitrite with the expression of inducible nitric oxide synthase in the brain during middle cerebral artery occlusion and reperfusion in rats. *Brain Res* 2002; 951: 113-120.
- Takai H, Katayama K, Yasoshima A, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. NMDA-induced apoptosis in the developing rat brain. *Exp Toxicol Pathol*. 2003; 55: 33-37.
- Tan S, Parks D. Preserving brain function during neonatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1999; 26: 733-747.
- Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 1999; 9: 93-117.
- Thomas RJ. Excitatory amino acids in health and disease. *J Am Geriatr Soc* 1995; 43: 1279-1289.
- Van Bel F, Shadid M, Moison RM, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, Van De Bor M, Berger HM. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics* 1998; 101: 185-193.

- Van den Bergh WM, Zuur JK, Kamerling NA, van-Asseldonk JT, Rinkel GJ, Tulleken CA, Nicolay K. Role of magnesium in the reduction of ischemic depolarization and lesion volume after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 2002; 97: 416-422.
- Vannucci RC, Perlman JM. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1977; 100: 1004-1014.
- Volpe JJ. Brain development: normal and abnormal. *J Perinat Med* 1991; 19: 29-34.
- Volpe JJ. Brain injury in the premature infant -current concepts of pathogenesis and prevention. *Biol Neonate* 1992; 62: 231-242.
- Volpe JJ. Brain injury in the premature infant -from pathogenesis to prevention. *Brain Dev* 1997; 19: 519-534.
- Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: Clinical aspects. In: Volpe JJ (ed) *Neurology of the Newborn*. WB Saunders Co, Philadelphia, pp: 314-369. 1995.
- Volpe JJ. *Neurology of the Newborn*, 4.<sup>a</sup> ed W.B. Saunders, Philadelphia, 2001a.
- Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001b; 50: 553-562.
- Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854: 155-170.
- Wilkinson I, Bear J, Smith J, Gill A, Challinor C, Jones W, Shahidullah M, Wooderson S. Neurological outcome of severe cystic periventricular leukomalacia. *J Paediatr Child Health* 1996; 32: 445-449.
- Yakovlev AG, Faden AI. mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx* 2004; 1: 5-16.
- Yan CYI, Ferrari G, Greene LA. N-Acetylcysteine promoted survival of PC12 cells is glutathione independent but transcription dependent. *J Biol Chem* 1995; 270: 26827-26832.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiology* 1994; 74: 139-161.
- Yue X, Mehmet H, Penrice J, Cooper C, Cady EB, Wyatt JS, Reynolds E.R, Edwards AD, Squier M. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient HI. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997; 23: 16-25.
- Zhu C, Wang X, Cheng X, Qui L, Xu F, Simbruner G, Blomgren K. Post-ischemic hypothermia-induced tissue protection and diminished apoptosis after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res* 2004; 996: 67-75.
- Zhu HD, Meloni BP, Bojarski C, Knuckey MW, Knuckey NW. Post-ischemic modest hypothermia combined with intravenous magnesium is more effective at reducing CA1 death than either treatment used alone following global cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 2005; 193: 361-368.

## CAPÍTULO 18:

### RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL

Daniel Alonso Alconada, Enrique Hilario, Antonia Alvarez.

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN.....	383
2.- LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL.....	384
2.1.- Incidencia.....	384
2.2.- Bases celulares de la lesión hipóxico-isquémica cerebral .....	384
3.- MEDIADORES INFLAMATORIOS.....	385
3.1.- Citoquinas .....	385
3.2.- Quimiocinas .....	387
3.3.- Metabolitos del Ácido Araquidónico .....	387
3.4.- Óxido Nítrico .....	388
3.5.- Especies Reactivas del Oxígeno.....	388
3.6.- Metaloproteinasas de la matriz.....	389
4.- MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y RECONOCIMIENTO CELULAR.....	390
4.1.- Selectinas .....	390
4.1.1.- Rodamiento y adhesión laxa .....	390
4.1.2.- Activación de los leucocitos .....	391
4.2.- Superfamilia de las Inmunoglobulinas .....	392
4.2.1.- Adhesión firme.....	392
4.3.- Integrinas .....	393
4.3.1.- Transmigración endotelial y quimiotaxis .....	394
5.- BIBLIOGRAFÍA.....	395



## 1.- INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los casos de pacientes con daño cerebral asfíctico, sólo una pequeña área del tejido cerebral afectado, llamado el núcleo isquémico, está dañado irreversiblemente desde la fase inicial del infarto. Sin embargo, existe un volumen mucho mayor de tejido cerebral que rodea al núcleo isquémico, conocido como zona de penumbra, que posee la capacidad de recuperar muchas de sus funciones, bajo condiciones favorables. Así pues, el resultado final del infarto no vendrá determinado únicamente por el volumen del núcleo isquémico, sino también por el grado de daño cerebral (microcirculación deteriorada, edema cerebral e inflamación) generado en la zona de penumbra (Olsen y cols., 1985).

Tras la isquemia cerebral se produce una gran respuesta inflamatoria caracterizada por la infiltración de leucocitos al interior del parénquima cerebral y por la activación de la microglía (Morioka y cols, 1993; Hallenbeck, 1996; Becker, 1998; Davies y cols, 1998; Zheng y Yenari, 2004). La interrupción del flujo sanguíneo cerebral origina el agotamiento energético y la muerte neuronal por necrosis, lo cual puede provocar respuestas inmunes que en última instancia generarán la activación de células inflamatorias y la infiltración. Este daño cerebral secundario generalmente se desarrolla tras un retraso de horas o días, y ha sido observado tras la isquemia, trauma o hemorragia subaracnoidea. La reperfusión, ya sea mediante la compensación a través de la circulación colateral o mediante la recanalización terapéutica o espontánea, provoca la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) tanto por reperfusión con sangre oxigenada como por su producción dentro del cerebro. Las ROS pueden estimular las células isquémicas para que secreten citoquinas inflamatorias y quimiocinas que causarán, entre otras muchas cosas, la sobreexpresión de las moléculas de adhesión en la red vascular cerebral y el reclutamiento de leucocitos periféricos. Una vez activadas, las células inflamatorias pueden secretar una gran variedad de agentes citotóxicos, incluyendo más citoquinas, metaloproteinasas de la matriz (MMPs), óxido nítrico (NO) y más ROS. Estas sustancias generarán un mayor daño celular, así como el desmantelamiento de la barrera hematoencefálica (BBB) y de la matriz extracelular (Danton y Dietrich, 2003; Emsley y Tyrell, 2002). El daño producido en la BBB potenciará el daño en el tejido cerebral y contribuirá al daño secundario permitiendo a elementos solubles y sangre penetrar en el cerebro (Rosenberg, 1999). El daño secundario se desarrolla como consecuencia del edema cerebral y del déficit vasomotor y hemodinámico desembocando en hipoperfusión e inflamación post-isquémica, lo cual generará la activación de la microglía y la infiltración al tejido cerebral de células inflamatorias periféricas (Dirnagl y cols., 1999). Esta migración de los leucocitos periféricos circulantes al interior del cerebro puede producir la amplificación de las cascadas inflamatorias, lo que acentuará aún más el daño. Numerosos estudios recientes en el campo de los accidentes cerebrovasculares y de la isquemia cerebral han demostrado la importancia que posee la respuesta inflamatoria junto al daño cerebral por necrosis (Wang y cols., 2007), señalándola como un importante mecanismo patofisiológico (Stanimirovic y Satoh, 2000).

## 2.- LESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA CEREBRAL

### 2.1.- Incidencia

El daño cerebral hipóxico-isquémico que tiene lugar durante el periodo perinatal es la causa más frecuente de muerte en los neonatos y una de las más importantes de déficit neurológico severo a largo plazo en niños (Volpe, 2001; Perlman, 2004). El incremento en la supervivencia de los neonatos de bajo peso así como de los niños asfixiados en las últimas décadas, ha sido el detonante para generar un gran interés y desarrollo del conocimiento de la neurología neonatal. Gracias al gran avance en los cuidados del prematuro, cerca del 90% de esos bebés sobrevive al periodo neonatal, presentando parálisis cerebral un 10% de los mismos. Además, entre un 25 y un 50% presenta otras discapacidades menores del neurodesarrollo que afectan a alteraciones motoras y a áreas de conocimiento y de la conducta (Edwards y Azzopardi, 2000; Volpe, 2001).

Practicamente el 80% del crecimiento del sistema nervioso central en humanos se produce durante los dos últimos trimestres de la gestación y los primeros meses de vida, periodo durante el cual es muy susceptible a un menor aporte sanguíneo (du-Plessis y Volpe, 2002; Soehle y cols., 2003). Además, en el cerebro inmaduro existen una serie de factores específicos que lo hacen más vulnerable (Inder y Volpe, 2000), entre los que se encuentran una mayor susceptibilidad a la excitotoxicidad y a los radicales libres, una mayor tendencia a la muerte celular por apoptosis y una mayor vulnerabilidad de los oligodendrocitos en desarrollo.

Durante el proceso de resucitación siguiente se restablecen la oxigenación cerebral y la perfusión. La reperfusión tras un episodio isquémico contribuirá al daño con la aparición de leucocitos, que son fuente de radicales libres tóxicos y de citoquinas causantes de reacciones inflamatorias, y en ocasiones de una muerte neuronal retrasada y por tanto de un incremento del daño cerebral (Feuerstein y cols., 1994; Fellman y Raivio, 1997; Benjelloun y cols., 1999).

### 2.2.- Bases celulares de la lesión hipóxico-isquémica cerebral

El deterioro del flujo sanguíneo cerebral es el mecanismo patogénico principal que subyace en la mayoría de las neuropatologías que se producen como consecuencia de la hipoxia-isquemia durante el parto. Esto es más probable que ocurra por la interrupción del flujo sanguíneo placentario y del intercambio gaseoso, a menudo conocido como "asfixia" o acidemia fetal severa. Esto último es definido como un pH arterial umbilical fetal  $\leq 7.00$  (Perlman, 1997). A nivel celular, la disminución del flujo sanguíneo cerebral y del aporte de oxígeno inicia una cascada de eventos bioquímicos lesivos. La falta de oxígeno impide la fosforilación oxidativa y tiene como resultado un cambio hacia un metabolismo anaeróbico. Este es un estado energético ineficiente dando lugar a un rápido agotamiento de las reservas de fosfato de alta energía incluyendo el ATP,

acumulación de ácido láctico e incapacidad en el mantenimiento de las funciones celulares (Wyatt y cols., 1989; Hilario y cols., 2006). El fallo en el bombeo iónico transcelular tiene como resultado una acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y agua (edema citotóxico). La despolarización de la membrana resulta en la liberación de neurotransmisores excitatorios y específicamente de glutamato desde los terminales axónicos. El glutamato activa específicamente receptores de superficie celular dando lugar a un influjo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas postsinápticas.

En el citoplasma, hay una acumulación de ácidos grasos libres derivados del aumento en la conversión de los fosfolípidos de membrana. Los ácidos grasos sufren entonces una peroxidación por los radicales libres de oxígeno que surgen del proceso de reducción en el interior de la mitocondria y por los productos en la síntesis de prostaglandinas, xantina y ácido úrico. Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  se acumulan en el citoplasma como consecuencia del aumento de la entrada de Calcio en la célula junto con una menor salida, así como de un aumento en el flujo hacia el citosol desde la mitocondria y el retículo endoplasmático (Hilario y cols., 2006). En algunas neuronas, el calcio intracelular induce la producción de óxido nítrico, un radical libre que difunde a las células adyacentes para las que resulta tóxico.

Los efectos combinados del fallo energético celular, acidosis, liberación de glutamato, cúmulo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , peroxidación lipídica y neurotoxicidad del óxido nítrico destruyen los componentes celulares esenciales con su consiguiente muerte (Volpe, 2001; Grow, 2002). Muchos factores, incluyendo la duración o severidad de la agresión tendrán influencia sobre el progreso del daño celular que sigue a la hipoxia-isquemia.

### 3.- MEDIADORES INFLAMATORIOS

Las células endoteliales cerebrales son una importante fuente de mediadores vasoactivos, permeabilizantes y proinflamatorios que actúan como reguladores locales de la microcirculación, la activación de células plasmáticas y reología sanguínea tanto en condiciones fisiológicas como de estrés. Estos mediadores regulan el entorno local a través de las vías paracrina y autocrina y se cree que juegan un papel importante en la evolución del estatus microcirculatorio y en el daño de la barrera hematoencefálica tras la hipoxia-isquemia (Stanimirovic y Satoh, 2000).

#### 3.1.- Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para comunicación intercelular, producidas por varios tipos celulares, principalmente por las del Sistema Inmunitario. Actúan como mediadores solubles controlando muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos (Arai y cols.,

1990). Las citoquinas ejercen también efectos protrombóticos ya que inhiben el efecto anticoagulante del endotelio y activan las plaquetas. Por lo tanto, el tejido cerebral sometido a isquemia puede permanecer en una situación de “no reflujo”, aunque la restauración del flujo a través de la arteria previamente ocluida sea precoz (Kochanek y Hallenbeck, 1992).

La respuesta inflamatoria que se desencadena tras la isquemia del tejido cerebral está mediada y modulada por la acción de las citoquinas. El aumento del calcio intracelular y la liberación tanto de ácidos grasos libres como de leucotrienos parecen ser los responsables de la inducción de la expresión de las estas proteínas en las neuronas, y en las células gliales (Kim, 1996). Las principales citoquinas que intervienen en la inflamación inducida por la isquemia cerebral son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-8 (IL-8), la interleucina-10 (IL-10) y el TGF- $\beta$  (Hagberg y cols., 1996; Han y Yenari, 2003).

**IL-1.** La familia IL-1 engloba a las IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dos receptores IL-1 y un receptor IL-1 antagonista (IL-1Ra). La IL-1 $\beta$  es una proteína de 17,5kDa originada a partir de su precursor inactivo mediante la acción de la enzima convertidora de la interleucina 1 beta (ICE). La IL-1 $\beta$  y la ICE se encuentran sobreexpresadas durante la isquemia cerebral, según se ha podido demostrar en ratas con oclusión de la arteria cerebral media, con isquemia global transitoria del encéfalo, dependiente de la circulación anterior y tras la lesión inducida por la ligadura de una de las arterias carótidas y la exposición a una atmósfera hipóxica (Szaflarski y cols., 1995). Las funciones más ampliamente reconocidas de la IL-1 son las de inducir la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y promover la afluencia de neutrófilos al tejido lesionado (Yamasaki y cols., 1995).

**TNF- $\alpha$ .** El TNF- $\alpha$  es sintetizado en multitud de células (linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos activados, NK, etc) como un polipéptido de 26kDa y su forma predominante es la que está unida a las membranas biológicamente activas (Beyaert y Fiers, 1998). Se ha observado que esta forma es la primera en activar el receptor del TNF- $\alpha$  en varios sistemas celulares, incluyendo el endotelio, actuando de esta forma como un regulador local de la respuesta inflamatoria (Beyaert y Fiers, 1998). Diversos estudios han mostrado que los niveles de TNF- $\alpha$  se incrementan en animales sujetos a isquemia cerebral (Feuerstein y cols., 1994), estimulando a su vez la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio periférico (Matilla y cols., 1992) y de moléculas de adhesión y quimiocinas en cultivos de células endoteliales cerebrales (Zhang y cols., 1999a; Zhang y cols., 1999b; Stanimirovic y Satoh, 2000).

**Otras citoquinas.** Siempre se ha pensado que la interleucina-6 actuaba como una citoquina pro-inflamatoria, pero el papel que desempeña en la isquemia cerebral está lejos de aclararse. Ratones deficientes en IL-6 presentan tamaños similares de infarto comparados con animales salvajes, sugiriendo que la IL-6 no participa en la patogénesis isquémica (Clark y cols., 2000). Por el contrario, otros estudios señalan que desempeña tanto un papel beneficioso (Herrmann y cols., 2003) como perjudicial (Smith y cols., 2004). En un estudio

con pacientes que presentaban accidente cerebrovascular, se observó como la concentración de IL-6 en suero fue mucho menor en los pacientes tratados con rhIL-1ra, una droga neuroprotectora, los cuales presentaron una mejor respuesta comparados con el grupo de pacientes que recibieron placebo (Emsley., 2005). Por otro lado tenemos a la interleucina-10, una citoquina anti-inflamatoria que actúa inhibiendo la IL-1 y el TNF- $\alpha$  y también suprimiendo la expresión y activación del receptor de citoquinas. La IL-10 se sintetiza en el sistema nervioso central y está sobreexpresada en modelos de infarto cerebral (Strle y cols., 2001). Su administración exógena parece presentar efectos beneficiosos en modelos animales de isquemia cerebral (Spera y cols., 1998). Pacientes con infarto cerebral agudo presentan un gran número de células mononucleares de sangre periférica secretando IL-10 (Pelidou y cols., 1999) y elevadas concentraciones de la misma en el fluido cerebroespinal (Tarkowski y cols., 1997).

### 3.2.- Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de polipéptidos reguladores que juegan funciones importantes en la comunicación celular y en el reclutamiento celular inflamatorio, tales como la regulación de la migración de los leucocitos proinflamatorios y de las respuestas inmunes. Se sabe que la expresión de las quimiocinas tras isquemia cerebral posee un papel prejudicial ya que incrementa la infiltración leucocitaria (Emsley y Tyrrell, 2002). Basándonos en la posición de los residuos de cisteína (C), las quimiocinas pueden dividirse en cuatro grupos: C, CC, CXC y CX3C, mediante los cuales las quimiocinas actúan a través de receptores específicos y compartidos pertenecientes a la superfamilia de los receptores unidos a proteínas G (Bajetto y cols., 2001). Diversas publicaciones demuestran que una gran variedad de quimiocinas están inducidas en modelos animales de isquemia cerebral focal, tales como la MCP-1 y la MIP-1 $\alpha$  (Chen y cols., 2003). Además, su inhibición o su disminución están asociadas con una reducción en la lesión (Garau y cols., 2005), mientras que Chen y cols. (2003) mostraron como la sobre-expresión de la MCP-1 en el cerebro exacerbaba el daño isquémico, lo cual estaba correlacionado con el reclutamiento de células inflamatorias.

Por otra parte, se ha demostrado como las quimiocinas afectan directamente a la permeabilidad de la BBB. Añadiendo MCP-1 se incrementó diecisiete veces la permeabilidad en un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica y causó alteraciones en las proteínas de unión, sugiriendo que la MCP-1 juega un papel importante en la disrupción de la barrera hematoencefálica (Stamatovic y cols., 2005).

### 3.3.- Metabolitos del Ácido Araquidónico

Prostaglandinas. Los eicosanoides, son conocidos mediadores de la inflamación (Samuelsson, 1983). La cascada del ácido araquidónico hasta generar diversas prostaglandinas es provocada por varias interacciones receptor-anatagonista,

incrementos en el calcio citoplasmático y/o por la isquemia (Funk, 1993; Samuelsson, 1983). El ácido araquidónico segregado desde los fosfolípidos del cerebro durante la isquemia/reperfusión es una importante fuente de radicales libres y un mediador importante en la disrupción de la barrera hematoencefálica y en la formación del edema cerebral (Abe y cols., 1989).

Leucotrienos. Son compuestos bioactivos generados a partir del ácido araquidónico mediante la acción de la lipooxigenasa, hasta formar el LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> o el LTC<sub>4</sub>, los cuales actúan como mediadores de inflamación y alergia en diversos tejidos (Samuelsson, 1983). Pese a que existe controversia en relación a sus efectos inflamatorios, se ha mostrado que existe correlación entre el contenido de LTC<sub>4</sub> y los tumores cerebrales, así como el hecho de que el edema sea disminuido mediante el empleo de inhibidores de la lipooxigenasa. Además, se produce un incremento en la liberación de los mismos durante la isquemia/reperfusión cerebral en modelos animales estudiados (Moskovitz y cols., 1984).

### 3.4.- Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es una importante molécula señalizadora involucrada en procesos fisiológicos tales como la comunicación neuronal o la regulación del tono vascular. Este gas relativamente estable difunde fácilmente dentro de las células y de las membranas celulares donde reacciona con diversas moléculas diana. Existen tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS); la NOS endotelial (también conocida como tipo II, NOS-II o NOS-3), NOS neuronal (llamada también como tipo I, NOS-I y NOS-1) y la NOS inducible (o tipo II, NOS-II, NOS-2 o iNOS).

Dentro de estas tres isoformas, la iNOS es especialmente relevante para las células inflamatorias y puede contribuir al daño isquémico a través del NO. De hecho, la expresión de la iNOS se cree que está restringida a células que intervienen en respuestas inflamatorias como los leucocitos, la microglía y los astrocitos. En el cerebro, tanto la inducción isquémica de la sobreexpresión de la iNOS como de su mRNA está asociada a incrementos en la actividad enzimática de la iNOS y de la producción de NO (Iadecola y cols., 1995a; Iadecola y cols., 1995b). El NO puede causar daño en el DNA en respuesta a la isquemia cerebral mediante la formación de peroxinitrito (Cui y cols., 1999; Cui y cols., 2000). La inhibición farmacológica de la iNOS reduce aproximadamente un 30% el tamaño del infarto (Iadecola y cols., 1995b) y ratones modificados sin iNOS presentan menores infartos y mejor respuesta que animales controles para la iNOS (Zhao y cols., 2000).

### 3.5.- Especies Reactivas del Oxígeno

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte de las células inflamatorias ocurre a través de múltiples sistemas enzimáticos. El superóxido es generado vía COX, xantina deshidrogenada, xantina oxidasa y NADPH

oxidasa, mientras que la mieloperoxidasa (MPO) y la monoamino oxidasa (MAO) generan ácido hipocloroso y  $H_2O_2$ . Entre todos los oxidantes que aparecen en el parénquima cerebral tras MCAO, el anión superóxido es el más importante. Causando daño directo al cerebro isquémico mediante la reacción con el NO generando peroxinitrito (Chan, 2001).

La NADPH oxidasa (NOX) es una enzima compuesta por dos subunidades unidas a la membrana, gp91 y p22, y tres subunidades citosólicas, p67, p47 y p40 más Rac, una pequeña GTPasa (Groemping y Rittinger, 2005). Con estímulos apropiados, las subunidades citosólicas se traslocan a la membrana donde interactúan con las subunidades unidas a la membrana, transfiriendo electrones desde el NADPH al oxígeno para formar superóxido. Estudios previos han demostrado que ratones deficientes en la subunidad gp91 de la NOX2 presentan menores infartos que ratones salvajes (Walter y cols., 1997). Además, la microglía potencia el daño a la barrera hematoencefálica mediante el superóxido producido por la NOX2 en modelos de isquemia cerebral (Yenari y cols., 2006).

La mieloperoxidasa (MPO) está relacionada con la inflamación y se cree que interviene en la muerte bacteriana vía  $H_2O_2$  y ácido hipocloroso. La actividad de la MPO es usada como marcador de la infiltración de neutrófilos polimorfonucleares, y el incremento en su regulación en la sangre puede usarse como indicador de riesgo de infarto. La MPO ha sido documentada tanto en modelos de MCAO permanente como transitoria (Garau y cols., 2005). Por el contrario, se ha observado como ratones transgénicos deficientes en MPO presentaban mayores infartos, sugiriendo un papel beneficios de la misma. Estos animales además presentaron un incremento en productos derivados de la nitrosilación en el interior del cerebro isquémico, sugiriendo que el efecto neuroprotector podría ser debido a su habilidad para eliminar la nitrotirosina (un producto de reacción del peroxinitrito) en presencia de glutatión. Así pues, actualmente se postula que la MPO podría limitar el daño cerebral derivado de la producción de ROS.

### 3.6.- Metaloproteinasas de la matriz

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son proteasas que pueden romper proteínas extracelulares, tales como el colágeno, y están involucradas en la remodelación de la matriz extracelular así como en la respuesta neuroinflamatoria. Las MMPs se encuentran generalmente en el citosol en un estado pro- o inactivo, pero son activadas mediante otras proteasas como la plasmina u otras MMPs (Rosenberg, 2002). Como una fuente importante de MMPs tras la isquemia, la microglía es necesaria para estimular a los astrocitos para generar MMPs activas (Rosenberg y cols., 2001).

En modelos experimentales de infarto cerebral, la inhibición de las MMPs reduce el tamaño del infarto, el edema cerebral y la hemorragia (Pfefferkorn y Rosenber, 2003). Tras el tratamiento con tPA, los componentes de la barrera hematoencefálica son desmantelados tras la activación de la MMP-9 (Kelly y

cols., 2006). Ratones deficientes en MMP-9 presentaron menores infartos que sus homólogos salvajes (Asahi y cols., 2000); por el contrario, esto no fue observado en ratones deficientes en MMP-2 (Asahi y cols., 2001), sugiriendo que la MMP-9 juega un papel más importante en el infarto cerebral que el desempeñado por la MMP-2.

#### 4.- MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y RECONOCIMIENTO CELULAR

El proceso de adhesión leucocito-endotelio engloba varios pasos, comenzando con el rodamiento del leucocito sobre la superficie del endotelio hasta tal punto que se detiene y se pega con la célula endotelial. En este punto el leucocito se activa y se aplana. Continúa con una adhesión firme a la célula. Posteriormente, el leucocito se arrastra por el endotelio hasta encontrar una unión intercelular para penetrar y migrar hacia el tejido diana (Akopov y cols., 1996).

Desde 1985, han sido identificadas 3 familias de moléculas de adhesión leucocito-endotelio: las selectinas, la superfamilia gen inmunoglobulina y las integrinas.

##### 4.1.- Selectinas

###### 4.1.1.- Rodamiento y adhesión laxa

Las selectinas son glicoproteínas transmembrana con dominios extracelulares homólogos que varían en longitud, dependiendo del número de repeticiones de complementos regulatorios que presenten. Por el contrario, el dominio intracelular citoplasmático carece de secuencias homólogas (Kluger, 2004).

Las selectinas intervienen en la primera fase de la adhesión leucocitaria, encargándose del proceso de marginación, donde el leucocito se adhiere de forma débil al endotelio. El proceso de rodamiento sirve para poner estas células en estrecho contacto con el endotelio y para disminuir la velocidad de su paso por las regiones de daño tisular e inflamación.

Los ligandos de las selectinas son proteínas tipo mucinas que contienen carbohidratos sializados y fucosilados. La E-selectina (CD62E) es sintetizada tras la estimulación mediante citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina-1 (IL-1), y es expresada en la membrana celular endotelial varias horas después del insulto. Además, la E-selectina se une al antígeno cutáneo linfocitario (CLA) expresado en las células T, al SLE<sup>x</sup> expresado en el ligando glicoproteico-1 de la P-selectina (PSGL-1), a la L-selectina, a la CD66 y a una glicoproteína de 150 Kd presente en leucocitos. La P-selectina (CD62P) está expresada constitutivamente en los cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales y en los gránulos  $\alpha$  de plaquetas. Por consiguiente, puede ser expresada inmediatamente tras la activación mediante agentes estimulantes tales como la trombina y la histamina (Subramaniam y cols., 1993; Takano y cols., 2002). Las células diana de ambas selectinas son



los neutrófilos y los monocitos. Esta molécula, también posee la capacidad de unirse al SLE<sup>x</sup>, expresado en el PSGL-1, y a la L-selectina. La L-selectina se une a la estructuras carbohidratadas expresadas en la molécula de adhesión celular-1 glicosilada (GluCAM-1), a la CD34 en vénulas endoteliales, a la adresina mucosa (MAdCAM-1) y, por supuesto, a las selectinas E y P (Carlos y Harlan, 1994).

Se ha observado como ratones que sobreexpresaban la P-selectina presentaban mayores infartos que sus homólogos salvajes, mientras que la administración con inhibidores o anticuerpos de la P-selectina y la E-selectina generaron una mejora evidente en el estado neurológico (Huang y cols., 2000b; Mocco y cols., 2002).

#### 4.1.2.- Activación de los leucocitos

Desde hace tiempo, es conocida la capacidad que poseen las células T para abandonar la circulación sanguínea en función de su estado de activación (Oppenheimer y cols., 1990; Kluger y cols., 2004). La activación se produce durante el rodamiento, cuando los leucocitos se encuentran con receptores como el C5a, el factor de activación de plaquetario, el leucotrieno B<sub>4</sub> o los formilpéptidos, y con citoquinas quimiorreceptoras y proteoglicanos heparán sulfato de la superficie luminal de las células endoteliales (Hoogewerf y cols., 1997; Weber y cols., 1999) Las citocinas inducen la liberación de quimiocinas, importantes para la quimiotaxis de los leucocitos hacia la región isquémica. Éstas se unen a receptores leucocito específicos que desencadenan la señalización de leucocitos dependiente de proteínas G heterotriméricas (Zlotnik y cols., 1999; Murdoch y Finn, 2000). Tales señales inician el agrupamiento e incrementan la afinidad de las integrinas LAF-1, Mac-1 y VLA-4 por las moléculas de adhesión celular (CAMs) de la superfamilia Ig de las células endoteliales (Constantin y cols., 2000; Grabovsky y cols., 2000; Divierto y cols., 2001). Otra serie de procesos incluidos en la activación leucocitaria son producidos durante la adhesión de la E-selectina, la del VLA-4 o durante la unión de la LFA-1 con la ICAM-1 (Kluger, 2004).

La activación leucocitaria conlleva otras acciones relacionadas con la respuesta inflamatoria como son la liberación de óxido nítrico, elastasa, mieloperoxidasa, radicales libres, etc, que en conjunto ejercen un efecto citotóxico sobre las membranas y el endotelio, y también producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad (Winqvist y Kerr, 1997). El resultado final es el transvase de proteínas y agua desde el espacio vascular al espacio extracelular y la formación de edema.

## 4.2.- Superfamilia de las Inmunoglobulinas

### 4.2.1.- Adhesión firme

La adhesión firme de los leucocitos a las células endoteliales, además de por la activación, está mediada por los receptores de la superfamilia gen inmunoglobulina. A esta familia pertenecen 5 moléculas que son expresadas por las células endoteliales: las moléculas de adhesión intercelular 1 y 2 (ICAM-1 e ICAM-2), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), la molécula de adhesión celular plaqueta-endotelio (PECAM-1), y la adhesina mucosa (MAdCAM-1) (Kubes y Ward, 2000). Las moléculas de adhesión celular (CAMs) intervienen en la adhesión leucocitaria donde las fuerzas de rozamiento son relativamente bajas; generando una adhesión al endotelio más fuerte que las selectinas.

La ICAM-1 (CD54) es una glicoproteína de membrana que posee dominios Ig repetidos en su región extracelular, característico de la superfamilia gen inmunoglobulina. Está presente a bajas cantidades en las membranas celulares de células endoteliales, leucocitos, células epiteliales y fibroblastos y se incrementa su expresión por activación a través de citoquinas con un pico a las 12-24 horas, precediendo a la infiltración leucocitaria. Se une a la CD18/11a (LFA-1) y a la CD18/11b (Mac-1), ambas pertenecientes al grupo de las integrinas- $\beta$ 2. Estudios recientes en modelos de hipoxia-isquemia animal han demostrado la regulación de la ICAM-1 en las paredes de la microcirculación y han correlacionado la infiltración de los neutrófilos cerebrales con los niveles de expresión de la ICAM-1 (Campanella y cols., 2002; Wang y cols, 2004). Zhang y cols. (1995) mostraron como la administración de un anticuerpo anti-ICAM1, además de anticuerpos contra las moléculas de adhesión expresadas en leucocitos en experimentos en animales antes y/o después de la isquemia, limita la infiltración leucocitaria al interior del cerebro y disminuye el tamaño del infarto y el hinchazón cerebral. Además, ratones transgénicos deficientes en ICAM desarrollan menores infartos frente a sus parientes salvajes (Soriano y cols., 1996) y la inhibición del mRNA de la ICAM-1 mediante el empleo de oligonucleótidos antisentido desemboca en una mejor respuesta al daño (Wang y cols., 2007).

La ICAM-2 (CD102) es un receptor de membrana de células endoteliales similar a la ICAM-1, que únicamente difiere con ella en que aquella posee 5 dominios extracelulares (Staunton y cols., 1988; Simmons y cols., 1988), frente a los 2 de ésta. Se une únicamente a la LFA-1 y su expresión no se incrementa tras la agresión H/I, al contrario que la VCAM-1 (CD106) proteína que presenta siete dominios extracelulares y cuya expresión en células endoteliales es inducida por el TNF- $\alpha$  y la IL-1. La VCAM-1 establece su unión con la integrina- $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (o VLA-4). La participación tanto de la ICAM-1 como de la VCAM-1 ha sido puesta de manifiesto en células endoteliales de la red microvascular sanguínea humana (Stanimirovic y cols, 1997) y en astrocitos (Rosenman y cols., 1995).

La PECAM-1 (CD31) interviene en la unión entre células endoteliales (unión PECAM-1/PECAM-1), en la adhesión leucocitaria y particularmente en la trans migración a través del endotelio. Su expresión no es incrementada por las

citoquinas. Ésta última integrante del grupo de la superfamilia gen inmunoglobulina tiene en el VLA-4 a su ligando (Carlos y Harlan, 1994). Por último, la MAdCAM-1 es una proteína expresada en el endotelio de los tejidos mucosos que actúa como ligando de los receptores L-selectina de los leucocitos y de la integrina- $\alpha 4\beta 7$  (Wang y cols., 2007).

#### 4.3.- Integrinas

Tras el rodamiento del leucocito sobre la superficie endotelial y habiendo ya detenido su circulación, las integrinas leucocitarias ya han sido activadas mediante quimiocinas y citoquinas. Las integrinas están compuestas a su vez por tres subfamilias de unidades  $\beta$ . Las integrinas de la subfamilia  $\beta 1$  se unen al colágeno, a la laminina y a la fibronectina, y están involucradas en la estructura de la matriz extracelular. Las CD18 o integrinas- $\beta 2$  están restringidas a los leucocitos e intervienen en la adhesión firme del mismo mediante su unión a moléculas de la superfamilia gen inmunoglobulina. Además, la migración transendotelial es un proceso dependiente de las integrinas CD18 aunque no está claro cómo intervienen otras moléculas. Por último aparecen las integrinas  $\beta 3$ , también conocidas como citoadhesinas, las cuales participan en procesos de estabilización.

Las integrinas  $\beta 2$  comparten una cadena  $\beta 2$  y tres cadenas  $\alpha$  diferentes (CD11a, CD11b o CD11c). Su expresión es activada mediante el TNF- $\alpha$  y tras la unión a la E-selectina. En este grupo cabe destacar a la CD18/11a (LFA-1) y a la CD18/11b (Mac-1), cuyos ligandos son la ICAM-1 para ambas y la ICAM-2 únicamente para la primera. Linfocitos y monocitos, además, expresan la integrina- $\alpha 4\beta 1$  (CD49 d o VLA-4), la cual pertenece al grupo de las integrinas  $\beta 1$ , que poseen receptores celulares para proteínas extracelulares de la matriz como la laminina, la fibronectina, el colágeno y la vitronectina (Carlos y Harlan, 1994). El VLA-4 se adhiere a la VCAM-1 y a la región CS-1 de la fibronectina, expresada en la superficie luminal del endotelio in vivo (Frijns y Kappelle, 2002). Se ha observado en modelos de hipoxia-isquemia cerebral, un descenso en el grado de infiltración leucocitaria tras la administración tanto de anticuerpos contra el VLA-4 (Relton y cols., 2000; Becker y cols., 2001), como de fibronectina sintética (Yanaka y cols., 1996).

Hay que resaltar que, en condiciones normales, las integrinas se expresan sobre la membrana plasmática del leucocito, pero no se adhieren a sus ligandos apropiados en ausencia de activación previa por sustancias quimiotácticas u otros estímulos (producidos por el endotelio u otras células en el lugar de la lesión). Sólo entonces, las integrinas sufren el cambio de conformación necesario para conferir una elevada afinidad de unión por las moléculas de adhesión endotelial. Finalmente, tras esta cascada de uniones se consigue la adhesión firme del leucocito al endotelio y la detención completa de su movimiento.

#### 4.3.1.- Transmigración endotelial y quimiotaxis

Tras su adhesión a las superficies endoteliales, los leucocitos migran escurriéndose entre las uniones intercelulares, siendo la PECAM-1 la proteína mediadora más importante de este proceso. Tras atravesar las uniones endoteliales, los leucocitos cruzan las membranas basales mediante la secreción de colagenasa, que las degradan localmente. Tras salir de los vasos, los leucocitos se desplazan hacia el lugar de la lesión a lo largo de un gradiente químico originado en el foco inflamatorio, este proceso es denominado quimiotaxis. Sustancias exógenas y endógenas pueden actuar como factores quimiotácticos, destacando algunas citoquinas (como la IL-8 y el PAF), el leucotrieno B4 y péptidos originados por la activación del complemento, que interactúan con receptores de membrana de la familia de receptores tipo rodopsina, que se asocian en su porción intracelular con una proteína G, la cual iniciará la activación de la fosfolipasa C para finalmente generar un incremento del calcio intracelular desencadenando el ensamblado de los elementos contráctiles citoesqueléticos necesarios para el movimiento mediante pseudópodos (Kumar y cols., 2005).

## 5.- BIBLIOGRAFÍA

- Abe K, Yoshidomi M, Kogure K. Arachidonic acid metabolism in ischemic neuronal damage. *Ann New York Acad Sci* 1989; 559: 269-268
- Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke* 1996; 27: 1739-1743
- Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines Co-ordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:783-789
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 1681-1689
- Asahi M, Sumii T, Fini ME, Itohara S, Lo EH. Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia. *Neuroreport* 2001; 12: 3003-3007
- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 147-184
- Becker K, Kindrick D, Relton J, Harlan J, Winn R. Antibody to the  $\alpha 4$  integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001; 32: 206-211
- Becker KJ. Inflammation and acute stroke. *Curr Opin Neurol* 1998; 11:45-49
- Benjelloun N, Renolleau S, Represa S, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C, Feuerstein G Z. Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal Rat. *Stroke* 1999; 30: 1916-1924
- Beyaert R, Fiers W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: *Cytokines* Eds (A. Mire-Sluis A, Thorpe R) Academic Press, San Diego.1998; pp.335-360
- Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke* 2002; 33: 586-592
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84 (7) 2068-2101
- Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, Yee E, Rosso M, Osborn L, Chi-Rosso G, Newman B, Lobb R, Harlan JM. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 1990; 76(5): 965-970
- Cassie S, Masterson MF, Polukoshko A, Viskovic MM, Tibbles LA. Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 36(9): 1102 - 1111
- Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21: 2-14
- Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NE, Vogel SN. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 748-755
- Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, Hazel K, Hill JK, Stenzel-Poore M, Eckenstein F. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke* 2000; 31: 1715-1720

Constantin G, Majeed M, Giagulli C: Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: Differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000; 13: 759-769

Cui J, Holmes EH, Greene TG, Liu PK. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *Faseb J* 2000; 14: 955-967

Cui J, Holmes EH, Liu PK. Oxidative damage to the c-fos gene and reduction of its transcription after focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 1999; 73: 1164-1174

Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 127-136

Davies CA, Loddick SA, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. An integrated analysis of the progression of cell responses induced by permanent focal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Neurol* 1998; 154: 199-212

Dietrich JB. The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier. *Journal of Neuroimmunology* 2002; 128: 58-68

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-397

DiVietro JA, Smith MJ, Smith BR: Immobilized IL-8 triggers progressive activation of neutrophils rolling in vitro on P-selectin and intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 2001; 167: 4017-4025

Domingos CK, Deshpande SS, Irani K, Alevriadou BR. Adhesion of flowing monocytes to hypoxia-reoxygenation-exposed endothelial cells: role of Rac1, ROS, and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: 93-102

du-Plessis AJ, Volpe JJ. Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 151-157

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon, tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Exp. Me.* 1986; 167: 1323-1340

Edwards AD, Azzopardi DV. Perinatal hypoxia-ischemia and brain injury. *Pediatric Res* 2000; 47: 431-432

Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1366-1372

Emsley HC, Tyrrell PJ. Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 1399-1419

Fellman V, Raivio K. Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res.* 1997; 41: 599-606

Feuerstein G, Liu T, Barone F. Cytokines, inflammation and brain injury: role of tumor necrosis factor. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1994; 6: 341-360

Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2002; 33: 2115-2122

Funk CD. Molecular biology in the eicosanoid field. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol.* 1993; 45: 67-98

- Garau A, Bertini R, Colotta F, Casilli F, Bigini P, Cagnotto A, Mennini T, Ghezzi P, Villa P. Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia. *Cytokine*. 2005; 30: 125–131
- Garau A, Bertini R, Colotta F, Casilli F, Bigini P, Cagnotto A, Mennini T, Ghezzi P, Villa P. Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia. *Cytokine* 2005; 30: 125–131
- Ge H, Wen Y, Yang G. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 in mouse focal cerebral ischemia model. *Chinese Medical Journal* 2000; 113: 75-79
- Grabovsky V, Feigelson S, Chen C: Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 2000; 192: 495-506
- Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J*. 2005; 386: 401–416
- Hagberg H, Gilland E, Hanson LA, Hanin-Zoric M, Blennow M, Holst M, McRae A, Soder O. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res*. 1996; 40(4): 603-609
- Hallenbeck JM. Significance of the inflammatory response in brain ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 1996; 66: 27–31
- Han HS, Yenari MA. Cellular targets of brain inflammation in stroke. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4: 522–529
- Harmon D, Lan W, Shorten G. The effect of aprotinin on hypoxia-reoxygenation-induced changes in neutrophil and endothelial function. *Eur J Anaesthesiol*. 2004; 21: 973–979
- Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, Vogel J, Prinz S, Schwab S, Monyer H, Brombacher F, Schwaninger M. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 406–415
- Hilario E, Alvarez A, Alvarez FJ, Gastiasoro E, Valls-i-Soler A. Cellular mechanisms in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Current Pediatric Rev* 2006; 2: 414-424
- Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE: Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 1997; 36: 13570-13578
- Hu X, Zhang Y, Zeng F. Effects of sodium  $\beta$ -aescin on expression of adhesion molecules and migration of neutrophils after middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Pharmacol* 2004; 25(7): 869-875
- Huang J, Choudhri TF, Winfree CJ, McTaggart RA, Kiss S, Mocco J, Kim LJ, Protopsaltis TS, Zhang Y, Pinsky DJ, Connolly ES. Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. *Stroke*. 2000b; 31: 3047–3053
- Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995a; 15: 378-384
- Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 1995b; 268: R286–292
- Inder TE, Volpe JJ. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2000; 5:3-16

- Kelly MA, Shuaib A, Todd KG. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol*. 2006; 200(1): 38-49
- Kim JS. Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci* 1996; 137: 69-78
- Kishimoto TK, Rothlein R. Integrins, ICAMs and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Advances in Pharmacology* 1994; 25: 117-169
- Kluger MS. Vascular endothelial cell adhesion and signaling during leukocyte recruitment. *Advances in Dermatology* 2004; 20: 163-201
- Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992; 23: 1367-1379
- Koh SH, Park Y, Song CW, Kim JG, Kim K, Kim J, Kim MH, Lee SR, Kim DW, Yu HJ, Chang DI, Hwang SJ, Kim SH. The effect of PARP inhibitor on ischaemic cell death, its related inflammation and survival signals. *Eur J Neurosci*. 2004; 20: 1461–1472
- Kubes P, Ward PA. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathology* 2000; 10: 127-135
- Kumar V, Abbas A, Fausto N. Inflamación aguda y crónica. En: Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional (Eds. V Kumar, A Abbas, N Fausto). Elsevier España. 2005: pp.47-87
- Matilla P, Majuri M-L, Mattila PS, Renkonen R. TNF $\alpha$ -induced expression of endothelial adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1, is linked to protein kinase C activation. *Scand J Immunol* 1992; 36:159-165
- Mocco J, Choudhri T, Huang J, Harfeldt E, Efros L, Klingbeil C, Vexler V, Hall W, Zhang Y, Mack W, Popilskis S, Pinsky DJ, Connolly ES. HuEP5C7 as a humanized monoclonal anti-E/P-selectin neurovascular protective strategy in a blinded placebo-controlled trial of nonhuman primate stroke. *Circ Res*. 2002; 91: 907–914
- Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Comp Neurol* 1993;327:123–132
- Moskovitz MA, Kiwak KJ, Hekimian K, Levine L. Synthesis of compounds with properties of leukotriene C4 and D4 in gerbil brains after ischemia and reperfusion. *Science* 1984; 224:886-888
- Murdoch C, Finn A: Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000; 95: 3032-3043
- Olsen ST, Bruhn P, Oberg G. An ischemic penumbra as the cause of neurologic deficit in humans. *J Cereb Blood Flow Metabol Suppl* 1985; 1: S7-S8
- Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Lipsky PE: Human T lymphocyte adhesion to endothelial cells and transendothelial migration. Alteration of receptor use relates to the activation status of both the T cell and the endothelial cell. *J Immunol* 1990; 145: 140-148
- Perlman JM. Brain injury in the term infant. *Semin Perinatol*. 2004 Dec; 28(6):415-24
- Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 2003; 34: 2025–2030



- Pober JS, Grimbrone MA, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer, TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J. Immunol.* 1986; 137: 1893-1896
- Relton JK, Sloan KE, Frew EM, Whalley ET, Adams SP, Lobb RR. Inhibition of  $\alpha$ 4 integrin protects against transient focal cerebral ischemia in normotensive and hypertensive rats. *Stroke* 2001; 32: 199-205
- Rice GE, Munro JM, Bevilacqua MP. Inducible cell adhesion molecule 110 (ICAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1990; 171: 1369-1374
- Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res* 2001; 893: 104-112
- Rosenberg GA. Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 42: 209-216
- Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 2002; 39: 279-291
- Rosenman SJ, Shrikant P, Dubb L, Benveniste EN, Ransohoff RM. Cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by astrocytes and astrocytoma cell lines. *J Immunol.* 1995; 154(4): 1888-1899
- Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity and inflammation. *Science* 1983; 220: 568-575
- Simmons D, Makgoba MW, Seed B: ICAM, an adhesion ligand of LFA-I, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 1988; 33 1: 624
- Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol* 2004; 4: 2
- Soehle M, Jaeger M, Meixensberger J. Online assessment of brain tissue oxygen autoregulation in traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* 2003; 25: 411-417
- Soriano SG, Lipton SA, Wang YF, Xiao M, Springer TA, Gutierrez-Ramos J-C, Hickey PR. Interleukin-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Ann Neurol* 1996; 39: 618-624
- Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett* 1998; 251: 189-192.
- Stamatovic SM, Shukui P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 593-606.
- Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathology* 2000; 10: 113-126
- Stanimirovic D, Wong J, Shapiro A, Durkin JP. Increase in surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human cerebrovascular endothelial cells subjected to ischemia-like insults. *Acta Neurochir Suppl.* 1997; 70: 12-16

Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA: Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 1988; 52: 925

Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol* 2001; 21: 427–449.

Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD: Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 791-801

Szaflarski J, Douglas B, Faye S. MD Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke*. 1995; 26: 1093-1100

Takano M, Meneshian A, Sheikh E: Rapid upregulation of endothelial P-selectin expression via reactive oxygen species generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H2054-H2061

Takizawa S, Aratani Y, Fukuyama N, Maeda N, Hirabayashi H, Koyama H, Shinohara Y, Nakazawa H. Deficiency of myeloperoxidase increases infarct volume and nitrotyrosine formation in mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22: 50–54

Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy. En: Volpe JJ, (Ed: *Neurology of the Newborn*) W.B. Saunders Company, Philadelphia. 2001:217-394

Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001; 50: 553–562

Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT, Thomas GR. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke*. 1997; 28: 2252–2258

Wang Q, Tang X, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007; 184(1-2): 53–68.

Wang Z, Chen X, Yang G, Zhou L. Inflammatory reaction after focal cerebral ischemia in mouse. *Chinese Medical Journal* 2004; 117(4): 586-591

Weber KS, von Hundelshausen P, Clark-Lewis I: Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* 1999; 29: 700-712

Winqvist RJ, Kerr S. Cerebral ischemia-reperfusion injury and adhesion. *Neurology* 1997; 49 (4): S23-26

Wyatt JS, Edwards AD, Azzopardi D, Reynolds EO. Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Arch Dis Child* 1989; 64: 953-963

Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995; 26: 676-681

Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, McCarthy JB, Furcht LT, Low WC, Heros RC. Neuronal protection from cerebral ischemia by synthetic fibronectin peptides to leukocyte adhesion molecules. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16(6): 1120-1125

Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke*. 2006; 37: 1087–1093

Zhang RL, Michael Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probst J, Manning AM, Anderson DC. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 1995; 26: 1438-1443

Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic DB. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101:148-160

Zhang W, Smith C, Stanimirovic D. Inflammatory gene expression in human brain endothelial cells and human astrocyte subjected to in vitro ischemia. *J Cerebral Blood Flow Metab* 1999; 19: S262

Zhao X, Haensel C, Araki E, Ross ME, Iadecola C. Gene-dosing effect and persistence of reduction in ischemic brain injury in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Brain Res* 2000; 872: 215-218

Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res* 2004; 26: 884-892

Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA: Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* 1999; 19: 1-47

## **CAPITULO 19:**

### **EFFECTOS DE LA HIPOXIA SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y TUMORAL.**

Unai Silván y Lucía Jiménez Rojo.

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN.....	403
2.- RESPUESTA CELULAR FRENTE A LA HIPOXIA.....	403
3.- LA HIPOXIA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	406
3.1.- Formación del sistema vascular del embrión.....	407
3.2.- Desarrollo placentario.....	409
3.3.- Desarrollo del riñón y regulación de la eritropoyésis.....	410
4.- HIPOXIA Y CANCER.....	411
4.1.- Supervivencia celular.....	412
4.2.- Invasión de tejidos adyacentes.....	412
4.3.- Vascularización tumoral.....	413
4.3.1.- Angiogénesis.....	414
4.3.2.- Incorporación de vasos del huésped.....	414
4.3.3.- Vasculogénesis.....	414
4.3.4.- Mimetismo vascular.....	415
4.4.- Agentes anti-angiogénicos como tratamiento del cáncer.....	415
5.- CONCLUSIONES Y FUTURO.....	416
6.- BIBLIOGRAFIA.....	417

## 1.- INTRODUCCIÓN.

Hablamos de hipoxia cuando un organismo o tejido del mismo recibe un suministro de oxígeno ( $O_2$ ) menor al normal. La hipoxia se relaciona habitualmente con procesos patológicos, como por ejemplo la isquemia, la inflamación y el crecimiento tumoral. Sin embargo, estas reducciones en la concentración de  $O_2$  también se dan en condiciones normales, siendo de gran importancia durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular (Giaccia y cols., 2004).

A pesar de que la concentración de  $O_2$  en el aire que respiramos es del 21%, en el organismo en condiciones fisiológicas normales la mayoría de los tipos celulares se encuentran en ambientes con una concentración de  $O_2$  en el rango de 2 al 9%. Sin embargo, existen tejidos, como el timo, la médula ósea y la cápsula renal donde la concentración de  $O_2$  apenas llega al 1% y otros, como los pulmones donde alcanza el 16%. Por otra parte, el desarrollo embrionario se lleva a cabo en ambientes notablemente hipóxicos, encontrándose la concentración de  $O_2$  de la sangre arterial del feto entre el 3 y el 5%. La importancia de la hipoxia no se limita al desarrollo embrionario, sino que también afecta a las células madre del adulto. El termino "nicho" de la célula madre se refiere al microambiente en el cual dichas células se encuentran y que debe de ser capaz de favorecer su proliferación y diferenciación hacia tipos celulares específicos. Por lo general son varios los factores que se relacionan con este nicho como los contactos intercelulares, la concentración de factores de crecimiento, la temperatura, ... (Dellatore y cols., 2008), pero la correcta regulación de la concentración de  $O_2$  también parece ser un factor esencial del mismo (Diabira y Morandi, 2008). Las concentraciones de  $O_2$  en la médula ósea, por ejemplo, se encuentran entre el 1 y el 2% (Cipolleschi y cols., 1993) y el cultivo de las células madre hematopoyéticas (HSC) *in vitro* en condiciones de hipoxia aumenta su capacidad de colonizar y repoblar la médula ósea de ratones inmunodeficientes (Danet y cols., 2003).

De acuerdo con este planteamiento es posible que bajas concentraciones de  $O_2$  pudieran ser importantes para impedir los daños por oxidación del material genético de las células madre, lo cual sería de particular importancia en animales con larga esperanza de vida.

## 2.- RESPUESTA CELULAR FRENTE A LA HIPOXIA

Todos los organismos, desde las bacterias hasta los mamíferos, han desarrollado mecanismos para protegerse de los cambios en la concentración de  $O_2$  del ambiente que los rodea. En las células de mamífero la exposición a bajos niveles de oxigenación desencadena una respuesta cuyo primer eslabón es el Factor Inducible por Hipoxia (Hypoxia Inducible Factor, HIF). Este complejo, descubierto a principios de la década de los 90 (Semeza y Wang, 1992), pertenece a las familias de factores de transcripción bHLH (basic Helix-Loop-Helix) y PAS (PER-ARNT-SIM) y está compuesto por dos subunidades: una variable (HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$ , ó 3 $\alpha$ ) y otra constante, la subunidad HIF-1 $\beta$ , que también se conoce como ARNT (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear

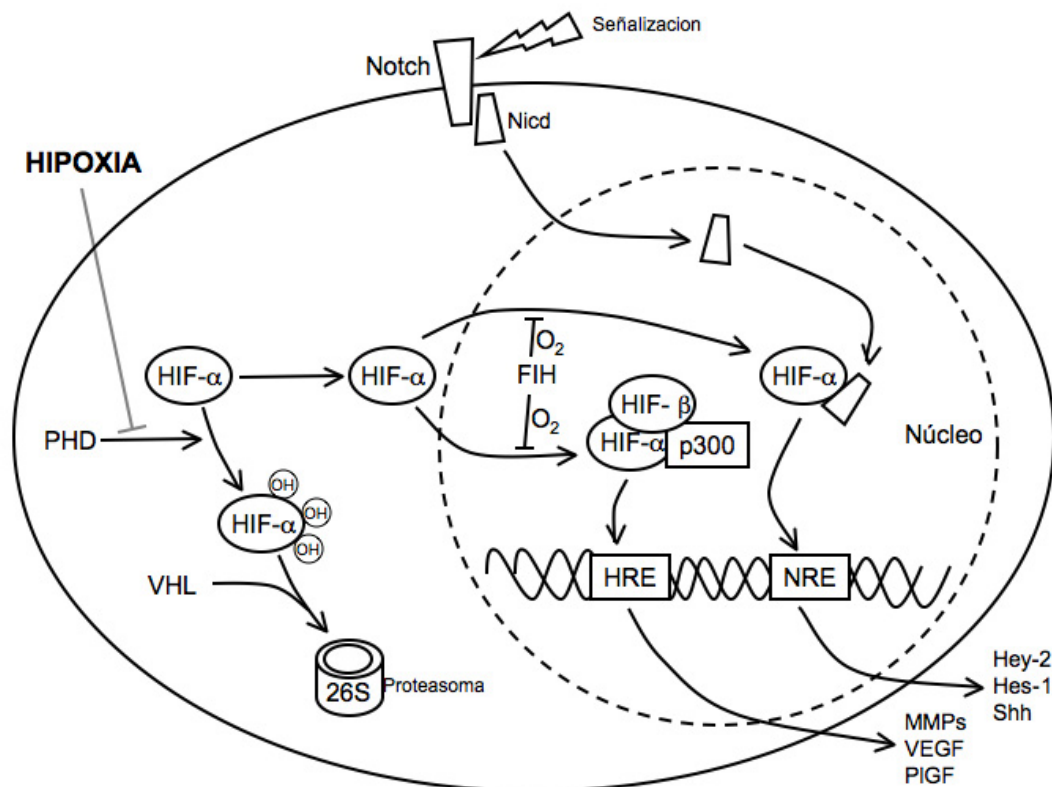
Translocator). La vida media de las subunidades  $\alpha$  viene regulada por la concentración de  $O_2$  (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2006).

La subunidad HIF-1 $\alpha$  se expresa en prácticamente todos los tipos celulares estudiados hasta el momento, mientras que, su homóloga HIF-2 $\alpha$  ha sido encontrada sólo en determinados tipos, como son células endoteliales, células del parénquima de hígado y células intersticiales de los riñones, entre otros (Haase, 2006; Rankin y cols., 2007). Experimentos de eliminación de genes llevados a cabo en ratones mostraron como tanto la subunidad 1 $\beta$ , como las subunidades 1 $\alpha$  y 2 $\alpha$  son imprescindibles para el desarrollo y supervivencia del animal (Ramírez-Bergeron y Simon, 2001), siendo el fenotipo de cada *knockout* diferente. HIF-3 $\alpha$ , por su parte, presenta diferentes modificaciones postranscripcionales y parece tener cierta actividad inhibitoria de HIF-1 $\alpha$  (Bárdos y Ashcroft, 2005).

En condiciones de oxigenación normales (entre el 10 y el 21% de  $O_2$ ), la subunidad HIF-1 $\alpha$  presenta una vida media extremadamente corta (menos de 5 minutos al 21% de  $O_2$ ). En estas condiciones es hidroxilada por parte del enzima PHD (Prolyl Hydrolase Domain Protein) en sus residuos P402 y P564, ambos localizados en los llamados Dominios de Degradación Dependiente de Oxígeno (ODDDs) (Ke y Costa, 2006). Estas modificaciones permiten que la subunidad sea reconocida por el complejo VHL (Von Hippel-Lindau protein) y degradada por el proteasoma 26S. Otro mecanismo de inhibición de la ruta HIF en condiciones de oxigenación normales es la hidroxilación de HIF-1 $\alpha$  en su residuo Asn 803 por parte del enzima FIH-1 (Factor Inhibiting Hypoxia Inducible Factor-1). Esta modificación inhibe la actividad transcripcional del HIF-1, impidiendo su unión al coactivador p300/CBP (Peet y Linke, 2006).

Cuando la concentración de  $O_2$  es menor estos mecanismos de inhibición y degradación del HIF-1 $\alpha$  se ven bloqueados y éste es capaz de translocarse al núcleo e interactuar con una subunidad HIF-1 $\beta$  y con el factor p300/CBP (Figura 1). Este complejo multiprotéico puede unirse a secuencias de DNA llamadas HRE (Hypoxia Regulated Elements), presentes en los promotores y potenciadores de determinados genes diana, promoviendo su expresión (Peet y Linke, 2006). Uno de los genes que ve aumentada su expresión mediante este mecanismo es el VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Se trata de un potente mitógeno endotelial de gran permeabilidad que posee diferentes funciones biológicas. De él existen diversas isoformas, siendo la más frecuente en humano VEGF165 (Breen, 2007). Uno de los mecanismos de regulación de este factor consiste en la reducción de su accesibilidad a las células. En ratón las variantes largas VEGF188 y 164 presentan en su región C-terminal unos motivos de unión a la heparina que anclan el factor a la matriz extracelular, siendo por el contrario VEGF120 una variante más corta que difunde libremente (Lundkvist y cols., 2007). Durante el desarrollo puede detectarse la expresión de VEGF en numerosos tejidos embrionarios, siendo sus niveles máximos en pulmón, riñón y corazón. Este factor de crecimiento también se expresa en el tejido placentario, aumentando esta expresión a medida que avanza la gestación. Hasta el momento han sido descritos tres receptores de VEGF, Flt-1 (o VEGFR1), KDR (o VEGFR2) y Flt-4 (o VEGFR3) (Clarck y cols., 1996).

También han sido descritos dos correceptores Neuropilin 1 y 2, resultando la inhibición de la expresión de cualquiera de estos genes letal para el embrión. Se postula que la señal de VEGF se transduce a través del receptor KDR, actuando Flt-1 como una “reserva” de ligandos de VEGF (revisado por Roskoski, 2008).



**Figura 1.** Regulación de la expresión génica por el complejo HIF. En condiciones de baja oxigenación los mecanismos de degradación de HIF-1 $\alpha$  se ven inhibidos acumulándose el mismo en el citoplasma. Este factor es capaz de translocarse al núcleo donde forma el complejo HIF-1 $\alpha$ /1 $\beta$ /p300 que se une a determinados promotores diana (HRE, Hipoxia Response Elements) induciendo la expresión de genes relacionados con el metabolismo, ciclo celular y diferenciación. Otro mecanismo de actuación del factor HIF-1 $\alpha$  es su unión a Nicd, fragmento citoplásmico del receptor Notch. El complejo Nicd/HIF-1 $\alpha$  es capaz de estimular de manera similar al HIF-1 $\alpha$ /1 $\beta$ /p300, la expresión de genes con unas secuencias en sus promotores llamadas NRE (Notch Response Elements).

El complejo HIF también lleva a cabo la regulación por medio de interacciones con la vía de señalización de la proteína Notch (Figura 1). La proteína Notch es un receptor transmembrana que presenta, además de una región extracelular, un dominio intracelular (Nicd, Notch intracellular domain) y su activación regula la transcripción de genes implicados en la diferenciación celular (Iso y cols., 2003). Tras unirse a su receptor Nicd se libera al citoplasma celular, pudiendo interactuar con HIF-1 $\alpha$ . Ambos forman un complejo que es capaz de unirse a las secuencias NRE (Notch Response Elements) e inducir, de manera similar al complejo HIF-1 $\alpha$ -1 $\beta$ -p300/CBP, la expresión de determinados genes diana. Las secuencias NRE aparecen en numerosos genes relacionados con la diferenciación, como son Hes3 (Hairy and enhancer of split 3) y Shh (Sonic hedgehog). Estos dos genes, por ejemplo, han mostrado favorecer la supervivencia de las células madre neuronales (Sainson y Harris, 2006).

Otra de las respuestas celulares a la hipoxia es la expresión de factores que provocan el arresto del ciclo celular y la disminución del crecimiento. Ambos procesos son regulados por los factores de transcripción de la familia Myc. Esta familia está constituida por 4 miembros en mamíferos (c-Myc, N-Myc, L-Myc y S-Myc), todos ellos relacionados con multitud de procesos celulares, como proliferación celular, angiogénesis, inestabilidad genómica e inhibición de la diferenciación celular (Meyer y Penn, 2008). Cuando las células se encuentran en un ambiente bien oxigenado, Myc inhibe la expresión de la ciclina quinasa dependiente p21. Al reducirse la concentración de  $O_2$ , el complejo HIF-1 $\alpha$  compite con Myc por sus lugares de unión a los promotores, dando como resultado una inducción de la expresión de p21, que conduce al arresto celular (Goda y cols., 2003). De hecho la mera sobreexpresión de HIF en condiciones normales es suficiente para inducir la expresión de p21 (Koshiji y cols., 2004). No está claro, sin embargo, que esta inducción sea dependiente de la unión de HIF-1 $\alpha$  al DNA, pudiendo tratarse de una nueva actividad del factor.

HIF-1 $\alpha$  también puede bloquear la unión de Myc al DNA de manera directa, uniéndose tanto a él como a sus cofactores Max y Sp1 en células sometidas a hipoxia (Koshiji y cols., 2004). Esta unión impide la formación del complejo Max-Myc y su posterior unión al DNA, reduciendo la expresión de sus genes diana. De manera indirecta HIF también interrumpe la función de Myc mediante la inducción de su antagonista Mxi. Este mecanismo también resulta en una reducción en la expresión de los genes diana de Myc e incluso inhibe la transformación celular (Hurlin y Huang, 2006).

En contraposición con HIF-1 $\alpha$ , se ha demostrado que HIF-2 $\alpha$  promueve la actividad de Myc en numerosas líneas celulares. Mediante la estabilización del complejo Max-Myc. HIF-2 $\alpha$  es capaz de transformar una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón (Gordan y cols., 2007). Estos mecanismos de inducción de la actividad de Myc podrían ser la causa de la restringida expresión de HIF-2 $\alpha$ .

### 3.- LA HIPOXIA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

El interés por el efecto de la concentración de  $O_2$  sobre el desarrollo embrionario nace del deseo de mejorar las condiciones de cultivo *in vitro* de embriones. Fue entonces cuando se comprobó que el desarrollo ex-útero de embriones de rata a altas concentraciones de  $O_2$  (20 y 40%  $O_2$ ) conducía a la formación defectuosa del pliegue neural. Sin embargo, al realizar el mismo experimento en condiciones de hipoxia (5 y 10%  $O_2$ ), más similares al ambiente en el interior del cuerno uterino, los embriones se desarrollaban con normalidad (Morriss y New, 1979). Desde estos primeros ensayos han sido numerosos los estudios que han puesto en evidencia la relación directa entre las variaciones en la concentración de  $O_2$  y la proliferación y diferenciación de diferentes poblaciones de células madre embrionarias. La concentración de  $O_2$  más adecuada para el desarrollo *in vitro* de embriones de mamífero parece ser del 5%, este es el caso de los embriones de ratón (Quinn y cols., 1978), conejo (Li y Foote, 1993), oveja (Bernardi y cols., 1996) y cabra (Batt y cols., 1991). El



crecimiento en este ambiente hipoxico tiene repercusión en el metabolismo embrionario. De esta manera antes de establecerse el sistema sanguíneo el embrión obtiene la energía a partir de la glicólisis anaerobia. Una vez establecida la circulación corioalantoica y al aumentar la disponibilidad de O<sub>2</sub> y nutrientes provenientes de la madre se reduce drásticamente la dependencia de la glicólisis y comienza a obtenerse energía a partir de la fosforilación oxidativa (Svensson y cols., 1992). Estas observaciones son coincidentes con la hipótesis de que los gradientes de O<sub>2</sub> son un componente más de los nichos de las células madre, ya sean estas embrionarias o del adulto (Dellatore y cols., 2008).

A continuación se ilustra la importancia de esta regulación por medio de 3 ejemplos de desarrollo embrionario.

### 3.1.- Formación del sistema vascular del embrión.

La vascularización o formación de nuevos vasos sanguíneos en el embrión puede darse mediante dos procesos diferentes, denominados vasculogénesis y angiogénesis.

El primero de ellos, la angiogénesis supone la formación de nuevos vasos a partir de la red vascular preexistente y es un proceso normal durante el crecimiento y desarrollo, así como en la cicatrización de heridas. Han sido propuestos tres mecanismos por los que pueden formarse estos nuevos vasos: por gemación, por inserción de tejido intersticial en la luz de un vaso preexistente o por formación de puentes interendoteliales (Velazquez, 2007; Carmeliet y Jain, 2000).

El proceso de vasculogénesis fue descrito por primera vez al ser observada la formación de nuevos vasos en cuerpos embrioides e implica la diferenciación *in situ* de un precursor de las células endoteliales llamado angioblasto (Kaßmeyer, 2008).

Estos dos procesos de formación de nuevos vasos son difícilmente diferenciables, debido, entre otras razones, a que los factores implicados son los mismos en ambos casos. Experimentos empleando precursores de las células endoteliales marcados han mostrado que en el animal adulto también tienen lugar ambos procesos simultáneamente (Asahara y cols., 1997).

En el embrión, el desarrollo del sistema vascular comienza con la formación de los islotes sanguíneos en la pared del saco vitelino. En este momento el embrión ha alcanzado un tamaño demasiado grande como para que el O<sub>2</sub> y los nutrientes lleguen a todas las células mediante procesos de difusión. Las células fundadoras de estos islotes son los hemangioblastos, los cuales poseen una capacidad de desarrollo bi-potencial, ya que pueden originar tanto células endoteliales como hematopoyéticas (Sabin, 1920). Una vez comprometidas a uno de estos dos destinos celulares, las células hijas pierden dicha potencialidad y en adelante solo pueden dar lugar a uno de dos tipos celulares. Los hemangioblastos se caracterizan por expresar gran número de genes relacionados con las rutas del HIF, como son CD31 (Watt y cols., 1995), Flk-1

(Yamaguchi y cols., 1993), Flt-1 (Millauer y cols., 1993) y Tie-2 (Sato y cols., 1995).

Actualmente, existe una gran controversia en cuanto al posible papel de la concentración de O<sub>2</sub> en la regulación de la diferenciación vasculogénica. Anderson-Berry y cols. (2005), sostienen que no es la concentración de O<sub>2</sub>, sino factores genéticos los que determinan dicha diferenciación. Sin embargo, diversos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, apoyan el hecho de que una menor concentración de O<sub>2</sub> favorece la diferenciación de precursores vasculares a células endoteliales. Experimentos en los que se tomaron células ES normales y *knockout* para el gen HIF-1 $\alpha$ , mostraron como al eliminar este gen, la capacidad de dar lugar células Flk1 positivas se reducía drásticamente (Ramirez-Berengon y cols., 2004).

La ruta de la angiopoyetina (Ang) y su receptor Tie-2 es también predominante en las células endoteliales. Hasta la fecha han sido descritos 3 miembros de la familia de las angiopoyetinas (Ang-1, -2, -3, y -4), teniendo todas ellas como ligando el receptor tirosina quinasa Tie-2. Ratones deficientes en Ang-1 o Tie-2 mueren en estadios embrionarios (entre E9.5 y E12.5) debido a defectos en el desarrollo de su sistema cardiovascular. Sin embargo se ha observado que no presentan alteraciones en el proceso de vasculogénesis, por lo que el principal motivo de su muerte parece ser únicamente la incapacidad de sus células endoteliales de anclarse a la matriz extracelular (Schnurch y cols., 1993). Este resultado muestra que si bien la ruta Ang-1/Tie-2 parece no ser imprescindible para que se dé el proceso de diferenciación endotelial, si lo es para aspectos como la migración y maduración del sistema vascular del embrión. Por su parte Ang-2 ha mostrado tener un efecto contrario al sistema Ang-1/Tie-2, mostrando los ratones que sobreexpresaban este factor un fenotipo similar a los Ang-1/Tie-2 *knockout* (Maisonpierre y cols., 1997).

La remodelación de la matriz extracelular también es de gran importancia durante la formación del sistema vascular. Para que un tejido o grupo de células pueda invadir otro tejido, como ocurre durante el crecimiento de los vasos, es necesaria la modificación de la matriz extracelular, no sólo con el fin de permitir el paso de las células, sino también crear un microambiente capaz de favorecer la invasión y supervivencia de las células endoteliales (Stupack y Cheresh, 2002). Este proceso implica la expresión y activación de numerosos factores de crecimiento, proteasas de la matriz e inhibidores de las mismas (Ryu y cols., 2005). En el embrión existen otros mecanismos proteolíticos de gran importancia en el crecimiento de los vasos, como son el sistema plasmina/plasminógeno, uPA/uPAR (urokinase-type plasminogen activator) y metaloproteasas de la matriz (MMPs). Las MMPs son un grupo de más de 25 miembros descritos de endopeptidasas dependientes de zinc capaces de degradar numerosos componentes de la matriz extracelular. Todas ellas son secretadas como pro-enzimas latentes que necesitan ser procesadas proteolíticamente antes de ser activas. Estos enzimas son absolutamente necesarios para el proceso de la formación del sistema vascular, sin embargo, por lo general los ratones *knockout* para alguno de estos genes no presentan

defectos en el proceso angiogénico, al compensar las demás MMPs la función de la eliminada.

Concretamente MMP-2, y -9 y MT1-MMP son las proteasas cuya función está más relacionada con el proceso angiogénico. La MT1-MMP fue la primera metaloproteasa de la matriz anclada a la membrana celular que fue descrita. Su eliminación conduce a severos defectos en el proceso angiogénico, sin embargo un análisis detallado sugirió que esta MMP no era necesaria durante el desarrollo embrionario (Filippov y cols., 2005). Experimentos empleando geles de fibrina mostraron la importancia de las MMPs, particularmente MT1-MMP para que las células endoteliales fueran capaces de migrar a través de ellos (Hiraoka y cols., 1998).

Un experimento realizado con embriones de pollo empleó una versión mutante para el colágeno tipo I, en el cual el lugar de corte por parte de la MMP-2 había sido modificado. Estos animales mostraron incapacidad de llevar a cabo la neovascularización embrionaria, demostrando la importancia de esta collagenasa en dicho proceso. MMP-7 por su parte ha mostrado capacidad de aumentar la expresión de otras dos MMPs, la -1 y la -2, en células endoteliales, y de esta manera, la angiogénesis *in vivo* (Nishizuka y cols., 2001).

Además de degradar la matriz extracelular y activar otras proteasas, las MMPs también están encargadas de aumentar la accesibilidad de determinadas citocinas y factores. La MMP-9 tiene, por ejemplo, capacidad de aumentar la cantidad de VEGF bio-accesible por medio de la digestión de heparán sulfato en determinados modelos experimentales, siendo este mecanismo probablemente también de importancia durante el desarrollo (Hawinkels y cols., 2008).

### 3.2.- Desarrollo placentario.

Otro ejemplo de regulación del desarrollo por hipoxia lo representan las células madre del trofoblasto y su invasión del tejido materno durante la implantación del blastocisto. Las células del trofoblasto son las primeras en diferenciarse durante el desarrollo embrionario, apareciendo en humano en el quinto día tras la concepción, cuando el embrión alcanza el estadio de blastocisto. La circulación placentaria no se establece en humano hasta pasadas entre 8 y 12 semanas de gestación (Jauniaux y cols., 2001) y por lo tanto la adquisición del fenotipo invasivo por parte de las células trofoblásticas se lleva a cabo en condiciones de hipoxia. Existe una gran controversia en lo relativo al aumento o descenso de la capacidad invasiva del trofoblasto a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> (Genbacev, 1997; Kilani y cols., 2003, Zhou y cols., 1998). No obstante, se ha demostrado como la eliminación de genes relacionados directamente con la respuesta a la hipoxia, como pVHL, HIF- $\beta$ , HIF-1 $\alpha$  y -2 $\alpha$  provocan un desarrollo defectuoso de la placenta.

Uno de los mecanismos estudiados en la invasión trofoblástica implica al factor uPA, que es secretado como un proenzima inactivo y sólo es activado tras su unión a un receptor específico. La unión entre ambos es capaz de desencadenar la conversión de plasminógeno a plasmina. Esta molécula es

capaz de degradar numerosos componentes de la matriz extracelular, así como de activar factores de crecimiento y metaloproteasas, procesos todos ellos relacionados con la invasión celular (Saksela y cols., 1985; Petersen y cols., 1988; Mayer, 1990).

Ensayos *in vitro* con células trofoblásticas, como la línea celular HTR8/SVneo, mostraron como su capacidad invasiva a través de Matrigel aumentaba si las condiciones de cultivo comprendían un 1% de O<sub>2</sub> en lugar del 20% habitual (Fitzpatrick y Graham., 1998). En este caso puede observarse como además los niveles de PAI-1, regulador a su vez de uPAR, incrementaban en condiciones de hipoxia.

### 3.3.- Desarrollo del riñón y regulación de la eritropoyésis.

El desarrollo del riñón ha mostrado ser sensible a las variaciones en la concentración de O<sub>2</sub> tanto *in vivo* como *in vitro* (Bernhardt y cols., 2006; Freiburg y cols., 2003). Sin embargo, hasta el día de hoy no ha sido estudiado su desarrollo en animales *knockout* para el gen HIF-1 $\alpha$ . En el riñón en desarrollo HIF-1 $\alpha$  muestra un patrón de localización específico de tipo celular y estadio, colocalizándose con la expresión de otros factores de gran importancia durante el desarrollo vascular, como puede ser VEGF (Warnecke y cols., 2006). La localización de HIF-1 $\alpha$  es alta en los conductos recolectores corticales y medulares y en las células glomerulares. HIF-2 $\alpha$ , por su parte se detecta en podocitos y en las células endoteliales, corticales y medulares. Además, ensayos de expresión génica han mostrado una posible actividad reguladora negativa de HIF-3 $\alpha$  sobre los anteriormente citados HIF-1 $\alpha$ , y -2 $\alpha$ , (Hara y cols., 2001). Dado su diferente patrón de expresión y teniendo en cuenta que las células glomerulares expresan uno u otro factor dependiendo del día de desarrollo, se cree que el papel de cada uno de ellos en el desarrollo de este órgano es diferente.

El riñón juega un papel muy importante en la eritropoyésis, sirviendo de sensor de O<sub>2</sub> y respondiendo a la hipoxia con un rápido aumento en la producción de eritropoyetina (EPO) por parte de las células renales intersticiales (Fandrey, 1993). Esta expresión parece estar regulada por HIF-2 $\alpha$ , ya que ambos genes aparecen colocalizados en dichas células (Scortegagna y cols., 2005). La producción de EPO no es exclusiva del riñón, sin embargo, en casos de fallo renal esta producción no puede ser compensada por el hígado y otros órganos, lo que deriva en anemia. Esta capacidad del HIF de inducir la generación de EPO, y por lo tanto, favorecer la producción de eritrocitos está siendo estudiada como posible diana para el tratamiento de la anemia. Rankin y cols. (2005 y 2007) mostraron como la inhibición de pVHL en hepatocitos, y por lo tanto la degradación de HIF-1 $\alpha$  y -2 $\alpha$ , inducía en ratones un aumento en la concentración de EPO y número de eritrocitos circulantes, mientras que la inhibición de HIF-2 $\alpha$ , pero no de HIF-1 $\alpha$  restauraba los valores normales. En humanos el uso de inhibidores farmacológicos del complejo HIF ha mostrado su capacidad no solo de elevar la producción de EPO y favorecer la eritropoyésis, sino también de aumentar el metabolismo y captación de hierro (revisado por

Jelkmann, 2007). Este efecto es debido a la regulación tanto de la expresión de transferrina y como de su receptor por parte de HIF.

#### 4.- HIPOXIA Y CANCER.

En contraste con la precisa regulación de HIF en el embrión, los tumores presentan una vascularización caótica (Konerding y cols., 1995) provocando la aparición de regiones hipóxicas junto a otras bien oxigenadas. La consiguiente estabilización de HIF-1 $\alpha$  estimula la progresión tumoral mediante la inducción de la expresión de determinados genes, entre los que se encuentran reguladores del metabolismo e incorporación al interior celular de glucosa (GLUT1, 6-fosfofructoquinasa 1 y piruvato dehidrogenasa quinasa), angiogénesis (VEGF, platelet derived growth factor, platelet-derived growth factor (PDGF) y connective tissue growth factor), enzimas relacionadas con la remodelación de la matriz extracelular (MMPs, lysyl oxidase), con la quimiotaxis (stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) y su receptor C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4)) y con la proliferación y supervivencia celular (transforming growth factor alfa (TGF- $\alpha$ ), epidermal growth factor receptor (EGFR)) (Papandreou y cols., 2006; Muñoz-Nájjar y cols., 2006; Erler y cols., 2006; Zagzag y cols., 2006; Francovic y cols., 2007). HIF-1 $\alpha$  también está relacionado con la regulación de la expresión de receptores de membrana como son las integrinas, responsables de la interacción celular con la matriz extracelular y cadherinas, relacionadas con la unión intercelular (Sullivan y Graham, 2007). La inhibición de la expresión de E-cadherina combinada con la sobreexpresión de N-cadherina ha mostrado ser la responsable de la desintegración del tejido necesaria para que se de la metástasis.

Como ya se ha mencionado anteriormente, c-Myc e HIF muestran en numerosos procesos actividades opuestas, especialmente en la angiogénesis y la tumorigénesis. En lo que a esta última se refiere, HIF-1 $\alpha$  ha mostrado ser esencial en aquellos procesos tumorigénicos mediados por c-Myc (Dang y cols., 2008). Mediante el análisis detallado de células con elevada expresión de c-Myc se ha observado que HIF y c-Myc pueden cooperar en el aumento de la expresión de genes diana comunes, como son VEGF, HK2 (Hexokinase 2) y PBK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1) (Kim y cols. 2007). Estas observaciones revelan una interacción compleja entre ambos factores, que parece ser fuertemente dependiente del contexto en el que se encuentre la célula.

A lo largo de la última década ha sido demostrada la relación entre alteraciones en la ruta de señalización de HIF y la capacidad de formar tumores o tumorigenicidad. Kim y Kaelin observaron que el hecho de portar mutaciones que inactivan el enzima VHL desencadena la aparición de múltiples tipos de tumor en el adulto, como hemanangioblastomas y tumores de riñón entre otros (Kim y Kaelin, 2004). Esta tumorigenicidad parece ser debida a la acumulación tanto de HIF-1 $\alpha$ , como de -2 $\alpha$ . Estudios realizados con líneas celulares VHL-/- de carcinoma renal humano han mostrado una reducción de la tumorigenicidad en ratones desnudos al ser restablecida la actividad VHL en ellas. Estas mismas

células adquirieron así mismo la capacidad de diferenciarse en cultivo (Lieubeau-Teillet y cols., 1998).

#### 4.1.- Supervivencia celular.

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo que puede ser activado en condiciones fisiológicas normales como defensa frente a la transformación tumoral. En este contexto se ha demostrado la capacidad de las bajas concentraciones de O<sub>2</sub> de inducir la apoptosis en células tumorales. Sin embargo, cuando se dan alteraciones génicas, como son la expresión de una variante defectuosa del gen supresor de tumores p53 o la sobreexpresión del inhibidor de apoptosis Bcl-2, ésta capacidad de llevar a cabo el proceso de apoptosis se reduce drásticamente. Las células resistentes a las condiciones hipóxicas son seleccionadas y pronto son mayoritarias en el tumor. Estas células insensibles a la apoptosis son, además, más resistentes al tratamiento con radio y quimioterapia (Lotem y Sachs, 1993; Graeber y cols., 1996).

#### 4.2.- Invasión de tejidos adyacentes.

La capacidad de algunas células tumorales de crecer a bajas concentraciones de O<sub>2</sub> (fenómeno mencionado en el apartado anterior) favorece la selección de aquellas que han desarrollado mecanismos de resistencia a la apoptosis, así como de otras con una mayor capacidad de migración e invasión que son capaces de alcanzar zonas con mayor presión de O<sub>2</sub>. Estos hechos derivan en un aumento del fenotipo maligno del tumor, lo cual implica un peor pronóstico (Hockel y Vaupel, 2001).

Los estudios realizados hasta el momento sobre este tema han identificado diversos factores implicados en el proceso invasivo, cuya expresión se ve alterada en condiciones de hipoxia. Estos factores incrementan capacidad de migración e invasión de las células tumorales facilitando procesos como la adhesión, la organización del citoesqueleto, la degradación de la matriz extracelular y/o la expresión de receptores para factores de crecimiento. El HIF-1 $\alpha$  se encuentra entre los factores inducidos por la hipoxia que se asocian a una mayor invasión tumoral y un peor pronóstico en varios carcinomas (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2006), si bien, en ocasiones el aumento de la invasión tumoral inducida por la hipoxia es independiente de HIF-1 $\alpha$  (Miyoshi y cols., 2006).

Son varios los autores que han confirmado la hipótesis de la importancia del complejo formado por las subunidades 1 $\alpha$  y 1 $\beta$  en la regulación del cáncer. Por un lado ensayos en los que se empleó un modelo de fibrosarcomas subcutáneos deficientes en HIF-1 $\alpha$  demostraron la importancia de la ruta HIF en el aumento de la malignidad inducida por hipoxia. En estos ensayos las células HIF-1 $\alpha$ -/- mostraron un crecimiento más lento que las que si expresaban HIF-1 $\alpha$  (Ryan y cols., 2000). Experimentos similares, mostraron que células de hepatoma deficientes en HIF-1 $\beta$  trasplantadas en ratones inmunocomprometidos presentaban una disminución considerable del

crecimiento tumoral en comparación con los trasplantes en los que se usaron células HIF-1 $\beta$  positivas (Maxwell y cols., 1997).

Uno de los procesos fundamentales para la invasión tumoral es la degradación de la matriz extracelular. Existen varios estudios que demuestran el papel de la hipoxia en la remodelación de la matriz extracelular mediante el aumento de la expresión de enzimas proteolíticas. En estudios realizados *in vitro* con carcinoma de colon se ha observado un aumento de la expresión de catepsina D, MMP-2 y uPAR en condiciones de hipoxia, acompañado de un incremento de su capacidad de invasión en matrices de matrigel (Krishnamachary y cols., 2003). Dicho aumento de la invasión tumoral podía ser bloqueado mediante el uso de RNA interferente contra HIF-1 $\alpha$  o mediante anticuerpos bloqueantes de uPAR. HIF-1 $\alpha$  también se ha asociado con una mayor expresión de uPAR en carcinoma mamario (Graham y cols., 1999) y adenocarcinoma pulmonar. En este último, además, se ha observado un aumento de la expresión de MMP-1, el cual a su vez provoca un incremento en la actividad de MMP-2 (Shyu y cols., 2007). En el caso del carcinoma pancreático HIF-1 $\alpha$  también favorece la invasión tumoral mediante la inducción en este caso de la expresión de MMP-2, MMP-7 y MT1-MMP (Ide y cols., 2007). Sin embargo, en células de hepatoma, si bien la hipoxia también induce la expresión de MMP-7 y MT1-MMP, ésta se produce de un modo independiente del HIF-1 $\alpha$  (Miyoshi y cols., 2006). En otros casos, como el del carcinoma ovárico, la actividad de MMP-2 es inducida por hipoxia pero no se asocia con un aumento de la invasión, sino con un incremento de la actividad heparanasa (He y cols., 2004).

Otro de los mecanismos mediante los cuales la hipoxia regula la invasión celular es modulando la expresión por parte de las células tumorales de factores implicados en la migración, tales como el citoesqueleto, las integrinas o agentes quimioatrayentes. La inhibición de GSL-3 en células de carcinoma mamario sometidas a hipoxia provoca la estabilización de microtúbulos implicados en el tráfico de vesículas en el citoplasma mediado por Rab-11. De este modo se desencadena un aumento en la concentración de integrinas en la membrana, fenómeno que se asocia con una mayor capacidad de invasión (Yoon y cols., 2005). En el caso del carcinoma de colon la estabilización de HIF-1 $\alpha$  provoca un aumento en los niveles de expresión de vimentina y de las keratinas 14, 18 y 19, además de factores implicados en la migración, como TGF- $\alpha$  o el factor autocrino de motilidad (Krishnamachary y cols., 2003). La expresión del gen CXCR4 también está regulada por HIF-1 $\alpha$  y asociada con una más rápida progresión tumoral y con la formación de metástasis. CXCR4 es el receptor derivado de las células del estroma SDF-1, que ha sido identificado como un potente agente quimioatrayente en procesos de migración celular.

#### 4.3.- Vascularización tumoral.

No cabe ninguna duda de que la formación de nuevos vasos juega un papel crucial en diferentes condiciones patológicas (Folkman, 1995), particularmente en el crecimiento de los tumores sólidos y en su metástasis (Folkman y cols., 1989; Millauer y cols., 1994). Para llevar a cabo esta neo-vascularización han sido descritos varios mecanismos:

#### 4.3.1.- Angiogénesis.

La angiogénesis es el mecanismo de formación de vasos en los tumores mejor conocido, y único hasta hace poco y fue descrito en los años 70 por Ausprunk y Folkman (Ausprunk y Folkman, 1977). Dicho proceso consiste en la vascularización a partir de brotes surgidos de los vasos del pre-existentes del huésped portador del tumor. El tejido tumoral avascular secreta factores vasodilatadores y pro-angiogénicos como VEGF y VPF (Vascular Permeability Factor), provocando así una redistribución de los receptores de membrana CD31 y (VE)-cadherin en las células endoteliales de los vasos del huésped adyacentes que en consecuencia se vuelven dilatados y frágiles. A continuación se produce una remodelación de la matriz extracelular mediada por MMPs y el sistema uPA, así como la proliferación y migración de las células endoteliales. Este proceso invasivo se encuentra mediado por multitud de factores, como TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor), TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) y PDGF (Platelet-derived Growth Factor). Una vez formada la red vascular en el interior del tejido tumoral, los vasos “maduran”, recubriéndose de pericitos y células de músculo liso (Carmeliet, 2005), aunque nunca llegan a adquirir la arquitectura típica de la de los tejidos normales.

#### 4.3.2.- Incorporación de vasos del huésped.

Otro mecanismo de vascularización tumoral es la incorporación de capilares del huésped sin mediar en este caso el proceso angiogénico (Thompson y cols., 1987). Esta posibilidad parece limitarse a los estadios iniciales de crecimiento tumoral (Holash y cols., 1999), aunque se ha observado que algunos tipos de tumor humanos, como el melanoma cutáneo muestran evidencias de que esta opción podría alargarse durante todas las fases de crecimiento del tumor primario (Döme y cols., 2002). La persistencia de los vasos del huésped incorporados al tumor está relacionada con la capacidad del mismo de evitar la muerte, bien sea por apoptosis o por necrosis, de las células endoteliales. Dicha supervivencia depende del microambiente tumoral y de la presencia o no de pericitos, así como de determinadas citocinas y proteínas de la matriz extracelular, siendo por lo tanto el mantenimiento de estos vasos fuertemente dependiente del tipo de tumor que se trate (Holash y cols., 1999).

#### 4.3.3.- Vasculogénesis.

El proceso vasculogénico en el individuo adulto implica la movilización de precursores endoteliales (Endothelial Precursor Cell, EPC) provenientes de la médula ósea, inducida por la secreción de determinadas citocinas. El factor implicado cuyo mecanismo ha sido más ampliamente estudiado es el VEGF. Durante la progresión tumoral ha sido descrito un aumento en la cantidad de VEGF circulante, estando dicha concentración directamente relacionada con el número de EPCs liberados. Por su parte Ang-1 tiene un efecto contrario, reduciendo el número de precursores movilizados (Garmy-Susini y Varner, 2005). El mecanismo mediante el cual los EPCs “anidan” en el tejido diana aún no se comprende en su totalidad, pero parece claro que es necesaria la



expresión de moléculas de adhesión por parte de las células tumorales capaces de captar a las células circulantes. Aún resta por conocer la contribución relativa de la vasculogénesis a la formación de vasos en los tumores y si es esencial para el crecimiento tumoral, y por lo tanto, una posible diana terapéutica.

#### 4.3.4.- Mimetismo vascular.

El mimetismo vascular (del inglés *vascular mimicry*) fue descrito por primera vez en melanoma (Maniotis y cols., 1999). Se observó cómo las células de éste tipo de tumor eran capaces, tanto *in vitro* como *in vivo*, de formar canales que imitaban el patrón de las redes vasculares embrionarias e incluso se fusionaban con el sistema vascular del huésped. Posteriormente el mimetismo vascular ha sido descrito en varios tipos de tumor, como por ejemplo el carcinoma pulmonar (Passalidou y cols., 2002), de próstata (Sharma y cols., 2002), ovárico (Sood y cols., 2001) y de mama (Shirakawa y cols., 2001).

La conjunta pero desorganizada colaboración de todos estos procesos de formación de vasos conduce al establecimiento de una red vascular defectuosa y caótica, nuevas zonas hipóxicas en el tumor y por lo tanto la aparición de células cancerosas más agresivas. Además la fragilidad de los vasos presentes en los tumores aumenta el riesgo de que éstos puedan dar lugar a metástasis. Estas alteraciones observadas en los vasos tumorales derivan en un riego sanguíneo deficiente, que causa una menor accesibilidad de los agentes quimioterapéuticos suministrados por esta vía y una menor efectividad de la radioterapia, técnica basada en la producción de especies reactivas de O<sub>2</sub> en el tejido transformado.

#### 4.4.- Agentes anti-angiogénicos como tratamiento del cáncer.

En los últimos años han sido desarrollados numerosos agentes antitumorales cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la invasión mediante el bloqueo de la vascularización. Algunos de ellos son, Sunitinib, Bevacizumab, Sorafenib y Temsirolimus.

Sunitinib es una molécula de pequeño tamaño con un fuerte efecto inhibitorio de los receptores de VEGF, Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3), cKit y PDGF (platelet-derived growth factor). La potente inhibición de estos receptores y los consecuentes efectos antiangiogénicos han sido testados tanto *in vitro* como en modelos murinos, siendo su eficacia probada en algunos cánceres humanos, como el carcinoma renal (Hiles y Kolesar, 2008) y el tumor del estroma gastrointestinal (Rini, 2007).

El mecanismo de acción del Bevacizumab es el bloqueo del VEGF circulante. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce VEGF. Este anti-angiogénico fue desarrollado por los laboratorios Avastin y ha mostrado una reducción de la densidad de vasos sanguíneos en los tumores tratados, siendo sus efectos secundarios mínimos. Al neutralizar la actividad biológica del VEGF se reduce la vascularización de los tumores y, por tanto, se inhibe el crecimiento del tumor. Ha sido demostrada su eficacia en cáncer colorectal metastático

(Lemmens y cols., 2008), cáncer pulmonar de células no pequeñas (Di Costanzo y cols., 2008) y cáncer de mama (Sachdev y cols., 2008).

Sorafenib es un compuesto originalmente desarrollado como inhibidor de las RAF quinasas con el objetivo de reducir la proliferación de las células tumorales. También bloquea la actividad de algunos receptores tirosin quinasa de gran importancia durante la angiogénesis, como son Flt-1, KDR y Flt-3 (Ng y Chen, 2006). La combinación de ambos efectos convierte a Sorafenib en un agente de gran relevancia en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como cáncer pulmonar de células no pequeñas (Blumenschein, 2008), cáncer renal (Wood y Manchen, 2007), melanoma metastásico (Egberts y cols., 2008) y carcinoma hepatocelular (Simpson y Keating, 2008).

Temsirolimus es un éster de rapamicina que inhibe de forma selectiva la quinasa mTOR (Mammalian target of rapamycin) y en consecuencia bloquea la traducción de factores implicados en la regulación del ciclo celular y previene la sobreexpresión de factores pro-angiogénicos. El empleo de este compuesto ha permitido un mayor conocimiento de la importancia de la ruta de señalización PI3K/AKT/mTOR en la regulación del metabolismo y ciclo celular de las células cancerígenas y endoteliales. Este compuesto ha mostrado ser eficaz tanto en experimentos llevados a cabo con líneas celulares *in vitro* como efecto citostático en tumores xenotrasplantados (Ma y Jimeno, 2007).

## 5.- CONCLUSIONES Y FUTURO.

Desde que los primeros estudios sobre el efecto de la concentración de O<sub>2</sub> sobre el desarrollo embrionario fueron realizados, ha aumentado considerablemente el conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la diferenciación. Sin embargo, estos resultados han conducido a nuevas incógnitas cuya respuesta aún se desconoce.

Un campo especialmente fértil en lo que a publicaciones relacionadas con la hipoxia se refiere es el de la Oncología. Los procesos tumorales presentan una gran similitud con el desarrollo embrionario en lo que a las rutas reguladoras y procesos celulares se refiere. Es por ello que un mayor conocimiento de la regulación por parte del O<sub>2</sub> durante el desarrollo es fundamental para abrir las puertas a nuevos avances en la lucha contra el cáncer.

## 6.- BIBLIOGRAFIA.

- Anderson-Berry A, O'Brien EA, Bleyl SB, Lawson A, Gundersen N, Ryssman D, Sweeley J, Dahl MJ, Drake CJ, Schoenwolf GC, Albertine KH. Vasculogenesis drives pulmonary vascular growth in the developing chick embryo. *Dev Dyn*. 2005; 233: 145-153
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967
- Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*. 1977; 14: 53-65
- Bárdos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1755: 107-120
- Batt PA, Gardner DK, Cameron AW. Oxygen concentration and protein source affect the development of preimplantation goat embryos in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 1991; 3: 601-607
- Bernardi ML, Fléchon JE, Delouis C. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil*. 1996; 106: 161-167
- Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Münchenhagen PM, Gröne HJ, Frei U, Warnecke C, Bachmann S, Wiesener MS, Willam C, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int*. 2006; 69: 114-122
- Blumenschein G Jr. Sorafenib in lung cancer: clinical developments and future directions. *J Thorac Oncol*. 2008; 3: 124-127
- Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006; 93: 73-80
- Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*. 2007; 102: 1358-1367
- Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP, Murphy G. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem*. 1998; 273: 871-880
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005; 438: 932-936
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407: 249-257
- Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993; 82: 2031-2037
- Clark DE, Smith SK, Sharkey AM, Charnock-Jones DS. Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum Reprod*. 1996; 11: 1090-1098
- Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*. 2003; 112: 126-135
- Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8: 51-56

- Dellatore SM, Garcia AS, Miller WM. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19: 534-540
- Diabira S, Morandi X. Gliomagenesis and neural stem cells: Key role of hypoxia and concept of tumor "neo-niche". *Med Hypotheses.* 2008; 70: 96-104
- Di Costanzo F, Mazzoni F, Micol Mela M, Antonuzzo L, Checcacci D, Saggese M, Di Costanzo F. Bevacizumab in non-small cell lung cancer. *Drugs.* 2008; 68: 737-746
- Döme B, Paku S, Somlai B, Tímár J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol.* 2002; 197: 355-362
- Egberts F, Kahler KC, Livingstone E, Hauschild A. Metastatic melanoma: scientific rationale for sorafenib treatment and clinical results *Onkologie.* 2008; 31: 398-403
- Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature.* 2006; 440: 1222-1226
- Fandrey J, Bunn HF. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood.* 1993; 81: 617-623
- Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH, Roberts JD, Fay WP, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Sabeh F, Allen ED, Weiss SJ. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med.* 2005; 202: 663-671
- Fitzpatrick TE, Graham CH. Stimulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression in immortalized human trophoblast cells cultured under low levels of oxygen. *Exp Cell Res.* 1998; 245: 155-162
- Folkman J. Is there a doctor in the house? *Arthroscopy.* 1985; 1: 153-155
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature.* 1989; 339: 58-61
- Freeburg PB, Robert B, St John PL, Abrahamson DR. Podocyte expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 during glomerular development. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 927-938
- Garmy-Susini B, Varner JA. Circulating endothelial progenitor cells. *Br J Cancer.* 2005; 93: 855-858.
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997; 277: 1669-1672
- Giaccia AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* 2004; 18: 2183-2194
- Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 359-369
- Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell.* 2007; 11: 335-347
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.* 1996; 379: 88-91

- Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald-Goodfellow S. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer*. 1999; 80: 617-623
- Haase VH. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 291: 271-281.
- Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 287: 808-813
- Hawinkels LJ, Zuidwijk K, Verspaget HW, de Jonge-Muller ES, van Duijn W, Ferreira V, Fontijn RD, David G, Hommes DW, Lamers CB, Sier CF. VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2008; 44: 1904-1913
- He X, Brenchley PE, Jayson GC, Hampson L, Davies J, Hampson IN. Hypoxia increases heparanase-dependent tumor cell invasion, which can be inhibited by antiheparanase antibodies. *Cancer Res*. 2004; 64: 3928-3933
- Hiles JJ, Kolesar JM. Role of sunitinib and sorafenib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Am J Health Syst Pharm*. 2008 ; 65: 123-131
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998; 95: 365-377
- Höckel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol*. 2001; 28: 36-41
- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*. 1999; 18: 5356-5362
- Hurlin PJ, Huang J. The MAX-interacting transcription factor network. *Semin Cancer Biol*. 2006; 16: 265-274
- Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, Miyazaki K. The hypoxic environment in tumor-stromal cells accelerates pancreatic cancer progression via the activation of paracrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling. *Ann Surg Oncol*. 2007; 14: 2600-2607
- Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 543-553
- Jauniaux E, Watson A, Burton G. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 184: 998-1003
- Jelkmann W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. *Methods Enzymol*. 2007; 435: 179-197
- Käßmeyer S, Plendl J, Custodis P, Bahramsoltani M. New Insights in Vascular Development: Vasculogenesis and Endothelial Progenitor Cells. *Anat Histol Embryol*. 2008 (in press).
- Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006; 70: 1469-1480
- Kilani RT, Mackova M, Davidge ST, Guilbert LJ. Effect of oxygen levels in villous trophoblast apoptosis. *Placenta*. 2003; 24: 826-834

Kim JW, Gao P, Liu YC, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 7381-7393

Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 4991-5004

Konerding MA, Miodonski AJ, Lametschwandtner A. Microvascular corrosion casting in the study of tumor vascularity: a review. *Scanning Microsc.* 1995; 9: 1233-1243

Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF-1 $\alpha$  induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 2004; 23: 1949-1956

Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003; 63: 1138-1143

Lemmens L, Claes V, Uzzell M. Managing patients with metastatic colorectal cancer on bevacizumab. *Br J Nurs.* 2008; 17: 944-949

Li J, Foote RH. Culture of rabbit zygotes into blastocysts in protein-free medium with one to twenty per cent oxygen. *J Reprod Fertil.* 1993; 98: 163-167

Lieubeau-Teillet B, Rak J, Jothy S, Iliopoulos O, Kaelin W, Kerbel RS. von Hippel-Lindau gene-mediated growth suppression and induction of differentiation in renal cell carcinoma cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1998; 58: 4957-4962

Lotem J, Sachs L. Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood.* 1993; 82: 1092-1096

Lundkvist A, Lee S, Iruela-Arispe L, Betsholtz C, Gerhardt H. Growth factor gradients in vascular patterning. *Novartis Found Symp.* 2007; 283: 194-201

Ma WW, Jimeno A. Temsirolimus. *Drugs Today (Barc).* 2007; 43: 659-669

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997; 277: 55-60

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999; 155: 739-752.

Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 8104-8109

Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8: 976-990

Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. *Nature.* Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. 1994; 367: 576-579

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993; 72: 835-846

- Morriss GM, New DA. Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 1979; 54: 17-35
- Muñoz-Nájjar UM, Neurath KM, Vumbaca F, Claffey KP. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene*. 2006; 25: 2379-2392
- Miyoshi A, Kitajima Y, Ide T, Ohtaka K, Nagasawa H, Uto Y, Hori H, Miyazaki K. Hypoxia accelerates cancer invasion of hepatoma cells by upregulating MMP expression in an HIF-1alpha-independent manner. *Int J Oncol*. 2006; 29: 1533-1539
- Ng R, Chen EX. Sorafenib (BAY 43-9006): review of clinical development. *Curr Clin Pharmacol*. 2006; 1: 223-228
- Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawa T, Kamiyama M, Hasegawa S, Momiyama N, Miyazaki K, Shimada H. Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. *Cancer Lett*. 2001; 173: 175-182
- Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006; 3: 187-197
- Passalidou E, Trivella M, Singh N, Ferguson M, Hu J, Cesario A, Granone P, Nicholson AG, Goldstraw P, Ratcliffe C, Tetlow M, Leigh I, Harris AL, Gatter KC, Pezzella F. Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2002; 86: 244-249
- Peet D, Linke S. Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation. *Novartis Found Symp*. 2006; 272: 37-49
- Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Danø K, Skriver L. One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J Biol Chem*. 1988; 263: 11189-11195
- Quinn P, Harlow GM. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. *J Exp Zool*. 1978; 206: 73-80
- Ramírez-Bergeron DL, Runge A, Dahl KD, Fehling HJ, Keller G, Simon MC. Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development*. 2004; 131: 4623-4634
- Ramírez-Bergeron DL, Simon MC. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system. *Stem Cells*. 2001; 19: 279-286
- Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, Simon MC, Keith B, Haase VH. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1068-1077
- Rankin EB, Higgins DF, Walisser JA, Johnson RS, Bradfield CA, Haase VH. Inactivation of the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) suppresses von Hippel-Lindau disease-associated vascular tumors in mice. *Mol Cell Biol*. 2005; 25: 3163-3172
- Rini BI. Sunitinib. *Expert Opin Pharmacother*. 2007; 8: 2359-2369
- Roskoski R VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Jr. Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 375: 287-291
- Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res*. 2000; 60: 4010-4015

Ryu J, Vicencio AG, Yeager ME, Kashgarian M, Haddad GG, Eickelberg O. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human and mouse lung development. *Thromb Haemost.* 2005; 94: 175-183

Sabin FR. Studies on the origin of blood-vessels and of red blood-corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. *Contr Embryol* 1920; 9: 215-262

Sachdev JC, Jahanzeb M. Evolution of bevacizumab-based therapy in the management of breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2008; 8: 402-410

Sainson RC, Harris AL. Hypoxia-regulated differentiation: let's step it up a Notch. *Trends Mol Med.* 2006; 2: 141-143

Saksela O, Hovi T, Vaheri A. Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor secreted by cultured human monocyte-macrophages. *J Cell Physiol.* 1985; 122: 125-132

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995; 376: 70-74

Schnürch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development.* 1993; 119: 957-968

Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, Shelton JM, Richardson JA, Moe O, Garcia JA. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood.* 2005; 105: 3133-3140

Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992; 12: 5447-5454

Sharma N, Seftor RE, Seftor EA, Gruman LM, Heidger PM Jr, Cohen MB, Lubaroff DM, Hendrix MJ. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate.* 2002; 50: 189-201

Shirakawa K, Tsuda H, Heike Y, Kato K, Asada R, Inomata M, Sasaki H, Kasumi F, Yoshimoto M, Iwanaga T, Konishi F, Terada M, Wakasugi H. Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 445-451

Shyu KG, Hsu FL, Wang MJ, Wang BW, Lin S. Hypoxia-inducible factor 1alpha regulates lung adenocarcinoma cell invasion. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 1181-1191.

Simpson D, Keating GM. Sorafenib: in hepatocellular carcinoma. *Drugs.* 2008; 68: 251-258

Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci.* 2002; 115: 3729-3738

Sullivan R, Graham CH. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 319-331

Svensson AM, Borg LA, Eriksson UJ. Glucose metabolism in embryos of normal and diabetic rats during organogenesis. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1992; 127: 252-257

Thompson WD, Shiach KJ, Fraser RA, McIntosh LC, Simpson JG. Tumours acquire their vasculature by vessel incorporation, not vessel ingrowth. *J Pathol.* 1987; 151: 323-332



Velazquez OC. Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg.* 2007; 45: 39-47

Warnecke C, Bachmann S, Wiesener MS, Willam C, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int.* 2006; 69: 114-122

Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma.* 1995; 17: 229-244

Wood LS, Manchen B. Sorafenib: a promising new targeted therapy for renal cell carcinoma. *Clin J Oncol Nurs.* 2007; 11: 649-656

Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an fli-1-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development.* 1993; 118: 489-498

Yoon SO, Shin S, Mercurio AM. Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the alpha6beta4 integrin. *Cancer Res.* 2005 65: 2761-2769

Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest.* 2006; 86: 1221-1232

Zhou Y, Genbacev O, Damsky CH, Fisher SJ. Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol.* 1998; 39: 197-213

## **CAPÍTULO 20:**

### **¿QUÉ ES UNA CITOCINA?**

María Luz Cañavate Escribano

#### Índice

1.- CONCEPTO HISTÓRICO Y DEFINICIÓN .....	425
2.- CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES GENERALES .....	426
3.- FAMILIAS DE CITOCINAS. CLASIFICACIÓN .....	427
4.- ESTRUCTURA DE CITOCINAS.....	429
5.- GENES Y EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOCINAS .....	430
6.- MECANISMOS DE COMUNICACIÓN. RECEPTORES Y SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN.....	431
7.- REDES BIOLÓGICAS DE CITOCINAS, PROPIEDADES: ACTUACIÓN EN CASCADA, PLEIOTROPÍA Y REDUNDANCIA. SINERGISMO Y ANTAGONISMO.....	437
8.- TOXICIDAD Y PATOLOGÍA ASOCIADA .....	440
9.- BIBLIOGRAFÍA.....	442

## 1.- CONCEPTO HISTÓRICO Y DEFINICIÓN

El descubrimiento de las citocinas partió de la investigación inmunológica centrada en la década de los años 60 en responder a la pregunta de cual era el mecanismo de comunicación entre las células del sistema inmunológico, fue en la siguiente década cuándo se demostró que en el sobrenadante de linfocitos activados *in Vitro* con mitógenos, células alogénicas o antígenos había factores que podían aumentar la proliferación de las células T, diferenciar las células B productoras de anticuerpos, inducir la citotoxicidad de las células T y activar macrófagos y otras células inflamatorias, para estos factores se propuso inicialmente el término “lymphokine” (Dumonde y cols 1969). La fuente de estos factores se asumió que eran linfocitos, sin embargo, en 1972 Gery y cols demuestran que los macrófagos pueden también producir un factor soluble mitogénico llamado factor activador de los linfocitos (LAF). La caracterización de estos mediadores avanzó despacio debido a que implicaban poblaciones celulares heterogéneas y los ensayos empleados para detectarlos eran complejos, en consecuencia, era difícil asegurar que la actividad celular medida fuese el resultado de la acción de una única especie molecular. La caracterización de estos factores se limitó a procedimientos bioquímicos como determinación del pH por cromatografía de filtración en gel o punto isoeléctrico. Se adoptó término genérico de “linfocina” para describir estos factores y a cada factor se le dio el nombre de la actividad biológica que inducía. A mediados de 1970 ya se habían descrito más de 100 factores con otras tantas actividades biológicas.

La prevalente visión de los años 70 de que los factores que amplificaban la respuesta proliferativa de las células T derivaban de los antígenos o mitógenos cambió radicalmente cuándo Morgan y cols (1976) demuestra que en ausencia de mitógenos o antígenos los sobrenadantes de células mononucleares de sangre periférica estimuladas podían por sí mismos estimular la proliferación de cultivos de linfocitos. En 1979 se llega al consenso de que había dos factores que modulaban la actividad de los linfocitos, 1: LAF (Lymphocyte Activating Factor) y 2 un producto del linfocito T estudiado por muchos laboratorios llamado por muchos nombres: Factor activador mitogénico del linfocito (TMF), factor de crecimiento de las células T (TCGF), factor estimulador de las células T (TSF). Debido a que la propiedad esencial de ambos factores es actuar como señal de comunicación entre distintas poblaciones de leucocitos se aplicó el término de “interleukin” que significa: “entre leucocitos”. El factor LAF fue designado como IL-1 Y TSF como IL-2.

Gracias a la conjunción de las nuevas técnicas de Biología Celular, Bioquímica y Biología Molecular en los últimos 30 años se han caracterizado más de 35 interleukinas y 100 péptidos genética y estructuralmente distintos. El campo de las interleukinas se ha ampliado considerablemente debido a: 1- Muchas de las interleukinas tienen importantes efectos biológicos sobre células no pertenecientes al sistema inmune; 2- la clasificación de estos factores sobre la base del tipo celular responsable de su producción no es correcto, muchos de estos factores son producidos por numerosos tipos celulares (Paul 1988), por estas razones a estos factores hoy se les aplica el término genérico de

“citocinas” ya que su definición no se restringe a los factores producidos únicamente por los leucocitos (Cohen 1977 ; Durum 1993).

*El término citocinas se utiliza hoy para un grupo de péptidos o proteínas que actúan como reguladores humorales a concentración nano y picomolares y que en condiciones tanto fisiológicas como patológicas modulan la actividad de tanto células individuales como tejidos.*

## 2.- CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES GENERALES

Las citocinas son mensajeros utilizados por varios tipos celulares en su comunicación. Como señales moleculares regulan en las células funciones como la proliferación, diferenciación, movimiento, supervivencia y muerte celular. A nivel fisiológico tienen a su vez un papel regulador en procesos como: respuesta inmune, hematopoyesis, inflamación (Arai y cols 1990), cicatrización, reproducción (Ingman y cols 2008), gestación (Robertson y cols 1994), embriogénesis (Slack, 1993), metabolismo energético (Gualillo y Lago, 2009), regulación del crecimiento neural (Ensoli y cols 1999).

Presentan unas características comunes (Balkwill y Burke 1989):

1. Son proteínas glucosiladas de bajo peso molecular (generalmente menores de 80kD)
2. Extremadamente potentes : actúan a concentraciones picomolares
3. En general se producen de forma transitoria y local, transmitiendo la información entre células de un tejido o entre varios tejidos con mecanismo preferentemente paracrino y autocrino.
4. Interaccionan con receptores de superficie específicos para cada citocina o grupo de citocinas, siendo escaso el número necesario de ellos para producir el efecto biológico.
5. La unión de una citocina a su receptor conduce a una señal de transducción que modula la expresión génica alterando en definitiva el comportamiento de la célula.
6. Son reguladas por muchos factores como es su concentración local en el medio, el tipo de célula productora, la unión simultánea de otras citocinas a la célula y otras señales de transducción paralelas.
7. Las citocinas interaccionan en una red compleja: una citocina induce a otras, modulan la expresión de receptores de citocinas (el propio o el correspondiente a otra) y pueden interactuar de forma sinérgica o antagónica sobre la misma célula.
8. Implicadas en los procesos de inmunidad e inflamación regulan el comienzo, amplitud y duración de la respuesta.

Al mediar las citocinas la comunicación celular, en muchos aspectos su actividad biológica se parece a la de las clásicas hormonas producidas por las células de tejidos especializados de las glándulas, algunas citocinas pueden además actuar a nivel sistémico. Pero en general, las citocinas presentan un espectro más amplio de acción que las hormonas sin olvidar el aspecto fundamental: no hay un órgano único productor de citocinas.

Normalmente no poseen actividades enzimáticas aunque hay un nº creciente de excepciones ECGF (Factor de Crecimiento de células Endoteliales derivado de plaquetas), neurolekin. En general su actividad se restringe a la desencadenada por la señal de transducción pero alguna de ellas como IL-33 se localiza en el núcleo donde actúa directamente como alarmina

### 3.- FAMILIAS DE CITOCINAS. CLASIFICACIÓN

Las citocinas comprenden un grupo de familias que se agrupan según los diversos criterios empleados: secuencias homólogas de nucleótidos o aminoácidos, estructura tri-dimensional, actividades específicas en el sistema inmunológico, efectos anti o pro-inflamatorios. Cualquier criterio de clasificación de citocinas conlleva contradicciones y problemas, a veces son clasificaciones arbitrarias ya que muchas citocinas tienen múltiples actividades biológicas y podrían incluirse en más de una categoría (Eberl, 2002).

Se aplica en esta revisión el criterio de agrupación de familias y subfamilias por sus propiedades funcionales confirmadas *in vitro* o *in vivo*, aportando así una información general de estas moléculas

**Interleucinas**, término propuesto en 1979, inicialmente aplicado a factores solubles que eran producidos y a su vez actuaban exclusivamente sobre los leucocitos: monocinas (producidas por los monocitos) y lincocinas ( lincocitos) (Dinarelli y Mier 1986) Posteriormente, el subcomité de la unión internacional de las sociedades de inmunología para la nomenclatura de interleucinas recomendaron que el nombre de interleucina se reservara para aquellos productos naturales del Sistema Inmunológico y si alguna nueva molécula ya estaba caracterizada en otra familia no perteneciente al sistema inmunológico que conservase su denominación, es por ejemplo el caso del Interferon- $\gamma$ . Comprende esta familia de las interleucinas de la IL-2, a la IL-36; la subfamilia de la IL-10, familia IL-1 y la familia IL-17 (Schrader, 2002). Reguladores del sistema inmunológico, algunos de sus miembros (IL-2, IL-12, IL-15,..) activan la respuesta celular frente a infecciones (Díez y cols 1991) y tumores, y otras como la IL-10 controlan la duración de la respuesta disminuyéndola (Boyano y cols 1990)

**Interferones**, Descrito en 1957, el primer interferón (IFN- $\alpha$ ) como un producto que confiere resistencia antiviral, hasta 10 años más tarde no se reconoció su papel como mediador del sistema inmunológico en el que se incluye la estimulación de los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

En 1965 se describe un interferón en cultivo de lincocitos libres de virus y se designa como Interferón tipo II y actualmente IFN- $\gamma$ . Induce la expresión de moléculas del Sistema Principal de Histocompatibilidad (Goguel y cols, 1990), activa el macrófago y lo capacita para digerir agentes infecciosos como bacterias o parásitos intracelulares y para ejercer una citotoxicidad frente a los tumores, podríamos decir de él que es el prototipo de interleucina ya que está considerado como uno de los reguladores endógenos más importantes de la respuesta inmune (Stark 1998).

**Factor de necrosis tumoral:** factor de necrosis tumoral (TNF, conocido como TNF  $\alpha$ ) y linfotoxina (LT $\alpha$ ), originalmente caracterizados por su capacidad para inducir apoptosis en células tumorales y caquexia, ahora los consideramos como mediadores con un amplio rango de actividades biológicas. Su actividad está presente con efecto beneficioso en respuestas inflamatorias y protectoras del sistema inmunológico frente a una gran variedad de agentes infecciosos. Por otra parte, la familia del TNF también ejerce efectos lesivos para el huésped en casos de sepsis, caquexia tumoral y en enfermedades autoinmunes. Además los miembros de esta familia y sus receptores tienen un papel esencial tanto durante la organogénesis de los órganos linfoides secundarios como en el mantenimiento de la arquitectura de los tejidos linfáticos (Pfeffer 2003).

**Quimioquinas.** Familia de citocinas quimiotácticas con un papel destacado en el control de la migración de los leucocitos tanto en la salud como en la enfermedad. La primera identificada: la IL-8. Algunas quimioquinas y sus receptores controlan y a su vez son reguladas en la enfermedades inflamatorias tanto agudas como crónicas, por este motivo son componentes clave en la inflamación asociada al cáncer (Miller y Krangel, 1992; Wells y cols 2006). Algunos miembros de esta familia participan además en los procesos de senescencia celular, proliferación, supervivencia de células tumorales y procesos de invasión y metástasis (Mantovani y cols 2009)

**Adipocinas.** El descubrimiento de la leptina, primera adipocina encontrada en el tejido adiposo, a mediados de 1990, inició el descubrimiento de nuevas citocinas (Adiponectina, Resistina, Visfatina, Adipsina,..) en un tejido cuyo interés hasta entonces se centraba únicamente en su función como reserva de energía del cuerpo. Las adipocinas se han estudiado no sólo en relación con la obesidad, el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina, sino también como moduladores de la inflamación y la respuesta inmune (Gualillo y Lago, 2009).

**Factores de crecimiento,** tienen un efecto positivo sobre la multiplicación celular, sin embargo también controlan la diferenciación y maduración de las células dianas (Liles y Van Voorhis 1995). Sus efectos varían entre los distintos factores de crecimiento, por ejemplo las proteínas morfogénicas del hueso, estimulan la diferenciación del hueso mientras que los factores de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento del endotelio vascular estimulan la diferenciación de los vasos sanguíneos (angiogénesis).

Esta familia presenta numerosos miembros estructuralmente y evolutivamente relacionados: factor de crecimiento epidérmico, eritropoietina, factor de crecimiento de hepatocitos, muchos de los miembros de esta familia participan activamente en los procesos de inducción durante el desarrollo embrionario (Snack, 1993).

Dentro de esta gran familia podemos a su vez diferenciar otra dos grandes familias: 1-los **Factores de crecimiento hematopoyéticos**, que estimulan la proliferación y diferenciación de células procedentes de médula ósea, incluyen los factores estimuladores de colonias (factor estimulador de colonias de granulocitos, (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocito –

macrófago (GM-CSF), la eritropoietina, factor stem cell. 2- **Familia del Factor de Crecimiento Transformante-  $\beta$  (TGF- $\beta$ )**, es difícil clasificar esta familia con otras ya que los miembros de esta familia pueden suprimir y estimular numerosos tipos de respuestas biológicas. Esta familia es distinta al resto, el gran número de receptores y ligandos de esta familia y sus pequeñas diferencias en sus especificidades hacia sus ligandos hace que haya una cierta promiscuidad en sus relaciones con diversos ligandos que, sin embargo están específicamente moduladas por otros factores de membrana y del medio extracelular, todo ello da lugar a un amplio espectro de funciones biológicas para esta familia entre las que destacan, su papel como inductor de la morfogénesis durante el desarrollo embrionario y su papel pro / anti tumoral (Massagué 1992).

Otras clasificaciones para las citocinas se basan en su origen y efecto: 1- Citocinas producidas por muchos tipos celulares con efecto en muchos tipos de células (ej TGF- $\beta$ ); 2- producidas por pocos tipos de células con acción sobre pocos tipos de células (ej. IL-2); 3- Producidas por pocos tipos celulares con efecto sobre muchos tipos de células (ej. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) (Asadullah, 2002). Desde el punto de vista del efecto de las citocinas en el proceso inflamatorio, se pueden clasificar en: proinflamatorias (ej IL-1, IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (ej. Antagonista del receptor de la IL-1, IL-10, TGF- $\alpha$ )

#### 4.- ESTRUCTURA DE CITOCINAS

Muchas de estas moléculas son proteínas pequeñas, la citocina típica es un péptido monomérico glucosilado con alrededor de 150 aminoácidos. Algunas son homodímeros (IL-15), o trímeros(TNF- $\alpha$ ) o heterodímeros(IL-12) (Kelso 1998). La glucosilación parece regular su actividad a través de facilitar el reconocimiento por el receptor (Opdenakker y cols 1995). La presencia además de puentes disulfuro le confiere flexibilidad a la molécula. Estos elementos aumentan la solubilidad, estabilidad y resistencia a las proteasas del medio extracelular.

Mediante ensayos de difracción de RX y técnicas de resonancia magnética nuclear se ha evidenciado tres tipos de estructuras tridimensionales en estas moléculas (Bazan 1990).

1. Citocinas en las que predomina las estructuras con cuatro cadenas  $\alpha$ -hélices antiparalelas, en este grupo se encuentran la IL-2, IL-3; IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, GM-CSF, M-CSF, IFN $\gamma$ .
2. Citocinas con largas cadenas de láminas  $\beta$ , familia del TNF, familia IL-1, familia del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF),
3. Citocinas cadenas cortas  $\alpha/\beta$ , familia del Factor de Crecimiento Epidérmico, la familia de las quimioquinas (Clare y Gronenborn, 1993)

## 5.- GENES Y EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOCINAS

La determinación de la verdadera importancia *in vivo* de las funciones de las citocinas se realizan sobre animales transgénicos Knock-out en los que los genes de las citocinas en estudio se inactivan funcionalmente mediante procedimientos de “gene targeting”, así se puede comprobar los efectos de la ausencia de la citocina en el animal. En la mayor parte de los casos se ha demostrado que aquellas mutaciones que anulan genes particulares de citocina no tienen los efectos *in vivo* que cabría esperar según los resultados obtenidos *in Vitro* (Villinger y cols 1995, Ingman y cols 2008), el hecho de que pocas respuestas biológicas sean mediadas por una citocina y muchas sean mediadas por varias, unido a que los experimentos con delección de genes revelan que, pocas citocinas a nivel individual sean absolutamente esenciales para la vida o para funciones celulares individuales, hace pensar que, las funciones celulares presentan sistemas de seguridad en los que una citocina compensa la pérdida de otra.

Las citocinas no son miembros de una única superfamilia de genes, pocas similitudes se han encontrado entre sus secuencias primarias de nucleótidos o aminoácidos y sus genes en la mayor parte de los casos están repartidos por todo el genoma. No obstante, se han evidenciado algunas relaciones entre citocinas, por ejemplo entre los genes de la familia IL-1 localizados en el cromosoma 2 humano, tienen entre el 25% de similitud entre sus aminoácidos, interaccionan con los mismos receptores y son codificados por genes estrechamente ligados (Dinarello CA 1996). Algo parecido sucede con los genes de los miembros funcionales de la familia del IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , sus genes localizados en el cromosoma 9 también están ligados, codifican proteínas relacionadas que se unen a un receptor común (Kelso, 1998). La fuerza de la evolución unida a la duplicación y diversificación genética pueden ser argumentos para explicar las diferencias en los mecanismos de expresión y función de los productos de una familia de citocinas.

Muchos genes de citocinas contienen numerosos elementos reguladores en sus regiones promotoras. Su presencia explica, al menos en parte, porqué la expresión de algunas citocinas la modulan otras citocinas y otros estímulos fisiológicos. Algunos genes de citocinas y de sus receptores contienen secuencias reguladoras específicas unidas a factores reguladores específicos para esas citocinas.

Las citocinas no conducen a una respuesta biológica directamente, estimulan o inhiben la producción de factores proteicos de unión al ADN que, a su vez, controlan la expresión de otros genes.

Las señales generadas por la unión de una citocina a su receptor conducen, en pocas horas a la transitoria activación de los llamados *genes de respuesta inmediata* que parecen ser muy numerosos (Beadling y cols 1993; Beadling y cols 2001). Algunas de las proteínas tempranas codificadas (proteínas tempranas) se unen a elementos promotores de los llamados *genes de respuesta tardía* y estimulan la respuesta de proteínas tardías. La simple interacción de una citocina con su receptor desencadena una cascada de



expresión génica con productos que actúan simultáneamente o secuencialmente. En general, las citocinas se expresan de forma transitoria pero también se han detectado expresiones constitutivas.

La expresión puede regularse a nivel de transcripción, translación y síntesis proteica.

El comportamiento de una célula en relación a la expresión de citocinas parece regularse en muchos niveles: en primer lugar en relación a su diferenciación dependiendo del tipo de célula y su estado del desarrollo, a nivel de la transcripción, se incluyen todos los factores que activan los promotores de las citocinas. Un punto crítico de control conocido para la expresión de los genes de citocinas y otras moléculas, son los cambios en la accesibilidad a la cromatina (Agarwal y cols 1999), estos controles en los genes de las citocinas se han identificado mediante manipulaciones metodológicas que reprimen la cromatina (Nikolajczyk, 2006). Recientemente, se han identificado polimorfismos en varios genes de citocinas (Valente, 2009), también se ha demostrado que el polimorfismo en un único nucleótido, en determinados elementos reguladores de la transcripción de citocinas, regula los niveles de citocinas en el contexto de haplotipos naturalmente seleccionados. Los polimorfismos de los genes de citocinas se asocian cada vez con más frecuencia con susceptibilidad a la enfermedad y su evolución patológica (Ollier, 2004), concretamente alteraciones atópicas como fiebre, asma, eczemas o elevados niveles de IgE (Nieters y cols 2004, Imboden y cols 2006).

En general, sutiles diferencias en las secuencias del DNA y en la composición de los complejos nucleoproteicos, incluyendo modificaciones proteicas post-transcripcionales se unen y combinan en una célula tipo específica para explicar las variaciones en la transcripción de una citocina en la población humana.

A otros niveles de control, la secreción y o liberación de una fuente celular es un proceso de exocitosis regulada por señales externas a la célula. Una vez liberado, su comportamiento en la circulación puede ser regulado por receptores solubles, proteínas de unión específicas o inespecíficas. La respuesta a nivel de la célula diana también se regula a nivel del receptor y a nivel de las vías de transducción de la señal.

## 6.- MECANISMOS DE COMUNICACIÓN. RECEPTORES Y SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN.

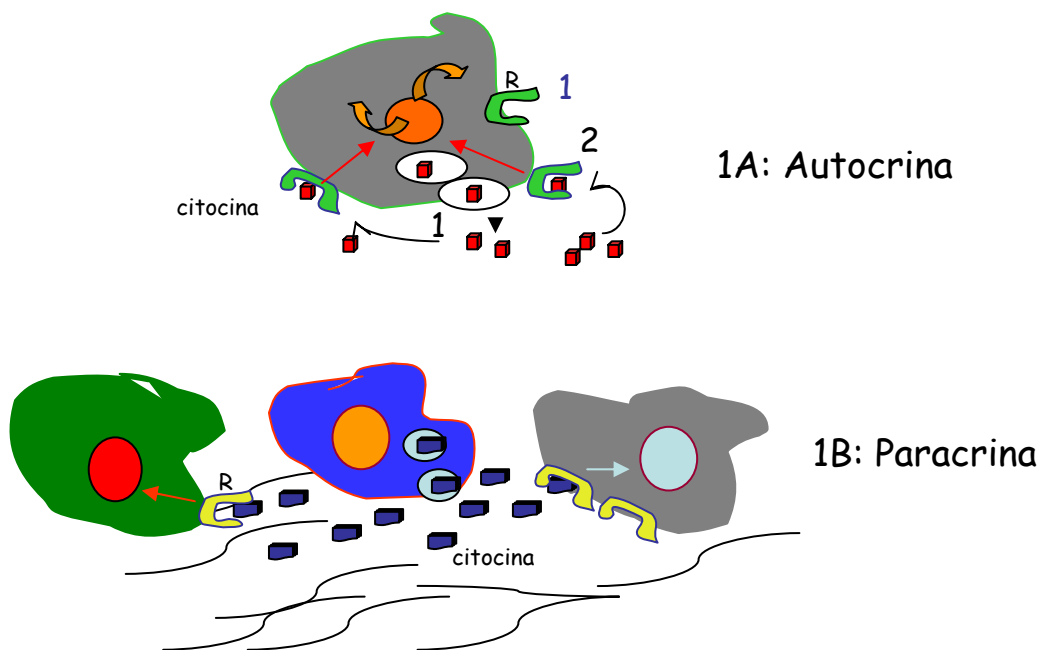
Una citocina se produce como respuesta a una señal de inducción por la activación de una célula. En general, no suelen observarse como depósitos celulares, su expresión es transitoria y regulada a todos los niveles, incluido el de diferenciación ya que depende del tipo de célula y de la edad del desarrollo. Una célula estimulada libera a la matriz extracelular una señal que se transmite a otras células mediante los siguientes mecanismos

**Autocrino:** La estimulación de una célula induce la expresión de un factor (citocina) y de su receptor de membrana. Al interaccionar el receptor con el

factor se desencadena la señal de transducción y la respuesta biológica en la propia célula que los ha producido (**Fig. 1A**).

**Paracrina:** La estimulación de la célula conduce a la síntesis de un factor (citocina) que es liberada por la célula estimulada y actúa sobre receptores de membrana de las células vecinas induciendo a su vez una respuesta en ellas. La estimulación puede conducir a la liberación de una o más citocinas (**Fig. 1B**).

### Mecanismo de comunicación

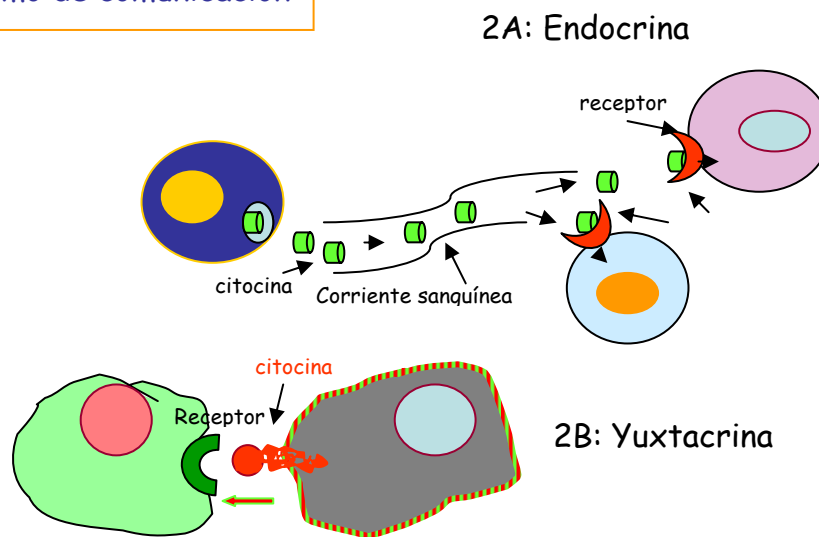


**Figura 1.** Vías frecuentes de señalización de citocinas: 1A. Autocrina; 1B.Paracrina.

Con menos frecuencia se transmiten por vía **Endocrina**, el transporte del factor se realiza por la circulación para llegar al receptor de células situadas a gran distancia de la fuente, este mecanismo es el empleado a nivel hormonal. Es un mecanismo restringido a ciertas citocinas como IL-1 o TGF $\beta$  (**Fig. 2A**).

Comunicación intercelular **Yuxtacrina**, en este caso se establece la señal por contacto célula a célula, entre el receptor para el factor (factor de crecimiento o ciertas citocinas como IL-1) de una célula y la membrana de la célula adyacente donde estos factores están anclados a la membrana. Las formas de citocinas de membrana presentan el mismo espectro de actividades biológicas que las formas solubles. Frecuentemente proceden de precursores activos que no finalizan su procesamiento o también pueden generarse por una maduración alternativa del ARNm (**Fig. 2B**).

## Mecanismo de comunicación



*Una célula, en un momento dado, recibe un conjunto de señales de su microambiente tisular y orgánico que intervienen y dirigen su desarrollo y función.*

**Figura 2.** Vías poco frecuentes de señalización de citocinas: 2A Endocrina, 2B Yuxtacrina

El anclaje a la membrana de la célula productora es un mecanismo extremo para concentrar citocinas pero hay otros mecanismos como la retención por sus cargas eléctricas a los proteoglucanos de la matriz extracelular o de la superficie de la célula. La unión de una citocina a la matriz extracelular, en algunas circunstancias al receptor soluble y a otras proteínas puede proteger a las citocinas de una rápida eliminación del medio y proveer de un depósito donde el factor se libere lentamente (Kelso 1998)

En general, la actividad de una citocina se restringe a la desencadenada por la señal de transducción procedente de la activación del receptor de membrana pero alguna de ellas como IL-33 (miembro de la familia IL-1) se localiza en el núcleo donde actúa directamente como alarmina (Haraldsen y cols 2009). Las alarminas definidas como proteínas residentes en el núcleo que son rápidamente liberadas por la célula en respuesta a la infección o al daño tisular, alarmando y activando al sistema inmune (Oppenheim y Yang, 2005)

Las citocinas envían mensajes a sus células diana mediante su unión a **receptores de membrana**. En general, estos receptores tienen constantes de disociación (Kd) alrededor de  $10^{-10}$  a  $10^{-11}$  mol/L y, dependiendo de la citocina y del tipo de célula, el número de receptores puede variar de  $10^3$  a  $10^4$  por célula. En algunos casos la unión de una citocina a aproximadamente 100 receptores de membrana es suficiente para inducir una respuesta biológica, en consecuencia, concentraciones sub-picomolares de citocinas pueden ser biológicamente ya activas (Kelso, 1998).

La notable homología de aminoácidos entre algunos receptores de citocinas de mamíferos ha servido de especulación para pensar que estos receptores derivan de un precursor común, de primitivas moléculas de adhesión (Bazán 1990).

Todos los receptores de citocinas están formados por una o más proteínas transmembrana cuyas porciones extracelulares son responsables de la unión de la citocina y cuyas porciones citoplasmáticas son responsables del inicio de las vías de transducción de señales (Sato y Miyajima, 1994). Estas vías de transducción son típicamente activadas por el agrupamiento de dos o más moléculas del receptor citoplasmático inducido por el ligando.

La clasificación más utilizada se basa en homologías estructurales de los dominios extracelulares de unión a las citocinas y en los mecanismos compartidos de la transducción de la señal. Según este criterio (Abbas y cols, 2008), los receptores pueden agruparse en la superfamilia de receptores de citocinas y se pueden dividir en varias familias:

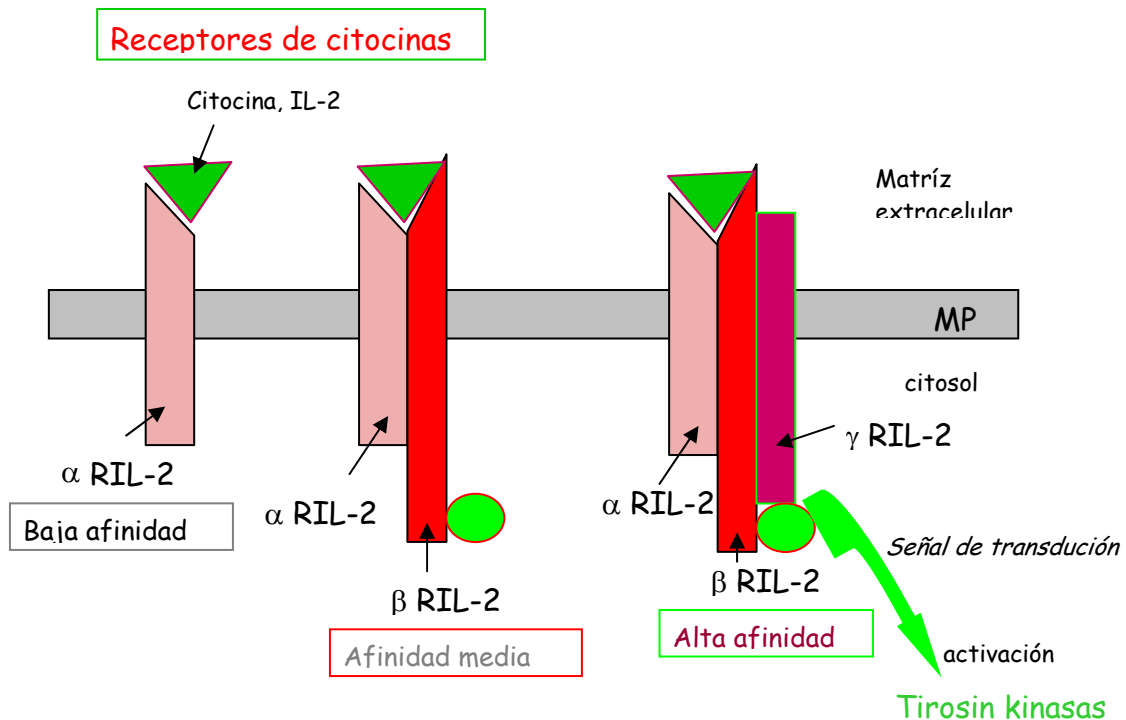
*Receptores de citocinas tipo I.* Contienen una o más copias de un dominio con dos pares conservados de cisteína y una secuencia de membrana proximal de triptófano-serina-X-triptófano-serina(WSXWS), donde X es cualquier aminoácido y le da la especificidad al receptor. Se unen a citocinas con cuatro cadenas helicoidales  $\alpha$ . Consisten en subunidades  $\alpha$  específicas de la citocina, receptores de baja afinidad, se unen a la citocina y no transmiten la señal de transducción. Subunidades comunes  $\beta$  que unen la citocina con baja afinidad pero transmiten la señal de transducción. El conjunto del receptor  $\alpha$  y  $\beta$  constituyen el receptor de alta afinidad y transmiten la señal a la célula. Hay receptores como el de la IL-2 que tiene una tercera subunidad llamada  $\gamma$  en este caso se necesitan las tres subunidades para formar el receptor de alta afinidad **(Fig 3)**.

Este grupo presenta una o más subunidades de transducción de señales con frecuencia comunes con receptores de otras citocinas, es el caso de IL-3, IL-5, GM-CSF. Estas citocinas compiten por el mismo receptor, inducen señales y tienen efectos biológicos similares en ciertas células específicas como los eosinófilos.

Son los receptores de la Hemopoyetina, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF, G-CSF, leptina.

Activan las vías de transducción de señales JAK-STAT.

*Receptores de citocinas tipo II.* Son similares a los anteriores pero no contienen la secuencia WSXWS. Estos receptores están formados por una cadena polipeptídica de unión al ligando y una cadena transductora de señales. Todos pertenecen a las vías de transducción de señales JAK-STAT. Receptores para IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-20, IL-24, IL-26.



**Figura 3.** Modelo de receptor de citosina tipo II.. Receptor de la IL-2

Los receptores de tipo I y II, son homodímeros y heterodímeros algunas cadenas del receptor son comunes entre los miembros de estos grupos es el caso en los receptores de los IFN y la IL-10, que presentan motivos análogos en sus dominios extracelulares.

**Señal de transducción vía JAK/STAT.** Los tres componentes de esta vía son:

- 1- El receptor carente de actividad intrínseca enzimática.
- 2- Tirosin quinasa (JAK) que significa "just another kinase", por su papel entre diversos receptores y factores de transcripción, también se ha propuesto como "Janus kinasa" en referencia al dios griego que abre las puertas
- 3- Factor de transcripción latente llamado STAT (signal transducer and activator of transcription). el proceso es el siguiente:

- A: La citocina se une al receptor uniendo sus dominios citoplasmáticos, las cinasas JAK se asocian físicamente a él.
- B: La asociación provoca la autofosforilación en los residuos de tirosina y posterior activación. Las JAK también fosforilan otras Tirosinas del receptor creando un lugar para el STAT.
- C: Un dominio SH2 del STAT se une a una fosfotirosina del receptor.
- D: JAK fosforila a STAT que se disocia del receptor.
- E: los receptores de los factores de crecimiento también pueden activar esta vía activando STAT;
- F: Los STATs forman un dímero activo por interacciones recíprocas SH<sup>2</sup>-tirosina.

- G: Los dímeros entran en el núcleo. H-los dímeros STAT activan la expresión de varios genes (Ihle y Kerr 1995, Pollard y cols, 2008).

La vía de estas tres proteínas, del receptor, de la citosina a la STAT parece simple pero hay que tener en cuenta que no opera sola, de un lado convergen las señales de los factores de crecimiento que pueden fosforilar y activar a STAT y de otro lado algunos receptores de citocinas pueden regular la expresión de genes por otras vías de transducción.

Hay tres mecanismos que regulan la respuesta a una activación de una citocina.

1- La fosfatasa que inactiva el receptor, la quinasa y la intranuclear STAT.

2- Endocitosis que inactiva al receptor.

3- Una regulación negativa que actúa de forma lenta y que limita la duración de la respuesta. Uno de los genes que se expresan en respuesta a STAT codifica SOCS1: Una vez sintetizado, la proteína SOCS1 inhibe la activación de STAT por interacción con el receptor (Fujimoto and Naka, 2003). La expresión de proteínas de la familia SOCS (CIS, SOCS1 - SOCS7) es inducida en respuesta a la estimulación por una gran variedad de citocinas, la sobre expresión de estas proteína en líneas celulares trae como resultado la inhibición de la señal (Krebs y Milton, 2000).

La selectiva expresión de los receptores específicos de citocinas, los cuatro JAK y los siete STATs preparan a las células diferenciadas de mamíferos para responder específicamente a varias citocinas.

*Receptores de la familia de la familia IL-1:* comparten una secuencia citosólica conservada, denominada del receptor de tipo toll/ de IL-1 (TIR), Su mecanismo de transducción es mediante unión de las cinasas de la familia IRAK a los dominios TIR y activación de los factores de transcripción. Receptor IL-1, IL-18  
*Los receptores del TNF,* con dominios extracelulares triméricos ricos en cisteína. Sus vías de transducción por: unión de proteínas TRAF o por unión de proteínas adaptadores de la familia de dominio de muerte celular, activación de caspasas. Sus mecanismos de transducción de señales intracelulares compartidos inducen la apoptosis o estimulan la expresión génica. Los receptores de este grupo son los del TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , LT, factor del crecimiento nervioso.

*Los receptores con siete hélices- $\alpha$  transmembrana,* también se denominan serpentina, porque sus dominios transmembrana parecen serpentear hacia un lado y otro de la membrana. Transducción de señales a través de proteínas G. Son los receptores de quimiocinas.

Otros receptores, como los de los factores de crecimiento y el receptor del TGF- $\beta$  tienen una actividad cinasa intrínseca del receptor.

Los receptores para los factores de crecimiento como el factor de crecimiento plaquetar (PDGF), factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), factor de

crecimiento epidérmico (EGF). Estos receptores tienen actividad intrínseca de proteína tirosina quinasa en su dominio citosólico, la unión del ligando estimula la actividad tirosinasa, la cual estimula posteriormente la vía de Ras-MAP-kinasa y varias vías de transducción de señales. Este tipo de vías de señalización tienen un amplio espectro de funciones que incluyen la regulación de la proliferación y diferenciación celular, la estimulación de la supervivencia celular y la modulación del metabolismo celular.

Otro tipo de receptores de factores de crecimiento usan los dominios serina/treonina quinasa del receptor citoplasmáticos para transducir la señal, los ligandos unen las distintas subunidades y desencadenan la actividad quinasa. Los receptores activos fosforilan factores de transcripción llamados Smads, estimulan su desplazamiento del citoplasma al núcleo donde regulan genes que controlan la proliferación y diferenciación. Son los receptores del TGF- $\beta$  y de las proteínas morfogenéticas del hueso (Shi y Massague, 2003).

Muchas moléculas identificadas primero como receptores en la superficie celular se detectaron libres en cultivos de sobrenadantes y fluidos tisulares, en general con retención de sus propiedades biológicas pero sin señal de transducción, IL-1 $\beta$ R, IL-2R, IL-4R, IL-5R, IL-6, TGF- $\beta$ , (Ling,1993), son los **Receptores solubles**, además de sus formas unidas a membrana hay muchas cadenas de receptores de citocinas que aparecen en forma soluble, producidas o por liberación proteolítica del dominio extracelular del receptor unido a membrana o por translocación de un receptor truncado de un transcrito alternativo (Rose-Jhon y Heinrich, 1994). La producción de receptores solubles por ambos mecanismos frecuentemente se incrementa con la activación celular. Son varias las causas, tanto negativas (Boyano y cols1990) como positivas para la liberación de estas formas solubles: 1- Desensibilización del receptor celular por pérdida de una parte del receptor; 2- Inhibición de la acción de una citocina por competición con el receptor unido a membrana; 3- protección de citocinas solubles frente a la degradación en el espacio extracelular; 4- transporte de citocinas, y 5- Participación en la formación de receptores funcionales (Fernández-Botran 1991)

## 7.- REDES BIOLÓGICAS DE CITOCINAS, PROPIEDADES: ACTUACIÓN EN CASCADA, PLEIOTROPÍA Y REDUNDANCIA. SINERGISMO Y ANTAGONISMO

La compleja relación que se establece entre las diferentes citocinas se ha definido como red de citocinas (Balkwill y Burke 1989). En estos momentos, la interacción mutua entre citocinas se compara con una jungla dada la casi infinita interacción que se va entretejiendo entre distintas citocinas. En la red, una citocina dada puede: (A) inducir/suprimir la secreción de otra o (B) regular un proceso mediado por citocinas. El proceso de inducción (A) puede desencadenar cascadas de citocinas y la supresión o conducir a retroregulación o cambiar un estado biológico funcional en equilibrio a otro estado (ejemplo: en el ámbito de la respuesta inmunológica, el equilibrio Th1/Th2, inmunidad predominantemente celular /inmunidad predominantemente humoral). Por otro lado, (B) una citocina puede regular el efecto de otras citocinas o modulando la

expresión en superficie de sus receptores o a nivel de transducción de la señal (Kroemer y cols, 1993). En definitiva, una citocina inicialmente induce la expresión de una o más citocinas que a su vez induce la expresión de factores ulteriores y se crea un complicado circuito regulado por retroalimentación. Se han desarrollado una gran cantidad de mecanismos para impedir que la red escape al control, por ejemplo ciertas citocinas inhiben la producción de otras en diferentes puntos *in vivo* (Ej IL-10 inhibe la producción de IL-1, IL-2, IL-6, IL-8). La red surgida a través de la evolución permite una gran flexibilidad, dependiendo de cuál es el punto de la red que se activa y de la amplificación de la respuesta ante un estímulo dado. La red puede ser también necesaria para estabilizar completamente el sistema y compensarlo ante la falta de un componente.

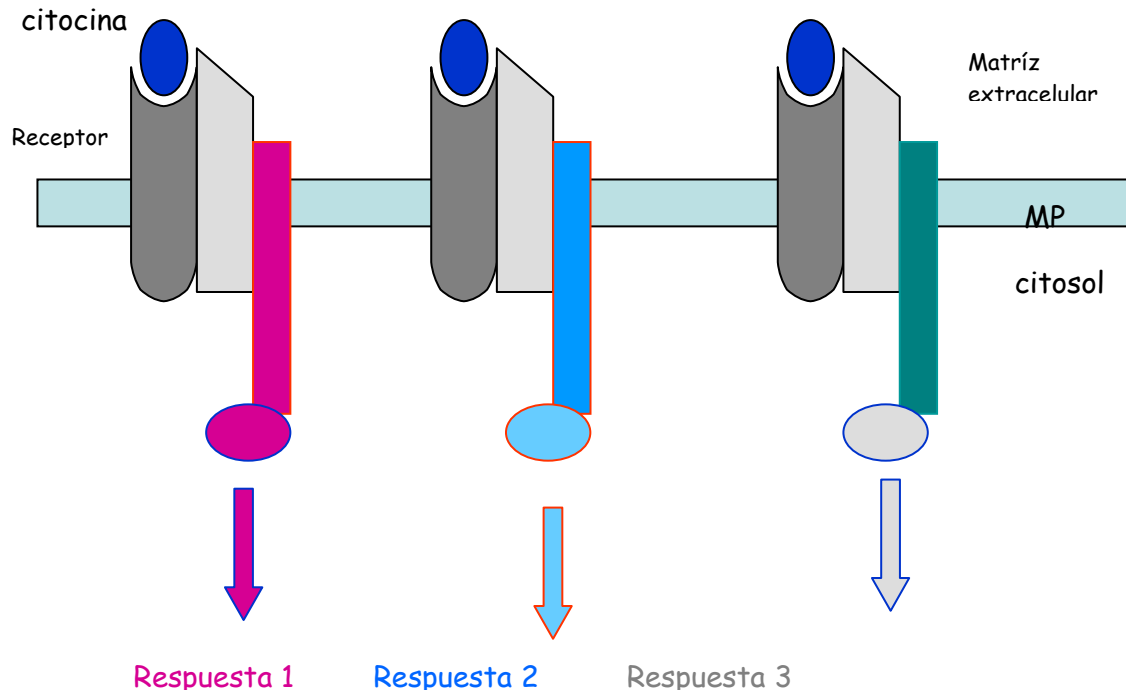
La red de citocinas puede ser o protectora o lesiva siendo la base de funciones fisiopatológicas importantes tales como factores angiogénicos, hematopoyesis, red neuroinmune (Ensoli y cols 1999), migración linfocitaria, fecundación, desarrollo embrionario, shock séptico, inflamación, cicatrización de heridas. La importancia en el contexto de un organismo vivo, se desprende no sólo considerando las acciones específicas de citocinas sobre dianas específicas, sino otros factores tales como, las moléculas de adhesión, los antígenos de superficie, los componentes de la matriz extracelular y numerosas moléculas de bajo peso molecular, que interactúan con las citocinas (Hauzenberger y cols., 1995). El conjunto de factores regula la amplificación y duración de la respuesta determinando en definitiva las actividades funcionales de células individuales, tejidos y órganos (Ej. La red de citocinas de los factores estimulantes de colonias).

Hay algunas características de las citocinas que son fundamentales para comprender la regulación de la red de citocinas. La primera es que las células dianas de las citocinas y por lo tanto sus respuestas son muy diversas; segundo, las citocinas pueden ser tanto específicas en su efecto-diana como desarrollar redundancia; y finalmente, las citocinas cuando actúan de forma combinada entre ellas pueden desarrollar efectos sinérgicos y antagónicos, cada uno de estos efectos pueden hoy explicarse por las características de los receptores de citocinas y sus vías de transducción (Kelso , 1998).

**Pleiotropía y Redundancia.** La capacidad de una citocina para ejercer diferentes funciones, y la de diferentes citocinas para ejercer la misma función. Las citocinas son en general bastante pleiotrópicas es decir, pueden realizar diversas funciones en distintos órganos, esta propiedad se basa en dos razones: 1- los receptores se distribuyen en una gran variedad de tipos celulares; 2- la activación por una misma citocina de diferentes vías de señalización (Ozaki y Leonard, 2002) **Fig 4.** La redundancia de las citocinas observada tanto *in Vitro* como *in Vivo* queda demostrada con el hecho de que la ausencia de una citocina o de su receptor no anula su función en animales de experimentación. La explicación molecular se encuentra en el receptor que puede presentar una homología en las cadenas dominios de transducción de señal **Fig 5** (Ishihara y Hirano, 2003). ¿Porqué algunas de las funciones de una citocina puede ser únicas y otras redundantes?, Kelso (1994) propone que los mecanismos compensatorios existen sólo para aquellas funciones de citocinas



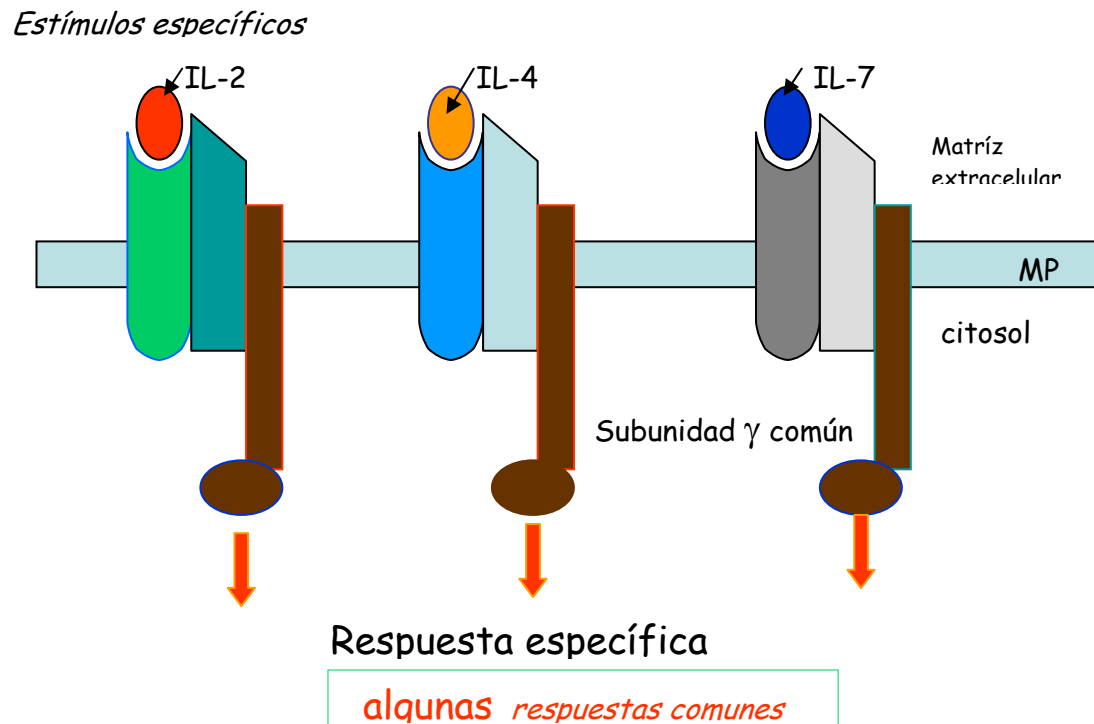
cuya inapropiada o excesiva activación podría no ser patogénica o cuya importancia justifique el riesgo. A la inversa, una función específica de una citocina podría ser aquella que estuviese finamente regulada para evitar las patológicas consecuencias causadas por su falta de expresión.



## Pleiotropía

**Figura 4. Pleiotropía.** Distintas cadenas del receptor transductoras de la señal producen efectos biológicos diferentes.

**Sinergismo y Antagonismo:** la exposición de una célula a dos o más citocinas coincidentes en un tiempo dado conduce a respuestas distintas. En consecuencia, una única citocina puede bajo ciertas circunstancias desencadenar respuestas que son inversas a las demostradas en otras circunstancias. La respuesta de una célula o tejido a una citocina individual *in vivo* o *in vitro* depende del contexto de la propia célula y de su micro ambiente cuándo recibe la señal, es decir del estado de crecimiento y de diferenciación, niveles de nutrientes, tipo de células vecinas, presencia o no de patógenos, lesiones celulares, igualmente es importante considerar la presencia de otros factores como la concentración de citocinas, combinación de otras citocinas presentes al mismo tiempo y a su vez distintas citocinas actuando sobre la misma célula en una secuencia temporal, la influencia de hormonas y neurotransmisores que probablemente estarán presentes en el medio (Burke y cols, 1993, Cañavate, 2002). El hecho de que cada tipo celular pueda tener diferentes respuestas al mismo factor de crecimiento puede ser explicado al menos en parte, por el diferente espectro de genes expresados en estas células y la viabilidad y niveles de factores de transcripción que conducen a la expresión génica (Kroemer y cols, 1993).



## Redundancia

**Figura 5. Redundancia.** Cadenas del receptor transductoras de la señal comunes, efectos biológicos coincidentes.

## 8.- TOXICIDAD Y PATOLOGÍA ASOCIADA

Dado que la compleja red de citocinas interactúa dinámicamente para regular los mecanismos homeostáticos tales como la respuesta inmune, inflamación, respuesta en fase aguda y reparación de tejidos entre otros, no es sorprendente que variaciones en las citocinas a nivel cuantitativo o estructural se asocie a susceptibilidad a determinadas enfermedades, sea la causa inicial de una enfermedad, de procesos patológicos, y en definitiva, se le atribuya un papel en la etiopatogenia de muchas enfermedades (Furie, 1995; García de Galdeano y cols, 1999; Ollier, 2004,).

Una de las primeras lecciones aprendidas de los protocolos experimentales y clínicos de la administración de citocinas fue que la circulación de elevadas concentraciones de citocinas era frecuentemente asociada a toxicidad. La manifestación predominante (fiebre, shock o pérdida de peso) de ciertas enfermedades como las provocadas por un patógeno invasor (Fresno y cols 1996) o una célula neoplásica (Balkwill, 1993) a menudo no son atribuibles a ellos, sino más bien a una compleja, redundante, interactiva y ocasionalmente desbordada cascada de efectos de citocinas. Una vez inducidas, las citocinas se detectan en cada fluido o cavidad corporal, incluyendo suero, fluido cerebroespinal, peritoneal, alveolar, del oído medio, orina, líquido sinovial (Tracey y Cerami, 1993).

Una de las primeras mediadoras identificadas en la caquexia, llamada inicialmente "caquectina" por su acción en el Sistema Nervioso Central y Periférico es hoy conocido como  $TNF\alpha$  (Rothwell, 1999). Efectos deletéreos en el sistema nervioso se produce por una expresión alterada de forma crónica de citocinas, como consecuencia de una infección o proceso inflamatorio, la fuente de estas moléculas son las propias células del sistema nervioso o del sistema inmune. En enfermedades neurológicas humanas como la esclerosis múltiple y la neurodegeneración asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida se ha propuesto a las citocinas como mediadores neuropatogénicos (Ensoli y cols 1999).

A nivel del desarrollo tumoral, hay más experiencias con la terapia de citocinas en oncología que en ninguna otra área de la medicina (Waldmann TA, 1993), pero algunas citocinas están implicadas en el desarrollo de la enfermedad maligna, o bien como factores de crecimiento autocrino/paracrino (García de Galdeano A 1996, Boyano y cols 1997, García de Galdeano A 1998, García-Vazquez y cols 2000) o, debido a su papel como moduladoras de las interacciones tumor/estroma (García de Galdeano A y cols, 1999).

Además ciertas citocinas como IL-1, IL-6 y  $TNF-\alpha$  aparecen con elevados niveles en la circulación en un elevado rango de enfermedades que incluyen las infecciones, inflamaciones severas, daños tisulares, sepsis, enfermedades autoinmunes, reacciones de rechazo injerto contra huésped y huésped contra de injerto (Kroemer y cols, 1993). En estos casos, niveles sistémicos moderados probablemente sean beneficiosos ya que generan fiebre, proteínas reactantes de fase aguda y movilización de factores hematopoyéticos. En enfermedades graves, sin embargo, elevadas concentraciones de IL-1, IL-6 y  $TNF-\alpha$  pueden contribuir a destruir un tejido y a inducir fallo orgánico.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman H, Pillai S. Mecanismos efectores de la respuesta inmunitaria. En. Immunology Cellular y Molecular. Elsevier Saunders ed. 6ª ed .2008
- Agarwal S, Viola JP, Rao A. Chromatin-based regulatory mechanisms governing cytokine gene transcription J Allergy Clin Immunol; 1999. 103:990-999.
- Arai,K, LeeF, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines :coordinators of immune and inflammatory responses. Annu Rev Biochem. 1990; 59:783-836.
- Asadullah KA, Wolfram S, Volk, HD. Analysis of Cytokine Expression in Dermatology. Arch Dermatol. 2002; 138:1189-1196.
- Balkwill FR. Burke F. The cytokine network .Immunol. Today.1989.10:299-304
- Balkwill FR. Cytokines in health and disease. Immunol Today. 1993. 14: 149-150
- Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. Immunol Today.1990.11.350-354.
- Bazán JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc Natl Acad Sci.USA. 1990. 87: 6934-6938.
- Beadling C et al .Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA.1993; 90: 2719-2723
- Beadling C et al. Cytokine response gene 8 (CR8) regulates the cell cycle G1-S phase transition and promotes cellular survival. Oncogene 2001; 20: 1771-1783
- Boyano MD.,García de Galdeano A. Smith-Zubiaga I., Cañavate ML. IL-2 treatment of B16F10 melanoma cells stimulates metastatic colonization in the liver.Anticancer Research.1997.17: 1135-1142 .
- Boyano MD; García Vazquez MD; Lopez-Michelena T; Gardeazabal J; Bilbao J; Cañavate ML; García deGaldeano,A; Izu R; Díaz-Ramon L; Ratón JA; Díaz-Perez J.L.Soluble Interleukin-2 receptor, Intercellular Adhesion Molecule-1 and Interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. British Journal of Cancer. 2000.83: 847-842
- Burke F, Naylor MS, Davies B, Balkwill. The Cytokine Wall Chart. Immunol Today.1993.14:165-170
- Cañavate ML. ¿Provoca el estrés alteraciones en nuestro sistema defensivo?. En Las Ciencias de la Salud y el Progreso Social. (Eds Real Sociedad Bascongada de los Amigos del País). Bilbao.2002
- Clore GM, Gronenborn M. Three-dimensional structures of cytokines and chemokines. FASEB J. 1995. 9:57-72.
- Diez B, Nicolás R., Galdeano A., Cisterna R., Cañavate ML. Kinetics and regulation of NK activity by Interleukin-2 and Interferon in acute toxoplasmosis. Scand J Immunol. 1991, 34: 673-677
- Dinarelli CA, Mier JW. Interleukins. Ann. Rev.Med.1986.37:173-178
- Dinarelli CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996; 87:2095-2147)
- DumondeDC, Wolstencroft RA, Panayi GS, Matthew M, Morley J,Howson WT. "Lymphokines": Non-Antibody mediators of cellular Immunity generated by Lymphocyte Activation. Nature. 1969.224:38-42.

Eberl M. Don't count your interleukins before they've hatched. *Trends Immunol.* 2002; 23: 341-342.

Ensoli F, Fiorelli V, Muratori DS, De Cristofaro M, Vicenzi L, Topino S, Novi A, Luzi G, Sirianni MC. Immune-derived cytokines in the nervous system: epigenetic instructive signals or neuropathogenic mediators?. *Crit Rev Immunol.* 1999. 19:97-116

Fernández-Botran r. soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *FASEBJ.* 1991. 5:2567-2574

Fresno M, Kopf M, Rivas L. Cytokines and infectious diseases. *Immunol Today.* 1997. 18:56-58

Fujimoto m, naka T. Regulation of cytokine signalling by SOCS family molecules. *T rends Immunol.* 2003. 24:659-665.

Furie MB, Randolph GJ. Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol.*1995. 146: 1287-1301.

García de Galdeano A., Boyano MD., Smith-Zubiaga I., Cañavate ML. B16 murine melanoma cells express IL-2 and a functional IL-2 receptor. *Tumor Biology.*1996. 17: 155-167.

García de Galdeano A, Boyano,MD; Smith-Zubiaga I; Alvarez,A; Cantón,I; Cañavate,ML. Involvement of Interleukin-6 in the biology and metastase activity of B16F10 melanoma cells. *European Cytokine Network.*1998; 9:187-192

García de Galdeano A; Boyano MD; Cañavate ML. Effect induced by Interleukin-1 on the behaviour of B16F10 melanoma cells. *Oncology Reports.* 1999. 6:225-228.

García Vazquez MD; Boyano MD; Cañavate ML; Gardeazabal J; García deGaldeano,A;Lopez -Michelena T;Ratón J.A. Díaz-Perez J.L. Interleukin-2 enhances the growth of human melanoma cells derived from primary but not from metastatic tumors. *European Cytokine Network;* 2000; 11: 654-651.

García deGaldeano,A; Cruz-Conde JC, Boyano MD, García Vazquez MD, Cañavate ML. Effect of IL-2 and IL-6 on parameters related to metastatic activity in a murine melanoma. *Pathobiol.* 2001.69:230-236.

Gery I, Gershon RK&Wakrman B.H. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogens: I The responding cell. *J. Exp.Med.* 1972; 136, 128-142

Goguel AF., Borgue F, Tlouzeau S., Cañavate ML., Lespinats G. MHC classI antigen expression and alterations induced by rIFN in tumor hybrid cell immunogenicity. *In vivo.* 1990.4: 185-190

Gualillo O, Lago F. Adipokines: Regulators of Lipid Metabolism. En: *Cellular Lipid Metabolism.* (Ed Christian Ehnholm) SpringerBerlin, Heidelberg. 2009.pp 283-299.

Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Kuchler. Interleukin-33-cytokine of dual function or novel alarmin?. *Trends Immunol.* 2009.30:227-233

Hauzenberger D, Klominet J, Bergströn SE, Sundqvist KG. T Lymphocyte migration: The influence of Onteractions via Adhesion Molecules, the T cell Receptor, and Cytokines. *Crit Rew Immunol.* 1995. 15:285-316.

Ihle JM, Kerr IM. Jaks and Stats. In signalling by the cytokine receptor superfamily. *TIG.*1995.11: 69-74.

Imboden M, A Nieters, AJ Birche, M Brutsche, N Becker, M Wjst, U Ackermann-Liebrich, W Berger, NM Probst-Hensch and S. Team. Cytokine gene polymorphisms and atopic disease in two European cohorts. *Clinical and Molecular Allergy* 2006. 4:doi:10.1186/1476-7961-4-9

Ingman., W.V. Jones R. L. Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. *Human Reproduction Update*, 2008; 14:179–192.

Ishihara K, Hirano T. Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. *BBA.Mol Cell Res.*2002.1592: 281-296

Kelso, A . The enigma of cytokine redundancy. *Immunol. Cell. Biol.* 1994. 72: 97-101

Kelso, A . Cytokines principles and prospects. *Immunol. Cell. Biol.* 1998. 76: 300-317

Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signalling. *J Cell Sci.*2000. 113:2813-2819

Kroemer G, Moreno de Alborán I, Gonzalo JA, Martínez-A C. Immunoregulation by cytokines. *Crit. Rev. Immunol* 1993; 13:163-191

Mantovani A, Savino B, Iocate M, Zammataro L, AllavenaP, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth factor Rev.* 2009 Doi:10.1016/cytogfr.2009.11. 007.

Massagué J. Receptors for the TGF- $\beta$ . Family. *Cell.*1992. 69:1067-1070.

Miller MD, Krangel MS. Biology and Biochemistry of the Chemokines: A family of Chemotactic and Inflammatory Cytokines. *Crit Rev Immunol* .1992.12:17-46

Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. & Gallo, R. *Science*. 1976;193:1007–1008.

Mozo L, Gutierrez C. Mecanismos de transducción de señales a través de los receptores de citocinas. *Inmunología*. 1996.15:1-12.

Nieters A, Linseisen J, Becker N. Association of polymorphisms in Th1, Th2 cytokine genes with hayfever and atopy in a subsample of EPIC-Heidelberg. *Clin Exp Allergy*; 2004; 34:346-353.

Nikolajczyk B. Regulation of cytokine transcription in the context of chromatin. *Arch Immunol Ther Exp.*2006. 54:299-305.

Liles WC, Van Voorhis. Review: Nomenclature and and Biologic Significance of Cytokines Involved in Inflammation and the Host Immune Response. *J Infect Dis.* 1995. 172:1573-1580

Ling NG. Pitfalls in the measurement of soluble forms of cell surface receptors. *Clin.Exp.Immunol.* 1993.93:139-141

Ollier W.E. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine*. 2004. 28: 174-178

Oppenheim, JJ, Yang D. Alarmins :chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005. 17: 354-365

Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and Cytokine Receptor pleiotropy and Redundancy. *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 29355-29358.

Paul WE, Lymphokine nomenclature. *Immunol Today*. 1988.9:366-367.

Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003. 14:185-91.

- Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J. Integration of signals. En: CellBiology. Saunders. Elsevier Ed. 2008. China
- Robertson SA, Seemark RF, Guilbert LJ, Wegmann G. The role of cytokines in gestation. Crit Rev Immunol. 1994; 14: 239-242
- Rose-Jhon S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: Generation and biological function. Biochem J. 1994.300:281-290
- Rothwell NJ. Cytokines-killers in the brain?. J Pathol. 1999.514: 3-17.
- Sato N, Mlyajima A. Multimeric cytokine receptors: common versus specific functions. Current Opinion in cell Biol. 1994.6: 174-179
- Schrader J W .Interleukin is a s interleukin does. Trends Immunol. 2002; 23: 573-574
- Durum S, Mealy K Immunology Today; 199011:103-106
- Shi Y. Massague J. Mechanism of TGF- $\beta$  signalling from cell membranes to the nucleus. Cell. 2003; 113: 685-700
- Slack JMV, Embryonic induction. Mechan Dev. 1993; 41: 91-107
- Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to Interferons. Annu Rev Biochem. 1998; 67:227-264.
- Tracey KJ, Cerami A. tumor Necrosis factor , other cytokines and Disease. Annu.Rev.Biol.1993.9:317-343
- Valente FP, Tan CRT, Temple SE, Phipps M, Witt CS, Kaur G., Gut I, McGinnS, Allcock RJN, Chew CSN and Price P. The evolution and diversity of TNF block haplotypes in European, Asian and Australian Aboriginal populations. Genes and Immunity 2009; 10, 607-615
- Villinger F et al Comparative sequence analysis of cytokine genes from human and nonhuman primates. J Immunol 1995; 155:3946-3954
- Waldmann TA. The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. Immunol today. 1993. 14: 264-269
- Wells TNC, Power CA, Shaw JP, Proudfoot AEI. Chemokine blockers-therapeutics in the making?. Trends Pharmacol Sciences. 2006. 27: 41-47
- Yoshimura A, Naka T , Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nature Rev .2007. 7:454-465.

## CAPÍTULO 21:

# ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN PROCESOS CELULARES Y PATOLÓGICOS

Aintzane Apraiz García

## Índice

1.- ESTRÉS OXIDATIVO: DEFINICIÓN.....	447
1.1.- Componentes.....	447
1.2.- Origen de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).....	448
2.- SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES.....	449
2.1.- Sistema antioxidante enzimático.....	449
2.2.- Antioxidantes no enzimáticos: ¿más que antioxidantes?.....	450
3.- IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PROCESOS CELULARES.....	452
3.1.- Cuando ROS es inductor primario de apoptosis.....	452
3.2.- ROS en la regulación del ciclo celular: efecto en la proliferación y diferenciación.....	454
3.3.- Estrés oxidativo en la senescencia celular y envejecimiento.....	455
3.4.- Estrés oxidativo en autofagia: al límite del bien y del mal.....	457
3.5.- ROS en la respuesta inmune.....	459
4.- PRODUCCIÓN ABERRANTE DE ROS: IMPLICACIÓN EN PROCESOS PATOLÓGICOS.....	461
4.1. ¿Puede el estrés (oxidativo) inducir cáncer?.....	461
4.2.- Cuando no hay adaptación al estrés (oxidativo) continuado: enfermedades (neuro)degenerativas.....	463
5.- MODULACIÓN DEL ESTADO REDOX COMO TERAPIA.....	465
5.1.- Aumento del microambiente oxidativo contra el cáncer.....	465
5.2.- Potenciación de la capacidad antioxidante contra enfermedades neurodegenerativas.....	466
6.- CONCLUSIONES FINALES.....	467
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	468



## 1.- ESTRÉS OXIDATIVO: DEFINICIÓN

Términos como “estrés oxidativo”, “radicales libres”, “especies reactivas de oxígeno” o “antioxidantes” son comunes en la literatura científica de hoy en día tanto si nos movemos en niveles “estrictamente” científicos como en los divulgativos. Sin embargo, no fue hasta finales de la década de los 50 del siglo pasado y más específicamente hacia el 1956 (Gilbert y cols.) cuando se propuso la posible toxicidad del oxígeno por medio de la formación de radicales libres. En caso de interés por un punto de vista histórico de la evolución hasta el presente siglo en este campo, se recomienda leer el trabajo elaborado por Gutteridge y Halliwell (2000).

El **estrés oxidativo** se define hoy en día como el desequilibrio entre la formación de moléculas reactivas oxidantes y sistemas de neutralización de los mismos. Dicho desequilibrio da lugar a la acumulación de moléculas inestables y altamente reactivas que tienden a oxidar y/o degradar moléculas lipídicas, proteicas, carbohidratos o el mismo DNA e inducen la activación de rutas celulares tanto de supervivencia como de muerte celular. La capacidad de estas moléculas para activar diversas rutas hace que se les haya propuesto una función general de *segundos mensajeros*, comparable con la función del calcio intracelular, cAMP, diacilglicerol (DAG) etc. (Valko y cols., 2007; Trachootham y cols., 2008)

### 1.1.- Componentes

Entre las **especies reactivas** mencionados, existen dos subgrupos bien definidos: a) especies reactivas de nitrógeno (*Radical Nitrogen Species* o **RNS**) y b) especies reactivas de oxígenos (*Radical Oxygen Species* o **ROS**). En ambos casos, la “reactividad” o “inestabilidad” provienen de la existencia de electrones en conformaciones inestables que tienden a modificar otras moléculas a fin de obtener una conformación química más estable. En este capítulo nos centraremos en los ROS y sus efectos a nivel celular por ser la principal clase de especies reactivas generadas en organismos vivos.

Los ROS son, tal y como su nombre indica, moléculas con átomos de oxígeno en conformación inestable. En base a su naturaleza química, podemos distinguir entre a) **radicales libres de oxígeno** como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) o el radical hidroxilo (OH), b) **hidrógeno peróxido** ( $H_2O_2$ ) y c) **aniones no radicales** como el ión hipoclorito ( $OCl^-$ ). Entre las arriba mencionadas, los radicales libres constituyen las especies más reactivas, debido a la aparición de electrones desaparejados (*unpaired electrons*) (Valko y cols., 2007; Trachootham y cols., 2008). Las especies de ROS principales se resumen en la figura 1.

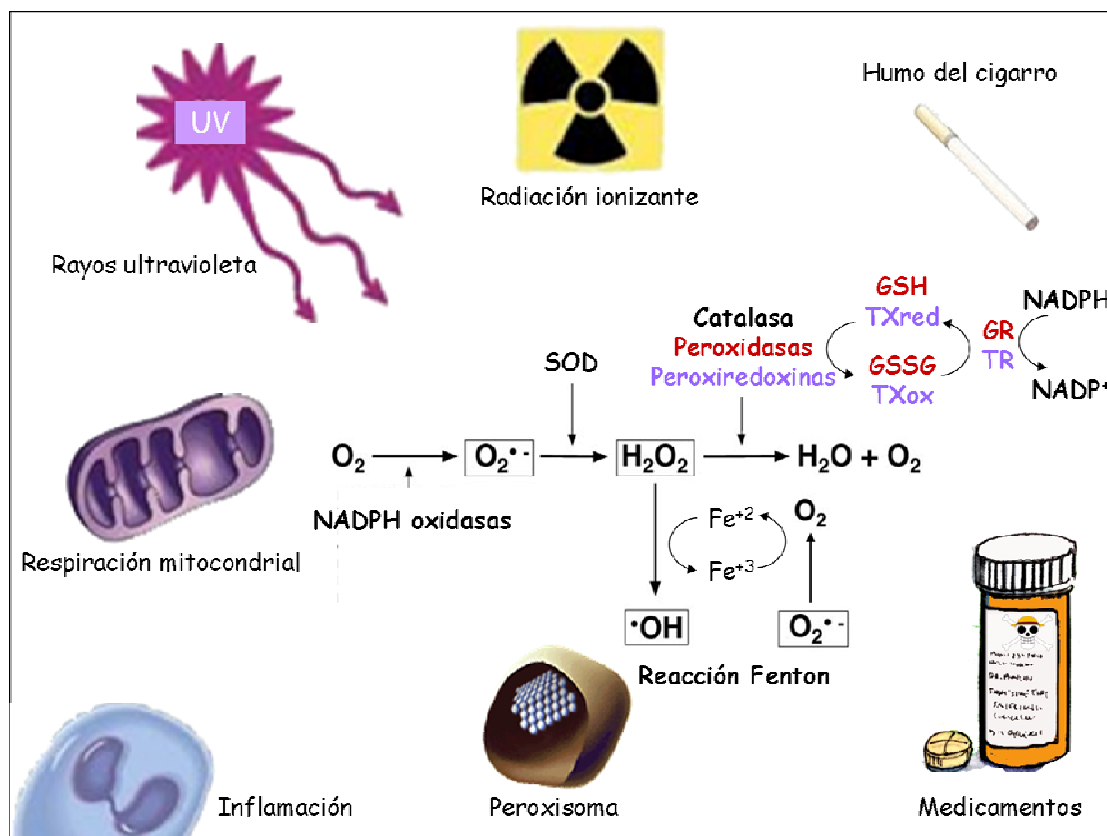
## 1.2.- Origen de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Antes de ahondar en su origen, es importante mencionar que lejos de la primera impresión de “exclusividad patológico”, la formación de ROS se da tanto dentro de la fisiología normal de la célula como en procesos patológicos. De hecho, la principal fuente de generación de ROS intracelular es la propia respiración celular, proceso común en todos los sistemas aeróbicos. La pérdida de electrones en el continuo flujo a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (y también en los cloroplastos en el caso de las plantas) da lugar a la formación de radicales libres de oxígeno que son posteriormente neutralizadas por el sistema antioxidante celular.

En un **plano general**, son múltiples los factores que pueden inducir un aumento en la producción intracelular de ROS (ver figura 1); desde xenobióticos, drogas, o citoquinas a factores medioambientales como la radiación ultravioleta (UV), radiaciones ionizantes (RI) o el propio humo de los cigarrillos (Turpaev, 2002; Ryter y cols., 2007).

En el **ámbito intracelular**, los principales centros y/o reacciones productoras de ROS (ver figura 1) se pueden resumir como:

- La mitocondria, donde ROS es subproducto normal de la respiración celular
- Peroxisomas, centros principales de detoxificación de ROS
- Síntesis programada por medio de enzimas como las NADPH oxidasas (o proteínas NOX)
- Consecuencia de la bloqueo de sistemas de transporte de electrones (e.g. cadena de transporte de electrones mitocondrial), cambios conformacionales mediados por la absorción de energía (e.g. en células epiteliales expuestas a radiaciones UV. Bickers y Athar, 2006)
- La cantidad de metales redox-reactivos reducidos como el hierro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) o el cobre ( $\text{Cu}^{+}$ ) es de gran importancia en la generación de radicales de oxígeno debido a su tendencia a reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reacción Fenton) (Valko y cols., 2007)



**Figura 1. Origen y principales tipos de ROS.** SOD: Superóxido dismutasa; GSH: glutatión; GSSG: glutatión bisulfito; TXred: tioredoxina en estado reducido; TXox: tioredoxina en estado oxidado; GR: glutatión reductasa; TR: tioredoxina reductasa.

## 2.- SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES

Tal y como se ha mencionado, en numerosos casos, la producción de ROS entra dentro de los procesos celulares normales. Por ello, las células han desarrollado sistemas de neutralización de daño por oxidación, genéricamente conocidos como “antioxidantes”.

En relación a los tipos de antioxidantes, existen dos subgrupos principales:

a) sistema enzimático y b) antioxidantes no enzimáticos.

### 2.1.- Sistema antioxidante enzimático

Las células disponen de un amplio sistema enzimático especializado en la metabolización de especies reactivas de oxígeno y en especial, de radicales libres ( $O_2^-$ ,  $OH$ ) e hidrógeno peróxido ( $H_2O_2$ ). Este sistema lo componen enzimas pertenecientes a la categoría de las oxidoreductasas ([http://enzymes.me.uk/enzyme/ec\\_1](http://enzymes.me.uk/enzyme/ec_1)) que corresponden a diferentes grupos como las catalasas, peroxidasas, reductasas, superóxido dismutasas (SOD) o las tioredoxinas (incluyendo las glutaredoxinas y la recientemente descrita nucleoredoxina) repartidas a lo largo de prácticamente toda la células.

Entre las mencionadas enzimas, algunas como la **catalasa**, se hallan normalmente confinadas en orgánulos especializados en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (peroxisomas), la **SOD Mn-dependiente** ha sido descrita como específica de la mitocondria y otras como **glutación peroxidasa (GP)**, **tio redoxina reductasa (TR)**, **glutación reductasa (GR)** o **Cu/Zn SOD** han sido descritas como principalmente citoplasmáticas. A modo de nota, cabe mencionar que incluso se ha descrito una enzima antioxidante extracelular: la SOD 3 o **SOD extracelular**.

Si bien no entraremos en detallar características (más información en los artículos referidos) de cada grupo de enzimas, su clasificación, en base a su función química celular (ver figura 1), sería la siguiente:

- Las **SOD** se encargan de la conversión de radical superóxido ( $O_2^-$ ) en  $H_2O_2$  (Zelko y cols., 2002)
- La conversión de  $H_2O_2$  en  $H_2O + O_2$  la llevan a cabo la **catalasa**, **las peroxidases** (e.g. GP, mediante la oxidación de una molécula de GSH) y las menos conocidas **peroxiredoxinas** (Rhee y cols., 2005; Bindoli y cols., 2008; Zamocky y cols., 2008)
- La **GR y TR** se encargan de la recuperación de la GSH y la tio redoxina (reducida) mediante la oxidación de NADPH (Mustacich y Powis, 2000)
- Las formas reducidas de la **tio redoxina y la glutaredoxina** se oxidan a favor de la reducción de otras moléculas (e.g. proteínas) (Funato y Miki, 2007)

## 2.2.- Antioxidantes no enzimáticos: ¿más que antioxidantes?

Dentro de esta categoría se hallan compuestos con capacidad protectora frente a inductores de estrés oxidativo como el **ácido ascórbico** (o vitamina C), **tocoferoles** (más conocidos como vitamina E), **carotenoides** (precursores de la vitamina A), **melatonina** (también conocida como “la hormona de la oscuridad”) o incluso metales como el **selenio** (debido al requerimiento del mismo en el centro activo de enzimas como la GP y la TR), la mayoría (exceptuando la melatonina) adquiridos extracelularmente mediante alimentos, principalmente vegetales. En este apartado incluimos también al **glutación (GSH)** que si bien está estrechamente ligado al sistema antioxidante enzimático celular, no es por sí mismo una enzima (McEligot y cols., 2005).

El **ácido ascórbico (AA)** o **vitamina C** es una molécula hidrofílica que ejerce su función antioxidante mediante la donación de un electrón que reduce tanto radicales libre de oxígeno como oxígeno singlete o peróxidos (McEligot y cols., 2005). Es a su vez importante la capacidad del AA para reciclar la vitamina E (vitE) mediante la reducción de su radical fenoxil (Kagan y Tyurina, 1998).

El término “**vitamina E**”, por su parte, engloba las diferentes isoformas del tocoferol ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) y tocotrienol ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) de entre las que destaca el  $\alpha$ -tocoferol, por ser la forma predominante en plasma y tejidos. Debido a su naturaleza

hidrófoba, la actividad del  $\alpha$ -tocoferol se centra en el sistema de membranas celulares y dominios lipoproteicos donde ha sido descrito como *inhibidor de peroxidación lipídica en cadena terminal*. A pesar de su bien descrita capacidad antioxidante en sistemas *in vitro*, suspensiones lipídicas o fosfolipídicas etc., cada vez son más las dudas a cerca de su comportamiento *in vivo*; la nueva corriente apunta hacia la actividad del  $\alpha$ -tocoferol como modulador de lípidos o proteína kinasas y con ello de cascadas de señalización celular, más allá de una actividad directa sobre ROS. Azzi, (2007), Traber y Atkinson, (2007) y Atkinson y cols., (2008) resumen el estado actual del tema mediante argumentos tanto a favor como en contra de la actividad antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol.

Los **carotenoides o C40 isoprenoides**, son pigmentos sintetizados tanto en plantas como en algunos hongos y bacterias. Entre ellos, nos es de especial importancia el  $\beta$ -caroteno por ser precursor de la vitamina A el cual jugaría una doble función como antioxidante y precursor del ácido retinoico (AR). El AR, a su vez, se une a sus receptores nucleares (RAR y RXR) regulando la transcripción de genes implicados en procesos como el desarrollo embrionario o la diferenciación celular.

Los carotenoides en general y el  $\beta$ -caroteno en particular han sido descritos como antioxidantes debido a su capacidad para interferir con reacciones iniciadas por radicales y desencadenantes de peroxidación lipídica así como para extinguir (*quench*) singletes de oxígeno (McEligot y cols., 2005). Sin embargo, se ha observado que su comportamiento parece variar entre anti y prooxidante dependiendo de la cantidad de oxígeno disponible o el grado de estrés oxidativo presente en el sistema por lo que se mantiene la controversia sobre su clasificación (Palozza, 2005).

En cuanto a la **melatonina**, es una molécula ubicua que se encuentra tanto en plantas, fungi o animales y que en humanos, como en la mayoría de los vertebrados, se sintetiza en la glándula pineal durante la noche (o fase oscura del ciclo luz/oscuridad ambiental). Sin embargo, además de la importancia en la regulación del sueño, esta hormona (derivada de la serotonina) cumple otras funciones importantes entre las que se halla la de antioxidante (tanto contra ROS como contra RNS) y regulador de enzimas antioxidantes celulares. De hecho, muestra propiedades citoprotectoras en numerosas enfermedades neurodegenerativas así como propiedades oncoestáticas (Pandi-Peruma y cols., 2006).

El **GSH** es el principal representante de la función antioxidante de los tioles y parte esencial del mencionado sistema antioxidante enzimático, cuya forma oxidada es el glutatión bisulfito (GSSG). El glutatión es abundante tanto en el citosol (1-11mM) como en el núcleo (3-15mM) y en la mitocondria (5-11mM), siendo el principal antioxidante soluble de los compartimentos mencionados. Su síntesis se realiza en el citosol mediante la actividad consecuyente de la glutamato-cisteína ligasa y la glutatión sintetasa; tras su síntesis este tripéptido (Glu-Cys-Gly) ha de ser transportado a la mitocondria y al núcleo (Valko y cols., 2007). Entre las funciones antioxidantes principales del GSH destaca la de ser

cofactor de numerosas enzimas antioxidantes como la GP y su labor es especialmente importante en el sistema nervioso central debido a la alta tasa de consumo de oxígeno (respiración mitocondrial) en la misma (Aoyama y cols., 2008).

### 3.- IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PROCESOS CELULARES

La presencia constante de especies reactivas de oxígenos así como los numerosos sistemas de control mencionados dan idea de la importancia de las reacciones reducción-oxidación (reacciones redox) dentro de los procesos celulares.

Junto a ello, la aparición de estrés oxidativo tras diferentes estímulos (citocinas, drogas etc) ha hecho que los ROS intracelulares se definan como *segundos mensajeros*. Sin embargo, creemos conveniente diferenciar entre el efecto de los ROS generados intracelularmente y de la exposición directa a ROS (e.g.  $H_2O_2$ ), ya que en este último caso, el estrés oxidativo sería desencadenante y no eslabón de los procesos celulares regulados.

#### 3.1.- Cuando ROS es inductor primario de apoptosis

La muerte celular es un proceso estudiado desde en el siglo XIX (Majno y Joris, 1995). Ya en 1885 Flemming describió un proceso que denominó *chromatolysis*, tras observar la desaparición de células que presentaban rotura nuclear. Desde entonces, y especialmente a partir de 1970s, son muchos los estudios dirigidos a un mayor entendimiento de cómo procesos extremos como la muerte celular están estrictamente regulados. Al igual que lo ocurrido con el estrés oxidativo, hoy en día se reconoce que la muerte celular apoptótica es un proceso programado que toma parte en actividades tan diversas como el desarrollo de numerosos tejidos o la destrucción de células dañadas.

El hecho de que muchos de los compuestos inductores de apoptosis fueran oxidantes o inductores del metabolismo oxidativo celular hizo que en 1994 Buttke y Sandstrom sugirieran el estrés oxidativo como mediador común en procesos apoptóticos. Al día de hoy, el desplazamiento del ratio GSH/GSSG (formas reducida y oxidada del glutatión) hacia la forma oxidada (GSSG) se considera como una de las principales señales reguladoras del destino celular (Circu y Aw, 2008). Sin embargo, la cada vez más compleja red de sistemas generadores de ROS hace que junto con el **ratio GSH/GSSG**, se hayan propuesto otras variables en la activación de rutas apoptóticas o de supervivencia como:

- **Tipo de ROS generado** donde un aumento de  $H_2O_2$  activaría rutas proapoptóticas mientras que concentraciones bajas de  $O_2^-$  podrían estar relacionadas con rutas de supervivencia

- **Origen de los ROS:** mitocondrial, originado por la NOX4, NQO1, otras NADPH oxidasas etc.

Ryter y cols. (2007) aportan extensa información de las rutas moleculares implicadas en apoptosis por agentes externos oxidantes directos tales como el propio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oxidantes intracelulares como el menadione o paraquat, radiaciones UV o RI. A modo de nota, recordar que a diferencia del estudio basado en el mecanismo de acción de numerosos xenobióticos, drogas o los mencionados oxidantes intracelulares, en el caso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el estrés oxidativo no es mensajero secundario sino inductor principal de la muerte celular. En el apartado 5.1 analizaremos algunos de los compuestos inductores de ROS intracelular por lo que en este apartado, nos centraremos en ROS como estrés primario.

Son muchas las moléculas/rutas de señalización relacionadas con apoptosis y/o supervivencia celular activadas tras la exposición a estrés oxidativo. Entre ellas, cabe destacar la proteína *apoptosis signal-related kinase-1* o **ASK-1**, activada por estrés oxidativo y a su vez, regulada por el sistema antioxidante celular. La ASK-1 es una quinasa de la familia de las MKKK (*Mitogen activated protein Kinase Kinase Kinase*) que ha sido involucrada en la regulación de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) en procesos de muerte celular. A su vez, ya en 1998, Saitoh y cols., describieron que la **TR**, enzima del sistema antioxidante celular, podía inhibir directamente la ASK-1. Junto a ello, la proteína **ser/thr fosfatasa 5** o las **proteínas 14-3-3** también han mostrado inhibir la ASK-1, lo que en su conjunto se puede interpretar como mecanismo de autorregulación o de supervivencia celular frente al estrés inducido (Ryter y col., 2007).

Además de la ruta ASK-1/JNK, otra de las rutas moduladas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incluye la PI3K/Akt, una de las principales rutas de supervivencia celular (Ryter y cols., 2007). La activación de Akt por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> representa un modelo de respuesta celular en su intento de superar el estrés inducido. La regulación de Akt por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no parece ser directa; moléculas como FAK (*Focal Adhesion Kinase*) y la PI3K parecen mediar el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre Akt/PKB mientras que PKC $\alpha$  e IAPs aparecen como dianas dependientes de Akt.

Si bien hemos mencionado algunas dianas intracelulares del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como inductor primario, Ryter y cols. (2007) también resumen el papel de los ROS como activadores de receptores de membrana. Entre dichos receptores, no sólo se hallan aquellos “específicos” de muerte celular (e.g. TNF-RI) sino también otros como los receptores tirosina-quinasa (también conocidos como *receptores de factores de crecimiento* como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor-2 Receptor*) o el PDGFR (*Plateret-Derived Growth Factor Receptor*) clásicamente unidos a supervivencia o proliferación celular.

El hecho de que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muestre dianas en la superficie celular refuerza la importancia de separar en estrés oxidativo de origen intracelular del de origen extracelular.

### 3.2.- ROS en la regulación del ciclo celular: efecto en la proliferación y diferenciación.

Si bien no tan evidentes como la muerte celular, ROS ha demostrado regular otros procesos como la progresión del ciclo celular y con ello, proliferación y la diferenciación. Boonstra y Post (2004) resumen el efecto de ROS sobre el ciclo celular y los procesos mencionados. Brevemente, se observa que aumentos leves puntuales de ROS pueden incrementar la progresión del ciclo celular (con ello la proliferación) mientras que estados prolongados de ROS elevado inducen arresto del ciclo celular ligado a diferenciación, senescencia o muerte celular, de forma dosis y tiempo dependiente (ver figura 2).

Es mucho lo que queda por conocer en cuanto a las bases moleculares precisas de ROS en la regulación del ciclo celular pero son muchos los datos que apuntan hacia la proteína p21 como inductor del arresto celular en casos de dosis no letales de ROS (Boonstra y cols., 2004).

En cuanto a cambios en niveles intracelulares de ROS durante el ciclo celular, Macleod (2008) resume lo que se conoce; se ha observado que los niveles de ROS aumentan durante el paso de la fase G1 a la S y que la eliminación del ROS mencionado induce arresto celular, evitando la entrada en la fase S (o de síntesis). De hecho, se ha postulado que ROS pudiera regular el ciclo celular mediante la modulación de enzimas con aminoácidos redox-sensibles en los centros catalíticos.

La unión entre el ciclo celular y la diferenciación se basa en que en condiciones normales, el arresto del ciclo celular es uno de los pasos previos al inicio tanto de la diferenciación (Miller y cols., 2007) como del proceso de senescencia (analizada más adelante).

Con respecto al proceso de diferenciación parece que una vez más, el nivel de estrés oxidativo es crucial en la inducción/inhibición del proceso. En células madre embrionarias de ratón, se ha observado que un nivel regulado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce proliferación y cardiomiogénesis de los mismos, mediado en parte por la expresión de genes específicos de células cardíacas (e.g.  $\alpha$ -actina, MLC2a, MLC2V etc.). Así mismo, se ha observado que durante la diferenciación, dichas células madre expresaban las isoformas Nox-1, Nox-2 y Nox-4 de las NADPH oxidasas y que el tratamiento de células cardíacas con ROS aumenta proteínas como la Nox-1 y Nox-4, sugiriendo una regulación bidireccional de ROS así como la implicación de los mismos en la diferenciación de células madre embrionarias (Buggisch y cols., 2007)

Otro de los ejemplos de la regulación por estrés oxidativo la encontramos en el sistema hematopoyético (amplia revisión en Macleod, 2008) donde el control sobre ROS o la falta de la misma han demostrado regular las proporciones de proliferación-regeneración-diferenciación del sistema hematopoyético. En este sistema, la familia Foxo (*Forkhead box O*) de factores de transcripción representa uno de los principales moduladores del estrés oxidativo, mediante la regulación de genes correspondientes al sistema antioxidante como la MnSOD



o la catalasa, entre otros (Huang y Tindall, 2007). De forma general, se ha observado que la delección de Foxo3a en ratón reduce la expresión de las 2 proteínas antioxidantes mencionadas dando lugar a un aumento del ROS en las células madre hematopoyéticas (CMH) y una menor regeneración de las mismas (Miyamoto y cols., 2007). Junto a ello, delección de miembros de la familia Foxo como Foxo1, Foxo3a o Foxo4 en CMH induce un aumento de células en las fases S/G2 y M del ciclo celular, diferenciación celular y consecuentemente, menor capacidad regenerativa (Tothova y cols., 2007).

Los ejemplos hasta ahora mencionados corresponden a procesos dentro de la fisiología normal pero la implicación de los ROS en proliferación y diferenciación celular es también extensible a procesos patológicos como el cáncer, caracterizado por la proliferación descontrolada y la falta de diferenciación celular. De hecho, son numerosas las diferencias en la producción y control de ROS halladas entre células normales y neoplásicas (McEligot y cols., 2005). En células neoplásicas, la mayor presencia de enzimas del sistema antioxidantes (e.g. tioredoxina) o antioxidantes no enzimáticos como el GSH induce un microambiente reductor, especialmente importante en compartimentos como el núcleo o la mitocondria. Este microambiente facilitaría no sólo la evasión del proceso apoptótico (e.g. inhibiendo la ASK-1, implicada en la inducción de muerte celular y analizada anteriormente) sino también la proliferación desmedida, fruto de un proceso inverso al ligado a la diferenciación celular y mediado por la activación de factores de transcripción redox-sensibles como el AP-1 (activador proteína-1) y el NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B).

### 3.3.- Estrés oxidativo en la senescencia celular y envejecimiento

“Senescencia” y “envejecimiento” son términos que a menudo se utilizan como sinónimos si bien en organismos pluricelulares, es la senescencia celular la que genera el envejecimiento del organismo. Dicho de otro modo, la consecución de ciertos cambios lleva a la célula hacia un estado inerte (senescencia), a falta de regeneración y deja al organismo carente de recursos frente a estreses (envejecimiento) lo que en último término, induce la muerte tanto celular como del organismo.

Son dos los principales grupos de teorías para la descripción del proceso de **envejecimiento**: a) **las teorías de la acumulación de daños** y b) **las teorías genéticas** (Fossel, 2003; Hayflick, 1998). Dentro de las teorías de acumulación de daños, hallamos la “**teoría de los radicales libres**”, mencionada por primera vez en 1956 (Harman, 1956). Brevemente, la “teoría de los radicales libres” se basa en que los radicales libre producidos durante la metabolismo aeróbico inducen daños aleatorios en el DNA, lípidos y proteínas, daños que se acumulan e inducen el envejecimiento (Valko y cols., 2007).

En cuanto a la senescencia, evolutivamente, se entiende como un proceso para evitar que DNA dañado se replique y pase a nuevas células. Sin embargo, el hecho de que diferentes estímulos pueden inducir senescencia prematura

(también conocida como senescencia inducida por estrés, senescencia independiente de la edad biológica o en cultivo de las células) indica que este proceso juega un papel importante en un amplio espectro de enfermedades que abarca desde enfermedades vasculares a desórdenes neurológicos como el Alzheimer (Muller, 2009).

Las características generales de la senescencia celular se resumen en (Muller, 2009):

- Arresto del ciclo celular (principalmente en la G1/S)
- Alteración en la respuesta a estímulos apoptóticos (una mayor resistencia hacia estímulos que en células no senescentes inducen apoptosis)
- Cambios en la morfología celular (mayor tamaño, células más planas y con citoplasma de poco grosor)
- Aumento en la detección de actividad  $\beta$ -galactosidasa\* (hidrolasa lisosomal)

1

A nivel molecular, el proceso mejor descrito de la senescencia es el acortamiento de los telómeros. Los telómeros están compuestos por repeticiones de secuencias de DNA (5'-TTAGGG-3' en vertebrados) ubicados en los extremos de los cromosomas que confieren estabilidad a los cromosomas y manteniendo la integridad del material genético. Debido a problemas en la maquinaria de replicación del DNA, aún dentro de la biología normal de la célula, los telómeros sufren acortamientos en cada replicación-división mitótica que limitan el número de divisiones celulares e inducen, en último término, la muerte celular por apoptosis.

En lo que respecta a los ROS, son varios los aspectos que lo unen a la inducción de senescencia. Por una parte, se ha observado una correlación positiva entre el número de divisiones celulares, aparición de características senescentes y la cantidad de ROS generado. Por otra parte, numerosos estudios muestran que la exposición de células no tumorales a dosis subletales de  $H_2O_2$  induce lo previamente denominado como *senescencia prematura* y que el estrés oxidativo generado tanto extra- como intracelularmente induce senescencia mediante dos vías: a) por activación de la ruta Erk/p38<sup>MAPK</sup> o b) por la activación indirecta de la ruta p53/p21 (activado tanto tras daño en el DNA o en la integridad de los telómeros). También se ha observado que antioxidantes como el AA, vitE o el *N-tert-butyl* hidroxilamina pueden no solo retrasar la aparición de la senescencia sino también reducir el acortamiento de

---

<sup>1</sup> Nota \*El aumento generalizado de lisosomas durante el proceso de senescencia hace que esta actividad se detecte con mayor facilidad (Kurz y cols., 2000) pero es importante tener en cuenta que la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa no es específica de células senescentes. Es igualmente importante recordar que en el caso de darse GM1-gangliosidosis, enfermedad autosomal recesiva inducida por la falta de  $\beta$ -galactosidasa, las células entran igualmente en senescencia, lo que indica que si bien la actividad de esta enzima es un indicador general, no es requerida para el desarrollo del proceso (Lee y cols., 2006).

los telómeros. Junto a todo ello, se propone que en ratio GSH/GSSG intracelular juega un papel esencial no sólo en procesos “extremos” como la apoptosis/supervivencia sino en previos como la senescencia. En relación a esto, se ha observado que en líneas celulares no tumorales, la depleción de GSH por medio de butahionina sulfoximida (inhibidor irreversible de la  $\gamma$ -glutamylcistina sintasa) induce un aumento de ROS intracelular, mayor acortamiento de los telómeros y desarrollo temprano de fenotipo senescente (Kurz y cols., 2004).

### 3.4.- Estrés oxidativo en autofagia: al límite del bien y del mal

La autofagia, tal y su nombre indica (del Griego *auto*=uno mismo y *phagy*=comer) es un proceso lisosomal de “digestión de uno mismo” (Levine y Kroemer, 2008). Este proceso fue en un principio catalogado como una forma de muerte celular programada, habiéndola llamado “muerte celular programada de tipo II” a fin de diferenciar de la apoptosis, también llamada como “muerte celular programada de tipo I” (Maiuri y cols., 2007). Sin embargo, al día de hoy, la autofagia se relaciona tanto a supervivencia como a muerte celular y son cada vez más los datos que apuntan hacia la autofagia como proceso adaptativo del organismo así como un primer intento de supervivencia (e.g. frente a la falta de nutrientes) que una vez agotado, da pie a la muerte de la misma.

Al igual que ocurre con la apoptosis, la senescencia, la producción de ROS u otros aspectos mencionados, niveles basales de autofagia entran dentro del funcionamiento normal celular, con el objetivo previamente mencionado de la homeostasis entre la formación y degradación de ciertas proteínas y/o organelas. Sin embargo, y de forma paralela a otros procesos como la senescencia, la alteración de este proceso de “reciclaje” puede dar lugar a patologías tales como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas (e.g. Alzheimer, Parkinson...), musculares o cardíacas, entre otras (Levine y Kroemer, 2008).

Al día de hoy, se distinguen al menos 3 formas de autofagia dependiendo del rol fisiológico y el del modo en el que el material se conduce hasta los compartimentos lisosomales (Massey y cols., 2006): **microautofagia** (degradación lisosomal directa de regiones citosólicas), **autofagia mediada por chaperonas** (CMA; degradación lisosomal selectiva de proteínas citosólicas reconocidas por chaperonas) y **macroautofagia** (eliminación de material celular mediante formación de autofagosomas posteriormente unidas a lisosomas). De entre las formas mencionadas, destaca la macroautofagia (a veces mencionado como *autofagia*), por ser el principal metabolismo catabólico regulado de células eucarióticas dirigido a la degradación de proteínas de vida larga y organelas.

En cuanto a la relación entre la macroautofagia y los ROS, existen diferentes estudios, tanto en modelos de levadura como en células humanas, describiendo a los ROS como inductores de autofagia. En el modelo propuesto por Scherz-Shouval y cols. (2007), la falta de nutrientes induce un aumento de

ROS que a su vez inactiva por oxidación a la Atg4. Por su parte, la Atg4 es una cisteína proteasa que regula la conjugación de la Atg8 (correspondiente a la LC3 en células de mamífero) a la membrana del autofagosoma, una de las características principales de la macroautofagia. En consonancia con lo mencionado, se ha observado que los antioxidantes son capaces de bloquear la formación de autofagosomas. Este tipo de macroautofagia se une a procesos de supervivencia celular pero en otros casos, la formación de ROS parece estar ligada a la inducción de muerte celular. Yu y cols. (2006) describieron que la inhibición química de las caspasas mediante el inhibidor zVAD da lugar a un aumento de ROS que induce muerte celular mediada por autofagia. En este estudio, el aumento de ROS se debía a la degradación selectiva de la catalasa. De hecho, se ha propuesto que la degradación de catalasa pudiera estar relacionada con la inducción de muerte celular en casos de autofagia.

Aparte de los ejemplos mencionados, son muchos los estímulos con conocida capacidad para generar ambos fenómenos (estrés oxidativo y macroautofagia) si bien no siempre se conoce el modo específico. El selenito (Kim y Choi, 2008) o el retinoides sintético 4-HPR/ferretinida (Asumendi y cols., 2002; Tiwari y cols., 2008) son algunos de los ejemplos. Junto a esto hay que tener en cuenta que si bien ROS puede inducir macroautofagia, también la macroautofagia puede regular el estrés oxidativo, al poder degradar moléculas u orgánulos dañados por oxidación que pueden ser a su vez, origen de expansión del estrés oxidativo. En el caso concreto de la degradación de mitocondrias, al proceso se le conoce como “mitofagia” (Kim y Choi, 2008).

Por último, cabe mencionar la interesante relación entre diversos aspectos ya mencionados como los ROS, la autofagia (microautofagia, CMA y especialmente, la denominada como macroautofagia) y la senescencia, así como la implicación de todos ellos en enfermedades degenerativas (ver figura 2) como el Alzheimer (también analizado en el apartado 4.2). Aún queda por aclarar si el aumento de ROS en células postmitóticas senescentes se debe a un aumento en la producción de los mismos o a la pérdida de la capacidad antioxidante de la célula pero el aumento de proteínas y orgánulos dañados (e.g. mitocondrias dañadas y lisosomas colmados de lipofuscina) son comunes en células de este tipo. Dentro de este marco, el característico aumento de vacuolas autofágicas podría bien deberse a un intento de la célula por deshacerse de organelas dañadas. Sin embargo, la acumulación de dichas vacuolas también podría ser consecuencia de la gradual pérdida de la capacidad reparadora de las células senescentes en cuyo caso, el aumento de vacuolas autofágicas se debería a un proceso acumulativo de las mismas siendo una consecuencia del proceso de senescencia. Al hilo de ello, recientes estudios muestran como con la edad, las células van perdiendo capacidad para la CMA, lo que aumenta la cantidad de agregados proteicos citosólicos dañados que a su vez, podría aumentar el riesgo de procesos neurodegenerativos (Kiffin y cols., 2007). Así mismo, se ha visto que el bloqueo de la autofagia en células neuronales induce la muerte de las mismas y la aparición de enfermedades neurodegenerativas en modelos de ratón (Hara y cols., 2006; Komatsu y cols., 2006).

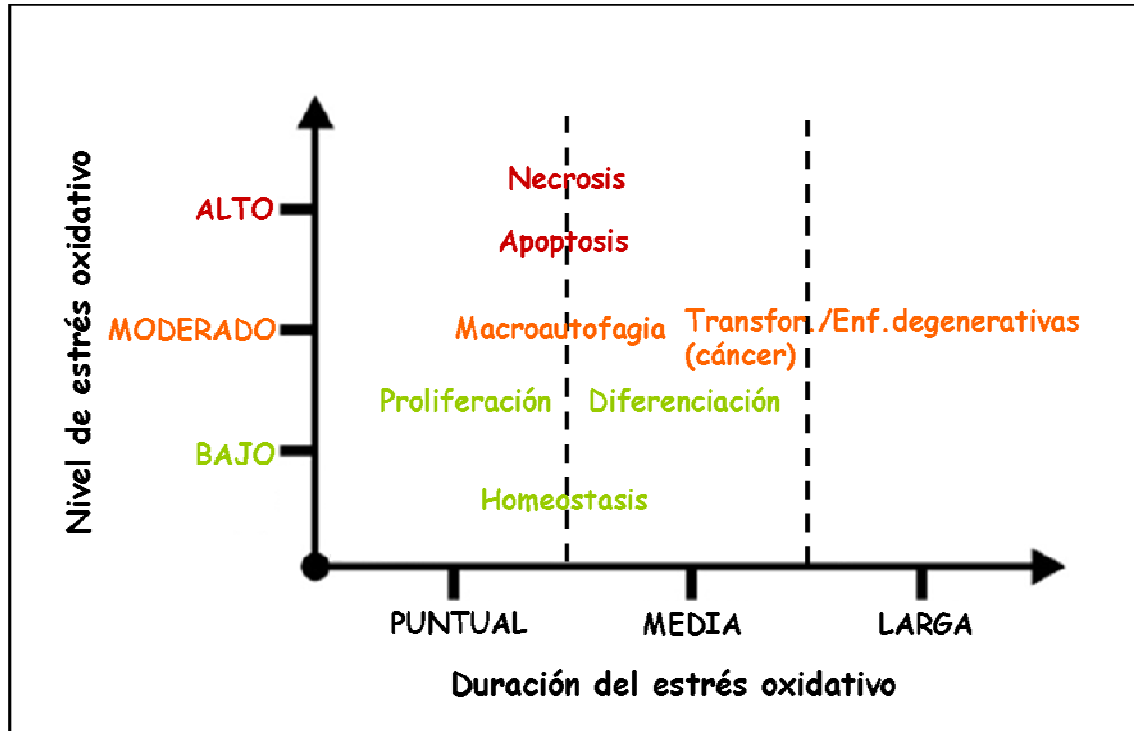


Figura 2: Propuesta de la relación de los niveles y la duración del estrés oxidativo con los procesos celulares afectados. Transfor.: transformación; Enf. Degenerativas: enfermedades degenerativas.

### 3.5.- ROS en la respuesta inmune

En los procesos previamente analizados, el incremento de ROS, tanto como estímulo extracelular primario como a modo de mensajero secundario intracelular, ejercía el efecto sobre la propia célula. Sin embargo, la generación controlada de las especies reactivas (tanto ROS como RNS) es también un arma importante dentro del sistema inmune, donde el fin principal es la destrucción del patógeno.

Esta función defensora la llevan a cabo células fagocíticas especializadas como los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleados neutrófilos), células dendríticas y los macrófagos a través de la producción de ROS/RNS así como mediante la producción de proteasas, péptidos antimicrobianos (e.g. defensinas) y oxidantes (Fialkow y cols., 2007). Entre las sustancias antimicrobianas producidas por los neutrófilos, destaca el ácido hipocloroso, generado a partir de  $H_2O_2$  y cloruro en los fagosomas por la actividad de la mieloperoxidasa (Dale y cols., 2008).

La generación de ROS se da durante el proceso de fagocitosis, debido al aumento del consumo de oxígeno y está principalmente mediada por la NADPH oxidasa fagocítica (comúnmente conocida como Nox2). El centro catalítico de la NADPH oxidasa fagocítica es la  $gp91_{phox}$ , una glicoproteína integral de membrana con masa molecular aparente de 91kDa. Al día de hoy se conocen otros homólogos de la  $gp91_{phox}$ , catalogados como Nox (NADPH oxidasas) y Duox (oxidases duales). En el caso del genoma humano, se han hallado 7 secuencias homólogas para la  $gp91_{phox}$ : Nox1-Nox5 (NADPH

oxidasas) y dos pertenecientes a las oxidasas duales (Duox1 y Duox2). Todas ellas oxidan moléculas de NADPH siendo el oxígeno molecular el último receptor del electrón transferido. Sin embargo, los Nox y los Duox difieren en el principal tipo de ROS detectado: el anión superóxido ( $O_2^-$ ) en el caso de las Nox-as y el hidrógeno peróxido ( $H_2O_2$ ) en el de las Duox. (Sumimoto, 2008).

A modo de nota, cabe mencionar que si bien las Nox-as son muy importantes en la función inmunitaria de las células fagocíticas, no son exclusivas de las mismas, ya que también se encuentran en otros tipos celulares como fibroblastos, miocitos cardíacos o células endoteliales (Valko y cols., 2007).

En el caso concreto de los neutrófilos, la Nox2 se halla no sólo en la membrana plasmática sino también en la membrana de los gránulos. Tras una primera fagocitación del patógeno, el fagosoma formado se fusiona con los mencionados gránulos dando lugar a fagosomas con membrana enriquecida en Nox2. La formación de ROS dentro del fagosoma requiere de la incorporación de NADPH citoplasmático y del transporte del electrón obtenido del NADPH hasta el  $O_2$  por lo que la Nox2 y en general todos los miembros de la familia funcionan como complejos de enzimas de transporte de electrones (Sumimoto, 2008).

Además de la generación de ROS como arma directa contra patógenos, las especies reactivas de oxígeno han sido también implicadas en la activación de los linfocitos T y se ha observado que funciones propias de células T (e.g. producción de interleuquina-2) pueden ser inducidas a concentraciones fisiológicamente relevantes de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Los y cols., 1995).

Por último, es de interés mencionar la dualidad funcional observada en la Apoptosis Signal-regulating Kinase-1 (ASK-1), anteriormente descrita en relación a la apoptosis inducida por estrés oxidativo pero involucrada también en la respuesta inmune innata (Takeda y cols., 2008). En este campo, la ASK-1 ha demostrado ser crucial en el desarrollo de la respuesta inmune activada por LPS (lipopolisacáridos), característico de bacterias Gram negativas. Entre los miembros de la familia TLR (Toll-Like Receptor), receptores de membrana cruciales para el reconocimiento de señales patógenas, la TLR4 es específica para el reconocimiento de LPS y consecuente activación de la respuesta inmune. Una vez TLR4 reconoce los LPS del patógenos, TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factor 6*, uno de los 6 miembros de la familia TRAF) es atraída a la TLR4 y tras la formación de un complejo, se activa la ruta de señalización celular mediada por quinasas que desemboca en la respuesta inmune antibacteriana. Dentro de la ruta de señalización mencionada, la ASK-1 jugaría un papel esencial en la unión del TRAF6 al TLR4 según los diferentes resultados tras tratamiento con LPS como a) la formación de ROS, b) disrupción de la interacción ASK-1-TRAF6 con antioxidantes, c) menos activación de p38 en células deficientes en ASK-1, d) supresión de la activación de la ruta ASK-1-p38 por antioxidantes. Aún queda por conocer el mecanismo preciso por el que se genera ROS tras la activación de TLR4 pero se ha propuesto la medicación de Nox4 (miembro de las NADPH oxidasas previamente mencionadas). La importancia específica de ASK-1 por la ruta LPS-TLR4 se basa en que en

células deficientes en ASK-1, la activación de p38 no se ve afectada tras en tratamiento de otras señales patógenas como los peptidoglicanos (característicos de bacterias Gram positivas y reconocidas por TLR2), Poly (I;C) (RNA sintético de doble cadena y ligando de TLR3) o DNA CpG no metilado (reconocido por TLR9).

**A modo de resumen**, hemos visto que la generación de niveles basales de ROS (principalmente durante la respiración o metabolismo aeróbico) es un proceso continuo y normal dentro de los sistemas aeróbicos y que por ello, las células han desarrollado sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para su control. Sin embargo, variaciones (en su mayoría controladas) de niveles de ROS actúan también como inductores y/o mensajeros secundarios en prácticamente todos los procesos celulares, desde la misma proliferación hasta la muerte celular. De una manera general, se ha propuesto que además del origen de los ROS y las células afectadas por los mismos, la cantidad de ROS generado podría ser clave para la activación de diferentes procesos.

En este sentido, y como ejemplos, la generación de ROS por células fagocíticas expuestas a bacterias Gram negativas implicaría la activación del sistema inmune mientras que la formación de ROS por privación de nutrientes podría inducir autofagia de forma no selectiva. En otro ejemplo, y tal y como mencionan Valko y cols., (2007) un ambiente intracelular reductor (mantenido por niveles altos de GHS o tioredoxina) estimula la proliferación celular mientras que un ligero cambio hacia ambientes mas oxidantes inicia la diferenciación celular. Consecuentes grados de oxidación, sin embargo, activan procesos de muerte celular bien por apoptosis (en casos de estímulos oxidantes moderados) o por necrosis (en casos de oxidación intensa, en los que se sobrepasa la capacidad celular de llevar a cabo una muerte celular programada).

Sin embargo, fallos en el sistema de producción y/o regulación de ROS dan lugar a la aparición de un amplio abanico de enfermedades que analizaremos a continuación.

#### 4.- PRODUCCIÓN ABERRANTE DE ROS: IMPLICACIÓN EN PROCESOS PATOLÓGICOS

El estrés oxidativo ha sido implicado en una gran variedad de condiciones patológicas como enfermedades cardiovasculares, cáncer, desórdenes neurológicos, diabetes, artritis reumatoide o procesos de isquemia/reperfusión (Valko y cols., 2007). Si bien de origen muy diverso, se cree que la mayoría de estas enfermedades aparecen tras cuadros de continuado estrés oxidativo elevado. En este capítulo, analizaremos dos grupos principales de enfermedades: el cáncer y los desórdenes neurodegenerativos .

##### 4.1. ¿Puede el estrés (oxidativo) inducir cáncer?

El cáncer, se entiende hoy en día como un grupo de enfermedades caracterizadas por la inmortalización y proliferación descontrolada de células

que pueden llegar a invadir tejidos ajenos al de su origen (metástasis) y que en última instancia, colapsan todo el sistema. Las alteraciones moleculares halladas no sólo entre diferentes tipos de cánceres o neoplasias sino también entre diferentes individuos con el mismo tipo de cáncer sugieren múltiples orígenes para una misma enfermedad. De hecho, se estima que alrededor del 90% de los casos tienen su origen en factores ambientales mientras que el 10% restante se debería a clara predisposición genética (<http://www.mskcc.org/mskcc/html/5707.cfm?Criteria=hereditary+cancer+percentage>). Dentro de esta amalgama de posibilidades, la extensa presencia de alteraciones en la producción y/o respuesta al estrés oxidativo en células cancerígenas vs. normales ha hecho que se proponga al estrés oxidativo como estimulador de procesos oncogénicos (Valko y cols., 2007; Hail y cols., 2008). En este marco, una presencia mantenida de estrés oxidativo moderado induciría constantes daños en el material genético y una mayor tasa de modificaciones/reparaciones del mismo, aumentando enormemente las posibilidades de mutagénesis y con ello, de carcinogénesis (ver figura 2).

Entre los daños del DNA originados por ROS, se hallan tanto roturas de cadena simple o doble, modificaciones en purinas, pirimidinas o desoxirribosa como *cross-links* de DNA. Estos daños pueden originar tanto arrestos como inducciones en la transcripción de genes, activaciones de rutas de señalización, errores en la replicación del material genético o inestabilidad genética, todas ellas asociadas con el proceso de carcinogénesis (Marnett, 2000; Valko y cols., 2007). Si bien es conocido el potencial carcinogénico de fuentes de ROS como el humo del tabaco, no debemos olvidar el papel de metales como el hierro, cadmio o arsénico. Estos elementos tienen tendencia a generar radicales libres o capacidad para inhibir enzimas antioxidantes por lo que la exposición continuada a los mismos ha sido asociada a la aparición de numerosas neoplasias (Valko y cols., 2007).

Si bien un estrés oxidativo moderado y mantenido puede inducir la aparición de células cancerígenas, también se ha observado que al comparar células normales y cancerígenas, estas últimas suelen presentar niveles intracelulares mayores de ROS (Szatrowski y Nathan, 1991) así como múltiples alteraciones en los sistemas antioxidantes celulares (Valko y cols., 2007; Trachootham y cols., 2008). De hecho, una **disminución del ratio GSH/GSSG** se acepta como uno de los biomarcadores de procesos cancerígenos (Valko y cols., 2007).

Entre las moléculas típicamente alteradas en neoplásicas y reguladas por (o reguladoras de) niveles intracelulares de ROS hallamos a) **factores de transcripción** como NF- $\kappa$ B o AP-1, con residuos de cisteína sensibles a oxidación en los lugares de unión al DNA, b) otras proteínas **como la tioredoxina, RAS, Akt o el Bcl-2**, o c) **proteínas estabilizadas mediante unión** a otras (e.g. ASK-1) entre otros (para más detalles, Trachootham y cols., 2008).

En cuanto a las alteraciones en los sistemas antioxidantes, no siempre hallamos cambios en un único sentido (bien aumento o bien disminución de la



capacidad antioxidante) aunque la mayoría de los estudios apuntan hacia el incremento de la respuesta antioxidante. Algunos trabajos señalan el aumento de tioredoxinas como característica de numerosos cánceres humanos y forma de adaptación/resistencia frente a numerosos fármacos (e.g. doxorubicina) (Baker y cols., 1997); es más, aumentos en niveles (o selección de células con niveles mayores de) de enzimas antioxidantes como la tioredoxina (TX), TX reductasa, GSH reductasa o glutaredoxina han sido asociados al desarrollo de quimioresistencia (McEligot y cols., 2005; Pennington y cols., 2005). Otros estudios apuntan hacia tanto aumentos como disminuciones en niveles de la MnSOD, enzima mitocondrial clave en la conversión del  $O_2^-$  al  $H_2O_2$  (Valko y cols., 2007). Aquellos casos en los que se ha observado un aumento, cabría la misma explicación de mecanismo de adaptación al estrés oxidativo previamente mencionada para la tioredoxina; sin embargo, la disminución de niveles de MnSOD ha sido también interpretada como una estrategia para inducir mayor proliferación celular (basándose en el aumento de ROS observado durante la progresión del ciclo celular y previamente mencionado en el apartado 3.2).

A modo de resumen, los datos indican que la exposición continuada a niveles moderados de ROS induce una mayor tasa de mutaciones y con ello mayor riesgo de oncogénesis. Por ello, la administración de antioxidantes puede ayudar a prevenir estados de estrés oxidativo continuado pero su administración en pacientes con cáncer es un tema a analizar en profundidad.

#### 4.2.- Cuando no hay adaptación al estrés (oxidativo) continuado: enfermedades (neuro)degenerativas

Frente a adaptaciones patológicas a niveles de ROS aumentado (e.g. cáncer), las enfermedades degenerativas que aquí trataremos se caracterizan por la falta de adaptación de las células y pérdida de funcionalidad masiva, mediada en muchos casos por una inflamación continua, aumento de agregados proteicos y desarrollo de senescencia. Nos centraremos en las enfermedades neurodegenerativas debido a la especial vulnerabilidad del sistema nervioso central frente al daño por estrés oxidativo; vulnerabilidad mediada por el alto consumo de oxígeno, abundancia lipídica y relativa escasez de sistema antioxidante, en comparación a otros tejidos (Coyle y Puttfarcken, 1993; Smith y cols., 2000). Queda por aclarar si el estrés oxidativo es el iniciador del proceso neurodegenerativo o el producto secundario de otras rutas patológicas activadas pero una cada vez mayor cantidad de datos implican al estrés oxidativo en la propagación del daño celular. Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Amiotrófica Lateral (EAL) o la ataxia con deficiencia de vitE son algunas de las enfermedades de este grupo; enfermedades contra las que se ha propuesto la aplicación de compuestos con características antioxidantes como la vitE (Ricciarelli y cols., 2007).

Entre las mencionadas patologías, el **Alzheimer** es la enfermedad neurodegenerativa asociada al envejecimiento más común con 20-30 millones de afectados en el mundo (Selkoe, 2005). Al igual que en el caso del cáncer,

manifestaciones tempranas de la enfermedad (entre los 40-50 años) suelen asociarse a componentes genéticos (o hereditarios) mientras que los casos de aparición tardía (en mayores de 60 años) suelen corresponder a casos espontáneos (Law y cols., 2001).

Las características moleculares principales de esta enfermedad son la **deposición extracelular de la proteína  $\beta$ -amiloide** ( $A\beta$ ; conformando la mayor parte de las llamadas placas seniles) y la **precipitación intracelular de la proteína tau hiperfosforilada** (formando los ovillos neurofibrilares) (Valko y cols., 2007; Ricciarelli y cols., 2007).

Los agregados de  $A\beta$  están formados por péptidos de 39-43 aminoácidos formados a partir de la rotura proteolítica de la proteína precursora larga del beta amiloide (APP). Existen dos formas principales de  $A\beta$ : la forma principal, la  $A\beta_{1-40}$ , y la minoritaria pero más tóxica (debido a una mayor propensión a formar agregados), la  $A\beta_{1-42}$  (Valko y cols., 2007). Condiciones oxidantes han mostrado favorecer la formación de agregados tanto de  $A\beta$  como de tau y la interacción de agregados de  $A\beta$  con las membranas celulares neuronales han mostrado desencadenar reacciones que forman ROS (Ricciarelli y cols., 2007). Entre dichas reacciones podemos mencionar la actividad Cu-reductasa de tanto la APP como la  $A\beta$ , generando  $Cu^+$  a partir de  $Cu^{+2}$ , reacción que genera  $H_2O_2$  como subproducto. Junto a ello, se ha visto que formas neurotóxicas de  $A\beta$  ( $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{1-40}$  e incluso  $A\beta_{25-35}$ ) estimulan la oxidación de ascorbato mediada por cobre, como no así el amiloide no tóxico  $A\beta_{40-1}$  (Valko y cols., 2007). Así mismo, *post-mortem* análisis de tejidos con Alzheimer han desvelado que los agregados de  $A\beta$  pueden formar ROS de manera indirecta, mediante la activación local de la respuesta inmune y consecuente inflamación, según resumen Ricciarelli y cols. (2007).

En el caso del **Parkinson**, la pérdida de neuronas se da en el área del cerebro medio llamado *substantia nigra*. De hecho, la **pérdida de neuronas** y la **formación de cuerpos de Lewy** son las características patológicas principales de esta enfermedad. Los cuerpos de Lewy son depósitos esféricos proteicos compuestos principalmente por  $\alpha$ -sinucleína y hallados en el citoplasma de células nerviosas (Sayre y cols., 2001). Al igual que en las enfermedades hasta ahora mencionadas, el Parkinson puede también desarrollarse como enfermedad hereditaria o de forma espontánea (Schulz, 2008). Una vez más, el estrés oxidativo parece estar detrás de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*. A modo general, se ha observado que uno de los primeros cambios en cerebros con Parkinson es la dramática bajada de niveles de GSH en la *substantia nigra* y que el nivel de estrés oxidativo de esta zona es mayor en individuos enfermos en comparación a los sanos. También se ha demostrado que en células dopaminérgicas en cultivo, la bajada de GSH induce la **inhibición selectiva de la actividad del complejo I mitocondrial**, otra de las características propias del Parkinson. Junto a la inhibición del complejo I mitocondrial y la bajada de niveles de GSH, los datos apuntan a una anormal acumulación de hierro, que en su conjunto induciría la oxidación aberrante de la dopamina y la formación de agregados de  $\alpha$ -

sinucleína, si bien se desconoce el proceso concreto (Valko y cols., 2007; Riciarelli y cols., 2007).

## 5.- MODULACIÓN DEL ESTADO REDOX COMO TERAPIA

Tal y como acabamos de mencionar, las células cancerígenas que caracterizan por la adaptación a condiciones de estrés oxidativo moderado mientras que en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, es el mismo aumento de generación de ROS o la pérdida de capacidad antioxidante la que genera y/o expande el efecto neurotóxico. De esta forma, creamos 2 grupos bien diferenciados de enfermedades ligados a alteraciones del estado redox celular que de forma lógica, requerirán de dos enfoques terapéuticos diferentes, si no opuestos.

### 5.1.- Aumento del microambiente oxidativo contra el cáncer

Las células neoplásicas se adaptan o son seleccionadas en condiciones demasiado “estresantes” para las células normales; de hecho, hasta parecen “aprovecharse” de las rutas de supervivencia celular activadas de forma normal como respuesta al estrés oxidativo (e.g. AP-1) para mantener su perpetuidad (ver figura 2). Sin embargo, también hemos visto que en numerosos casos, las células cancerígenas muestran niveles alterados (y en la mayoría de casos aumentados) de componentes del sistema antioxidante celular, dejando clara la importancia del estado redox incluso en este sistema. Teniendo en cuenta la importancia de hallar fármacos que atacando células cancerígenas no afecten o mínimamente afecten las normales, diferencias como la del ROS basal entre las dos poblaciones son claves para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

Por ello, son dos las estrategias principales basadas en el balance redox celular y testadas contra el cáncer: a) depleción de la capacidad antioxidante celular y b) aumento de estrés oxidativo.

En el caso de la **depleción de la capacidad antioxidante**, la disrupción del GSH mediante el compuesto natural  $\beta$ -fenietil isotiocianato (PEITC) ha demostrado incrementar el ROS en células malignas, induciendo su muerte selectiva *in vitro* y con mínima toxicidad para las correspondientes células parentales no tumorales. *In vivo*, este tratamiento ha mostrado aumentar la supervivencia en ratones con cáncer de ovario con Ras transformado (Trachootham y cols, 2008). El TDZD-8 (4-benzil, 2-metil, 1, 2, 4-tiadiazolidina, 3, 5 diona) también induce acumulación de ROS mediada por eliminación de tioles y muerte selectiva de células de leucemia con marcadores de células madre, sin toxicidad significativa en células madre hematopoyéticas normales (Guzman y cols., 2007).

El gran número de compuestos dirigidos al **aumento de estrés oxidativo** como terapia anticancerígena indican la prevalencia de esta estrategia sobre la anterior. Entre las agentes anticancerígenos aprobados por la FDA (Food and

Drug Administration; <http://www.fda.gov/cder/cancer/approved.htm>) y/o siendo extensamente analizados, hallamos unos 56 inductores de ROS, entre otros, el arsénico trióxido (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), el metoxiestradial (2-ME), la N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR), antraciclinas (como la doxorubicina (adriamicina) o la daunorubicina), cisplatín, bleomicina o fluorouracil. A pesar de la larga lista de compuestos con actividad antineoplásica, se desconoce el mecanismo de acción exacto de la mayoría y en otros casos, se han propuesto numerosas moléculas diana susceptibles de ser afectadas (Fontana y Rishi, 2002; Miller y cols., 2002; Hail y cols., 2006). Junto a ello, no podemos olvidar que algunos de estos agentes (e.g. 4-HPR; Fontana y Rishi, 2002) inducen la muerte selectiva de células cancerígenas, afectado mínimamente las células normales mientras que otras (como las antraciclinas), han demostrado causar daños también en tejidos no diana como las células cardíacas (Chen y cols., 2007; Anderson y Sawyer, 2008). En conjunto, queda clara la necesidad de futuros estudios sobre el mecanismo de acción exacto de las drogas ya en uso a fin de mejorar su uso y diseñar nuevos compuestos con dianas cada vez más específicas.

## 5.2.- Potenciación de la capacidad antioxidante contra enfermedades neurodegenerativas.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la acumulación de ROS puede promover la muerte excesiva o temprana de células, induciendo, en muchos casos, enfermedades degenerativas (principalmente, del sistema nervioso central). Es por ello que hace ya décadas que se estableció la utilización de antioxidantes en la prevención de este tipo de patologías, mediante tratamientos con antioxidantes exógenos y neutralizadores (*scavenger*) naturales de ROS (para una revisión, Dröge y Schipper, 2007). A modo de ejemplo, la N-acetilcisteína (NAC), precursor de GSH, ha demostrado proteger de la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo y pudiera retrasar la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Arakawa e Ito, 2007). Por otra parte, la melatonina, hormona con capacidad antioxidante parece proteger frente a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson o la Corea de Huntington (Pandi-Perumal y cols., 2006).

Además de intervenciones farmacológicas, estudios epidemiológicos han mostrado que dietas ricas en compuestos antioxidantes como las frutas y verduras también podrían reducir el riesgo a desarrollar enfermedades neurodegenerativas mayormente asociadas a la edad como el Alzheimer o Parkinson (Lau y cols., 2007). Una vez más, quedan muchos aspectos por determinar; entre ellos, las concentraciones fisiológicas requeridas de los mencionados antioxidantes o las posibles diferencias entre el uso de antioxidantes lipofílicos como la vitE frente a otros como el AA (o vitamina C).

## 6.- CONCLUSIONES FINALES

Es extensa la información facilitada y muchos los aspectos analizados. Sin embargo, el objetivo del presente capítulo no ha sido otro que el de eliminar el carácter “destructor” más generalizado en relación a las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y facilitar fuentes de información a cerca de “las otras funciones” de las mismas.

Tal y como se ha mencionado, los ROS pueden ser bien inductores primarios como segundos mensajeros, participando en prácticamente todos los procesos celulares (desde la proliferación a la muerte). La inducción de uno u otro proceso parece depender del tipo de ROS acumulado, su cantidad y duración del estímulo, lo que dificulta el estudio de moléculas de por sí poco estables. No obstante, el amplio sistema antioxidante celular así como la eficacia mostrada por terapias basadas en la modulación del estado redox indican la importancia del mismo en las células (y por consiguiente organismos) dependientes de oxígeno. Una vez conocido el efecto destructor de situaciones extremas de estrés oxidativo, el reto consiste en dar con sistemas de estudio que permitan conocer el efecto de las “modulaciones leves de ROS”. Ahí queda eso...

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- Anderson B, Sawyer DB. Predicting and preventing the cardiotoxicity of cancer therapy. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; 6: 1023-33
- Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol Sci* 2008; 108: 227-38
- Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. *Cerebellum* 2007; 19: 1-7
- Asumendi A, Morales MC, Alvarez A, Aréchaga J, Pérez-Yarza G. Implication of mitochondria-derived ROS and cardiolipin peroxidation in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis. *Br J Cancer* 2002; 86: 1951-6
- Atkinson J, Epanand RF, Epanand RM. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 739-64
- Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 16-21
- Baker A, Payne CM, Briehl MM, Powis G. Thioredoxin, a gene found overexpresses in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997; 57: 5162-7
- Bickers DR, Athar M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 2565-75
- Bindoli A, Fukuto JM, Forman HJ. Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1549-64
- Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004; 337: 1-13
- Buggisch M, Ateghang B, Ruhe C, Strobel C, Lange S, Wartenberg M, Sauer H. Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J Cell Sci* 2007; 120: 885-94
- Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7-10
- Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sayer DB. Molecular and cellular mechanism of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007; 7: 114-21
- Circu ML, Aw TY. Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res* 2008; 42: 689-706
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-95
- Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008; 112: 935-45
- Dröge W, Schipper HM. Oxidative stress and aberrant signalling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 2007; 6: 361-70
- Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signalling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 153-64
- Fontana JA, Rishi AK. Classical and novel retinoids: their targets in cancer therapy. *Leukemia* 2002; 16: 463-72

- Fossel M. Cells, Aging and Human Disease. Oxford University Press, New York. 2003
- Funato Y, Miki H. Nucleoredoxin a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1035-57
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1956; 119: 623-26
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 136-47
- Guzman ML, Li X, Corbett CA, Rossi RM, Bushnell T, Liesveld JL, Hébert J, Young F, Jordan CT. Rapid and selective death of leukemia stem and progenitor cells induced by the compound 4-benzyl, 2-methyl, 1, 2, 4-thiadiazolidine, 3, 5 dione (TDZD-8). *Blood* 2007; 110: 4436-44
- Hail N Jr, Cortes M, Drake EN, Spallholz JE. Cancer chemoprevention: a radical perspective. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 97-110
- Hail N Jr, Kim HJ, Lotan R. Mechanism of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 1677-94
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; 441: 885-9
- Harman D. Aging-A theory based on the free-radical and radiation-chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300
- Hayflick L. How and why we age. *Exp Gerontol* 1998; 33: 639-53
- Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007; 120: 2479-87
- Kagan VE, Tyurina YY. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 425-34
- Kiffin R, Kaushik S, Zeng M, Banyopadhyay U, Zhang C, Massey AC, Martinez-Vicente M, Cuervo AM. Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age. *J Cell Sci* 2007; 120: 782-91
- Kim EH, Choi KS. A critical role of superoxide anion in selenite-induced mitophagic cell death. *Autophagy* 2008; 4: 76-8
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441: 880-4
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000; 113: 3613-22
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 2417-26
- Macleod KF. The role of the RB tumour suppressor pathway in oxidative stress responses in the haemopoietic system. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 769-81
- Lau FC, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Nutritional intervention in brain aging: reducing the effects of inflammation and oxidative stress. *Subcell Biochem* 2007; 42: 299-318

- Law A, Gauthier S, Quirion R. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 35: 73-96
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell* 2006; 5: 187-195.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27-42
- Los M, Dröge W, Stricker K, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol* 1995; 25: 159-65
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-70
- Massey AC, Kaushik S, Cuervo AM. Lysosomal chat maintains the balance. *Autophagy* 2006; 2: 325-7
- Mauri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Cell Biol* 2007; 8: 741-52
- McEligot AJ, Yang S, Meyskens FL Jr. Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Annu Rev Nutr.* 2005; 25: 261-95
- Miller JP, Yeh N, Vidal A, Koff A. Interweaving the cell cycle machinery with cell differentiation. *Cell Cycle* 2007; 6: 2932-8
- Miller WH Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanism of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002; 62: 3893-903
- Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 101-12
- Muller M. Cellular senescence: molecular mechanism, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 59-98
- Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 2000; 346: 1-8
- Palozza P. Can beta-carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740: 215-21
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 2006; 273: 2813-38
- Pennington JD, Wang TJ, Nguyen P, Sun L, Bisht K, Smart D, Gius D. Redox-sensitive signalling factors as a novel molecular targets for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2005; 8: 322-30
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanism and emerging concepts in cell signalling. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1543-52
- Ricciarelli R, Argellati F, Pronzato MA, Domenicotti C. Vitamin E and neurodegenerative diseases. *Mol Aspects Med* 2007; 28: 591-606



- Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanism of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 49-89
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998; 17: 2596-606
- Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 2001; 8: 721-38
- Scherz-Shpuval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 26: 1749-60
- Schulz JB. Update on the pathogenesis of the Parkinson's disease. *J Neurol* 2008; 255: 3-7
- Selkoe DJ. Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2005; 62: 192-5
- Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1502: 139-44
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 2008; 275: 3249-77
- Szatrowski TP, Nathan CP. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51: 794-8
- Takeda K, Noguchi T, Naguro I, Ichijo H. Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48: 199-225
- Tiwari M, Baipai VK, Sahasrabudhe AA, Kumar A, Sinha RA, Behari S, Godbole MM. Inhibition of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced autophagy at a lower dose enhances cell death in malignant glioma cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 600-9
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegué E, DePinho RA, Gilliland DG. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007; 128: 325-39
- Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 4-15
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1343-74
- Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67: 281-92
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem cell Biol* 2007; 39: 44-84
- Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 4952-57
- Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1527-48
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 337-49

## **CAPÍTULO 22:**

### **EL ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y EL RIÑÓN**

Lourdes Castro Ortega; Santos Blanco Ruiz; Juan Ángel Pedrosa Raya;  
M<sup>a</sup> Ángeles Peinado Herreros.

#### Índice

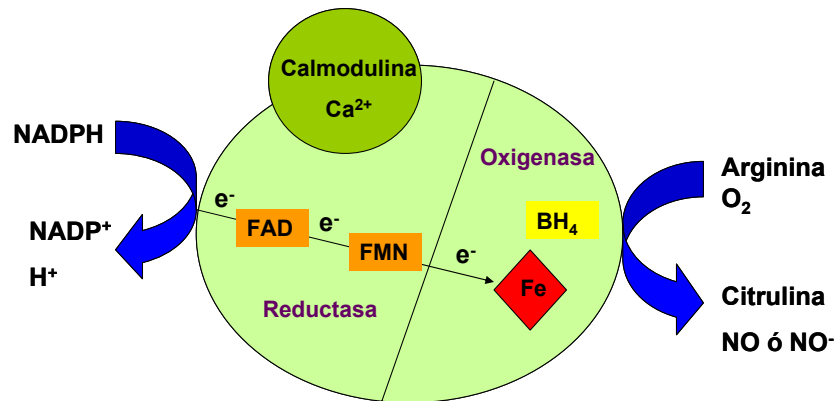
1.- INTRODUCCIÓN .....	473
2.- SÍNTESIS, FUNCIÓN DEL NO E INTERACCIÓN CON OTRAS SUSTANCIAS.	473
3.- LOCALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS (NOS) EN RIÑÓN .....	477
3.1.- Expresión de la endotelial óxido nítrico sintasa (eNOS) en riñón .....	478
3.2.- Expresión de la neuronal óxido nítrico sintasa (nNOS) en riñón.....	478
3.3.- Expresión de la inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) en riñón.....	479
4.- FISIOLÓGÍA RENAL Y SISTEMA NO/NOS. ....	479
4.1.- Funciones del NO en el riñón .....	480
4.2.- Fisiología renal y eNOS.....	481
4.3.- Fisiología renal y nNOS.....	482
4.4.- Fisiología renal e iNOS.....	483
5.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS NOS .....	483
6.- BIBLIOGRAFÍA .....	486

## 1.- INTRODUCCIÓN

El riñón es un órgano que desempeña un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis corporal, así como en la eliminación de productos de desecho metabólicos potencialmente tóxicos para el organismo. El riñón también ejerce otras funciones como la endocrina, al ser responsable de la secreción de hormonas como la renina y la eritropoyetina. Además, muchas de estas funciones dependen de una serie de mecanismos moleculares en los que el óxido nítrico (NO) juega un papel central. El NO es un radical libre gaseoso de corta vida media que actúa como mensajero celular e interviene en un gran número de procesos fisiológicos en multitud de órganos y sistemas, siendo su papel como vasodilatador a nivel endotelial uno de los más críticos e importantes. El NO es sintetizado por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) que transforman L-arginina en L-citrulina junto con cantidades equimoleculares de NO, en presencia de poder reductor NADPH y oxígeno molecular. Hasta la fecha se han descrito tres isoformas NOS: la neuronal o NOS 1 (nNOS), la endotelial o NOS 3 (eNOS) y la inducible o NOS 2 (iNOS). Las tres isoformas NOS se encuentran constitutivamente expresadas en el riñón y desempeñan un importante papel fisiológico relacionado con la tasa de filtración glomerular, el mecanismo del feedback tubuloglomerular (TGF) y la regulación de la tensión arterial, entre otras.

## 2.- SÍNTESIS, FUNCIÓN DEL NO E INTERACCIÓN CON OTRAS SUSTANCIAS

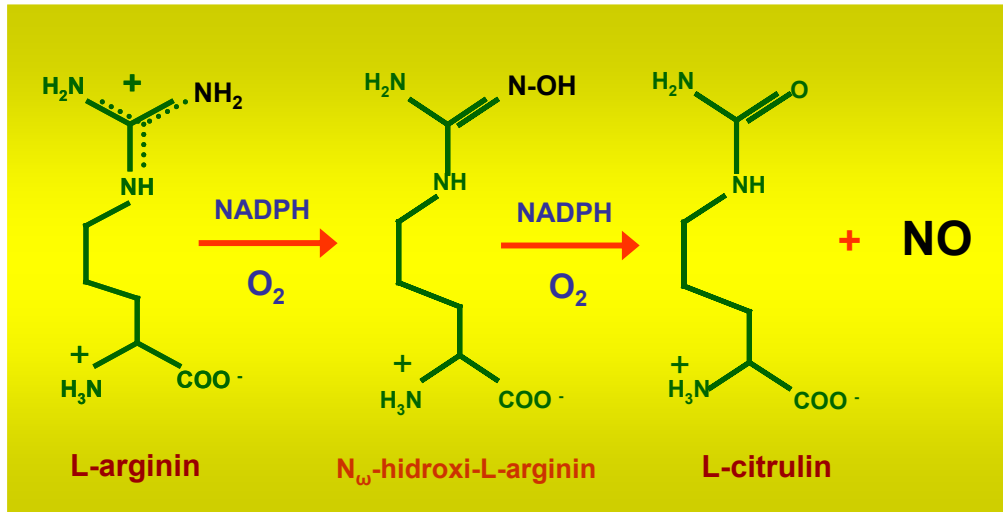
El NO es un radical libre gaseoso que participa como molécula señalizadora en múltiples funciones fisiológicas, por ejemplo, como sustancia neuromoduladora (revisado en Rodrigo y cols., 2000). De hecho, se ha descrito el papel del NO como mensajero autocrino y paracrino en el sistema nervioso central (SNC) (Bredt y Snyder, 1994) donde está implicado en los mecanismos de plasticidad sináptica y vasodilatación (Hobbs e Ignarro, 1996; Bon y Garthwaite, 2001) entre otros. Estudios desarrollados en la última década demuestran que el NO también está altamente implicado en la función renal; concretamente se sabe que el NO renal regula la reabsorción de sales y fluidos (Stoos y Garvin, 1997; Ortiz y Garvin, 2002), la hemodinámica (Kone y Baylis, 1997), la secreción de renina (Kurtz y Wagner, 1998) y el feedback tubuloglomerular (TGF) (Tojo y cols., 1994; Wilcox, 1998; Wilcox y Welch, 1998; Ren, Garvin y Carretero, 2000).



**Fig. 1: Esquema representativo de las óxido nítrico sintasas (NOS)** en relación a la catálisis de su reacción química y cofactores asociados. Los electrones ( $e^-$ ) son donados por NADPH al dominio reductasa de la enzima y son transportados vía FAD y FMN hasta el dominio oxigenasa, donde interactúan con el Fe del grupo hemo y tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) en el lugar activo de la enzima para catalizar la reacción del oxígeno con la L-arginina generando como productos L-citrulina y óxido nítrico (NO). El flujo de  $e^-$  desde el dominio reductasa al dominio oxigenasa, requiere la presencia y anclaje de  $Ca^{2+}$ -Calmodulina (revisado por Alderton y cols., 2001).

La síntesis biológica de NO la llevan a cabo una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) (Moncada y cols., 1991; Moncada y Higgs, 1993; Rodrigo y cols., 1994, 1997, 1998), de las cuales se han descrito tres isoformas: dos de ellas, la de tipo I y la de tipo III, también denominadas neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS) al ser detectadas por primera vez en estos tipos celulares, respectivamente. Tanto la eNOs como la nNOS son generalmente de carácter constitutivo (cNOS) y generan pequeñas cantidades de NO en condiciones fisiológicas. Por el contrario, la isoforma tipo II, con un nivel bajo de expresión en condiciones basales, es de carácter inducible (iNOS); así esta isoforma se induce por endotoxinas y citoquinas generando grandes cantidades de NO (Moncada y Higgs, 1991; Fostermann, 1994; Marletta, 1993; Xie y cols., 1994; Possel, 2000; Lee y cols., 2003) y se detecta principalmente en células del sistema inmune, aunque puede ser inducida en prácticamente cualquier célula nucleada que sea sometida al estímulo apropiado.

Las tres isoenzimas sintetizan NO y L-citrulina equimolecularmente a partir de L-arginina, reacción que es dependiente de calcio-calmodulina, utilizan nucleótidos de flavina y tetrahidrobiopterina como cofactores y su actividad tiene lugar en presencia de  $O_2$  y NADPH (Knowles y cols., 1989; Moncada y Higgs, 1993). El NO lo producen mediante la hidroxilación de un N-terminal del grupo guanidinio de la arginina, formando un intermediario que se descompone rápidamente hasta NO y L-citrulina (ver Fig. 1 y 2).



**Fig. 2: Reacción química de formación del óxido nítrico (NO) y L-citrulina a partir de L-arginina en presencia de NADPH y oxígeno, llevada a cabo por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS)**

El NO participa en numerosos procesos biológicos mediante la modificación reversible o irreversible de proteínas, y la mayoría de sus efectos dependen en gran medida de su concentración. Así, sus funciones fisiológicas como mensajero intra e intercelular estarían mediadas por bajas concentraciones de NO, que actuaría directamente sobre sus dianas moleculares (este papel lo realiza normalmente NO sintetizado por las NOS constitutivas). En cuanto a sus efectos patológicos, estos los ejerce de forma indirecta a través de las especies reactivas de nitrógeno (ERN), que se generan por un exceso en la producción de NO, a través de la sobreestimulación de las cNOS o por la inducción de la iNOS.

Se han descrito dos vías principales por las que el NO ejerce su actividad en la célula. La primera de ellas se desencadena por la activación de la enzima guanilato ciclasa soluble (cGC) que genera GMP cíclico (GMPc), un segundo mensajero que activa quinasas dependientes de GMPc (*protein kinase G*, PKG, cGK); éstas a su vez, mediante mecanismos de fosforilación, controlan el funcionamiento de canales iónicos (GNIC) y la actividad de fosfodiesterasas (PDE), que además modulan la expresión génica en diferentes rutas de señalización intracelular, incluida apoptosis. Mediante este mecanismo de activación de la guanilato ciclasa, el NO ejerce la mayoría de sus funciones fisiológicas. La segunda vía es más directa y depende de la S-nitrosilación de proteínas implicadas en múltiples vías de señalización; éstas actúan como dianas del NO, que de esta forma, interfiere en las actividades dependientes de las proteínas que nitrosila (Peinado y cols., 2003). De hecho, mediante esta segunda vía, el NO puede modular en el sistema nervioso su propia producción, al influir sobre la activación de las NOS Ca $^{2+}$ -dependientes. En este último caso, el mecanismo se suscita por su unión directa a receptores como el NMDA que regula la entrada de calcio a la célula y por tanto la función de las dos NOS constitutivas. El NO también puede reaccionar fácilmente con grupos ferro-

sulfuro inactivando proteínas de forma irreversible (revisado por Brown y Borutaite, 2004).

El NO sintetizado en cantidades adecuadas, participa en multitud de procesos fisiológicos, destacando la neuromodulación, la regulación del flujo sanguíneo, o la participación en mecanismos de defensa frente a patógenos (Moro y cols., 1998). Ahora bien, cuando el NO se produce en grandes cantidades o durante largos períodos de tiempo su reactividad puede volverse nociva; en este último caso, la isoforma más implicada corresponde a la iNOS, que sintetiza NO de forma no regulada, y que requiere para su expresión de citoquinas inflamatorias que ponen en marcha la vía de I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B y la consiguiente biosíntesis de iNOS (Peinado y cols., 2003; Rodrigo y cols., 2000; Pannu y Singh, 2006). La superproducción de NO derivado de la actividad iNOS, crea las condiciones idóneas para que se produzca su unión a superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) lo cual determina la formación del potente oxidante peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Koppenol y cols., 1992; Pryor y Squadrito, 1995). El ONOO<sup>-</sup> es muy soluble en lípidos y tiene un amplio abanico de moléculas diana, causando la oxidación de grupos -SH, peroxidación lipídica, roturas en el ADN y ARN, etc. (Beckman y Ames 1997; Lipton, 1999). Así pues, el anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) puede nitrar residuos de tirosina de determinadas proteínas, impidiendo las interacciones funcionales de las mismas a través de estos residuos y poniendo en peligro la viabilidad celular (Beckman y cols., 2000). Cuando el anión peroxinitrito reacciona con residuos de tirosina de las proteínas, forma 3-nitro-L-tirosina y este compuesto suele utilizarse como marcador de exposición acumulada a NO a través de anticuerpos específicos (Rodrigo J y cols., 2001). Además, el peroxinitrito estimula la vía intrínseca de la apoptosis. Diversos estudios han demostrado que en la hipoxia, tanto isquémica como hipóxica, el peroxinitrito, además de facilitar la formación de poros mitocondriales de permeabilidad transitorios (Clementi y cols., 1998), desencadena una rápida modificación de la estructura del citocromo c, probablemente vía nitración de tirosina, lo que facilita su salida al citosol proceso básico para que se active la vía de las caspasas que lleva a la apoptosis (Cassina y cols., 2000).

Por otra parte, es sabido que el óxido nítrico puede reaccionar con restos sulfhidrilo para formar compuestos S-nitrosotioles que actúan como reservorios endógenos circulantes de NO y que, en cierta medida, son potenciales donadores del mismo. Su fórmula general es RSNO y existen numerosos ejemplos tales como la S-nitrosocisteína, el S-nitrosoglutatión y la S-nitrosoalbúmina, en los que R representa un aminoácido, un polipéptido o una proteína, respectivamente. Los compuestos S-nitrosotioles son bastante inestables y se degradan para generar NO y el correspondiente disulfido. De hecho su estabilidad les viene conferida entre otros factores por las propiedades del grupo R, la presencia de iones metálicos de transición (en particular cobre) y la presencia de otros tioles. Los RSNOs participan en la reacción de transnitrosación en la que el grupo nitroso (-NO) es transferido a otro tiol para formar un compuesto RSNO más estable (revisado por Richardson y Benjamín, 2002). Recientemente muchos S-nitrosotioles son sintetizados químicamente para su aplicación como fármacos donadores de NO (revisado por Al-Sa'doni y Ferro, 2004). En este sentido algunos científicos han demostrado que la

liberación de NO a partir de compuestos S-nitrosotioles promueve la angiogénesis; por tanto, a través de una incrementada denitrosilación tiene lugar un aumento de la biodisponibilidad de NO, independientemente de la actividad de las enzimas NOS (Al-Ani y cols., 2006).

Así pues, la molécula S-nitrosoglutatión (GSNO) se origina a partir de la S-nitrosilación del glutatión (GSH), es decir de la interacción del NO con grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína de la proteína. Esta molécula, el GSNO, tiene un elevado poder antioxidante, hasta cien veces superior al glutatión (GSH). El GSNO se ha relacionado tanto con procesos de daño como protectores. Chiueh y Rauhala (1999) demostraron que en SNC el GSNO aniquila numerosos radicales y promueve neuroprotección a través de sus acciones de nitrosilación independiente de GMPc, reduciendo además la peroxidación lipídica. De este modo, la S-nitrosilación de residuos de cisteína por parte del GSNO se relaciona con la inactivación de la caspasa 3 y la proteasa HIV-1, por lo que previene la apoptosis y la neurotoxicidad. No obstante, en condiciones aeróbicas, la reacción del NO con grupos tiol genera ERO, como el radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), y provoca daños en el ADN (Kikugawa y cols., 2005), mientras que en un ambiente anaeróbico, en ausencia de  $\text{O}_2$ , la interacción de GSNO con GSH o grupos CySH genera radicales tioles como el  $\text{GS}^{\cdot}$  y el  $\text{CyS}^{\cdot}$ . Recientemente, otros autores han revisado que existe una compleja modulación de la apoptosis en las células inmunes, fundamentada en mecanismos de S-nitrosilación/denitrosilación vía GSNO (Duan y Chen, 2007). Por tanto, el NO y su donador, el GSNO, son capaces de inducir la apoptosis de células del sistema inmune a través de varias rutas de señalización, entre las que se encuentra el sistema de S-nitrosilación/denitrosilación que supone una importante y reversible herramienta redox.

### 3.- LOCALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS (NOS) EN RIÑÓN

Tojo y colaboradores (1994) realizaron un estudio inmunocitoquímico para averiguar la localización de las isoformas NOS en el aparato yuxtglomerular del riñón de ratas normales. Desarrollaron anticuerpos específicos para las NOS constitutivas (cNOS) por un lado, y para la isoforma inducible (iNOS) por otro. Detectaron un intenso marcaje cNOS-positivo en el aparato yuxtglomerular a nivel de las células de la mácula densa. No obstante, la inmunorreactividad para iNOS fue detectada en la porción terminal de la arteriola aferente y de forma ocasional en la porción inicial de la arteriola eferente del aparato yuxtglomerular. Además, el túbulo distal aparecía completamente marcado pero de forma débil. Las arterias arciformes e interlobulares no mostraron marcaje NOS. Asimismo, la inyección de lipopolisacáridos estuvo asociada a un incremento del inmunomarcaje para la iNOS en la arteriola aferente, sin embargo, no tuvo efecto en la inmunorreactividad para las cNOS. Lo más interesante del estudio, es que Tojo y colaboradores aportaron imágenes de microscopía electrónica que mostraron el marcaje de las cNOS (nNOS y eNOS) distribuido como pequeñas vesículas citoplasmáticas de las células de la mácula densa. Para la isoforma inducible, la arteriola aferente exhibió una

distribución desigual en algunas células, mientras que otras muestran el citoplasma inmunoteñido. Los resultados de Tojo y colaboradores (1994) sentaron las bases para admitir que las isoformas NOS (constitutivas e inducible) estaban presentes en el aparato yuxtaglomerular, lo que les hizo pensar que éstas podían estar implicadas en los mecanismos de regulación del *feedback* tubuloglomerular (TGF) y presión sanguínea capilar del glomérulo.

### 3.1.- Expresión de la endotelial óxido nítrico sintasa (eNOS) en riñón

Como es lógico pensar, la eNOS está altamente expresada en el endotelio de la vasculatura renal, aunque a nivel tubular también está presente. Ensayos inmunohistoquímicos han mostrado que eNOS está expresada en las arterias y arteriolas renales, los capilares glomerulares y los vasos rectos descendentes medulares (Bachmann y cols., 1995; Fernández y cols., 2003). Por el contrario, esta isoforma no está expresada en los capilares corticales o en el endotelio venoso (Bachmann y cols., 1995). La expresión de eNOS a nivel tubular se ha descrito tanto en los conductos colectores de la médula interna (Wu y cols., 1999) como en la rama gruesa ascendente del asa de Henle (Plato y cols., 2000) y en los túbulos contorneados proximales (Kone BC y Baylis C, 1997; Baines y Ho, 2002). A nivel de expresión de proteína por *western blot*, se observan similares niveles tanto en corteza como en médula (Martin y cols., 2002).

### 3.2.- Expresión de la neuronal óxido nítrico sintasa (nNOS) en riñón

Numerosos estudios han demostrado que existe un elevado nivel de expresión de proteína nNOS en la mácula densa (Mundel y cols., 1992; Wilcox y cols., 1992; Bachmann y cols., 1995; Tojo y cols., 2000; Mount y cols., 2005), donde el NO es un importante modificador de la respuesta del *feedback* tubuloglomerular o TGF (Wilcox, 1998). Igualmente, Bachmann y colaboradores (1995) han identificado en el riñón la nNOS en neuronas especializadas, conocidas como nervios no-adrenérgicos, no colinérgicos, englobados en las arterias del hilio renal, las arterias arqueadas y las arterias interlobulares, y ocasionalmente las arteriolas aferentes preglomerulares. Además estos mismos autores observaron que nNOS se expresaba también en la cápsula de Bowman y en los túbulos distales. Fernández y colaboradores (2003) también describieron un plexo nitrérgico nNOS-inmunorreactivo en el seno renal y los cálices menores, además de una inervación nNOS positiva extendida a través del parénquima renal. Por otro lado, estudios de PCR y microdissección de determinados segmentos, han permitido detectar expresión de ARNm de nNOS en conductos colectores de la médula interna, externa y de la corteza renal, así como en la rama delgada de la médula interna (Terada y cols., 1992).

La evaluación de expresión de proteína nNOS por *western blot*, confirma que los mayores niveles de expresión están en la médula renal, en concreto en la médula interna (Martin y cols., 2002). De hecho en los conductos colectores, la nNOS es encontrada en las principales células encargadas del transporte de



agua, sodio y potasio, siendo mínima la expresión de nNOS en las células intercaladas secretoras de ácido (Wang y cols., 1998). En el túbulo proximal (Wang y cols., 2000, Baines y Ho, 2002) y en la rama gruesa ascendente del asa de Henle (Wang y cols., 2002) la expresión de nNOS es baja.

### 3.3.- Expresión de la inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) en riñón

Existe controversia en relación a la expresión de la isoforma iNOS en el riñón. Varios investigadores han sido incapaces de detectar expresión de la proteína iNOS en riñón de ratas normales (Bryant y cols., 1998, Zhang y cols., 2000; Stumm y cols., 2002; Kosaka y cols., 2003; Mount y cols., 2005) en ratón (Park y cols., 2003) o en humanos (Jarry y cols., 2003). Por el contrario, autores como Ni y colaboradores han detectado expresión de proteína iNOS en el riñón de ratas normales (Ni y Vaziri, 2001). Se ha descrito que la iNOS es expresada constitutivamente en médula renal (Kone y Baylis, 1997) y también se han detectado en el túbulo proximal (Ahn y cols., 1994). Mohaupt y colaboradores (1994) detectaron dos formas de ARNm iNOS en el riñón de rata normal: la equivalente a la de macrófagos murinos (macNOS) y la equivalente a la de la musculatura lisa vascular (vsmNOS). El lugar de mayor expresión de ARNm iNOS en el riñón es la rama gruesa ascendente medular (Mohaupt y cols., 1994; Morrissey y cols., 1994). Hay numerosos estudios que demuestran que la expresión de iNOS en riñón, tanto a nivel de ARNm como de proteína, se ve incrementada a través de estímulos pro-inflamatorios tales como la isquemia/reperfusión (Kosaka y cols., 2003; Park y cols., 2003; Viñas y cols., 2006) o lipopolisacáridos (Mohaupt y cols., 1994; Morrissey y cols., 1994; Bryant y cols., 1998, Zhang y cols., 2000; Stumm y cols., 2002; Kosaka y cols., 2003) pero menos es conocida frente a otros estímulos como la hipoxia hipobárica.

La diferencial distribución topográfica que las tres isoformas NOS tienen en el riñón a lo largo de los segmentos de la nefrona y otras estructuras renales, confiere un mayor nivel de complejidad al estudio e interpretación de la funcionalidad de las mismas.

## 4.- FISIOLÓGÍA RENAL Y SISTEMA NO/NOS.

El óxido nítrico en el riñón representa numerosos papeles fisiológicos incluyendo la regulación de la hemodinámica renal y glomerular (Kone y Baylis, 1997; Majid y Navar, 2001), la mediación de la natriuresis y presión (Majid y cols., 1993), el mantenimiento de la presión medular de perfusión (Mattson y cols., 1992), la modulación de la respuesta del feedback tubuloglomerular (TGF) (Wilcox, 1998; Wilcox y Welch, 1998; Ren, Garvin y Carretero, 2000), la secreción de renina (Kurtz y Wagner, 1998), la reabsorción de sales y fluidos (Stoos y Garvin, 1997), como por ejemplo, la inhibición de la reabsorción tubular de sodio (Ortiz y Garvin, 2002) y la modulación de la actividad del nervio simpático renal (Eppel y cols., 2003). El efecto reticular del NO en el riñón es promover la natriuresis y la diuresis (Lahera y cols., 1991). Además el NO juega un papel crucial en la adaptación a las variaciones del consumo de sal en la

dieta (Shultz y Tolins, 1993). Por otra parte, una deficiente producción de NO en respuesta a un incremento de la sal en la dieta está implicado en la patogénesis de la hipertensión (Pallone y Mattson, 2002). A su vez, se ha descrito que la producción de NO endógeno disminuye la expresión génica de la hormona eritropoyetina (EPO) en vivo. En este sentido, experimentos usando ratones knock-out para eNOS o inhibidores de las NOS (Ej.: L-NAME) indican un considerable aumento de los niveles de ARNm-EPO tras la hipoxia, con respecto a individuos control (Todorov y cols., 2000).

#### 4.1.- Funciones del NO en el riñón

Haciendo una revisión de los conocimientos que hasta la fecha se tienen sobre el papel del NO en la fisiología renal, se pueden admitir las siguientes funciones:

a) Regulación de la hemodinámica renal. Estudios en los que se han empleado inhibidores NOS, como por ejemplo, análogos de L-arginina (NLA y L-NAME), han demostrado que el NO juega un papel importante en el mantenimiento del normal tono vascular en el riñón, que es un órgano con una resistencia vascular más baja que otros (Majid y Navar, 2001).

b) Mediación de la natriuresis-presión. En el riñón este aspecto es crucial para mantener la presión sanguínea normal y el balance de sodio (Guyton y cols., 1972). De hecho, cuando tiene lugar un incremento fisiológico de la presión sanguínea se produce una rápida respuesta de elevación de la excreción de sodio en la orina (natriuresis) que restablece los niveles de presión arterial y de sodio normales. El NO interviene en dicha respuesta (Majid y cols., 1993), así la inhibición de NO provoca embotamiento y una correcta elevación de la curva de presión natriurética, resultando en una mayor presión sanguínea (Salom y cols., 1992).

c) Regulación de la secreción de renina. El NO actúa como un potenciador de la secreción de renina por la vía de inhibición de la degradación del AMPc a través de la acción del GMPc, pero además puede activar una respuesta inhibitoria a través de la actividad proteína quinasa dependiente de GMPc (Kurtz y Wagner, 1998).

d) Transporte tubular de sodio. El efecto del NO en el transporte tubular de sodio varía a lo largo de los diferentes partes de la nefrona. No obstante, en la mayoría de los casos el NO actúa inhibiendo la reabsorción tubular de sodio, con los consiguientes efectos natriuréticos y diuréticos (Ortiz y Garvin, 2002). El efecto inhibitorio del NO de la reabsorción de sodio en el túbulo proximal parece ser debido a una disminución del intercambio apical de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Roczniak y Burns, 1996) y una reducción en la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Liang y Knox, 1999).

e) Regulación del *feedback* tubuloglomerular (TGF). Existen evidencias de que el NO participa en la respuesta del TGF (Guan y cols., 2003). El TGF describe la vasoconstricción arteriolar aferente y ello resulta en una reducción

de la tasa de filtración glomerular, con una incrementada entrega de soluto al segmento de la mácula densa de la misma nefrona (Thomson y cols., 1999). De hecho, la elevada expresión de nNOS en la mácula densa fue la primera pista de que el NO interviene en la regulación de la respuesta TGF (Wilcox y cols., 1992; 1998).

f) Regulación del flujo sanguíneo medular. La principal función del NO en la médula es contrarrestar los efectos vasoconstrictivos de agentes como la angiotensina II, la vasopresina y la noradrenalina, para mantener el flujo sanguíneo medular y proteger contra el desarrollo de hipertensión (Zou y cols., 1998; Cowley y cols., 2003).

g) Interacción entre el NO y los nervios renales simpáticos. El sistema nervioso simpático renal es importante en la regulación de la hemodinámica y juega un papel relevante en la homeostasis de sodio. La síntesis basal de NO en la médula contribuye a la resistencia relativa de la médula renal al efecto vasoconstrictivo de la activación del nervio simpático renal (Eppel y cols., 2003), también está relacionado con el incremento de reabsorción de sodio en el túbulo proximal (Wu y Johns, 2002) contrario a los ya comentados efectos natriuréticos.

## 4.2.- Fisiología renal y eNOS

Los estudios con ratones deficientes en las diferentes isoformas NOS han sido muy útiles para comprender el papel del NO en la fisiología renal. Muchos trabajos realizados al respecto han demostrado que los ratones knock-out para eNOS (KO eNOS o eNOS<sup>-/-</sup>) muestran hipertensión con respecto a los ratones silvestres (Kurihara y cols., 1998; Stauss y cols., 1999 y 2000; Wagner y cols., 2000; Beierwaltes y cols., 2002).

Estudios previos in vivo han demostrado el papel del NO derivado del endotelio (NO/eNOS) en la regulación del tono vascular (Kone y Baylis, 1997; Fleming y Busse, 1999). Existen trabajos con ratones KO eNOS para el estudio de la respuesta de la vasculatura frente a estímulos vasodilatares; en estos ratones eNOS<sup>-/-</sup> no se produce relajación en respuesta a acetilcolina (ACh) (Huang y cols., 1995). Otros autores como Scotland y colaboradores (2002) demostraron que eNOS modula la vasodilatación inducida por ACh. No obstante, investigaciones llevadas a cabo con un inhibidor no selectivo de las NOS, como el N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), dieron como resultado un descenso del flujo sanguíneo en ratones silvestres mientras que no hubo diferencias en los ratones KO eNOS. Estos datos sugieren, que en ausencia de eNOS para restablecer el flujo sanguíneo renal se activan una serie de mecanismos compensatorios. En arterias resistentes, la ausencia de eNOS es a veces compensada o bien por EDHF (factor de hiperpolarización derivado del endotelio) (Scotland y cols., 2001), o por un producto ciclooxigenasa, o incluso por NO derivado de otras isoformas como la nNOS, como ocurre en las arteriolas piales del cerebro y la microcirculación coronaria (Meng y cols., 1998;

Huang y cols., 2002). En otros casos como en la circulación pulmonar, la ausencia de eNOS no es compensada en absoluto (Fagan y cols., 1999).

Por otra parte, existen datos que apoyan la idea de que el NO/eNOS es el responsable de la secreción de renina, mientras que otros dicen lo contrario (Kurtz y Wagner, 1998). Muchos autores concluyen que la liberación de renina dependiente de la presión estaría completamente compensada en ratones eNOS<sup>-/-</sup>, puesto que el NO derivado de la nNOS en mácula densa podría ocupar este papel.

Igualmente, se ha descrito que el NO producido por la eNOS actúa como un autacoide que inhibe la absorción de NaCl en la rama gruesa ascendente del asa de Henle, no siendo compensada por otras isoformas la carencia de eNOS (Plato y cols., 2000; Ortiz y cols., 2005). Así pues, es posible que la ausencia del NO/eNOS pueda incrementar de forma crónica la reabsorción de NaCl por la nefrona y las respuestas del TGF, contribuyendo a la hipertensión observada en ratones KO eNOS. Además, el NO endotelial disminuye la respuesta vasoconstrictora de la angiotensina II y es un importante regulador de la microcirculación medular en el riñón (Mattson y cols., 1997; Pallone y Mattson, 2002).

#### 4.3.- Fisiología renal y nNOS

Desde el punto de vista de la tensión arterial los ratones knock-out para nNOS (KO nNOS o nNOS<sup>-/-</sup>) no muestran una variación con respecto al grupo de ratones silvestres (Nelson y cols., 1995; Vallon y cols., 2001). La administración de un inhibidor específico para nNOS, como es el 7-nitroindazol (7-NI) en ratones eNOS<sup>-/-</sup> reduce significativamente la presión sanguínea (Kurihara y cols., 1998). Aunque nNOS puede comportarse como antihipertensivo en algunos casos (Ren y cols., 2001), en otros parece ser pro-hipertensivo (Barouch y cols., 2002). Por tanto, el papel de nNOS en la regulación de la presión arterial está todavía poco definido.

Como ya se ha introducido, la expresión de nNOS es significativamente más alta en la mácula densa comparada con otras células tubulares, lo que sugiere un importante papel de dicha isoforma en la modulación de la función del aparato yuxtglomerular y la mácula densa (Wilcox, 1998). Por otro lado, cuando se aplica un inhibidor específico para la isoforma nNOS, no tiene lugar un cambio en el flujo sanguíneo medular, a pesar de que disminuyen los niveles de NO (Kakoki y cols., 2001), de lo que se deduce que nNOS no juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo medular, no obstante, cuando la eNOS esté desajustada la nNOS podría recobrar protagonismo.

La inhibición de la nNOS de la mácula densa con 7 nitroindazol (7-NI) incrementa la magnitud de respuesta de TGF, visto como una gran constricción de la arteriola aferente (Ren y cols., 2001). A pesar de ello, otros autores encontraron que no había diferencias significativas en cuanto al TGF entre los ratones silvestres y los ratones nNOS<sup>-/-</sup> (Vallon y cols., 1998). Otros trabajos

han postulado que un posible mecanismo es que NO actúe de forma autocrina en la macula densa, vía TGF por inhibición tónica de la entrada de NaCl a través del cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (Ortiz y cols., 2001). El NO producido en la mácula densa difunde a través del espacio intersticial y activa a la guanilato ciclasa soluble en las células de la musculatura lisa, incrementando los niveles de GMPc y dilatando la arteriola aferente.

A pesar de que se ha demostrado que el NO en el túbulo contorneado proximal inhibe el transporte de sodio y fluido (Ortiz y Garvin, 2002), no hay evidencias de que esté relacionado con NO generado por nNOS.

#### 4.4.- Fisiología renal e iNOS

Por último, en lo referente a la isoforma inducible (iNOS), mientras que en la mayoría de los tejidos es inducida sólo por factores proinflamatorios, es expresada constitutivamente en médula renal (Kone y Baylis, 1997). A pesar de que iNOS puede estar implicada en el desarrollo de hipertensión sensible-salina, han sido muy pocos los estudios que la han relacionado con la regulación del flujo sanguíneo. De hecho iNOS no ha sido encontrada en la vasculatura bajo condiciones fisiológicas, sino que sólo ha afectado de forma evidente al tono vascular cuando es inducida por factores inflamatorios (Ullrich y cols., 1999).

Como ya se ha descrito antes, iNOS está expresada en el túbulo proximal (Ahn y cols., 1994). En esta línea, existen trabajos que concluyen que bajo condiciones basales el NO producido por iNOS en el túbulo proximal estimula la reabsorción de solutos y fluidos (Wang et al, 2002). A diferencia de eNOS, la iNOS no parece contribuir a la inhibición de la reabsorción de sodio mediada por NO en la rama gruesa ascendente (Plato y cols., 2000).

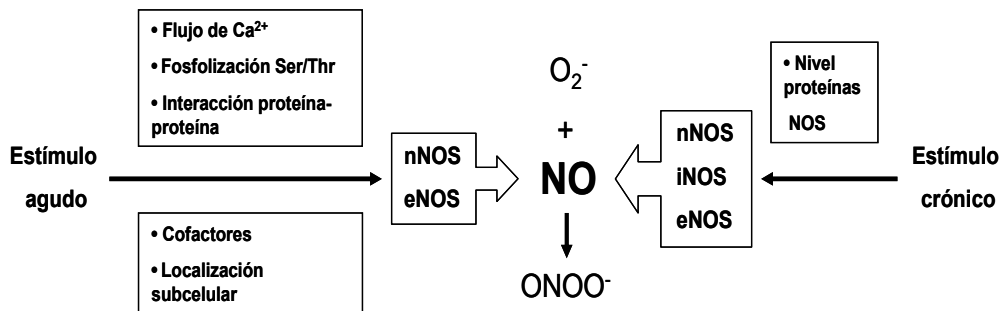
### 5.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS NOS

En función de la duración e intensidad se pueden describir dos tipos de estímulos, que contribuyen a regular la expresión de las NOS: estímulos agudos y estímulos crónicos. Además en función de a qué nivel se produce la regulación, ésta puede ser transcripcional, traduccional o post-traduccional (ver Fig. 3).

Cuando se producen estímulos agudos es más frecuente que deriven en respuestas basadas en mecanismos post-traduccionales, capaces de regular la producción de NO de una forma más rápida que cuando tienen lugar cambios a nivel de la transcripción y la traducción.

En el caso de un estímulo crónico, como es el de una dieta prolongada de alto contenido en sal, se ha descrito en la literatura científica, que la expresión total de las isoformas NOS no tiene por qué coincidir siempre con la producción de

NO en ese instante. De hecho, se observa una correlación inversa entre la expresión de nNOS y la producción de NO (Bosse y cols., 1995; Singh y cols., 1996; Tojo y cols., 2000; Mount y cols., 2005). Ni y Vaziri (2001) observaron que un efecto similar de la dieta salina en la expresión de NOS puede variar con el tiempo. Todo ello indica que los mecanismos post-traduccionales no intervienen exclusivamente ante estímulos agudos.



**Fig. 3: Posibles mecanismos de regulación de la síntesis de NO en el riñón.** Los diferentes tipos de regulación de la síntesis de NO en el riñón. En general, los mecanismos post-traduccionales son importantes en respuesta a estímulos agudos requiriendo cambios en la síntesis renal de NO dentro de pocos segundos o minutos. Por el contrario, la regulación de la expresión total de óxido nítrico sintasa (NOS) es una respuesta importante a cambios más sostenidos en los requerimientos de NO, ocurriendo a partir de horas o incluso días. El nivel de superóxido ( $O_2^-$ ), que reacciona con NO para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), también influye en la biodisponibilidad del NO en el riñón (revisado por Mount y Power, 2006).

Históricamente se sabe que tanto nNOS como eNOS son enzimas constitutivas con una baja actividad basal que responden a cambios de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, lo que favorece el anclaje de la calmodulina (Bredt y Zinder, 1990). No obstante, la isoforma iNOS es independiente del  $Ca^{2+}$  intracelular y tiene una elevada actividad basal (Xie y cols., 1992), esto es porque iNOS se ancla irreversiblemente a la calmodulina, incluso a bajas concentraciones de  $Ca^{2+}$ . En la mayoría de las situaciones iNOS no es constitutiva y es predominantemente regulada por control transcripcional, que ocurre en respuesta a estímulos pro-inflamatorios tales como lipopolisacáridos e interferón (Lowenstein y cols., 1993).

La regulación de eNOS y nNOS es más compleja y requiere, normalmente de mecanismos post-traduccionales como la fosforilación de sitios múltiples de la enzima (activación/inhibición), las posibles interacciones proteína-proteína, o bien, la regulación de la localización subcelular (Shaul, 2002; Boo y Jo, 2003; Kone y cols., 2003). También es importante el nivel de estrés oxidativo de la célula, ya que una elevada concentración del anión superóxido supondría una rápida combinación de éste con NO para formar peroxinitrito, actuando como *scavenger* de NO y retirándolo del medio. Por tanto, la presencia de radicales libres como el anión superóxido (Beckman y Koppenol, 1996) y, por tanto, las alteraciones del estrés oxidativo renal (Bayorn y cols., 2004), modulan la biodisponibilidad del NO. Por otro lado, la disponibilidad de sustrato y de los

cofactores de las enzimas NOS también afecta a su actividad en la síntesis de NO. Por ejemplo, en dietas de bajo contenido en sal la disponibilidad de L-arginina, a nivel de la mácula densa es limitante de la síntesis de NO por nNOS (Welch y Wilcox, 1997).

La sensibilidad ante la ruta de señalización del NO también influye, de hecho Ortiz y colaboradores (2004), vieron que una dieta salina durante siete o diez días no alteró la síntesis de NO de la rama gruesa ascendente pero incrementó la sensibilidad al NO de la rama ascendente gruesa.

## 6.- BIBLIOGRAFÍA

- Ahn KY, Mohaupt MG, Madsen KM, Kone BC. In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol*. 1994 Nov; 267(5 Pt 2):F748-57.
- Al-Ani B, Hewett PW, Ahmed S, Cudmore M, Fujisawa T, Ahmad S, Ahmed A. The release of nitric oxide from S-nitrosothiols promotes angiogenesis. *PLoS ONE*. 2006 Dec 20; 1:e25.
- Al-Sa'doni HH, Ferro A. S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. *Curr Med Chem*. 2004 Oct; 11(20):2679-90. Review.
- Bachmann S, Bosse HM, Mundel P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol*. 1995 May; 268(5 Pt 2):F885-98.
- Baines A, Ho P. Glucose stimulates O<sub>2</sub> consumption, NOS, and Na/H exchange in diabetic rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Aug; 283(2):F286-93.
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 2002; 416: 337–339.
- Bayorh MA, Ganafa AA, Socci RR, Silvestrov N, Abukhalaf IK. The role of oxidative stress in salt-induced hypertension. *Am J Hypertens* 2004; 17: 31–36.
- Beckman DL, Mehta P, Hanks V, Rowan WH, Liu L. Effects of peroxynitrite on pulmonary edema and the oxidative state. *Exp Lung Res*. 2000 Jul-Aug; 26(5):349-59.
- Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271, C1424–C1437.
- Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*. 1997 Aug 8; 272(32):19633-6. Review.
- Beierwaltes WH, Potter DL, Shesely EG. Renal baroreceptor-stimulated renin in the eNOS knockout mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Jan; 282(1):F59-64.
- Bon CL, Garthwaite J. Nitric oxide-induced potentiation of CA1 hippocampal synaptic transmission during baseline stimulation is strictly frequency-dependent. *Neuropharmacology* 2001 Mar; 40(4):501-7.
- Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: C499–C508.
- Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S. Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol* 1995; 269: F793–F805.
- Bredt DS, Snyder S. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682–685.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63:175-95. Review.
- Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 23; 1658(1-2):44-9. Review.



- Bryant CE, Perretti M, Flower RJ. Suppression by dexamethasone of inducible nitric oxide synthase protein expression in vivo: a possible role for lipocortin 1. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 279–285.
- Cassina AM, Hodara R, Souza JM, Thomson L, Castro L, Ischiropoulos H, Freeman BA, Radi R. Cytochrome c nitration by peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14; 275(28):21409-15.
- Chiueh CC, Rauhala P. The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic Res*. 1999 Dec; 31(6):641-50. Review.
- Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Jun 23; 95(13):7631-6.
- Cowley AW Jr, Mori T, Mattson D, Zou AP. Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284, R1355–R1369.
- Duan S, Chen C. S-nitrosylation/Denitrosylation and Apoptosis of Immune Cells. *Cellular and Molecular Immunology* 2007 October; 4: 5. Review.
- Eppel GA, Denton KM, Malpas SC, Evans RG. Nitric oxide in responses of regional kidney perfusion to renal nerve stimulation and renal ischaemia. *Pflugers Arch* 2003; 447: 205–213.
- Fagan KA, Tyler RC, Sato K, Fouty BW, Morris KG Jr, Huang PL, McMurtry IF, Rodman DM. Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 277: L472–L478.
- Feig DI, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Johnson RJ. Nephron number, uric acid, and renal microvascular disease in the pathogenesis of essential hypertension. *Hypertension*. 2006 Jul; 48(1):25-6.
- Fernández AP, Serrano J, Castro S, Salazar FJ, López JC, Rodrigo J, Nava E. Distribution of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2003 Dec; 21(12):2375-88.
- Fleming I, Busse R. NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 5–14.
- Förstermann U. Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelforschung*. 1994 Mar; 44(3A):402-7. Review
- Guan Z, Willgoss DA, Matthias A, Manley SW, Crozier S, Gobe G, Endre ZH. Facilitation of renal autoregulation by angiotensin II is mediated through modulation of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 2003; 179: 189–201.
- Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV Jr, Scheel KW, Manning RD Jr, Norman RA Jr. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med* 1972; 52: 584–594.
- Hobbs AJ, Ignarro LJ. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. *Methods Enzymol*. 1996; 269:134-48. Review.
- Huang A, Sun D, Shesely EG, Levee EM, Koller A, Kaley G. Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H429–H436.
- Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239–242.

Jarry A, Renaudin K, Denis MG, Robard M, Buffin-Meyer B, Karam G, Buzelin F, Paris H, Laboisse CL, Vallette G. Expression of NOS1 and soluble guanylyl cyclase by human kidney epithelial cells: morphological evidence for an autocrine/paracrine action of nitric oxide. *Kidney Int* 2003; 64: 170–180.

Kakoki M, Zou AP, Mattson DL. The influence of nitric oxide synthase 1 on blood flow and interstitial nitric oxide in the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R91–R97.

Kikugawa K, Oikawa N, Miyazawa A, Shindo K, Kato T. Interaction of nitric oxide with glutathione or cysteine generates reactive oxygen species causing DNA single strand breaks. *Biol Pharm Bull*. 2005 Jun; 28(6):998-1003.

Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989 Jul; 86(13):5159-62.

Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol*. 1997 May; 272(5 Pt 2):F561-78.

Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F178–F190.

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*. 1992 Nov-Dec; 5(6):834-42.

Kosaka H, Yoneyama H, Zhang L, Fujii S, Yamamoto A, Igarashi J. Induction of LOX-1 and iNOS expressions by ischemia-reperfusion of rat kidney and the opposing effect of L-arginine. *FASEB J* 2003; 17: 636–643.

Kurihara I, Saito T, Sato H, Chiba J, Saito J, Soma J, Ito S. Successful treatment with steroid pulse therapy in a case of immunotactoid glomerulopathy with hypocomplementemia. *Am J Kidney Dis*. 1998 Jul; 32(1):E4.

Kurtz A, Wagner C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol*. 1998 Dec; 275(6 Pt 2):F849-62. Review.

Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol* 1991; 261, F1033–F1037.

Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15; 100(8):4843-8.

Liang M, Knox FG. Nitric oxide reduces the molecular activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in opossum kidney cells. *Kidney Int* 1999; 56: 627–634.

Lipton SA. Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ*. 1999 Oct; 6(10):943-51. Review.

Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 9730–9734.

Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens* 2001; 14: 74S–82S.

Majid DSA, Williams A, Navar LG. Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anaesthetized dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 1993; 262: F718–F722.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993 Jun 15; 268(17):12231-4. Review.

Martin PY, Bianchi M, Roger F, Niksic L, Féraille E. Arginine vasopressin modulates expression of neuronal NOS in rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Sep; 283(3):F559-68.

Mattson DL, Lu S, and Cowley AW Jr. Role of nitric oxide in the control of the renal medullary circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 587–590, 1997.

Mattson DL, Roman RJ, Cowley AW Jr. Role of nitric oxide in renal papillary blood flow and sodium excretion. *Hypertension* 1992; 19: 766–769.

Meng W, Ayata C, Waeber C, Huang PL, Moskowitz MA. Neuronal NOS-cGMP-dependent ACh-induced relaxation in pial arterioles of endothelial NOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 274: H411–H415.

Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int* 1994; 46: 653–665.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30; 329(27):2002-12. Review.

Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991 Aug; 21(4):361-74. Review.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun; 43(2):109-42. Review.

Moro MA, De Alba J, Leza JC, Lorenzo P, Fernández AP, Bentura ML, Boscá L, Rodrigo J, Lizasoain I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur J Neurosci*. 1998 Feb; 10(2):445-56.

Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S. Location of inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int* 1994; 45: 998–1005.

Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol* 2006; 187: 433–446.

Mount PF, Fraser SA, Watanabe Y, Lane N, Katsis F, Chen ZP, Kemp BE, Power DA. Phosphorylation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in the kidney with high and low salt diets. *Nephron Physiol* 2006; 102(2):p36-50.

Mount PF, Hill RE, Fraser SA, Levidiotis V, Katsis F, Kemp BE, Power DA. Acute renal ischemia rapidly activates the energy sensor AMPK but does not increase phosphorylation of eNOS-Ser1177. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 Nov; 289(5):F1103-15.

Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W. Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int*. 1992 Oct; 42(4):1017-9.

Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 378: 383–386.

- Ni Z, Vaziri ND. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens* 2001; 14: 155–163.
- Ortiz PA, Garvin JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R628–R638.
- Ortiz PA, Garvin JL. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 May; 282(5):F777-84. Review.
- Ortiz PA, Garvin JL. Superoxide stimulates NaCl absorption by the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002 Nov; 283(5):F957-62.
- Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL. Luminal flow induces eNOS activation and translocation in the rat thick ascending limb. II. Role of PI3-kinase and Hsp90. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F281–F288.
- Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL. NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F819–F825.
- Ortiz PA, Hong NJ, Garvin JL. Luminal flow induces eNOS activation and translocation in the rat thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Aug; 287(2):F274-80. Epub 2004 Apr 6. Erratum in: *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Apr; 288(4):F867.
- Pallone TL, Mattson DL. Role of nitric oxide in regulation of the renal medulla in normal and hypertensive kidneys. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11: 93–98.
- Pannu R, Singh I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem Int*. 2006 Jul; 49(2):170-82. Epub 2006 Jun 12. Review.
- Park KM, Byun JY, Kramers C, Kim JI, Huang PL, Bonventre JV. Inducible nitric-oxide synthase is an important contributor to prolonged protective effects of ischemic preconditioning in the mouse kidney. *J Biol Chem* 2003; 278: 27256–27266.
- Peinado MA, Del Moral ML, Martínez Lara E, Siles E, Hernández R, López JC, Blanco S, Cañuelo A, Rodrigo J and Esteban FJ. Role of nitric oxide system in the aged brain. *Recent Res Devel. Biochem* 2003; 4: 181-192.
- Plato C, Shesely E, Garvin JL. eNOS mediates L-arginine-induced inhibition of thick ascending limb chloride flux. *Hypertension* 2000; 35: 319–323.
- Possel H, Noack H, Putzke J, Wolf G, Sies H. Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia*. 2000 Oct; 32(1):51-9.
- Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*. 1995 May; 268(5 Pt 1):L699-722. Review.
- Ren YL, Garvin JL, Carretero OA. Role of macula densa nitric oxide and cGMP in the regulation of tubuloglomerular feedback. *Kidney Int*. 2000 Nov; 58(5): 2053-60.
- Ren YL, Garvin JL, Ito S, and Carretero OA. Role of neuronal nitric oxide synthase in the macula densa. *Kidney Int* 2001; 60: 1676–1683.
- Richardson G, Benjamin N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Jan; 102(1):99-105. Review.

- Roczniak A, Burns KD. Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule. *Am J Physiol* 1996; 270: F106–F115.
- Roczniak A, Levine DZ, Burns KD. Localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrol Physiol*. 2000; 278:F702–F707.
- Rodrigo J, Alonso D, Fernández AP, Serrano J, López JC, Encinas JM, Fernández Vizarra P, Castro S, Peinado MA, Pedrosa JA, Richard A, Martínez-Murillo R, Santacana M, Bentura ML, Uttenthal LO. [Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity]. *An Sist Sanit Navar*. 2000 May-Aug; 23(2):195-235.
- Rodrigo J, Alonso D, Fernández AP, Serrano J, Richart A, López JC, Santacana M, Martínez-Murillo R, Bentura ML, Ghiglione M, Uttenthal LO. Neuronal and inducible nitric oxide synthase expression and protein nitration in rat cerebellum after oxygen and glucose deprivation. *Brain Res*. 2001 Aug 3; 909(1-2):20-45.
- Rodrigo J, Riveros-Moreno V, Bentura ML, Uttenthal LO, Higgs EA, Fernandez AP, Polak JM, Moncada S, Martínez-Murillo R. Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *J Comp Neurol*. 1997 Feb 24; 378(4):522-34.
- Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martínez-Murillo R, Polak JM, Moncada S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994 Jul 29;345(1312):175-221.
- Rodrigo J, Uttenthal LO, Peinado MA, Esteban FJ, Fernández AP, Serrano J, Martínez de Velasco J, Santacana M, Bentura ML, Martínez-Murillo R, Pedrosa JA. Distribution of nitric oxide synthase in the esophagus of the cat and monkey. *J Auton Nerv Syst*. 1998 Jun 10; 70(3):164-79.
- Salom M, Lahera V, Miranda-Guaridola F, Romero J. Blockade of pressure natriuresis induced by inhibition of renal synthesis of nitric oxide in dogs. *Am J Physiol Renal Physiol* 1992; 262: F718–F722.
- Schultz PJ, Tolins JP. Adaptation to increased dietary salt intake in the rat: role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest*. 1993; 91:642-650.
- Scotland RS, Chauhan S, Vallance PJ, Ahluwalia A. An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Hypertension* 2001; 38: 833–839.
- Scotland RS, Morales-Ruiz M, Chen Y, Yu J, Rudic RD, Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Functional reconstitution of endothelial nitric oxide synthase reveals the importance of serine 1179 in endothelium-dependent vasomotion. *Circ Res* 2002; 90: 904–910.
- Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: Location, Location, Location. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 749–774.
- Shultz PJ, Tolins JP. Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. Role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest* 1993; 91: 642–650.
- Singh I, Grams M, Wang WH, Yang T, Killen P, Smart A, Schnermann J, Briggs JP. Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. *Am J Physiol* 1996; 270: F1027–F1037.
- Stauss HM, Godecke A, Mrowka R, Schrader J, Persson PB. Enhanced blood pressure variability in eNOS knockout mice. *Hypertension* 1999; 33: 1359–1363.

Stauss HM, Nafz B, Mrowka R, Persson PB. Blood pressure control in eNOS knock-out mice: comparison with other species under NO blockade. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 155–160.

Stoos BA, Garvin JL. Actions of nitric oxide on renal epithelial transport. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997 Aug; 24(8):591-4.

Stoos BA, Garvin JL. Effect of efflux of guanosine 3',5' cyclic monophosphate (cGMP) on the regulation of intracellular levels of cGMP in the inner medullary collecting duct. *Biochem Pharmacol*. 1997 Mar 7; 53(5):631-6.

Stoos BA, Garvin JL. Vectorial efflux of cGMP and its dependence on sodium in the cortical collecting duct. *Am J Physiol*. 1996 Dec; 271(6 Pt 2):R1676-81.

Stumm MM, D'Orazio D, Sumanovski LT, Martin PY, Reichen J, Sieber CC. Endothelial, but not the inducible, nitric oxide synthase is detectable in normal and portal hypertensive rats. *Liver* 2002; 22: 441–450.

Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F. Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments. *J Clin Invest* 1992; 90: 659–665.

Thomson SC, Bachmann S, Bostanjoglo M, Ecelbarger CA, Peterson OW, Schwartz D, Bao D, Blantz RC. Temporal adjustment of the juxtaglomerular apparatus during sustained inhibition of proximal reabsorption. *J Clin Invest* 1999; 104: 1149–1158.

Todorov V, Gess B, Gödecke A, Wagner C, Schröder J, Kurtz A. Endogenous nitric oxide attenuates erythropoietin gene expression in vivo. *Pflügers Arch*. 2000 Feb; 439(4):445-8.

Tojo A, Brecht DS, Wilcox CS. Distribution of postsynaptic density proteins in rat kidney: relationship to neuronal nitric oxide synthase. *Kidney Int* 1999; 55: 1384–1394.

Tojo A, Gross SS, Zhang L, Tisher CC, Schmidt HH, Wilcox CS, Madsen KM. Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1994 Jan; 4(7):1438-47.

Tojo A, Kimoto M, Wilcox CS. Renal expression of constitutive NOS and DDAH: separate effects of salt intake and angiotensin. *Kidney Int*. 2000 Nov; 58(5):2075-83.

Ullrich R, Bloch KD, Ichinose F, Steudel W, Zapol WM. Hypoxic pulmonary blood flow redistribution and arterial oxygenation in endotoxin-challenged NOS2-deficient mice. *J Clin Invest* 1999; 104: 1421–1429.

Vallon V, Osswald H, Blantz RC, Thomson S. Luminal signal in tubuloglomerular feedback: what about potassium? *Kidney Int Suppl*. 1998 Sep; 67:S177-9. Review.

Vallon V, Traynor T, Barajas L, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J. Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1599–1606.

Viñas JL, Sola A, Genescà M, Alfaro V, Pí F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2006 Mar 15; 40(6):992-1003.

Wagner C, Gödecke A, Ford M, Schnermann J, Schröder J, Kurtz A. Regulation of renin gene expression in kidneys of eNOS- and nNOS-deficient mice. *Pflügers Arch* 2000; 439: 567–572.

Wang H, Carretero OA, Garvin JL. Nitric oxide produced by THAL nitric oxide synthase inhibits TGF. *Hypertension* 2002; 39: 662–666.

Wang T, Inglis FM, Kalb RG. Defective fluid and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption in proximal tubule of neuronal nitric oxide synthase-knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F518–F524.

Wang X, Lu M, Gao Y, Papapetropoulos A, Sessa WC, Wang W. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in principal cell of collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998; 275, F395–F399

Welch WJ, Wilcox CS. Macula densa arginina delivery and uptake in the rat regulates glomerular capillary pressure. Effects of salt intake. *J Clin Invest* 1997; 100: 2235–2242.

Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HH. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15; 89(24):11993-7.

Wilcox CS, Welch WJ. Macula densa nitric oxide synthase: expression, regulation, and function. *Kidney Int Suppl*. 1998 Sep; 67:S53-7.

Wilcox CS. Role of macula densa NOS in tubuloglomerular feedback. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998 Jul; 7(4):443-9. Review.

Wu F, Park F, Cowley AW Jr, Mattson DL. Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999; 276: F874–F881.

Wu XC, Johns EJ. Nitric oxide modulation of neurally induced proximal tubular fluid reabsorption in the rat 10.1161/hy0302.105681. *Hypertension* 2002; 39: 790–793.

Xie QW, Cho H, Kashiwabara Y, Baum M, Weidner JR, Elliston K, Mumford R, Nathan C. Carboxyl terminus of inducible nitric oxide synthase. Contribution to NADPH binding and enzymatic activity. *J Biol Chem*. 1994 Nov 11; 269(45):28500-5.

Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225–228.

Zhang C, Walker LM, Mayeux PR. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced oxidant stress in the rat kidney. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 203–209.

Zou LB, Yamada K, Tanaka T, Kameyama T, Nabeshima T. Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology*. 1998; 37(3):323-30.

## CAPÍTULO 23:

### APOPTOSIS: CARACTERIZACIÓN Y MECANISMOS MOLECULARES

Asumendi Aintzane, Boyano Maria Dolores, Apraiz Aintzane, Pérez-Yarza Gorka

#### Índice

1.- INTRODUCCIÓN .....	495
2.- APROXIMACIÓN HISTÓRICA: MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y APOPTOSIS .....	495
3.- FUNCIONES DE LA APOPTOSIS.....	496
3.1.- Desarrollo embrionario .....	497
3.2.- Homeostasis.....	497
3.3.- Mecanismos de selección .....	497
4.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA APOPTOSIS .....	498
5.- ALTERACIONES BIOQUÍMICAS ASOCIADAS A LA APOPTOSIS .....	500
5.1.- Fragmentación del DNA .....	500
5.2.- Activación de caspasas .....	501
5.3.- Externalización de señales “eat me” .....	501
5.4.- Alteraciones en la fisiología mitocondrial .....	501
5.4.1.- Disipación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	502
5.4.2.- Aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y liberación de proteínas proapoptóticas al citoplasma .....	502
5.4.3.- Proteínas apoptogénicas mitocondriales.....	503
6.- FAMILIAS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PROCESO APOPTÓTICO .....	504
6.1.- Proteínas adaptadoras .....	505
6.2.- Las caspasas.....	505
6.2.1.- Caspasas iniciadoras.....	505
6.2.2.- Caspasas efectoras .....	506
6.2.3.- Proteínas reguladoras de las caspasas: IAPs.....	506
6.3.- Proteínas de la familia Bcl-2.....	507
6.3.1.- Proteínas antiapoptóticas .....	507
6.3.2.- Proteínas proapoptóticas.....	507
7.- RUTAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA .....	508
7.1.- Ruta extrínseca o mediada por receptores .....	509
7.2.- Ruta intrínseca o mitocondrial.....	510
8.- ADDENDUM.....	513
9.- BIBLIOGRAFÍA .....	515



## 1.- INTRODUCCIÓN

La **apoptosis** es actualmente uno de los temas más investigados de la Biología moderna. El interés que este proceso ha suscitado en la comunidad científica es el reflejo del peso específico que tiene en la vida de cualquier organismo multicelular. Las células de un organismo son miembros de una comunidad altamente organizada donde el equilibrio entre la supervivencia y muerte celular es esencial para su correcto funcionamiento. Es evidente que la muerte celular puede ocurrir a través de diferentes mecanismos –apoptosis, necrosis, autofagia...- pero entre éstos es la muerte celular apoptótica la que tiene sin duda una mayor relevancia fisiológica. La apoptosis representa una forma ordenada y silenciosa de eliminar células indeseadas, caracterizada por una morfología específica y regulada genéticamente. Su disregulación está relacionada con diversas patologías o anomalías, que incluyen defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas o cáncer. La caracterización del complejo mecanismo apoptótico está cambiando profundamente la comprensión de estas patologías.

## 2.- APROXIMACIÓN HISTÓRICA: MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y APOPTOSIS

La existencia de muerte celular en los embriones se conoce desde el siglo XIX en el que los embriólogos sentaron las bases para la comprensión de procesos tales como la diferenciación sexual o la formación de extremidades. Las primeras observaciones de muerte celular fisiológica fueron realizadas por **Vogt** en 1842, en metamorfosis de anfibios. El embriólogo alemán **Glücksman** describió detalladamente el proceso de muerte celular que tenía lugar de modo natural en embriones de pollo, salamandra y rana, y fue desarrollando sus estudios durante décadas (Glücksman, 1951). No obstante, las primeras aproximaciones experimentales al fenómeno de muerte celular durante el desarrollo embrionario fueron posteriores, cuando se observó que las células portaban la información necesaria para su muerte pero que no se encontraban irreversiblemente dañadas puesto que podían sobrevivir en otro ambiente embrionario. Se dedujo, por lo tanto, de la existencia de un programa o secuencia de acontecimientos que conducía a la involución de los tejidos afectados. Nació así el concepto de **Muerte Celular Programada**, acuñado por **Lockshin y Williams** (1964), para describir la muerte celular que ocurre en lugares y momentos predecibles durante el desarrollo embrionario, procesos de muerte celular que están **programados** dentro del **plan de desarrollo de un organismo**.

Hasta 1965, los estudios realizados acerca de la muerte celular se basaban fundamentalmente en la microscopía óptica y en modelos embrionarios. En 1965, **Kerr** desarrolló un sistema para estudiar la muerte celular en el hígado adulto de rata donde caracterizó un tipo de muerte celular distintivo. En 1972, **Kerr, Willie y Currie** descubrieron que el patrón distintivo de muerte celular que el propio Kerr había encontrado anteriormente se repetía en cultivos de células de tumor mamario de rata (Kerr y cols., 1972). Fue en este trabajo donde

acuñaron el término **Apoptosis** para describir un tipo de muerte celular que exhibía un patrón morfológico definido, estableciendo diferencias con la **necrosis** o muerte celular patológica. Ampliando los detalles mediante el empleo del microscopio electrónico, describieron las distintas etapas por las que atravesaba este fenómeno (ver apartado 4) y sugirieron que constituía una forma fisiológica de muerte celular y un mecanismo importante para la eliminación de células innecesarias en embriones y animales adultos. En griego antiguo apoptosis significa el “acto de caer” (*apo*: separar, *ptosis*: caer), haciendo referencia a la caída de los pétalos de las flores y las hojas de los árboles en otoño. Fue elegido porque sugiere pérdidas beneficiosas, necesarias para el buen funcionamiento y la supervivencia del organismo, en contraposición a la necrosis. Según este grupo, la muerte por apoptosis respondía a un programa de muerte intracelular que podía ser activado o inhibido por una variedad de estímulos, tanto fisiológicos como patológicos.

Fue años después, tras la identificación de genes responsables del programa de muerte celular y de su control en el nematodo ***Caenorhabditis elegans*** (Horvitz *et al.* 1982; Ellis & Horvitz 1986) y el descubrimiento de algunos homólogos de éstos en mamíferos (Vaus *et al.* 1992; Yuan *et al.* 1993; Hergartner & Horvitz 1994), cuando los conceptos de Apoptosis y Muerte Celular Programada, calaron sobre la comunidad científica. El análisis genético, realizado inicialmente en *Caenorhabditis elegans*, demostró que la muerte celular es un proceso **regulado a nivel genético**; las células expresan los componentes moleculares que les van a permitir “suicidarse” dependiendo de un balance de señales procedentes del medio ambiente celular.

Si bien a menudo los términos de **Muerte Celular Programada** y **Apoptosis** se utilizan indistintamente, no es correcto asumir que ambos términos son sinónimos. El término apoptosis define un proceso de muerte celular asociado inicialmente a cambios morfológicos concretos (y en la actualidad también bioquímicos), mientras que el término de muerte celular programada es una expresión que hace referencia a que la muerte celular está genéticamente programada, como ocurre durante el desarrollo o el envejecimiento. Si bien es cierto que la muerte celular programada normalmente tiene lugar mediante apoptosis, existen bastantes excepciones. Las recomendaciones dadas recientemente por el “**Nomenclature Committee on Cell Death**” en relación a la utilización de términos sobre procesos de muerte celular, apuntan en este sentido (Kroemer y cols., 2009).

### 3. FUNCIONES DE LA APOPTOSIS

La apoptosis es un mecanismo básico implicado de forma decisiva en numerosos procesos. Entre ellos destacamos el desarrollo embrionario, el mantenimiento de la homeostasis y su papel fundamental en varios mecanismos de selección celular.

### 3.1. Desarrollo embrionario

En organismos complejos la pérdida de funcionalidad del proceso de apoptosis altera el desarrollo de tal forma que en muchos casos el animal no es viable. Los objetivos que cumple la apoptosis dentro del desarrollo de un organismo están encaminados, en último lugar, a la eliminación de células sin utilidad en un momento y lugar determinados (Meier y cols., 2000). En general, el *modus operandi* del desarrollo de los metazoos consiste en una sobreproducción de células seguida de la muerte celular selectiva en estadios más tardíos del desarrollo. Un claro ejemplo lo constituye la escultura de distintas estructuras. La eliminación de las membranas interdigitales es necesaria, por ejemplo, para la formación de los dedos en vertebrados superiores (Couvovanis y cols., 1995). Durante el desarrollo a veces se forman estructuras que después es necesario suprimir. Ello permite una mayor flexibilidad de modo que las estructuras primordiales pueden ser adaptadas para diferentes funciones en diferentes etapas de la vida o en diferentes sexos.

Por otra parte, durante el desarrollo se eliminan por apoptosis células anormales, con localización errónea, no funcionales o potencialmente peligrosas, de forma que sólo completen el proceso de desarrollo células no dañadas.

### 3.2. Homeostasis

La homeostasis tisular comprende una serie de mecanismos dinámicos que requieren el equilibrio entre la proliferación celular y la eliminación o pérdida de células, logrando así mantener constante el número de células de un organismo adulto. En un contexto normal, una de las funciones de la apoptosis es asegurar que el tamaño y la constitución de un compartimento particular del organismo no exceda los límites dictados por las necesidades fisiológicas. En este sentido la apoptosis juega un papel muy importante en la regulación del recambio de células en los tejidos. La mayoría de los tejidos del organismo experimentan, en mayor o menor medida, un recambio celular sostenido por cierto grado de proliferación de las células que lo componen u originan, acompañado de muerte y posterior eliminación de células "viejas". Esta muerte tiene lugar por apoptosis.

### 3.3. Mecanismos de selección

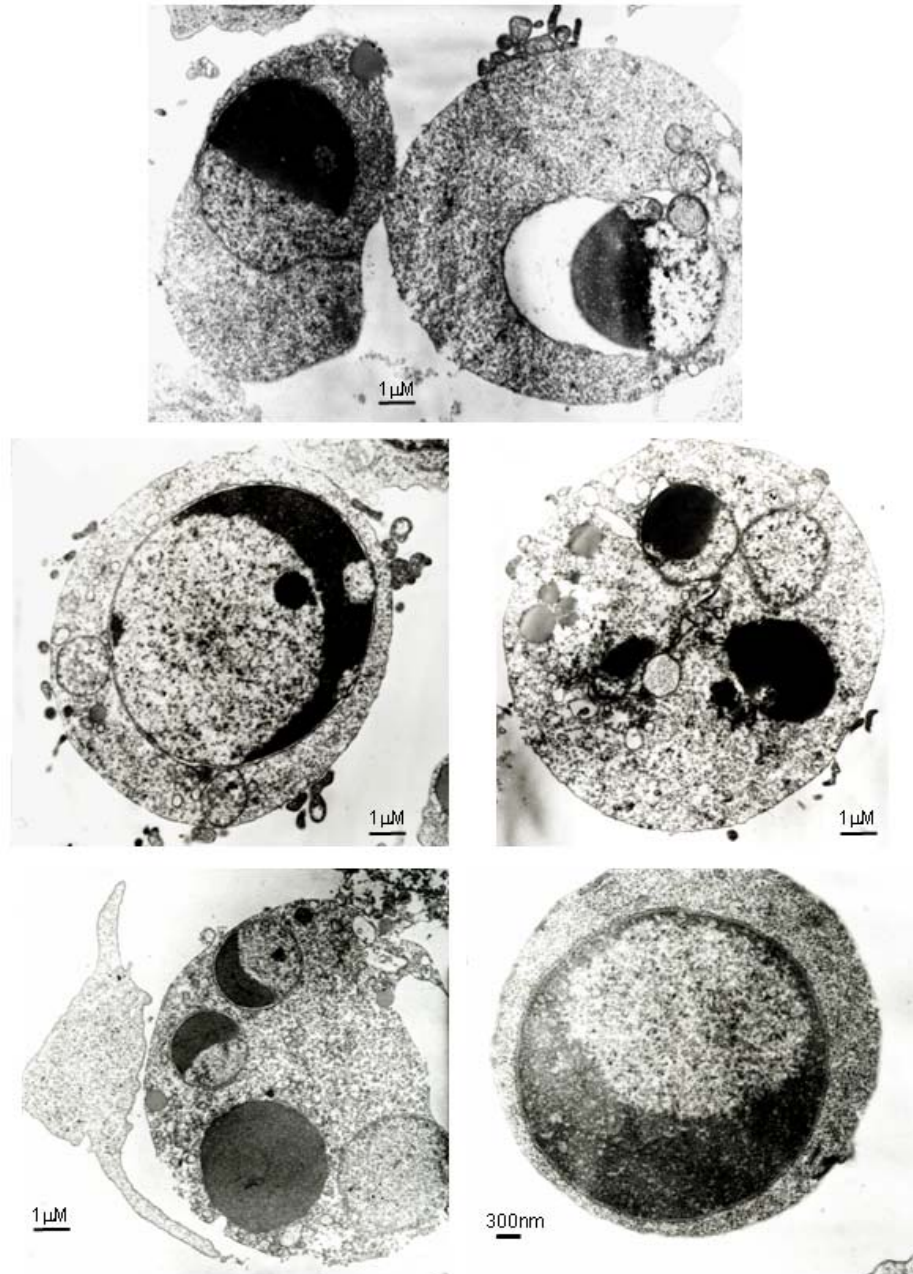
El funcionamiento óptimo de algunos de los sistemas fisiológicos que componen los organismos superiores requiere de procesos de selección celular específicos. Estos están basados en mecanismos de generación de variedad celular en cuanto a su funcionalidad, seguidos de una selección de los mejores clones, normalmente en un ambiente de competencia. Estos fenómenos reproducen, en el desarrollo del organismo, los procesos evolutivos que han dado lugar a la especialización y optimización de las especies. De la misma forma consiguen una eficacia óptima de sus componentes, así como una

adaptación individualizada de cada organismo, en la que la participación del medio externo tiene gran importancia. Dentro de estos procesos de selección, la apoptosis juega un papel fundamental como herramienta para hacer desaparecer las células que no han sido seleccionadas.

Estos fenómenos de selección son particularmente importantes en el sistema nervioso y el sistema inmunitario. La adquisición de la tolerancia inmunológica, por ejemplo, se basa en la eliminación de los clones de linfocitos en desarrollo (*timocitos*) que presentan un receptor del linfocito T (TCR) con especificidad hacia un antígeno propio. Este proceso se lleva a cabo en el timo como etapa final de la maduración de los linfocitos T y tiene lugar mediante apoptosis. De esta forma se hace posible la autotolerancia en los organismos, es decir, la incapacidad de responder a un Ag propio y por lo tanto, de desencadenar procesos autoinmunes (Nossal, 1994). En este sentido existen pruebas que relacionan defectos en la apoptosis a este nivel con el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Oliveira y Gupta, 2008).

#### 4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA APOPTOSIS

La célula apoptótica sigue un **patrón morfológico distintivo**, que se repite en diferentes modelos y que tiene lugar de una manera ordenada en el tiempo (Wyllie *et al.* 1981). Durante el proceso apoptótico la célula se condensa como consecuencia de un movimiento neto de fluidos fuera de la célula, lo que ocasiona una reducción significativa de su tamaño, se encoge; también pierde las uniones con las células vecinas y adopta una forma redondeada. A menudo las cisternas del retículo endoplasmático se suelen engrosar llenándose de agua y muchas de ellas parecen fundirse con la membrana plasmática, por lo que ésta adquiere un aspecto punteado ("*pitted*"). La membrana plasmática no sufre daños morfológicos aparentes, aunque sí alteraciones bioquímicas que permiten a los macrófagos reconocer las células apoptóticas para su posterior fagocitosis. Los orgánulos permanecen aparentemente intactos, pero el citoplasma suele condensarse por la pérdida de citosol y pueden aparecer grandes vacuolas. La cromatina se condensa y se dispone en forma adyacente a la cara interna de la envoltura nuclear. Posteriormente se suelen apreciar una serie de estrangulaciones tanto en la membrana plasmática como nuclear, fenómeno conocido como "**blebbing**", formando protuberancias que se separaran por gemación. Finalmente, se produce un desprendimiento de fragmentos celulares discretos rodeados de membrana, que reciben el nombre de **cuerpos apoptóticos**. Suelen ser de tamaño variable y en su interior podemos encontrar orgánulos intactos que pueden llevar fragmentos nucleares o no. *In vivo*, los cuerpos apoptóticos, son rápidamente fagocitados por los macrófagos sin producir inflamación; si el proceso tiene lugar *in vitro*, desemboca en la degeneración de los cuerpos apoptóticos a falta de células especializadas en su eliminación.



**Figura 1. Micrografías electrónicas de células de leucemia humana en diferentes estadios del proceso apoptótico.** (A) Cromatina fuertemente condensada y dilatación de la envoltura nuclear. (B) Cromatina condensada dispuesta en forma de media luna y presencia de grandes vesículas en el citoplasma (5000x). (C-D) Fragmentación del núcleo en fragmentos menores o "micronúcleos" (5000x). (E) cuerpo apoptótico (13000x).

Este patrón morfológico es distintivo del proceso apoptótico y contrapuesto al de la muerte por necrosis de tal modo que ambos tipos de muerte celular pueden ser distinguidos tanto desde el punto de vista bioquímico como morfológico. En general la apoptosis constituye un proceso altamente regulado, más ordenado y menos traumático que la necrosis. La **necrosis**, por el contrario, desencadena una desintegración mitocondrial y daño de la membrana plasmática, impidiendo que la célula controle su balance de fluidos, así como la ruptura de lisosomas, la cual provoca una desintegración celular que desemboca en la inflamación de los tejidos circundantes.

## 5. ALTERACIONES BIOQUÍMICAS ASOCIADAS A LA APOPTOSIS

Los cambios morfológicos anteriormente descritos precisan de un sustrato bioquímico, molecular. Entre las distintas alteraciones bioquímicas descritas, tres son las que más se repiten y mejor definen el proceso: la fragmentación del DNA, la activación de caspasas y la expresión en la superficie de la célula apoptótica de señales “*eat me*”. Además, en la mayoría de los casos la mitocondria sufre alteraciones que están directamente relacionados con la señalización apoptótica.

### 5.1. Fragmentación del DNA

La observación de que en el núcleo acontecen importantes cambios morfológicos en las células apoptóticas hizo que los estudios bioquímicos se centraran inicialmente en el comportamiento del DNA nuclear. Durante el proceso, el DNA es fragmentado mediante la activación de **endonucleasas endógenas**, hecho que se considera uno de los acontecimientos distintivos. Esta fragmentación ocurre de manera sincrónica a la compactación de la cromatina y da lugar a la formación de grandes fragmentos de DNA (50-300kb) y a fragmentos múltiples de 200kb, que dan lugar al típico patrón en escalera tras su separación mediante electroforesis en geles de agarosa. Estos fragmentos resultan del corte al azar entre los nucleosomas; llegan a sumarse hasta un millón de cortes dando como consecuencia una situación en la que la transcripción se para, ya que no existe forma de ser reparada. Los fragmentos más pequeños derivan de los mayores, si bien se ha implicado a diferentes sistemas enzimáticos en su formación (Oberhammer y cols., 1993). La enzima mejor caracterizada es una endonucleasa que se activa por caspasas denominada **CAD** (caspase-activated DNase) que es la responsable, en la mayoría de los casos descritos, de la fragmentación interoligonucleosómica del DNA (Hengartner, 2000).

Otros acontecimientos bioquímicos también colaboran en la morfología nuclear apoptótica como es el caso de la fragmentación de la lámina nuclear interna, y otras proteínas implicadas en el mantenimiento del entramado nuclear (Hengartner, 2000).

## 5.2. Activación de caspasas

Dentro de la maquinaria que lleva a cabo el programa de apoptosis, los miembros ejecutores son una serie de proteasas conservadas a lo largo de la evolución, englobadas bajo el nombre de **caspasas**. Tras ser descritas en primer instancia en el nematodo *C. elegans*, se encontraron los equivalentes en mamíferos gracias a la homología que éstos presentaban (Martin y Green, 1995). La mayoría de los cambios morfológicos que se observan en las células apoptóticas pueden ser atribuidos a las caspasas; con todo se considera a estas proteasas como las principales ejecutoras de la apoptosis si bien es cierto que en ocasiones la muerte celular por apoptosis puede tener lugar de manera independiente a las caspasas (Li y Yuan, 2008).

## 5.3. Externalización de señales “eat me”

En el proceso de apoptosis, tan importante es que la muerte sea rápida, efectiva y sometida a buenos procesos de regulación como que, una vez muerta, la célula sea convenientemente retirada. De esta manera se evita su ruptura y el vertido de su contenido al medio, lo que daría lugar a una respuesta inflamatoria indeseable (Gardai y cols., 2006). En mamíferos, la eliminación de las células apoptóticas está regulada por numerosos ligandos que expresan las células apoptóticas en la membrana plasmática durante el proceso y que son las responsables de activar su fagocitosis. Estos ligandos también denominados **señales “eat me”** incluyen a lípidos, azúcares y proteínas (Lauber y cols., 2004). La señal mejor caracterizada es la **traslocación de fosfatidil colina**, desde la cara interna de la membrana plasmática, hacia la cara externa. Este fosfolípido normalmente se encuentra secuestrado en la cara interna. Estudios recientes indican que esta translocación está regulada por el nivel intracelular de ATP y por los acontecimientos mitocondriales dependientes de Bcl-2 (Fadeel y Orrenius, 2005). Por ejemplo, tras la pérdida local del potencial de membrana mitocondrial se externaliza rápidamente la fosfatidilserina durante la apoptosis. Sin embargo, la mayoría de los fagocitos especializados (macrófagos) no reconocen directamente este fosfolípido sino que éste tiene lugar a través de otras proteínas que actúan a modo de puente entre la fosfatidil serina y receptores de membrana en estas células (Lauber K. et al 2004). Estas **“proteínas puente”** amplifican el repertorio de receptores que pueden reconocer la misma señal “eat me” y además, confieren un mecanismo de regulación específico de tejido para la eliminación de células apoptóticas.

## 5.4. Alteraciones en la fisiología mitocondrial

La mitocondria juega un papel decisivo durante la apoptosis (Keeble y Gilmore 2007). Por un lado aporta un lugar de regulación a través de la familia de proteínas Bcl-2 (véase 6.3) y además actúa como amplificadora de la señalización apoptótica, lo que asegura la culminación del proceso. Debido a su implicación en la muerte celular, la mitocondria es uno de los orgánulos

celulares que sufren cambios en su funcionamiento durante el proceso. Sin embargo, estos cambios bioquímicos no se corresponden con cambios morfológicos aparentes, manteniéndose intacta su morfología prácticamente durante todo el proceso.

Existen dos alteraciones básicas de la fisiología mitocondrial relacionadas entre sí. Éstas son la disipación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa con la consiguiente liberación de proteínas proapoptóticas al citosol.

#### 5.4.1. Disipación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Durante décadas el **desacoplamiento** de la **fosforilación oxidativa** ha sido reconocido como una característica temprana del proceso de muerte celular (Castedo y cols., 2002). Como consecuencia del mismo se produce una notable disminución de la producción de ATP. La falta de ATP disponible puede dañar de diversas maneras a la célula, pero no parece ser éste el factor desencadenante de la muerte celular (Martinou y Green, 2001).

El desacoplamiento de la cadena respiratoria es causado por la disminución o **disipación del  $\Delta\Psi_m$** , originado a su vez por un aumento en la **permeabilidad de la membrana mitocondrial interna**. El potencial es el resultado de una distribución asimétrica de protones y otros iones a ambos lados de la membrana interna mitocondrial, que en condiciones normales es impermeable a éstos. Esta distribución asimétrica origina un gradiente electroquímico esencial para que se pueda producir la fosforilación oxidativa. Algunos autores consideran la disipación del  $\Delta\Psi_m$  como el primer "punto de no retorno" que permite identificar a aquellas células destinadas a sufrir un proceso de apoptosis (Castedo y cols., 2002).

#### 5.4.2. Aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y liberación de proteínas proapoptóticas al citoplasma

Un fenómeno característico que se produce al comienzo de muchos, si no de todos, los procesos apoptóticos descritos hasta el momento es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (Martinou y Green, 2001). Éste es un punto clave debido a que la mitocondria retiene, especialmente en el espacio intermembrana, multitud de **proteínas apoptogénicas** que son esenciales para la activación apoptótica (véase 5.4.3) (Ravagnan y cols., 2002). Éstas deben necesariamente ser liberadas al citosol para activar las caspasas iniciadoras.

Los motivos que conducen a los cambios de permeabilidad descritos son múltiples (estrés oxidativo, calcio, ceramida ...etc) y pueden ser causados al menos por dos vías alternativas:



- Por la formación de **canales** o **poros** por parte de proteínas de la **subfamilia BAX** en la membrana externa (véase apartado 6.3), o
- Por la apertura de una estructura denominada **poro de transición de permeabilidad** (PTP, *Permeability Transition Pore*).

Estas dos alternativas no son mutuamente excluyentes y están reguladas por proteínas de la familia Bcl-2 (Gogvadze y cols., 2006). El PTP está formado tanto por proteínas de la membrana interna -el translocador de nucleótido adenina (ANT) por ejemplo- como de la membrana externa -la porina o canal aniónico voltaje dependiente (VDAC). Los componentes de las dos membranas mitocondriales se acoplan entre sí constituyendo un **punto de contacto** entre ambas membranas a través del cual pueden pasar moléculas de peso inferior a 1,5 KDa. Su función fisiológica conocida es la de permitir la liberación de calcio al citoplasma así como la entrada de proteínas necesarias para mantener el potencial transmembrana hacia la matriz mitocondrial. Esto tiene lugar mediante breves pulsos de apertura. Durante la apoptosis, la **apertura mantenida** de este poro provoca el hinchamiento de la matriz mitocondrial y la expansión de la membrana interna, fenómenos que van a producir la ruptura y por tanto **permeabilización de la membrana externa** (Gogvadze y cols., 2006).

#### 5.4.3. Proteínas apoptogénicas mitocondriales

La mitocondria no es sólo la productora de energía de la célula, es también un arsenal. La mitocondria secuestra un potente cóctel de proteínas proapoptóticas que al ser liberadas al citosol desencadenan la muerte celular o amplifican la señalización del proceso ya iniciado por otras vías (Ravagnan et al. 2002). Entre estas proteínas destacamos las siguientes:

- Citocromo *c*

El citocromo *c* es una proteína globular que permanece retenida en el espacio intermembrana donde participa como lanzadera de electrones entre el complejo III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, una vez liberado al citosol, se une a una proteína adaptadora denominada Apaf-1, por su región C-terminal rica en residuos de WD (valina aspártico). Esto facilita la unión de **ATP** y la exposición de una superficie oligomerizada de los extremos NH<sub>2</sub>-terminal de la proteína acopladora. La oligomerización de **Apaf-1** va acompañada de un reclutamiento de **pro-caspasa-9** y la maduración proteolítica hacia caspasa-9, mediante **autocatálisis** (Green y Kroemer, 2004). Este complejo proteico activador de la pro-caspasa-9, ha sido denominado "**Apoptosoma**".

- Caspasas

A pesar de que la mayor parte de las pro-caspasas poseen una localización citosólica, ciertas pro-caspasas pueden estar presentes en el espacio

intermembrana de la mitocondria, incluyendo la pro-caspasa-2, -3 y -9. La cantidad relativa que se localiza en la mitocondria vs citosol, parece depender del tipo de celular. Se ha sugerido que este mecanismo podría contribuir a prevenir la activación de caspasas (Ravagnan y cols., 2002).

- Smac / DIABLO

Los inhibidores de proteínas apoptóticas (Inhibitor of apoptosis proteins IAPs), tales como XIAP, c-IAP1 y c-IAP2, descritos recientemente, pueden encontrarse unidos a caspasas, tanto iniciadoras como efectoras, e inhibirlas eficazmente durante la vida de una célula. Sin embargo, durante el proceso apoptótico, las caspasas pueden ser liberadas del bloqueo de los IAPs gracias a una proteína denominada **Smac** (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*) o **Diablo** (*Direct IAP Binding protein with Low pI*); ésta se encuentra retenida en el espacio mitocondrial intermembrana y se libera tras la permeabilización mitocondrial (Martinez-Ruiz y cols., 2008).

- AIF y endonucleasa G

El **factor inductor de apoptosis (AIF; Apoptosis Inducing Factor)**, fue identificado por el equipo del Dr. Kroemer como un factor capaz de promover el proceso apoptótico por una vía independiente de caspasas. Tras el estímulo apoptótico, puede liberarse al citosol y, en algunos modelos celulares, translocarse posteriormente al núcleo, donde provocaría una condensación parcial de la cromatina en la periferia nuclear y una fragmentación del DNA en fragmentos de unos 50 kpb. Al parecer, la vía de señalización mediada por AIF es muy antigua y conservada filogenéticamente, puesto que ocurre en todos los metazoos y asume un papel muy importante durante el desarrollo embrionario (Modjtahedi y cols., 2006).

La **endonucleasa G** presenta características similares al AIF, esto es, promueve la muerte celular de manera independiente de caspasas una vez es translocada al núcleo (Davies AM y cols., 2003).

## 6.- FAMILIAS DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL PROCESO APOPTÓTICO

Los mecanismos de suicidio celular son regulados por un conjunto específico de genes que ha evolucionado para destruir a la célula de manera que su muerte tenga el menor efecto sobre el ambiente que la rodea. La maquinaria genética está presente en **todas las células nucleadas** de tal manera que todas son susceptibles de iniciar su autodestrucción tras recibir las señales pertinentes. Para llegar a esta conclusión, resultó determinante la descripción de los genes implicados en la maquinaria de apoptosis del nematodo ***Caenorhabditis elegans***.

*C. elegans* es un organismo de aproximadamente 1mm de longitud. Su vida se prolonga a lo largo de 2-3 semanas durante las cuales se reproduce. La apoptosis juega un importante papel en el desarrollo embrionario de este nematodo. A partir de los estudios que inició **Horvitz** (Horvitz y cols., 1982; Horvitz 1990) se estableció el número y la localización de las células que morían por apoptosis durante el desarrollo y mediante el análisis de mutantes se describieron los genes implicados. **Cada una de las proteínas expresadas a partir de estos genes son equivalentes a las que, en organismos superiores, constituyen los pilares que soportan la red de señalización de la apoptosis.**

De este modo, el estudio del nematodo permitió establecer las bases para la caracterización de la red de procesos que culminan con la apoptosis celular. Estos estudios fueron recompensados con la concesión del premio Nobel de Fisiología y Medicina a Roberts Horvitz y sus colegas en el año 2002, lo cual refleja la enorme importancia del proceso apoptótico.

Independientemente de la ruta de señalización implicada, en la mayoría de los casos es fundamental la participación de algunas familias de proteínas que juegan un papel fundamental en el proceso. Destacamos las denominadas proteínas **adaptadoras, las caspasas y proteínas de la familia Bcl-2.**

## 6.1. Proteínas adaptadoras

Denominamos proteínas adaptadoras a aquellas proteínas accesorias que carecen de actividad propia pero que median interacciones proteicas fundamentales en la señalización de la muerte celular. Entre éstas encontramos las proteínas adaptadoras FADD, TRADD y Apaf-1, entre otras. En su conjunto participan en interacciones proteína-proteína que son necesarias para la **formación de los grandes complejos** implicados en las principales rutas (véase apartado 7). Los principales complejos proteicos se denominan **DISC** y **apoptosoma** y son fundamentales para la activación de las caspasas iniciadoras (Strasser A et al, 2000).

## 6.2. Las caspasas

Las caspasas, principales ejecutoras de la apoptosis, constituyen un grupo de cisteín proteasas con especificidad hacia residuos de ácido aspártico (**Cysteine-dependent Aspartate-Specific ProteASE –CASPASE**). Se han descrito hasta 14 caspasas diferentes de las cuales dos tercios están vinculadas al proceso apoptótico. Las **caspasas apoptóticas** se clasifican, según su función, en iniciadoras y efectoras (Li J y Yuan J, 2008; Chowdhury y cols., 2008).

### 6.2.1. Caspasas iniciadoras

Se caracterizan por poseer largos prodominios N-terminales con secuencias de interacción que permiten su unión a proteínas adaptadoras o reguladoras. Estos dominios se denominan **CARDS** o "**dominios de reclutamiento**" ya que permiten su reclutamiento, oligomerización y asociación con otras proteínas.

Estas interacciones permiten la **autoproteólisis** que dan lugar a su activación. Las caspasas iniciadoras desempeñan un papel fundamental en la **propagación de la señal apoptótica** ya que activan las caspasas efectoras. Dentro de este grupo se encuentran las **caspasas 8, 9, 2 y 4 (12 en roedores)** (Li J y Yuan J, 2008; Chowdhury y cols., 2008).

### 6.2.2- Caspasas efectoras

Las caspasas efectoras 3, 6, 7, 11 y 13 poseen prodominios N-terminales cortos, por lo tanto, son incapaces de interactuar con las proteínas adaptadoras. **Su activación requiere otras proteasas**, generalmente, caspasas activas capaces de eliminar el prodominio mediante proteólisis. La activación mediante otras caspasas posibilita un “cascada de activación” que amplifica la señalización apoptótica. Las caspasas efectoras son los “caballos de tiro” de la familia de caspasas, y en general son más abundantes y activos que las iniciadoras. Sus sustratos son proteínas implicadas en la señalización o bien proteínas estructurales; la fragmentación de estas proteínas diana da lugar a los **cambios morfológicos y funcionales asociados con la apoptosis**. El primer sustrato de caspasas descrito fue la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP), que en células no apoptóticas es responsable de inhibir la replicación y transcripción del DNA, permitiendo la unión de enzimas reparadores del DNA. La endonucleasa responsable del patrón de fragmentación de DNA característico de la apoptosis, conocida como **DNasa activada por caspasa** o **CAD** (caspase-activated DNase) es una diana importante de las caspasas. En las células vivas forma un complejo con la subunidad inhibidora ICAD; la activación de CAD tiene lugar cuando la caspasa-3 fragmenta la subunidad inhibidora, lo cual da lugar a la liberación y activación de la subunidad catalítica de la nucleasa. La fragmentación mediada por caspasas también explica muchos de los demás aspectos característicos del mecanismo de muerte por apoptosis. Por ejemplo, la activación de **PAK2** (miembro de la familia de quinasas activadas por p21) es la responsable de las estrangulaciones características que tienen lugar tanto en la membrana plasmática como nuclear (*blebbing*) de las células apoptóticas y que dan lugar a los cuerpos apoptóticos. En este caso, las caspasas cortan entre la subunidad reguladora negativa y la subunidad catalítica de la proteína, lo que da lugar a la activación constitutiva de PAK2 (Li J y Yuan J, 2008; Chowdhury y cols., 2008).

### 6.2.3. Proteínas reguladoras de las caspasas: IAPs

La activación de las caspasas está controlada por una familia de proteínas reguladoras denominadas **IAPs** (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*). Las IAPs mejor descritas en humanos son: XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y survivina. Son inhibidores endógenos de las caspasas, y por lo tanto, contrarrestan la apoptosis. También pueden funcionar como ligasas de ubiquitina, promoviendo la degradación de caspasas diana. En general, cada IAP tiene su propio perfil de influencia, mecanismo de acción y regulación. Algunas de las proteínas que se liberan desde la mitocondria (Smac/DIABLO, HtrA2/Omi) son reguladores

negativos de estas proteínas ya que su unión evita su actividad inhibidora de caspasas. Se ha observado que, frecuentemente, miembros de la familia de IAPs se encuentran sobreexpresadas en tumores humanos, aportando a las células malignas una herramienta para soslayar la activación apoptótica (Hunter y cols., 2007).

### 6.3. Proteínas de la familia Bcl-2

Bcl-2 es el miembro fundador de una familia muy amplia compuesta por proteínas homólogas que se han conservado a lo largo de la evolución. Esta familia constituye una pieza importante en la regulación apoptótica y a ella pertenecen proteínas que actúan tanto como inhibidores como inductores de la muerte celular (Youle y cols., 2008). La función de la familia Bcl-2 en la apoptosis estriba principalmente en **regular la permeabilidad mitocondrial**. Hasta la actualidad se han identificado 21 miembros y todos ellos poseen, al menos, uno de los cuatro **dominios de homología BH** (Bcl-2 Homology) conservados que presenta la proteína Bcl-2. Estas proteínas se dividen en dos categorías de acuerdo con su estructura y función:

#### 6.3.1. Proteínas antiapoptóticas

BCL-2, BCL-XL, MCL1, BCL-W, BCL-B (también conocido como BCL-2L10 Y A1 (también conocido como BCL-2A1) forman parte de este grupo. Todas ellas poseen cuatro dominios de homología y una cola hidrofóbica que ancla la proteína a las membranas. Se localizan principalmente en la membrana mitocondrial externa, retículo endoplásmico y membrana nuclear. BCL-2 y sus homólogos más cercanos, BCL-XL y BCL-W inhiben la apoptosis. BCL-2 es una proteína integral de membrana, mientras que BCL-XL y BCL-W sólo se insertan en las membranas después de una señal citotóxica. MCL1 (*myeloid cell leukemia 1*) se localiza en la mitocondria y además de regular la apoptosis también se le ha implicado en la regulación del ciclo celular. BCL-2 y Bcl-X<sub>L</sub> inhiben la liberación de iones de calcio, citocromo *c*, y AIF (factor inductor de apoptosis) desde la mitocondria al citosol por lo que preservan la integridad de la mitocondria y frenan la activación de caspasas.

#### 6.3.2. Proteínas proapoptóticas

BAX, BAK y BID, entre otras, son responsables de aumentar la permeabilidad mitocondrial, contribuyendo así a la liberación de factores proapoptóticos (citocromo *c*, AIF...) y en consecuencia, a la activación de caspasas. Dentro de este grupo, BAX y BAK son cruciales en el mecanismo de muerte celular. En condiciones normales **BAX** se localiza en el citosol en forma inactiva; diferentes señales apoptóticas inducen su cambio conformacional de modo que queda expuesto el dominio hidrofóbico que favorece la inserción de BAX en la membrana mitocondrial externa y su oligomerización (Korsmeyer y cols., 2000). BAX forma canales homo-oligoméricos o hetero-oligoméricos junto con **BAK**,

que favorecen la permeabilidad mitocondrial y en consecuencia, la liberación de factores proapoptóticos desde el espacio intermembrana al citosol (Letai y cols., 2002). La sobreexpresión de BCL-2, característico de numerosos cánceres, no afecta tanto a la translocación de BAX sino a su inserción en la membrana y, en especial, evita la oligomerización de BAX en la membrana mitocondrial (Mikhailov y cols., 2001). La protección que ejerce BCL-2 sobre la oligomerización de BAX se debe principalmente a efectos estéricos provocados por una saturación de BCL-2 en las membranas que interfieren en los cambios conformacionales necesarios para la formación del canal.

Las proteínas de la familia BCL-2 también pueden interaccionar con componentes del denominado poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, **PTP (permeability transition pore)**. Numerosas señales de estrés celular provocan la apertura de esta estructura lo que causa el hinchamiento de la matriz mitocondrial y la expansión de la membrana interna, fenómenos que van a producir la ruptura, y por tanto, permeabilización de la membrana mitocondrial externa. BAX y otras proteínas proapoptóticas interaccionan con componentes del PTP tales como VDAC y ANT (translocador de nucleótidos de adenina) favoreciendo su apertura y con ello, facilitando la liberación de factores apoptogénicos. BCL-2, por el contrario, actúa inhibiendo la apertura del poro (Schwarz y cols., 2007).

Un grupo importante de proteínas proapoptóticas lo constituyen las **proteínas sólo-BH3 (BH3 only)**, así denominadas porque poseen una única secuencia de homología (BH3) con el resto de la familia (Youle y Strasser, 2008). En este grupo se incluyen BAD, BIK, BID, BIM, NOXA y PUMA, que actúan como **sensores iniciales de las señales apoptóticas** iniciadas por diferentes procesos celulares. Por ejemplo, NOXA y PUMA son inducidos por p53 en respuesta a un daño genómico y BIM es inducido de diferentes maneras en respuesta a la privación de factores de crecimiento o a un estrés reticular. Por otra parte, las proteínas sólo-BH3 también pueden activarse de modo post-transduccional; BAD, por ejemplo, se activa por desfosforilación y BID por proteólisis mediada por caspasa-8. En cualquier caso, una vez que las proteínas sólo-BH3 son activadas, promueven la apoptosis, bien inactivando BCL-2 o bien interaccionando con proteínas tipo BAX (Huang y Strasser, 2000; Youle y Strasser, 2008).

## 7. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA

Los elementos que forman parte de la maquinaria apoptótica se encuentran coordinados entre sí, tanto física como funcionalmente, y aportan al sistema global una gran variedad de rutas de iniciación en respuesta a muy diferentes estímulos así como de puntos de regulación. La vía de señalización de la apoptosis, más que lineal, presenta una **estructura reticular**, muy ramificada en sus inicios pero que después va confluyendo hacia rutas comunes (Danial y Korsmeyer, 2004).

En general, el proceso apoptótico puede activarse por muy diferentes estímulos bien procedentes del exterior (inducción extrínseca mediada) o intracelulares

(inducción intrínseca). Los factores que pueden activar una ruta apoptótica son múltiples: unión de ligandos a receptores específicos, daño del DNA, tratamiento con drogas citotóxicas, irradiación, pérdida de señales de supervivencia, señales contradictorias de proliferación y señales de muerte asociados al desarrollo son algunas de ellas. Estas señales de muerte de muy distinto origen son capaces, sin embargo, de activar rutas de señalización comunes.

Existen dos rutas principales que desencadenan la apoptosis: la **ruta extrínseca**, mediada por la estimulación de receptores transmembrana, y la **intrínseca**, en la cual la mitocondria actúa como componente central, regulado por proteínas de la familia BCL-2. Otros orgánulos celulares como el retículo endoplasmático, el núcleo o los lisosomas también pueden participar en la señalización y respuesta apoptótica, sin embargo, los mecanismos de señalización a través de los cuales intervienen se conocen tan sólo parcialmente.

### 7.1. Ruta extrínseca o mediada por receptores

En la vía extrínseca o apoptosis mediada por receptores, las moléculas señalizadoras que desencadenan la respuesta apoptótica **-ligandos-** provienen del medio extracelular y son liberadas o están ancladas en otras células (Figura 2). Estos ligandos se unen a **receptores de muerte** de la célula diana y son los responsables de inducir la muerte celular (Figura 2). Los receptores de muerte mejor caracterizados son el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1) también denominado DR1 (**Death Receptor 1**), Fas (DR2, **Death Receptor 2**), Apo-3 (DR3), Trail-R1 (DR4) y Trail-R2 (DR5). Un claro ejemplo de esta ruta apoptótica lo tenemos en el sistema inmunológico. Las células NK (*natural killer*) poseen el ligando Fas (FasL) en su superficie. La unión de FasL a los **receptores Fas** (DR1) en la célula diana, provoca que gran número de receptores se agreguen en la superficie de la célula diana. Estos receptores de membrana poseen en su dominio intracitoplasmático el **dominio de muerte** (DD, *Death-domain*) encargados de reclutar **proteínas adaptadoras** que poseen el dominio de muerte asociado a Fas conocido como **FADD** (**Fas-Associated Death Domain protein**). FADD también posee el dominio **DED** (death effector domain), presente también en los prodominios de las procaspasas iniciadoras implicadas en esta vía, la **procaspasa 8 y 10**. El complejo proteico formado por DD, FADD y las procaspasas se denomina **DISC** (*Death-Inducing Signal Complex*) y su función es la activación de las caspasas iniciadoras. Es la formación de este complejo proteico lo que facilita el reclutamiento de gran cantidad de procaspasa-8 o 10, dando lugar a la activación de éstas por proximidad. La activación de la caspasa-8 dará lugar, a su vez, a la activación de una cascada de caspasas hasta la **caspasa efectora 3**. La señalización FADD-caspasa-8 puede ser bloqueada mediante proteínas inhibitoras, como **FLIP**, que evitan el reclutamiento y activación de la caspasa-8. La caspasa 8 activa es capaz, también, de fragmentar la proteína **Bid** (de la familia de proteínas *BH3-only*), dando lugar a la proteína **tBid**, la cual actúa como una

molécula de señalización en la membrana mitocondrial facilitando la liberación del **citocromo c** y enlazando así la vía extrínseca con la intrínseca mitocondrial.

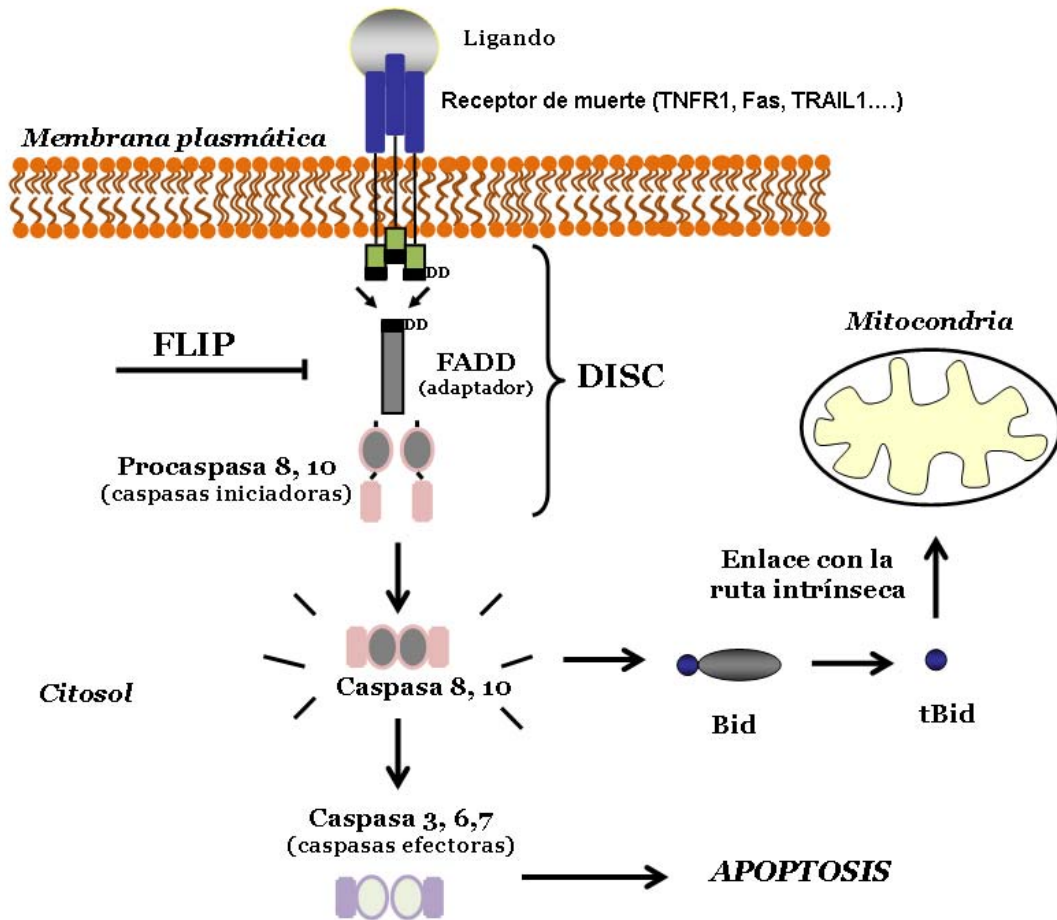


Figura 2. Ruta extrínseca o mediada por receptores.

## 7.2. Ruta intrínseca o mitocondrial

La ruta intrínseca se desencadena en general por un estrés celular como puede ser un daño en el DNA, choque térmico, drogas, privación de factores de crecimiento, estrés reticular etc. Las diferentes señalizaciones de estrés celular convergen la mayoría de las veces en la mitocondria, frecuentemente a través de la activación de las proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2 (Kroemer y cols., 2007) (Figura 3). Sin embargo, como se menciona al final de este apartado, el retículo endoplasmático y otros orgánulos han sido recientemente



implicados en la señalización apoptótica y juegan un papel importante en la respuesta al estrés celular.

Las proteínas de la familia BCL-2 regulan la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y con ello regulan la liberación de moléculas apoptogénicas retenidas en el espacio intermembrana (citocromo *c*, AIF, Smac/DIABLO, etc). En las células sanas, las proteínas pro-apoptóticas de esta familia se encuentran inactivas pero dispuestas a actuar ante las señales pro-apoptóticas. Así, BAX se localiza en el citosol en forma de monómeros inactivos y BAK, que es una proteína oligomérica, se encuentra integrada en su forma inactiva en la membrana mitocondrial y unida a MCL1 o BCL-XL. Ante el estímulo apoptótico, BAX y BAK cambian su conformación que en el caso de BAX conlleva su translocación a la membrana mitocondrial y oligomerización. La activación de los miembros pro-apoptóticos tiene lugar a través de la fosforilación, proteólisis y otros mecanismos. Estos procesos dirigen a los miembros pro y antiapoptóticos de la familia BCL-2 a la superficie mitocondrial, donde se encuentra la proteína inhibidora BCL-2; aquí, el balance entre unos y otros determina la permeabilización o no de la mitocondria y con ello, la liberación o no de moléculas pro-apoptóticas, entre ellas el citocromo *c* (Korsmeyer y cols., 2000; Mikhailov y cols., 2001). Al ser liberado al citoplasma el **citocromo c** se asocia con la proteína adaptadora **Apaf-1** y luego con la **procaspasa-9** y **ATP** formando un gran complejo proteico denominado **apoptosoma**. La formación de este complejo provoca la activación de la **caspsa 9**, cuya función es la activación de la **caspsa 3**. Desde el espacio intramembrana de la mitocondria también se liberan otros factores importantes. El factor de inducción de apoptosis (AIF, *apoptosis inducing factor*), por ejemplo, favorece la fragmentación del DNA de manera **caspsa-independiente**. También las proteínas Smac/DIABLO antagonistas de las IAPs. Ambas rutas apoptóticas intrínseca y extrínseca convergen a nivel de la activación de la caspsa 3 (Kroemer y cols., 2007).

Hay que destacar que la salida del citocromo *c* de la mitocondria al citosol no sólo actúa como un factor pro-apoptótico esencial para la formación del apoptosoma, sino que también da lugar al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, un cese de la producción de ATP que conduce a la muerte celular. Según la intensidad del estímulo puede desencadenarse la muerte celular por apoptosis o necrosis. Un daño severo que afecta a la mayoría de la población mitocondrial provocará la muerte celular por necrosis; un estímulo moderado que tan sólo afecte a una parte de la población mitocondrial, permitirá mantener el aporte suficiente de ATP para que concluya el proceso apoptótico (Bossy-Wetzel y cols., 1998).

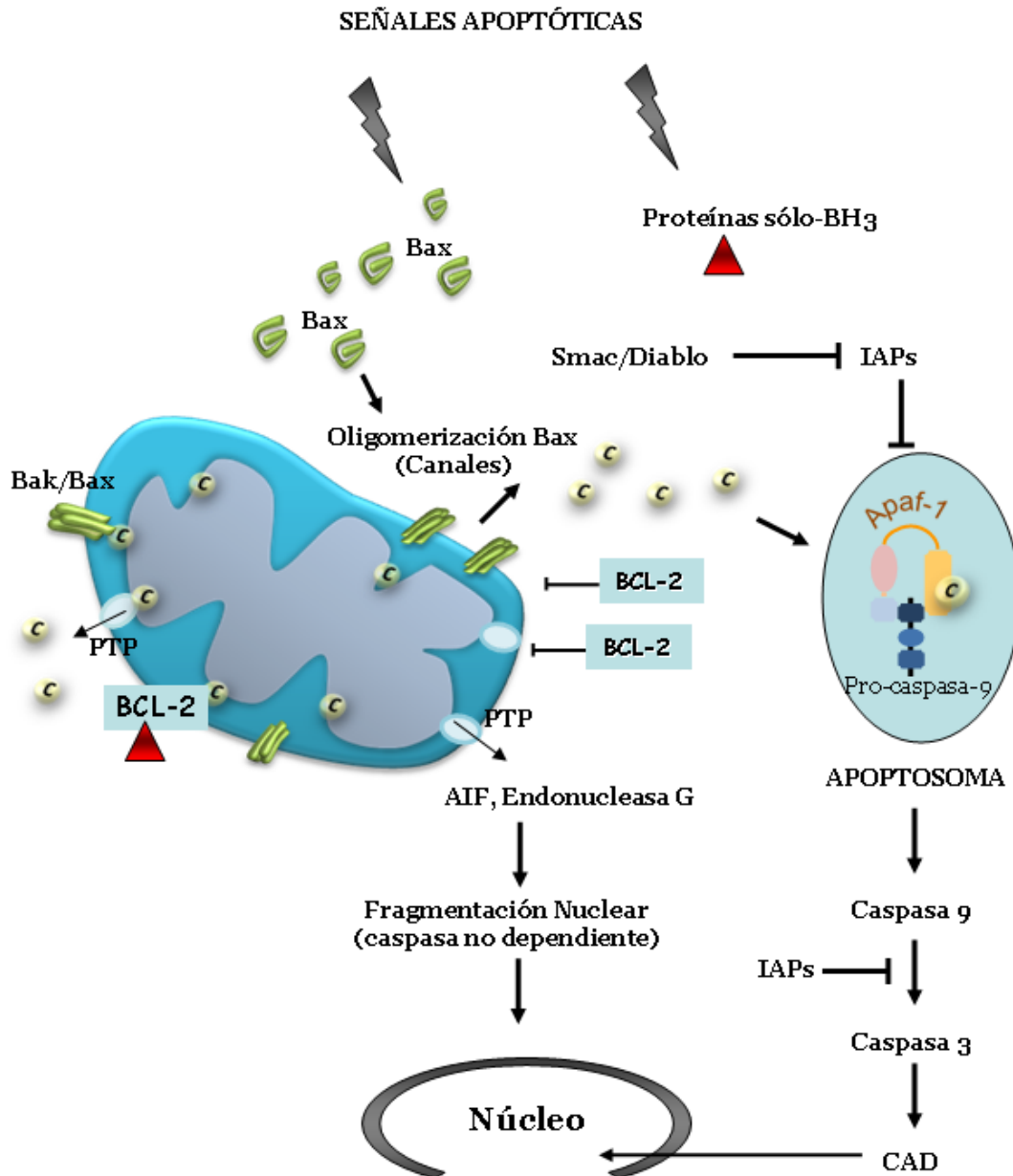


Figura 3. Ruta apoptótica intrínseca

La mitocondria integra varios tipos de señales proapoptóticas que provienen de otros orgánulos. La mayoría de estas señales conectan con la permeabilidad mitocondrial o la activación de caspasas. Estudios recientes apuntan a que el **retículo endoplasmático** es capaz de ejercer un papel regulador de la apoptosis mediado estrés (Kroemer y cols., 2007). El estrés reticular puede ser originado por un plegamiento defectuoso de proteínas en este orgánulo, o bien a por una perturbación del gradiente de  $Ca^{2+}$  a través de su membrana. La

acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo activa una respuesta adaptativa denominada **respuesta a proteínas no plegadas** (*unfolded protein response: UPR*). Se han descrito numerosos mecanismos mediante los cuales bien el  $\text{Ca}^{2+}$  reticular, o bien la respuesta a proteínas no plegadas inducen una permeabilidad mitocondrial y por lo tanto, la activación de la ruta intrínseca, estando sujetos al control de la familia BCL-2 (Oakes y cols., 2006). Sin embargo, la transducción de señales que conectan el estrés reticular y la maquinaria apoptótica no se conocen bien y aún quedan muchos interrogantes. Algunos autores han propuesto que la caspasa 12, expresada en ratones y localizada en la cara citosólica del retículo endoplasmático actúa como caspasa iniciadora de la señalización apoptótica en esta vía (Szegezdi *et al*, 2003). En células humanas es la caspasa 4 la que actuaría como mediador del estrés reticular, pero no existen datos consistentes de que dicha caspasa active a su vez las caspasas ejecutoras.

También **el núcleo** puede iniciar una señalización apoptótica y conectar ésta con la mitocondria, a través de **p53**. p53 es capaz de transactivar numerosas proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2, en particular BAX, BID, PUMA y NOXA, las cuales actúan induciendo la permeabilidad mitocondrial (803); también es capaz de transreprimir BCL-2 y con ello favorecer la apoptosis. En respuesta a roturas de doble cadena del DNA, p53 estimula la liberación de la histona H1.2, la cual actúa posteriormente favoreciendo la permeabilidad mitocondrial (Konishi y cols. 2003). Es más, p53 puede estimular la expresión de **PIDD** (*p53-induced protein with death domain*), contribuyendo así a la activación de la **caspasa-2**. La caspasa 2 se activa en el núcleo mediante el complejo denominado **PIDDosoma**, que contiene PIDD y **caspasa 2** entre otras; una vez activado es capaz de inducir directamente la permeabilidad mitocondrial conectando la señalización nuclear con la mitocondria (Berube y cols. 2005).

Además de los mencionados, los lisosomas, el citoesqueleto y metabolitos intermediarios presentes en el citosol, son también capaces de iniciar una señalización de muerte celular convergente en la mitocondria (Kroemer y cols., 2007).

## 8. ADDENDUM

La comprensión de los mecanismos que controlan y ejecutan la apoptosis va más allá de un simple interés científico. La muerte celular apoptótica es un componente esencial en la mayoría de las anomalías del desarrollo y enfermedades humanas, y en muchos casos, la causa que subyace al desarrollo de la patología. Los desórdenes asociados a una muerte celular insuficiente incluyen las enfermedades autoinmunes y el cáncer. También se ha establecido que muchos, sino todos, los virus poseen mecanismos para evitar la activación apoptótica de las células que infectan permitiéndoles tener un hospedador vivo donde propagarse (Roulston y cols., 1999). En todos estos casos, el restablecimiento del programa apoptótico que se encuentra

bloqueado, tendría un impacto enorme. En el lado opuesto, muchas otras patologías que incluyen el SIDA, las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Párkinson o la retinitis pigmentosa, están asociados a una apoptosis excesiva. En estos casos, la supresión de la muerte celular podría restaurar la funcionalidad de los tejidos afectados.

Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan la muerte celular tiene un gran interés terapéutico; el diseño de nuevos fármacos que puedan activar o inhibir selectivamente la muerte de las células contribuirá a la mejora de los tratamientos en beneficio de los pacientes. Por estas razones, no sorprende que los científicos intentemos comprender cuando, cómo y por qué muere una célula por apoptosis.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA

Berube C, Boucher LM, Ma W, Wakeham A, Salmena L, Hakem R, Yeh WC, Mak TW, Benchimol S. Apoptosis caused by p53-induced protein with death domain (PIDD) depends on the death adapter RAIDD. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:14314-14320

Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVE-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998; 17:37-49

Castedo M, Ferri K, Roumier T, Métivier D, Zamzami N, Kroemer G. Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 2002; 265:39-47

Coucouvanis E, Martin GR. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 1995; 83(2):279-87

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 151(1):10-27

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116(2):205-19

Davies AM, Hershman S, Stabley GJ, Hoek JB, Peterson J, Cahill A. A Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition causes complete release of rat liver endonuclease G activity from its exclusive location within the mitochondrial intermembrane space. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(4):1364-73

Ellis HM and Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986; 44:817-829

Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Int Med* 2005; 258:479-517

Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* 2006; 79(5):896-903

Glücksmann A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Cambridge Phil Soc* 1951; 26:59-86

Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 639-647

Grimm S, Brdiczka D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 2007; 12(5):841-55.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-776

Hengartner MO and Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994; 76: 665-676

Horvitz HR, Ellis HM, Sternberg PW. Programmed cell death in nematode development. *Neurosci. Commentaries* 1982; 1: 56-65

Horvitz HR. Genetic control of cell death in the nematode *C. elegans*. *Gerontol* 1990; 30:252A

Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000; 103(6):839-42.

Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007; 12(9):1543-68

Keeble JA, Gilmore AP. Apoptosis commitment--translating survival signals into decisions on mitochondria. *Cell Res* 2007; 17(12):976-84

Kerr JFR, Wyllie AH y Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257

Kerr JFR. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965; 90:419-435

Konishi A, Shimizu S, Hirota J, Takao T, Fan Y, Matsuoka Y, Zhang L, Yoneda Y, Fujii Y, Skoultchi AI, Tsujimoto Y. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* 2003; 114:673-688

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 2000; 7(12):1166-73

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87:99-163

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH y cols. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2009; 16, 3–11

Lai E, Tracy T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* 2006; 22:193-201

Lauber, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Cell* 2004; 14:277-287

Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002; 2(3):183-92

Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008; 27(48):6194-6206

Lockshin RA y Williams CM. Programmed Cell Death I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm. *J Insect Physiol* 1964; 11:605-643

Martin SJ y Green DR. Protease activation during apoptosis death by a thousand cuts?. *Cell* 1995; 82:349-352

Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JP, Melendez-Zajgla J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27:48

Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev* 2001; 2:63-66

Meier P, Finch A, Evan F. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407:796-801

Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam A, Saikumar P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2001; 276(21):18361-1874

Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 2006; 16(5):264-72

- Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994; 76(2):229-39
- Oakes SA, Lin SS, Bassik MC. The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr Mol Med* 2006; 6:99-109
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C y cols. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993; 12:3679-3684
- Oliveira JB, Gupta S. Disorders of apoptosis: mechanisms for autoimmunity in primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol* 2008; Suppl 1:S20-28
- Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *Biol Chem* 1998; 273(50):33533-33539
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002; 192:131-137
- Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Anu Rev Microbiol* 1999; 53 :577-628
- Schwarz M, Andrade-Navarro MA, Gross A. Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? *Apoptosis* 2007; 12(5):869-76
- Vaus DL, Weissman IL, Kim SK. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human BCL-2. *Science* 1992; 258:1955-1957
- Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Younes AB, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G. Senescence, apoptosis or autophagy? *Gerontology* 2008; 54:92-99
- Willie AH. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. En *Cell death in biology and pathology* (Eds. Bowen and Lochshin). P9. Chapman & Hall, London.
- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(1):47-59
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1  $\beta$ -converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-652
- Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; 183:1533-1544