

Actividad antitumoral de los antagonistas de los receptores NK-1 (CP-96,345 y [D-Arg1, D-Trp5,7,9, Leu11]SP en líneas celulares de melanoma humano

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Ingeniero Químico

Septiembre de 2014

Autora: María del Carmen Jiménez Zamora

Tutores: José Usero García y Miguel Muñoz Saez

Agradecimientos

Realizar este Proyecto Final de Carrera ha sido un reto para mí.

Quisiera agradecer a mis tutores de la ETSI, José Usero y José Morillo, la dedicación y confianza puesta en mí.

A Miguel Muñoz, tutor y director de este trabajo. Gracias por brindarme tu confianza y por abrirme las puertas de la investigación. Ha sido un placer trabajar con una gran persona, entusiasta, motivadora y fuente de conocimiento como lo eres tú. Gracias de verdad.

*Este trabajo me gustaría dedicárselo a mi familia, a mi padre, Albino, a mi madre, Sole, y a mi hermana, M^a Soledad. Gracias por todo el esfuerzo que habéis hecho durante todos estos años, por las palabras de ánimo en momentos de flaqueza y por la confianza que siempre tenéis en mí.
Sois un ejemplo a seguir.*

*También dedicártelo a ti, Antonio, porque desde que me embarqué en este viaje, has estado a mi lado, siendo mi principal punto de apoyo.
Gracias por estar a mi lado.*

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1.	Taquicininas.....	5
1.2.	Receptores taquicinérgicos	8
1.3.	Sustancia P (SP)	13
1.4.	Antagonistas de los receptores NK-1	18
1.5.	Melanoma	22
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO.....	26
3.	MATERIAL	27
3.1.	Material fungible	27
3.2.	Material consumible	27
3.3.	Material inventariable.....	28
3.4.	Material biológico	29
3.5.	Material farmacológico	30
4.	MÉTODO DE OPERACIÓN	31
4.1.	Normas generales de manipulación en el laboratorio	31
4.2.	Preparación del medio de cultivo	31
4.3.	Descongelación celular.....	32
4.4.	Mantenimiento celular.....	33
4.5.	Congelación celular	34
4.6.	Preparación de los antagonistas	35
4.7.	Ensayo de proliferación.....	36
4.8.	Análisis estadístico de los resultados.....	42
5.	RESULTADOS	44
5.1.	Mantenimiento y cultivo de las líneas celulares	44
5.2.	Inhibición de CP-96.345 sobre las líneas COLO 858 y MEL HO	44
5.3.	Inhibición de [D-Arg ¹ , D-Trp ^{5,7,9} , Leu ¹¹] SP sobre las líneas COLO 858 y MEL HO ..	46
5.4.	Imágenes	48
6.	COMPARACIÓN CON OTROS FÁRMACOS.....	50
6.1.	Descripción de los antagonistas	50
6.2.	Resultados obtenidos.....	54
6.3.	Comparación de los resultados.....	55
7.	DISCUSIÓN.....	58
8.	CONCLUSIONES	60

9.	BIBLIOGRAFÍA.....	61
10.	ANEXOS	71
10.1.	Figuras	71
10.2.	Tablas	72
10.3.	Gráficas.....	73
10.4.	Otros.....	73

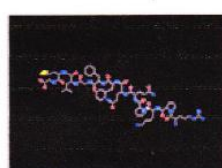
1. INTRODUCCIÓN

1.1. Taquicininas

Las Taquicininas (TK) son una familia de péptidos ampliamente distribuidas en animales vertebrados e invertebrados (Nakanishi S. 1987) tradicionalmente clasificada como neurotransmisores y a la que pertenece la SP.

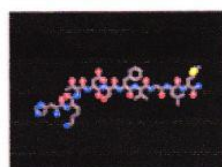
Dentro de la familias de las TK de mamíferos (Figura 1), la primera en ser descubierta fue la SP (Von Euler US y Gaddum JH 1931), posteriormente se identificaron Neurokinina A (NK-A) y Neurokinina B (NK-B) (Kimura S. et al. 1983; Maggio JE 1988), y las formasealongadas de NK-A, el Neuropéptido K (NP-K) (Kangawa K. et al. 1983; Nawa H. et al. 1984; Tatemoto K et al. 1985) y Neuropéptido gamma (NP γ) (Kage R et al.1988), cuyas funciones no han sido totalmente definidas. En el año 2000 se descubrió una nueva TK en ratón que se denominó Hemokinina-I (HK-I), se expresa principalmente en tejido no neuronal y que dio lugar a la creación de un nuevo grupo de TK, las endokininas (Zhang Y et al. 2000; Kurtz MM et al. 2002; Page NM et al. 2003). Erspamer V (1981) describió otros péptidos pertenecientes a esta familia en especies no mamíferas: Fisalemina, Eledoisina y Kassinina. (Erspamer V. 1981).

TAQUICININAS EN MAMÍFEROS



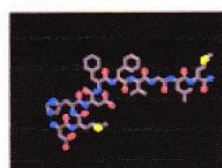
Substance P

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH₂



Neurokinin A

Hys-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH₂



Neurokinin B

Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH₂

Figura 1. Estructuras de las principales Taquicininas en mamíferos.

Desde el punto de vista químico, todas las TK presentan dos zonas definidas: una secuencia pentapéptida característica común en el extremo hidrofóbico carboxi-terminal, Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, (Regoli, Boudon, & Fauchere, 1994), y una secuencia amino-terminal, variable en las diferentes TK. Según el residuo que ocupe la posición X en la secuencia carboxi-terminal, se distinguen dos tipos de TK: las aromáticas, en las que X es un aminoácido aromático (Phe, Tyr), y las alifáticas, en las que es un aminoácido alifático (Val, Ile).

Todas las TK presentan un grupo amida en el extremo carboxi-terminal y la secuencia común: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, hasta completar los 10-11 aminoácidos que generalmente posee la estructura, y el extremo aminoterminal distinto para cada péptido (Tabla 1). La secuencia carboxílica es esencial para la interacción y la activación del receptor, mientras que el extremo amino define la especificidad al subtipo de receptor (Krause JE et al. 1992). Añadir que la estructura primaria de las TK (Tabla 1) se ha conservado a través de la evolución de las especies sugiriendo el papel destacado de este grupo molecular en los sistemas biológicos.

Estructura de las Taquicininas	
SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH ₂
NK-A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
NK-B	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
NP-K	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
NPy	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
Hemokinina-I	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH ₂
Fisalemina	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-MetNH ₂
Eledoisina	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-MetNH ₂
Kassinina	Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
Filomedusina	pGlu-Asn-Pro-Asn-Arg-Phe-Ile-Gly-Leu-MetNH ₂
Uperoleina	pGlu-Asn-Pro-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met NH ₂

Tabla 1. Estructura de las Taquicininas. Estructura de las Taquicininas

Las TK de mamíferos están codificadas por tres genes diferentes, llamados preprotaquicininas TAC1, TAC3, TAC4 de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de Genes (www.gene.ucl.ac.uk/nomenclatura) de la Organización del Genoma Humano (HUGO), sustituyendo los términos clásicos PPT-A/PPT-I por TAC1, PPT-B/PPT-II por TAC 3 y PPT-C /PPT-III por TAC 4 (Patacchini R. et al. 2004) (Figura 2).

El gen TAC 1 puede generar cuatro formas diferentes de péptidos. Por medio de distintos procesamientos a partir de segmentos del gen y uniones alternativas del RNAm, se producen las formas α TAC1 y δ TAC1 (que codifican solo para la SP) y las formas β TAC1 y γ TAC1 (que codifican tanto para la SP como para la NK-A) (Nawa H. et al. 1985; Kawaguchi Y. et al. 1986; Harmar A.J. et al. 1990). La inclusión o exclusión diferencial del exón 4 en β TAC1 y γ TAC1 permite la formación de dos péptidos que son formas elongadas de la NK-A, el neuropéptido K (NPK) (Takemoto K. et al. 1985) y el neuropéptido γ (NP γ) (Kage R., et al. 1988). Es importante tener en cuenta que a veces la SP se expresa de manera aislada, mientras que la NK-A se expresa siempre acompañada de SP. Hay estudios sobre las diferentes concentraciones de las distintas isoformas γ y β , en concreto las que expresan SP y NK-A (Pintado C.O. 2003).

Diferentes estudios han demostrado la expresión del gen TAC1 en todos los tejidos humanos, particularmente en cerebro, corazón, bazo, colon, cerebro fetal y glándula mamaria (Page N.M. et al. 2003; Pinto F.M et al. 2004).

En cuanto al gen TAC3 (PPT II según anterior nomenclatura), éste codifica exclusivamente para la NK-B (Hökfelt T. et al. 2001) y su organización se asemeja bastante a la del gen TAC1 en humanos; aunque su procesamiento no es tan complejo, existen evidencias de la existencia en humanos de dos isoformas precursoras de TAC3, la α TAC3 y la β TAC3 (Page N.M 2004) y de una forma elongada de la NK-B en el cerebro de rata (Lang S., Sperk G. 1995).

Varios estudios inmunorreactivos han dado negativos para la presencia de la NK-B en tejidos periféricos (Moussaoui S.M., et al. 1992) pero sí que se encuentran niveles altos de RNAm de NK-B en tejido placentario. Además, recientemente se ha visto que la distribución de la expresión de TAC3 en tejidos humanos era igual o incluso más amplia que la de TAC1 (Pinto F.M. et al. 2004).

Por último, el gen más recientemente identificado perteneciente a la familia de las TK, es el gen TAC4 (anterior PPT III) (Zhang Y. et al 2000; Kurtz M.M. et al. 2002; Page N.M. et al. 2003). Éste puede ser procesado de manera que de origen a cuatro variantes alternativas: α , β , γ y δ , codificando cada una para cuatro péptidos diferentes clasificados como endokinina A (EKA), EKB, EKC y EKD. Mientras que la EKB está

codificada por las cuatro isoformas, la EKA y la EKC lo están sólo por el α TAC4 y la EKD por el β TAC4 (Page M.M. et al. 2003).

La distribución de las cuatro isoformas de TAC4 no ha sido definida completamente, aunque sí se sabe que α y δ TAC4 se expresan en tejidos periféricos humanos (Page M.M. et al. 2003).

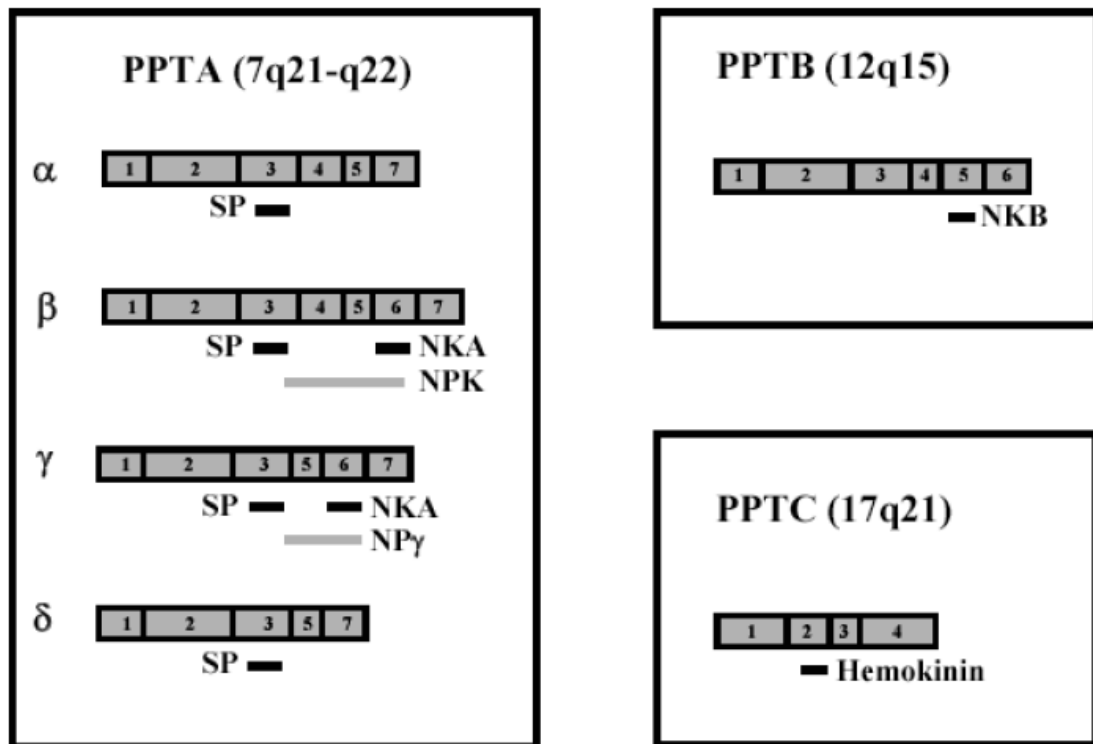


Figura 2. Esquema de la estructura de los genes humanos PPT-A, PPT-B y PPT-C. Los exones de cada uno de los genes están expresados por números. Las isoformas del RNAm del gen PPT-A (α , β , γ y δ) y los productos codificados por cada exón están indicados. Se incluye la localización cromosómica de cada gen.

1.2. Receptores taquicinérgicos

El conocimiento de receptores de neuropéptidos se basaba en estudios de unión y análisis farmacológicos, hasta que Nakanishi y col. clonaron el primer receptor taquicinérgico (Masu Y. et al. 1987).

Los receptores taquicinérgicos son receptores perteneciente a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son proteínas transmembranas responsables de la traducción de señales en el proceso de comunicación celular. Por su

estructura, también se les llama receptores de los siete dominios transmembranas (Figura 3 y Figura 4).

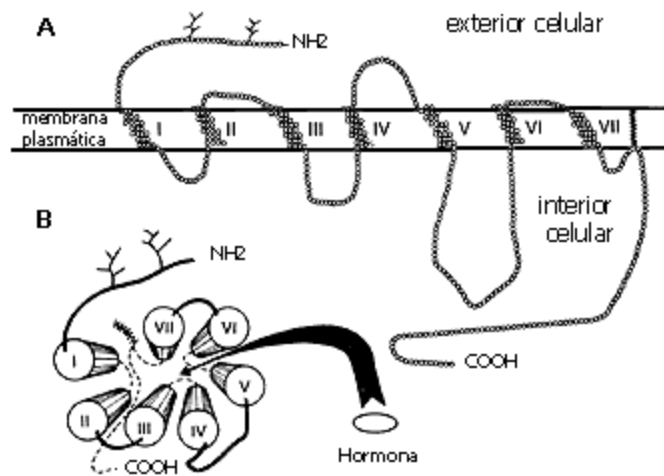


Figura 3. Estructura de un receptor de la familia de los Receptores acoplados a Proteínas G o de los siete dominios transmembranas. En la parte superior (A) se ilustra una representación de estos receptores, en plano, señalando su topología. En la parte inferior (B), se ilustra una representación del receptor en tres dimensiones, visto desde la cara extracelular y señalando la zona de interacción con la hormona.

Estos receptores comparten varias características estructurales, siendo la más importante la existencia de un paquete de siete hélices transmembrana conectadas por seis bucles de distinta longitud (Figura 3). Aunque los GPCRs comparten una topología en común, cada uno tiene ciertas características diferenciadoras pudiendo variar especialmente en el tamaño del amino-terminal extracelular, bucles citoplasmáticos y el grupo carboxilo terminal.

La proteína G es un heterotrímero constituido por una subunidad α con actividad GTPasa y dos subunidades β y γ que forman un dímero. La unión de un agonista a su receptor específico en la superficie celular causa un cambio conformacional en el receptor que permite la interacción con la proteína G, se forma así un complejo de alta afinidad: agonista-receptor-proteína G. Lo que ocurre es que el dímero se disocia de la subunidad α quedando activa la proteína G. Todas las subunidades activadas produce una cascada de señalización intracelular por activación de sus proteínas efectoras (Figura 5).

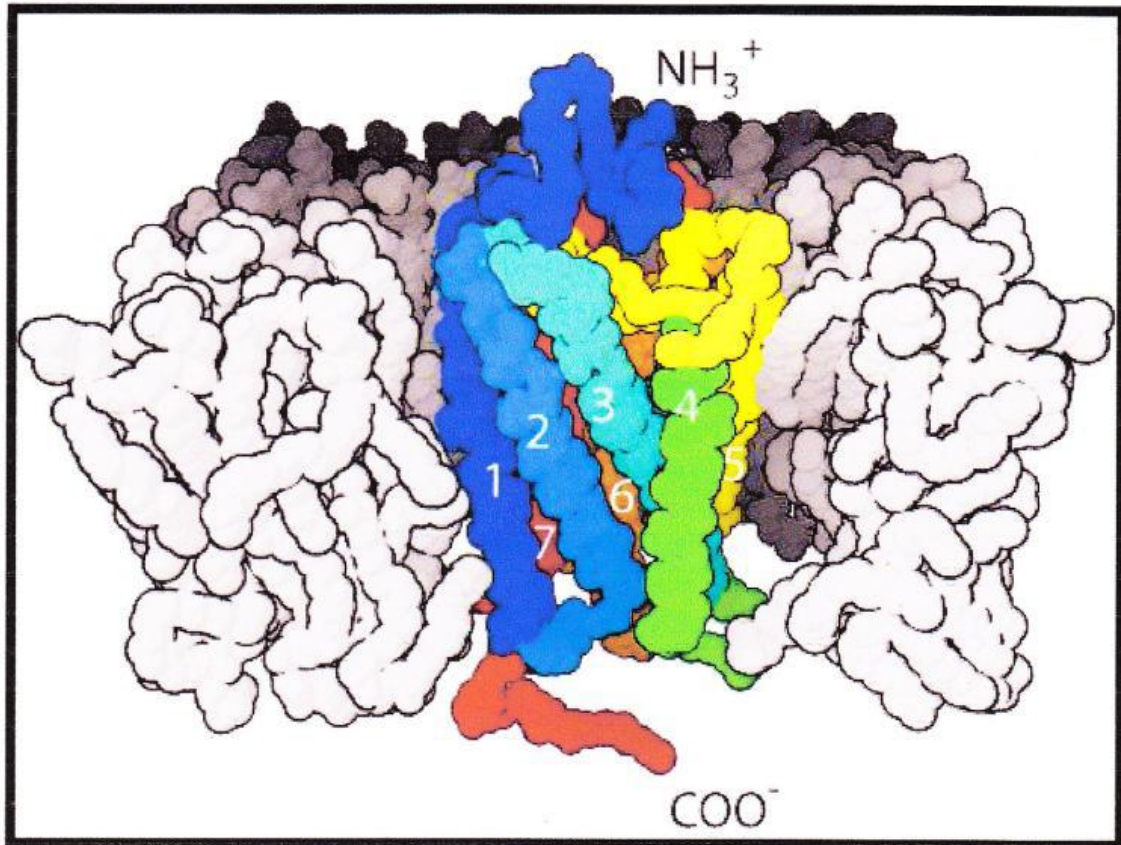


Figura 4. Receptor asociado a Proteína G genérico: 7 dominios transmembrana y 6 bucles.

Las proteínas G activadas median la estimulación o inhibición de enzimas efectoras (adenilato ciclasa y fosfolipasa C) y también canales iónicos (de calcio y potasio) (Strader C.D. et al. 1994; Lefkowitz R.J. 2000; Ozo et al. 2000) modulando los niveles de segundos mensajeros intracelulares.

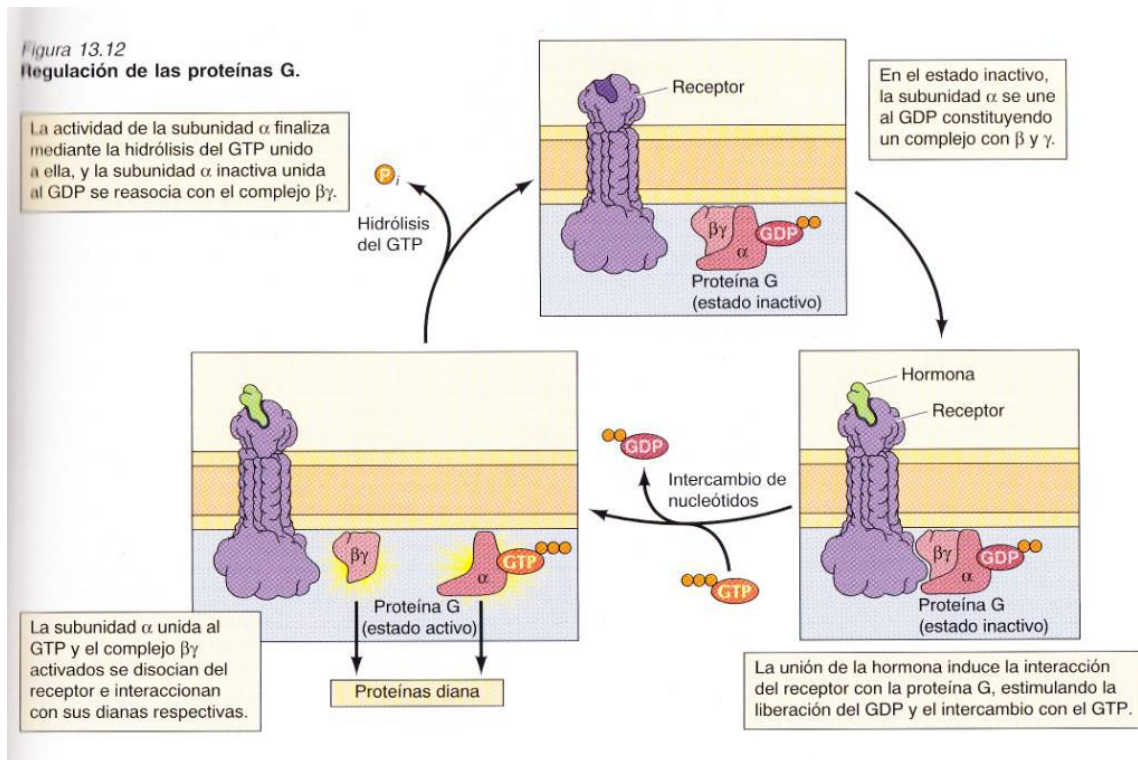


Figura 5. Regulación de la Proteína G trimérica. (Figura procedente de Cooper's MARBAN)

Basándose en los análisis comparativos de las propiedades farmacológicas de varias taquicinas, fue posible comprobar la existencia de tres receptores diferentes para estos mensajeros moleculares (Teichberg VI et al.1981; Lee C-M et al.1982; Buck SH y Burcher E 1986, Maggi CA et al. 1993).

Nakanishi S (1987) fue el primero en clonar un receptor afín a la SP, el receptor de la Sustancia K, que fue el primer receptor clonado de un neuropéptido. Más tarde otros receptores de taquicinas fueron clonados en pocos años por Nakanishi S 1991; Betancur C et al. 1997.

Más recientemente tres receptores de taquicinas de mamíferos se clonaron (Hökfelt T et al. 2001): receptor NK-1 (407 residuos), NK-2 (398 aminoácidos), NK-3 (receptor más desconocido) (Figura 6). Finalmente se ha clonado una variante del NK-3 referido como NK-4. El RNK-1 es el receptor taquicinérgico mejor caracterizado de los tres subtipos. Dichos receptores poseen una moderada selectividad a las taquicinas endógenas. Así, la SP, NK-A y NK-B actúan como agonistas de los tres receptores, no obstante, no todos se unen con la misma afinidad. Así pues, la SP es el ligando más afín

del receptor NK-1, la NK-A del receptor NK-2 y la NK-B a su receptor NK-3. (Tabla 2).

Receptores taquicinérgicos y sus ligandos	
NK1 R	SP>NK-A>NK-B
NK-2 R	NK-A>NK-B>SP
NK-3 R	NK-B>NK-A>SP

Tabla 2. Receptores de las Neuroquininas y sus ligandos.

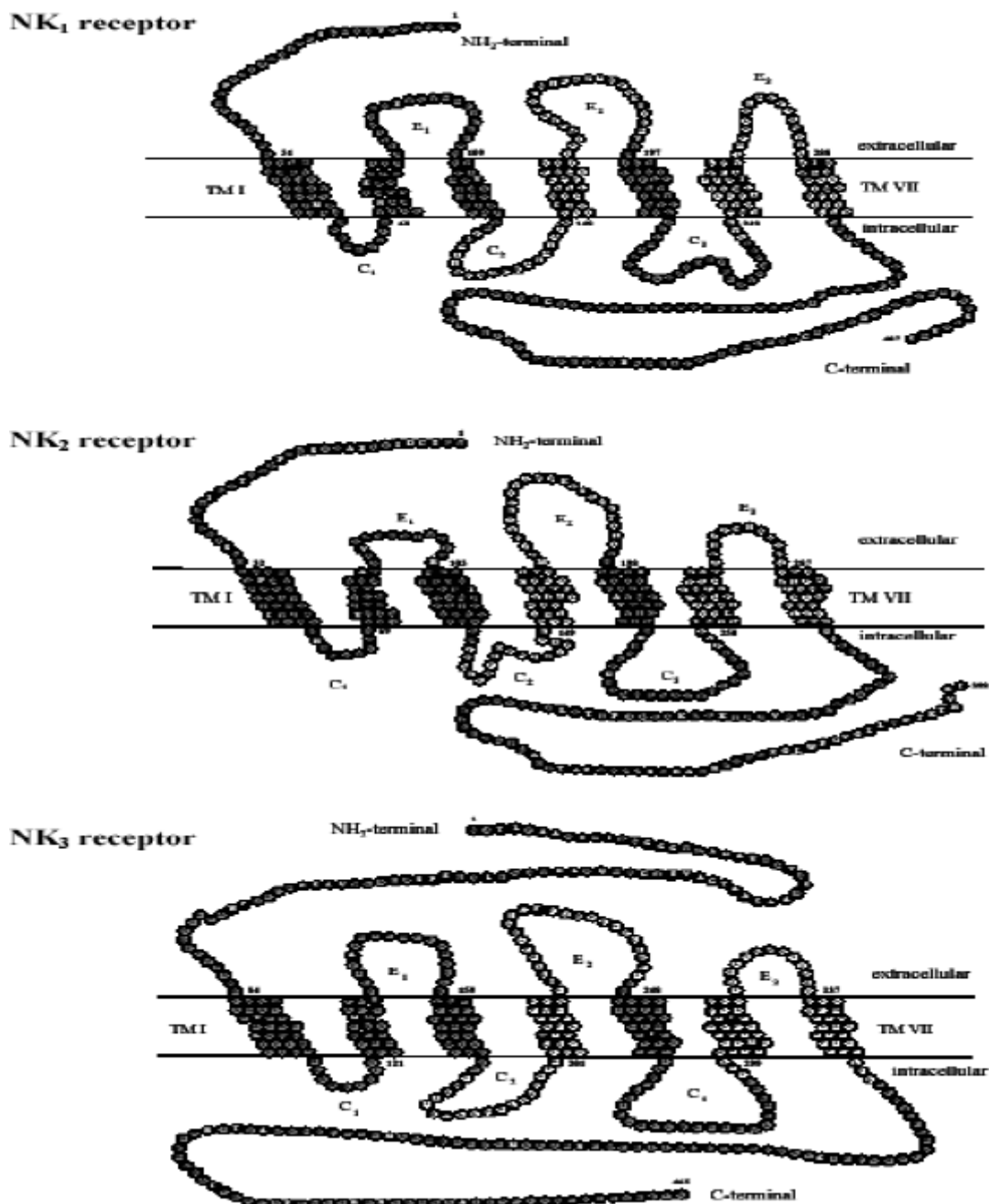


Figura 6. Disposición transmembrana de RNK-1, RNK-2 y RNK-3.

1.3.Sustancia P (SP)

La SP tiene la historia más larga y es probablemente el mejor neuropéptido caracterizado en cuanto a su distribución, liberación y propiedades biológicas.

La historia de la SP se inicia en 1931 cuando Von Euler US y Gaddun JH, tratando de encontrar acetilcolina en extractos hipotalámicos e intestinales de caballo, descubrieron una sustancia que producía contracciones del propio intestino y disminuía la presión sanguínea como consecuencia de la dilatación vascular (Von Euler US y Gaddun JH 1931).

Este nuevo material fue designado sustancia P (P “powder”), se observaba que las propiedades de ese nuevo extracto se mantenían cuando se evaporaba al polvo seco en el extracto de los tejidos (Hökfelt T. et al. 2001). 40 años más tardes, en 1970, fue purificada, caracterizada y sintetizada por Chang M.M y Leeman S.E, que finalmente identificaron la Sustancia P como un undecapéptido formado por 11 aminoácidos (Chang M.M., et al. 1970) y en el mismo año Treager G.W. et al. fueron los primeros en sintetizar el compuesto (Treager G.W. et al. 1971).

La secuencia de los 11 aminoácidos que componen la SP es la siguiente:

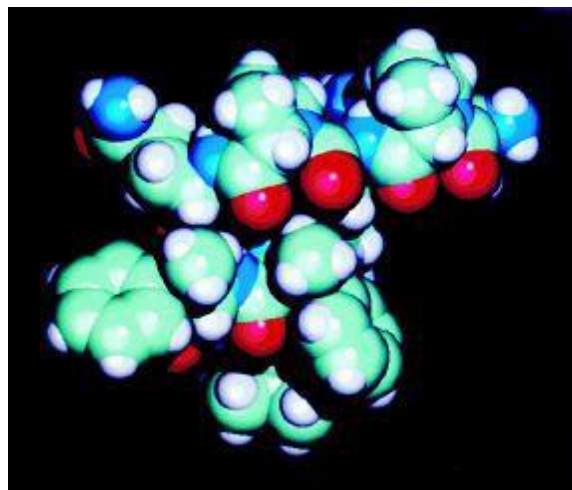


Figura 7. Imagen tridimensional de la molécula de SP.

Esta molécula pertenece al grupo de las taquicininas (TK), es un péptido de cadena corta de once aminoácidos, de los que los seis correspondientes al extremo C-terminal

son esenciales para su actividad biológica a través de la unión con su receptor de membrana específico.

La SP es soluble en agua y alcohol, insoluble en éter y cloroformo. Tolera ebullición a pH entre 1-7 y es rápidamente destruida en medio alcalino. En electroforesis se desvía hacia el cátodo a $\text{pH} < 10$ y su punto isoeléctrico está próximo a 9. La actividad biológica de la SP es inactivada por Tripsina y Pepsina, y resiste la acción de las carboxipeptidasas. Studer RO et al. (1973) aislaron SP de intestino de caballo. La extracción tisular fue realizada de acuerdo con Von Euler US y Gaddun JH (1931) y los pasos iniciales para su purificación fueron los mismos que los utilizados por Pernow B (1953).

La SP está ampliamente distribuida por el organismo así como en el sistema nervioso central y periférico de los animales vertebrados. Fue la primera molécula neuroactiva propuesta como neurotransmisor, dentro de la familia de taquicinas, por Lembeck F. en 1953, existiendo varios datos a favor de la acción neurotransmisora de la SP:

- Localización neuronal y concentración preferentemente en los terminales de la región sináptica
- Transporte desde el cuerpo neuronal hasta los terminales nerviosos
- Liberación dependiente de calcio, en respuesta a un estímulo despolarizante adecuado
- Undecapéptido puro, o sus análogos sintéticos, parecen imitar los efectos mediados por SP.

Se sabe que actúa también como neuromodulador, ya que regula la actividad de otras moléculas y como hormona debido a que ejerce su actividad a distancia de los lugares donde es liberada, y las funciones fisiopatológicas más conocidas son: nociceptiva, espasmogénica, hipotensora, sialagoga, colérica, y está involucrada en el edema y broncoconstricción del árbol bronquial y posee capacidad mitogénica en células tumorales. Es el mayor mediador de la inflamación neurogénica.

Una vez liberado el péptido, como respuesta a un estímulo despolarizante, su vía primordial de inactivación consiste en la degradación por peptidasas sin que participen procesos de recaptación por el terminal nervioso.

Estudios moleculares demostraron que la SP ejerce sus actividades biológicas uniéndose a un receptor acoplado a una proteína G, el de las neuroquininas con especial afinidad para el RNK-1 (Regoli D et al. 1989; Macdonald SG y Boyd ND 1989; Gerard NP et al. 1991).

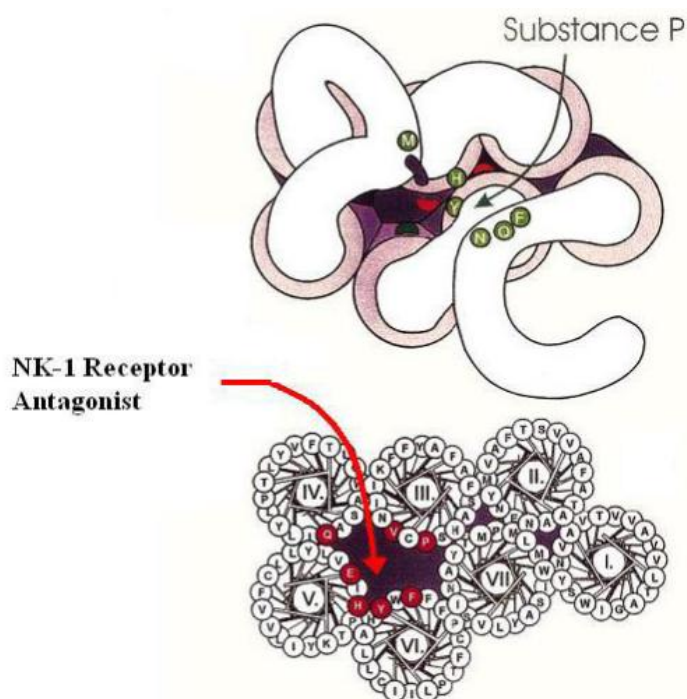


Figura 8. Diferentes sitios de unión en el RNK-1 para la SP y un antagonista no peptídico.

Intracelularmente la unión es seguida de una hidrólisis de fosfoinositol, movilización del calcio, aumento de los niveles de AMPc y la activación del sistema proteína-quinasa activadas por mitógenos (MAPK) (Martin FC et al.1992; Kavelaars A et al.1994; Luo W et al.1996).

La ruta endocelular tras la internalización del complejo SP/NK-1R ha sido estudiada en profundidad por Grady et al (Grady EF et al.1995). Gracias a los estudios con microscopia confocal usando SP marcada y anticuerpos anti NK-1R, se pudo detallar la ruta intracelular así como los procesos de degradación y reciclaje de dichos receptores. Se ha podido determinar que SP y su receptor se internalizan rápidamente mediante la acción de la clatrina en los denominados endosomas tempranos. En ausencia de SP, en NK-1R se localiza en la membrana plasmática, pero cuando la célula está expuesta a este neuropéptido, el receptor y el ligando se une, tras activarse la ruta, se inicia la agrupación en la membrana y se desplazan conjuntamente hacia el interior de la célula

por endocitosis. Es posible que este método no sea el único método de entrada como aseguran los autores en este estudio. Se ha observado que una vez el complejo se internaliza se dirige a la región perinuclear donde se origina una acidificación del endosoma provocando la disociación de SP y RNK-1. Finalmente, se comprueba que los receptores aparecen de nuevo en la membrana. Esto puede ser explicado por tres teorías:

- 1) Síntesis de nuevos receptores
- 2) Inserción de receptores preformados
- 3) Reciclaje de los receptores internalizados

Por el contrario, el ligando se degrada enzimáticamente en el interior de los endosomas ya que no parece de nuevo en la membrana plasmática junto con los receptores.

Parece ser que es precisamente estos mecanismos de endocitosis y reciclaje de los receptores los que serían responsables de los fenómenos de desensibilización y resensibilización ante la presencia de SP, de este modo la célula se haría insensible a cantidades excesivas de SP y se conseguiría una regulación celular frente a este neuropéptido.

1.3.1. Cáncer y SP

Una de las implicaciones más relevantes de la SP es la capacidad mitogénica en varios tipos de células normales como: células del tejido conectivo, sinoviocitos, fibroblastos y linfocitos (Nilsson J et al. 1985; Lotz M et al. 1987; Ziche M et al. 1990 y Payan DG et al. 1983 respectivamente).

Hennig IM et al. (1995) identificaron la presencia del receptor de la SP (RNK-1) en células tumorales de astrocitomas, glioblastomas, carcinoma medular de tiroides, cáncer de mama y ganglioneuroblastomas; en muchos de estos tumores se encontraron receptores de la SP tanto intratumoral como en vasos peritumorales. El estudio de Hennig IM tiene mayor interés en el contexto de otros estudios donde la presencia de la SP es detectada en algunos tumores cerebrales primarios (Allen JM et al. 1985), de ahí que la combinación de ambos estudios sugieran fuertemente la presencia tanto de la SP como de su receptor en tumores cerebrales primarios y eleven la posibilidad de la existencia de un sistema autocrino en tumores cerebrales.

Además Luo W et al. 1996 y Sharif TR et al. 1996 demuestran por vez primera in vitro que concentraciones fisiológicas de SP ($IC_{50} \leq 1$ nM) y de sustancia K inducen mitogénesis vía receptor NK-1 (comprobado mediante la técnica de incorporación de la timidina 3H tritiada al DNA) en la línea celular de astrocitoma humano U373 MG; dicho efecto lo realiza a través de la fosforilación de la tirosina y por tanto la activación enzimática de los Erk1 y Erk2 también llamadas MAPKS (proteína kinasa activada por mitógenos) (Figura 9).

Algunos años más tarde (Palma C et al. 1999) concluirían que la SP participa en el desarrollo y crecimiento in vivo del tumor en ratones atímicos a los cuales se le inyectó células tumorales de la línea celular de astrocitoma humano U373 MG.

Los estudios realizados por Muñoz M et al. han demostrado la capacidad mitogénica de la SP y presencia del receptor NK-1 en distintas líneas celulares tumorales humanas (Figura 9), neuroblastoma SKN-BE(2) y Glioma GAMG (Muñoz M et al., 2005a), retinoblastoma WERI-Rb-1 e Y-79 (Muñoz et al. 2005b, Muñoz et al. 2007), carcinoma de páncreas (Muñoz et al. 2006), cáncer de laringe HEp-2 (Muñoz M et al. 2008a), adenocarcinoma gástrico y de colon (Muñoz M et al 2008b), en melanomas y leucemias (Muñoz et al. 2010a, 2010 DOI).

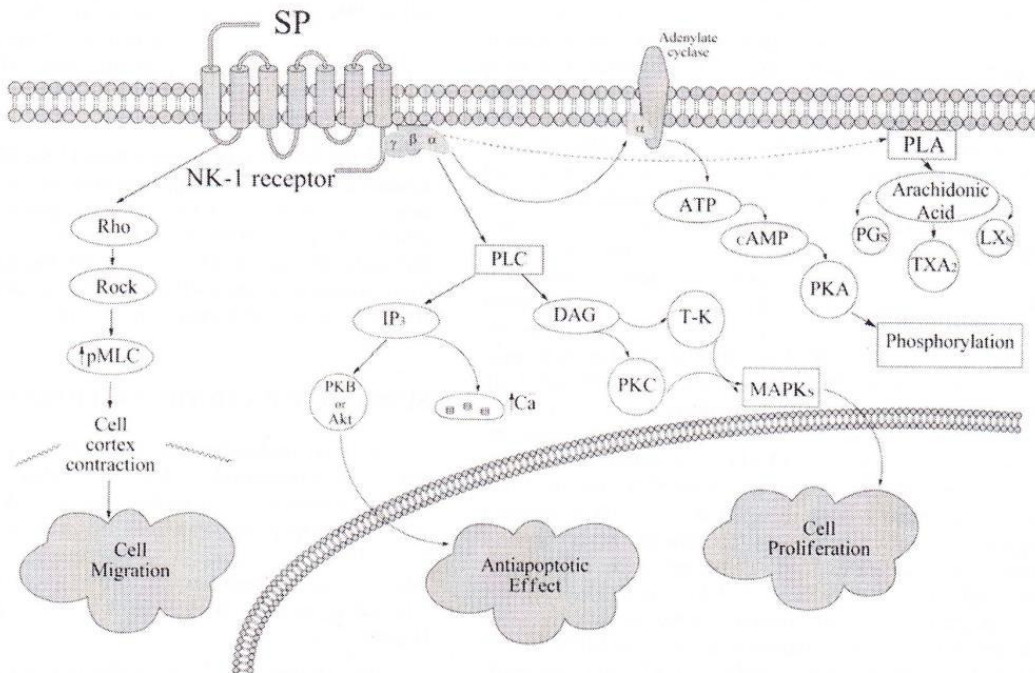


Figura 9. Mecanismos de acción de la SP

1.4. Antagonistas de los receptores NK-1

El desarrollo de los antagonistas de la SP, sensibles y selectivos, ha permitido comprender mejor, la fisiología y fisiopatología del receptor NK-1. En un primer momento, surgen los antagonistas peptídicos pero con ciertas limitaciones, como son su menor afinidad al receptor, su inestabilidad metabólica y una rápida inactivación por peptidasas. Estas limitaciones motivaron la ampliación de la investigación hacia moléculas no peptídicas con capacidad de unión a los receptores de las Taquicinas. Aparece el primer antagonista no peptídico RNK-1 (CP-96,345) realizado por Snider RM et al. (1991). Con el desarrollo de este primer antagonista no peptídico de los RNK-1 CP-96, 345, pudo ser analizado el sitio de unión del antagonista competitivo no peptídico y del neuropéptido SP, demostrándose que mientras la SP se une en los giros extracelulares de las hélices transmembrana del receptor por su carácter hidrofílico, los antagonistas no peptídicos hidrófobos se unen más profundamente entre los segmentos transmembrana (Gether U et al. 1993).

A) Antagonistas peptídico

La serie de antagonistas utilizados es muy extensa y nombramos aquellos de mayor potencia los más utilizados desde el punto de vista clínico:

- [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- [D-Arg¹, D-Pro², D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] SP
- [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] SP
- [Arg⁶, D-Trp^{7,9}, MePhe⁸] SP (6-11)
- [D-Pro²- Trp^{7,9}]SP
- [D-Arg¹, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] SP (Spantide I)
- H-D-Lys(Nicotinoyl)-Pro-(3-(3-pyridyl)-Ala)-pro-D-Phe^{83,4}-Cl¹²-Asn-D- Trp-Phe-D-Trp-Leu-Nle-NH₂ (Spantide II)
- [D-Pro⁴, D-Trp^{7,9,10}, Phe¹¹] SP (4-11)
- Antagonistas peptídicos de cadena corta: NY 3238, NY 3460, NY 3521

B) Antagonistas SP no peptídicos

Los antagonistas no peptídico pueden ser amonios cuaternarios derivados de la quinuclidina, análogos de la piperazina y los compuestos piperidínicos, y derivados

del triptófano entre otras estructuras químicas. Desde que están disponibles los antagonistas no peptídicos de los RNK-1 (Maggi CA et al. 1993; Regoli D et al. 1994), ha habido un incremento de artículos describiendo nuevos antagonistas (Quartara L y Maggi CA 1997). Así, esteroides como WIN-51,708, tipo perhidroisindolonas (RP-67,580, RP-73,467, RPR-100,893...), benzilamino y benzileter quinuclidina (CP-96,345, L-709,210...), benzilamino piperidinas (CP-99,994, GR-203,040, GR-205,171, CP-122,721...), benzileter piperidinas (L-733,060, L-741,671, L-742,694...) y derivados del triptófano como L-732,138.

En la siguiente lista se incluyen otros antagonistas no peptídicos de los RNK-1:

- SR-1400333
- MEN-11,467
- MEN-11,149
- Vofopitant (GR-205,171)
- Ezlopitant (CJ-11,974)
- CJ-12,458 (active metabolite of Ezlopitant)
- CJ-12,764 (active metabolite of Ezlopitant)
- MK-869 (L-754,030, Aprepitant y su sal Fosaprepitant)
- L-758,298
- L-759,274
- Maropitant

Se ha relacionado la SP con varios actos fisiológicos como son la emesis producida por la quimioterapia, el desarrollo del sistema inmune, cambios en el tono cardiovascular, la regulación de la motilidad gastrointestinal, estimulación de la secreción salival y pancreática, muchos procesos fisiológicos además del crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis. Ahora desde el punto de vista clínico, debemos destacar el papel que desempeñan los antagonistas selectivos de la SP y por tanto de los RNK-1, tales como: CP-96,345, CP-99,994, RP-67,580, L-733,060, SR-1400333, GR-203040, MEN-11,467, MEN-11,149, Vofopitant (GR-205,171), CP-122,721, Ezlopitant (CJ-11,974), CJ-12,458 y CJ-12,764 (metabolitos activos de Ezlopitant), MK-869 (L-754,030, Aprepitant®), L-758,298, L-742,694 y L-759,274.

Los antagonistas no peptídicos presentan un amplio rango de usos terapéuticos (Maggi C.A. et al. 1993; Harrinson S. et al. 1994; Regoli D. et al. 1994; Quartara L. y Maggi CA 1997; Rupniak NM et al. 2000; Giardina GAM et al. 2003) de entre ellas se destaca la acción antitumoral.

A principios de los noventa crece un interés por los antagonistas de los receptores taquicinérgicos como inhibidores de la proliferación tumoral como bien reflejan los trabajos realizados por Woll PJ y Rozengurt E 1988 sobre los antagonistas no peptídico en el cáncer de pulmón de células pequeñas, tanto in vitro como in vivo en ratones Swiss 3T3, obteniéndose inhibición del crecimiento de células cancerosas, considerando estos antagonistas como futuros agentes terapéuticos contra este tipo de cáncer.

Algunos años después Orosz A et al 1995 realiza un cribado de varios antagonistas peptídico en las mismas líneas celulares de cáncer de pulmón tipo células pequeñas para identificar la potencia de dichos compuestos tanto in vitro como in vivo.

A finales de los noventa comienzan a utilizarse los antagonistas no peptídico para antagonizar a los receptores taquicinérgicos expresados en líneas celulares tumorales humanas (Luo W et 1996 y Palma C et al 1999, 2000).

A partir del año 2000 son muchas publicaciones las que avalan la posibilidad de la implicación de la SP y RNK-1 en la oncogénesis en distintos órganos (Muñoz et al. 2004a, Rollandy I., 1989; Luo W. 1996; Muñoz et al. 2004b; Friess H. 2003; Palma C. 1999, Palma C. 2000; Dingh D. 2000; Sitohy B.2002; Muñoz M. 2005a; Muñoz M. 2005b; Fowler CJ. 1994; Lee CM. 1989; Eistetter HR. 1992; Muñoz et al. 2006b; Lang K. 2004; Langdon S. 1992; Reeve JG. 1994; Seckl M.J 1997; Woll PJ. 1988; Bigioni M. 2005; Flageole H.1992) entre ellas se pueden destacar:

- Líneas celulares de Glioma y astrocitomas humanos: U373 MG, U138 MG, UC11 MG y GAMG
- Líneas celulares de neuroblastoma humanos: SKN-BE (2)
- Líneas celulares de retinoblastoma humanos: WERI-Rb-1 y Y-79
- Líneas celulares de melanomas humanos: COLO 679, COLO 858, MEL-HO
- Líneas celulares de cáncer pancreático humanos: CAPAN-1, ASPC-1 y PATU-8902

- Líneas celulares de cáncer de pulmón humanos: de células pequeñas H69, COR-L88, H128, H417, COR-L51 y de células grandes COR-L23
- Líneas celulares de cáncer de mama humanos: MDA-MB-468
- Líneas celulares de cáncer colorectal humanos: HT-29

1.4.1. CP-96.345

El antagonista no peptídico de la sustancia P (SP), CP – 96,345 (Figura 10).

Tiene una selectividad 90 veces mayor para el receptor humano NK-1, o el receptor de SP sobre el receptor NK-1 de rata, mientras que el agonista no muestra tal selectividad. El receptor NK-1 clonado de estas dos especies tiene estructuras proteínicas principales similares, difiriendo solo en 22 de los 407 residuos. (Bruce S. Sachais, R. Michael Snider et al. 1993).

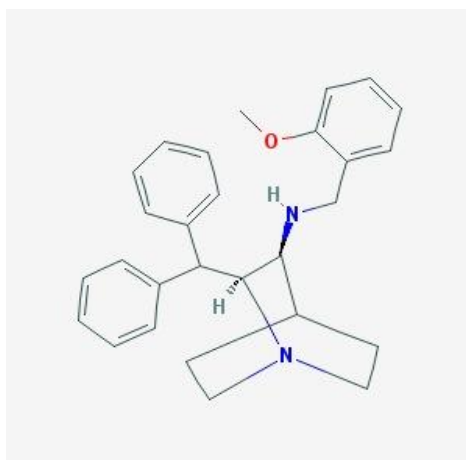


Figura 10. Estructura molecular del antagonista del RNK-1: CP-96,345

1.4.2. [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] Substance P

El compuesto [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP, es una modificación de la SP, como se puede ver en la figura 11.

El antagonista del análogo de SP, es una molécula similar al péptido SP, se sintetiza mediante la modificación de la molécula SP con la sustitución de un L-aminoácido por

un D-aminoácido. Por el contrario, cuando este antagonista análogo se une a la función de los receptores NK-1 de la SP, inhibe la proliferación de células de melanoma.

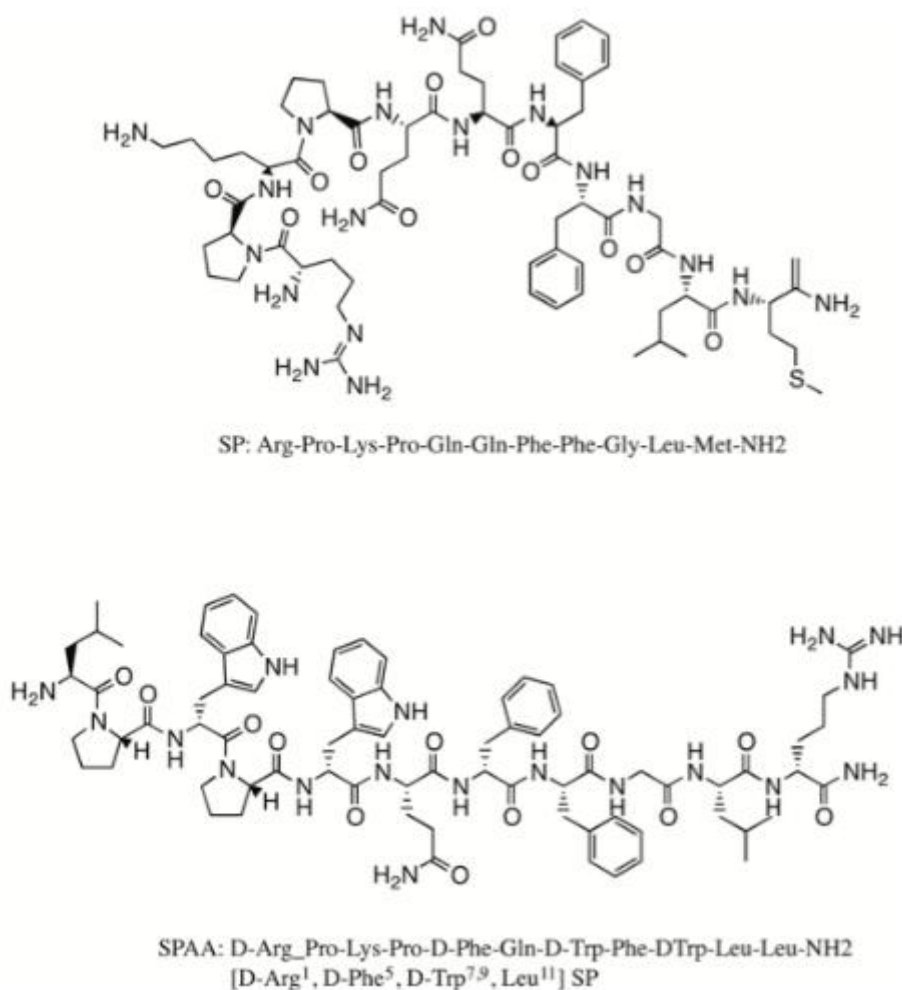


Figura 11. Estructura molecular de la SP y del antagonista del RNK-1 [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP

1.5.Melanoma

1.5.1. Qué es melanoma e incidencia

La piel es el órgano más grande del cuerpo cuya misión principal es la de protegernos de la temperatura, del sol y de las infecciones. La piel también recoge las sensaciones de temperatura, dolor y tacto.

Las características más importantes de la piel, como el grosor, el color o la textura, no son uniformes en todo el cuerpo: la piel de los pies o de las palmas de las manos es más gruesa y posee menos folículos pilosos que cualquier otra parte del cuerpo.

La piel tiene varias capas: epidermis, dermis e hipodermis, nombradas del exterior al interior. La epidermis está en continua descamación porque sus células, llamadas queratinocitos, se dividen y reemplazan continuamente. Por debajo de estos hay otra clase de células llamadas melanocitos, que se encuentran en la parte más inferior de la epidermis y se encargan de producir la melanina, pigmento que da color a la piel al recibir rayos solares.

Cuando las células tumorales, con capacidad de invadir los tejidos sanos de alrededor y de alcanzar órganos alejados e implantarse en ellos se originan partir de los melanocitos, hablamos de melanoma.

El melanoma es el nombre genérico de los tumores melánicos o pigmentados. A pesar de que la mayoría de los melanomas se originan en la piel, por ejemplo en el tronco o en las extremidades, también pueden aparecer en otras superficies del cuerpo (como la mucosa de la boca, del recto o de la vagina, o la capa de coroides del interior de nuestros ojos).

Actualmente se diagnostican unos 160.000 casos al año en todo el mundo, (79.000 hombres y 81.000 mujeres) y el 81% se localizan en países desarrollados. El melanoma representa aproximadamente el 1,5% de los tumores en ambos sexos. En Europa es más frecuente entre las mujeres, al contrario que en el resto del mundo. La mayor incidencia se registra en países con fuerte irradiación solar y con una población blanca no autóctona, lo que sucede en Australia, Nueva Zelanda, USA y Sudáfrica. En Europa es más frecuente en el norte y en el oeste (población con piel muy blanca, expuesta al sol sobre todo en verano). Pero mientras que en todas estas zonas la frecuencia del melanoma tiende a estabilizarse e incluso a disminuir, sigue aumentando en el sur y el este de nuestro continente.

En España se diagnostican unos 3.600 casos anuales. Como en el resto de Europa, es un tumor más frecuente entre las mujeres (2,7% de los cánceres femeninos) que entre los hombres (1,5%). La incidencia en nuestro país se puede considerar alta (tasa ajustada mundial en 2002: 5,3 nuevos casos/100.000 habitantes/año en hombres y 5,5 en mujeres), con un ascenso muy importante, especialmente desde los años 90.

Se registran casos prácticamente a cualquier edad, aunque la mayoría se diagnostican entre los 40 y los 70 años.

1.5.2. Fases del melanoma

Estadio	Localización	Grosor (en mm)	Breslow *	Tasa de supervivencia a 5 años (%)
0	Las células anormales se encuentran solamente en la capa externa de la piel sin invadir los tejidos más profundos			97
I	El cáncer se encuentra en la epidermis (capa más externa de la piel) o en el inicio de la dermis que se halla debajo de la epidermis. No hay afectación de los ganglios linfáticos	< 1-2	<0,75	90-95
II	El cáncer afecta a la dermis, pero no más allá de ésta ni a los ganglios linfáticos.	entre 2- 4	0,75 – 1,5	45-85
III	El tumor afecta a los tejidos situados debajo de la piel, aparecen tumores satélites alrededor de la lesión principal o afectación de ganglios linfáticos cerca de la lesión principal	> 4 mm	>1,5	45
IV	El tumor afecta a ganglios linfáticos alejados del tumor original o a órganos		>3	10%

Tabla 3. Fases del Melanoma

*Breslow, es una clasificación para determinar el grado de extensión del melanoma.

El Breslow se mide en milímetros desde la capa granulosa en profundidad.

1.5.3. Melanoma, SP y receptor NK-1

La sustancia P (SP) es un undecapéptido que pertenece a la familia de las taquiquininas de péptidos y se distribuye ampliamente por todo los sistemas nerviosos central y periférico. SP, neuroquinina A (NK-A), neuropéptido K y neuropéptido Gamma (este último siendo dos formas alargadas de NK-A) se derivan de la preprotachykinin.

Mientras que la neuroquinina B (NK-B) se deriva del gen preprotachykinin B. Las acciones biológicas de SP, NK-A y NK-B están mediadas por tres receptores, neuroquininas designado NK-1, NK-2 y NK-3, el receptor de NK-1, que muestra afinidad preferencial por SP. Después de la unión al receptor de NK-1, SP regula muchas biológica funciones (Harrison S, Geppetti P, 2001) (Henning IM et al, 1995).

Desde 2004, varios estudios se han centrado en la participación del sistema de SP / receptor NK-1 en el melanoma humano ((Muñoz M, Bernabeu-Wittel J Coveñas R, 2011), (Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R., 2004), (Muñoz M, Rosso M, González-Ortega A, Coveñas R., 2010), (Muñoz M, Rosso M, Robles-Frías MJ, Salinas-Martín MV, Coveñas R, 2010)). Antagonistas del receptor de forma de drogas (L-733,060 NK-1, L-732,138 y Aprepitant) inducen apoptosis y contrarrestan la mitogénesis relacionando la SP en líneas celulares de melanoma humano; la acción antitumoral de los antagonistas del receptor de NK-1 se produce a través del receptor NK-1; ambas líneas celulares de melanoma humano expresan receptores NK-1; las líneas celulares de melanoma expresan ARNm para la Receptor NK-1 y el receptor de NK-1 está implicado en la viabilidad de dos líneas celulares de melanoma humanos (COLO 679, MEL HO).

También se ha informado de que los receptores NK-1 se sobreexpresan en las células tumorales en comparación con los normales: los tejidos malignos expresan más receptores NK-1 que en los tejidos benignos; las células tumorales que expresan los fenotipos más malignos muestran un aumento del porcentaje de NK-1 la expresión del receptor, y la expresión del precursor de SP, preprotachykinin A, se incrementa en las células tumorales en comparación con los niveles encontrados en células normales. Además, la expresión de SP ha sido reportado en melanomas malignos invasivos primarios, metástasis melanomas, en melanomas in situ, atípica (displásicos) nevus, y el husillo y células epitelioides (Spitz) nevus, pero no se ha detectado en cualquier nevus melanocíticos benignos adquiridos (Henning IM et al, 1995). Todos estos datos sugieren que el receptor de NK-1 puede ser una nueva diana prometedor en antagonistas de investigación del melanoma y que los receptores NK-1 representan una importante oportunidad para explotar aún más compuestos que son activo contra el receptor de NK-1 como agentes terapéuticos novedosos en cáncer. (Miguel Muñoz et al, 2014).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis de trabajo se centra en que las células tumorales de melanoma sobre expresan en el receptor NK-1 (Muñoz et al, 2014) y en que la SP produciría un aumento de la proliferación de dichas células. Por lo tanto los antagonistas del receptor NK-1 inhibirían la proliferación a través de los receptores NK-1.

El principal objetivo de este estudio es demostrar que la administración de los antagonistas específicos de los receptores NK-1, CP-96345 y [D-Arg¹, D-Trp^{5, 7, 9}, Leu¹¹] SP, inhiben la proliferación de las líneas celulares de melanomas COLO 858 y MEL HO.

3. MATERIAL

3.1. Material fungible

- Frascos de cultivo no pirogénicos estériles de 25cm² o 75 cm² (Falcon, Heidelberg; Alemania)
- Puntas de pipetas estériles de 0,5 – 1 µL, 1 – 10 µL y 20 – 200 µL.
- Pipetas serológicas estériles de 25 mL, 10 mL y 5 mL (Becton Dickinson, Francia)
- Pipetas de Pasteur estériles desechables de 3 mL.
- Cámara de conteo celular con 10 gradillas (Kova Hycor Biomedical Inc. California USA)
- Tubos de polipropileno con fondo cónico Falcon de 15 mL para centrifuga (Becton Dickinson, Francia)
- Placas de siembra de 96 pocillos Nunclon TM surface (Nunc Brad Products. Nalge Nunc International Dinamarca)
- Criotubos de 1,8 mL (Nunc Internacional Dinamarca)
- Tubos eppendorf de 1,8 mL (Daslab Nirco, s.a)
- Tubos eppendorf de 0,5 mL (CMB bioline)
- Tubos eppendorf de 0,2 mL (CMB bioline)
- Portaobjetos (Menzel GMBH +Co KG, Alemania)
- Cubreobjetos (Menzel GMBH +Co KG, Alemania)
- Tubos de polipropileno de 1,5 mL para centrifuga (Becton Dickinson, Francia)
- Papel de filtro (Auxilab, S.L., España)
- Frasco Lavador (Nalgene, U.S.A)

3.2. Material consumible

- Medios de cultivo RPMI 1640 y D-MEM (GIBCO, Barcelona, España)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corp., Madison, USA)

- L-glutamina 2 mM (GIBCO, Barcelona, España)
- Estreptomina / Penicilina (GIBCO, Barcelona, España)
- Heppes buffer 10 mM (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, USA)
- Azul tripan (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Dimetil sulfoxido DMSO (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- Tripsina EDTA (tripsina 0,05% y 0,02% EDTA sin Ca^{2+} y Mg^{2+}) (GIBCO, Barcelona, España)
- Suero fisiológico (GIBCO, Barcelona, España)
- PBS (GIBCO, Barcelona, España)
- Agua destilada en monodosis (Fraserius Kabi España)
- Suero bovino fetal SBF (GIBCO, Barcelona, España)
- Alcohol (Instrumentación técnico analítica S.L., España)

3.3. Material inventariable

- Cabina de flujo laminar vertical HeraGuard Mod.HPH9 (SORVALL_Heraeus U.S.A)
- Baño de agua 2-6 L: (SORVALL_Heraeus, U.S.A)
- Congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ REVCO LEGACITM Refrigeration system Asheville North Carolina USA
- Contenedor de Nitrógeno Líquido Dewars 196, CD-90, 33Lts carga automática (Carbuos metálicos Barcelona España)
- Frigorífico-congelador ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) Superser Ecologic
- Incubadora para T° de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y CO_2 a 5% Termo-Forma Hepa filter
- Microscopio invertido (Olimpus CKX41 Optical España, S.A.)
- Microscopio óptico NIKON AFX-DX
- Vortex (Gene 2 Scientific Industries, U.S.A)
- Micropipetas Pipetman de 10, 100 y 200 μL (Gilson Medical Electronics, Francia)
- Lector de placa TECAN (Spectra classic, Barcelona, España)
- Espectrofotómetro DU 640 Beckman
- Gradilla de acero inoxidable (Marienfield, Alemania)

- Cronometro digital (Digital timer, China)
- Ordenador / Impresora
- Análisis estadístico

3.4. Material biológico

Para realizar el presente estudio se han usado las siguientes líneas celulares humanas:

3.4.1. COLO 858

- Casa comercial: ICLC Interlab Línea Celular Collection – CBA – Genova
- Morfología:
- Medio de cultivo: 87% RPMI 1640 + 10% Suero bovino fetal (SBF) + 1% heppes buffer (PBS) + 1% penicilina (PEN-STRP) + 1% L-glutamina.
- Subcultivo: se subcultiva cada 5 días usando tripsina/EDTA
- Incubación: a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂.
- Tiempo de duplicación celular: 48 horas
- Medio de congelación: 70% de medio celular + 20% de suero bovino fetal (SBF) + 10% de DMSO

3.4.2. MEL HO

- Casa comercial: DSMZ – Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen
- Morfología:
- Medio de cultivo: 87% RPMI 1640 + 10% Suero bovino fetal (SBF) + 1% heppes buffer (PBS) + 1% penicilina (PEN-STRP) + 1% L-glutamina.
- Subcultivo: se subcultiva cada 5 días usando tripsina/EDTA
- Incubación: a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂.
- Tiempo de duplicación celular: 24 horas
- Medio de congelación: 70% de medio celular + 20% de suero bovino fetal (SBF) + 10% de DMSO

3.5. Material farmacológico

3.5.1. CP 96.345

$C_{28}H_{32}N_2O$: Sigma Aldrich, Madrid, España.

Vial de 10 mg, es un antagonista de los RNK-1 con PM 412,57 gramos/mol, polvo de aspecto blanco soluble en DMSO a 20 mM.

Ver en anexo 1 y anexo 2 la ficha técnica y la hoja de seguridad, respectivamente.

3.5.2. [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP

$C_{79}H_{109}N_{19}O_{12}$: Sigma Aldrich, Madrid, España.

Vial de 1 mg, es un antagonista de los RNK-1 con PM 1.515mg/mol, polvo de aspecto blanco soluble al 50% en agua bidestilada.

Ver en anexo 3 y anexo 4 la ficha técnica y la hoja de seguridad, respectivamente.

4. MÉTODO DE OPERACIÓN

Los métodos y formas de operación llevados a cabo se detallan a continuación:

4.1. Normas generales de manipulación en el laboratorio

La manipulación de las células en cultivo es una operación minuciosa que debe seguir unas normas de asepsia muy estrictas para evitar contaminaciones indeseadas.

La operación se realiza dentro de una campana de flujo laminar ascendente, previamente esterilizada con luz ultravioleta, durante al menos 30 minutos antes de cada operación. Durante ese tiempo, permanecen dentro de la campana los materiales de trabajo (pipetas, puntas, gradillas,...) para que también se esterilicen y cumplan con el mantenimiento de asepsia.

Toda manipulación debe llevarse a cabo con guantes y materiales totalmente estériles.

Los medios de cultivo, soluciones y demás material necesario para cultivos celulares deben estar esterilizados y autoclavados.

Las soluciones que se usan para el cultivo y mantenimiento de las líneas celulares, se calientan en un baño a 37°C hasta que adquieren temperatura, antes de entrar en contacto celular.

4.2. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo es específico de cada línea celular y se prepara atendiendo a las indicaciones del fabricante. En este caso, el medio de cultivo es idéntico para ambas líneas y se compone de un 87% RPMI 1640 + 10% Suero bovino fetal (SBF) + 1% heppes buffer (PBS) + 1% penicilina (PEN-STRP) + 1% L-glutamina.

El medio de cultivo se oxida con el paso del tiempo, por ello se prepara en pequeñas cantidades según se vaya necesitando.

Durante el estudio realizado, se prepararon 100 mL de medio de cultivo en cada ocasión y los pasos fueron los siguientes:

- 1) Se calientan las soluciones a 37°C en el baño, hasta que adquieran temperatura.
- 2) Se coge un bote de cristal de 100 mL aforado, previamente esterilizado y autoclavado.
- 3) Se lleva todo el material a la campana de trabajo, y se añaden los compuestos en orden de mayor a menor volumen (así evitamos pérdidas por posibles salpicaduras):
 - a. 87 mL de RPMI 1640
 - b. 10 mL de SBF
 - c. 1 mL PBS
 - d. 1 mL PEN-STRP
 - e. 1 mL L-Glutamina
- 4) El medio se guarda a baja temperatura en el frigorífico.

4.3.Descongelación celular

La descongelación celular es una operación que debe realizarse de forma rápida y cuidadosa, prestando atención para evitar posibles contaminaciones. Los pasos son los siguientes:

- 1) Se coloca el criotubo que contiene las células en una gradilla al baño maría a unos 37°C hasta notar la descongelación. Es importante no dejar excesivo tiempo, pues las células se pueden dañar, por lo que es necesario estar vigilando la operación de forma continua. Se debe evitar el contacto del tapón con el agua del baño para evitar contaminación.
- 2) Una vez descongelado, se baña el criotubo en etanol, para desinfectarlo y se lleva a la campana de flujo laminar para extraer las células, mediante pipeteo, y depositarlas en un tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente se le añaden 2 mL de su medio de cultivo y se resuspende la solución.

- 3) Se lleva el tubo Falcon a la centrifugadora durante 5 minutos a 1000 r.p.m. (revoluciones por minuto). Este tiempo es necesario para que se forme el pellet celular en la parte inferior del tubo.
- 4) Una vez formado el pellet celular, se lleva el tubo a la campana. Se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta, evitando arrastrar el pellet conseguido, y se añaden 2 mL de medio. Se resuspende y se elimina el pellet celular hasta conseguir una solución homogénea. Esta operación debe llevarse a cabo sin producir un exceso de burbujas.
- 5) Conseguida la solución homogénea se procede al cultivo de la misma. Para ello se preparan frascos de cultivo de 25cm² con 7 mL de medio rotulados con el nombre de la cadena celular a cultivar y la fecha. Después de añadir el medio se añade la solución celular y se lleva el frasco a la incubadora a 37°C y 5% de CO₂.
- 6) A partir de las 24 horas de la siembra, observar al microscopio el desarrollo y crecimiento celular (las células crecen adheridas al sustrato del fondo del frasco).

4.4.Mantenimiento celular

El mantenimiento celular se realiza entre 2 y 3 veces por semana, atendiendo a las necesidades del crecimiento de la cadena celular. Dentro de la operación de mantenimiento celular se pueden dar tres situaciones diferentes: cambio de medio de cultivo, necesidad de subcultivar o congelación celular.

La diferencia entre la necesidad de cambio de medio de cultivo o subcultivar se denota por la abundancia de población celular en el frasco de cultivo. La congelación celular se realiza para mantener las características originales de la línea celular y merece un punto a parte para su explicación.

Para conocer si hay que realizar un cambio de medio o es necesario subcultivar, hay que llevar el frasco de cultivo al microscopio: si el cultivo celular no cubre todo el fondo del frasco (quedan zonas del sustrato sin cubrir), se realiza un cambio de medio; si por el contrario, el cultivo cubre todo el fondo del frasco (no se observan huecos y las células comienzan a crecer muy pegadas y amontonadas, es decir, el cultivo está confluyente) se procede a subcultivar las células.

4.4.1. Cambio de medio de cultivo

Se realiza cuando el medio se observa deteriorado (cambio de color respecto al original) y el cultivo no está confluyente. Para ello se extrae el medio con ayuda de una pipeta, sin tocar el fondo donde crecen las células, y se añaden 7 mL de medio nuevo a 37°C.

4.4.2. Subcultivar

Se realiza cuando el cultivo está confluyente y para ello es necesario tripsinizar.

- 1) Se añaden 2 mL de tripsina EDTA al 0'05% y 0'02% EDTa sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , y se deja actuar durante 5 minutos. Este tiempo es necesario para romper los enlaces que unen las células al sustrato. En ocasiones es necesario realizar movimientos bruscos para ayudar a finalizar la operación.
- 2) Una vez despegadas las células del sustrato, se añaden 2 mL de medio de cultivo para neutralizar la acción de la tripsina. Se homogeniza la solución se le lleva a un tubo Falcom de 15 mL, mediante pipeteo, para proceder a la formación del pellet celular mediante centrifugación durante 5 minutos a 1000 r.p.m.
- 3) Una vez que se obtiene el pellet celular, se elimina el sobrenadante y se añaden 2 mL de medio, homogeneizando la solución y sin formar burbujas.
- 4) Se coge un frasco de cultivo de 25cm², se rotula con el nombre de la cadena celular a subcultivar y la fecha y se añaden 7 mL de medio de cultivo. Después de añadir el medio se añaden 300 µL de solución celular y se lleva el frasco a la incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

4.5. Congelación celular

La congelación celular se lleva a cabo para preservar las características originales de la línea celular, así como para la obtención de reservas ante cualquier incidencia como, por ejemplo, la contaminación de los cultivos.

Esta operación debe realizarse atendiendo a las indicaciones del fabricante, en este caso, ambas líneas requieren de una solución de idéntica composición: 70% de medio de

cultivo + 20% de suero fetal bovino + 10% DMSO. (El DMSO actúa como agente crioprotector).

Para realizar la congelación de la línea se opera de la siguiente manera:

- 1) Se prepara 1 mL de medio de congelación formado por: 700 μ L de medio de cultivo + 200 μ L de FBS + 100 μ L de DMSO.
- 2) Se prepara el criotubo con el nombre de la cadena celular y la fecha.
- 3) Una vez se obtiene el pellet de células tras tripsinizar y centrifugar el falcom de 15 mL durante 5 minutos a 1000 r.p.m. se elimina el sobrenadante y se añaden 1 mL de medio de congelación. Se resuspende rápidamente hasta homogeneizar el pellet celular y se lleva al criotubo.
- 4) Se procede a una bajada progresiva de temperatura del criotubo que contiene las células: primero se mantiene unas horas en el congelador, posteriormente se pasa a -80°C y para finalizar se almacena en nitrógeno líquido a -196°C .

4.6. Preparación de los antagonistas

La preparación de los fármacos se realiza atendiendo a la ficha técnica del mismo.

4.6.1. CP-96.345

El antagonista de los receptores NK-1, el CP-96.345 es soluble en DMSO a 20 mM.

De manera que se añaden 1212 μ L de DMSO en el los 10mg de CP-96.345 quedando una concentración de $19'998 \text{ mM} \approx 20 \text{ mM}$.

El fármaco se alícuota en dosis de 10 μ L para evitar su excesiva manipulación y posible contaminación.

Las alícuotas son congeladas y serán usadas de forma individual.

Cuando es necesario usar la alícuota para realizar el ensayo de proliferación, es necesario disminuir su concentración, de forma que nos permita llevar a cabo el estudio con volúmenes manejables. La dilución se realiza hasta los 200 μ M: se toman 990 μ L de medio y se le añaden los 10 μ L de la alícuota concentrada.

Para determinar la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) y al 100% (IC₁₀₀), se evaluaron diferentes concentraciones del antagonista.

4.6.2. [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP

El antagonista de los receptores NK-1, el [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP es soluble al 50% en agua bidestilada.

De manera que se añaden 2 mL de agua bidestilada en el 1mg de nombre quedando una concentración de 329'634μM.

El fármaco se alícuota en dosis de 100 μL para evitar su excesiva manipulación y posible contaminación.

Las alícuotas son congeladas y serán usadas de forma individual.

Cuando es necesario usar la alícuota para realizar el ensayo de proliferación, es necesario disminuir su concentración, de forma que nos permita llevar a cabo el estudio con volúmenes manejables. La dilución se realiza hasta los 200μM: se toman 64'8 μL de medio y se le añaden los 100 μL de la alícuota concentrada.

Para determinar la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) y al 100% (IC₁₀₀), se evaluaron diferentes concentraciones del antagonista.

4.7. Ensayo de proliferación

El ensayo de proliferación celular se realiza para llevar a cabo el estudio de la efectividad de los fármacos. Es un ensayo colorimétrico, en el cual mediante la lectura de la absorbancia se determina, de forma directamente proporcional, la población celular viva del cultivo.

El ensayo se realiza de forma individual, aleatoria y por duplicado, es decir, sólo se realiza un ensayo cada vez que se tripsiniza el cultivo, para asegurar la aleatoriedad del mismo; se realiza por duplicado para poder hacer una estimación media de los resultados, cada experimento se realiza dos veces.

Este ensayo se realiza en diferentes pasos, los cuales se detallan a continuación.

4.7.1. Contaje celular

El contaje celular se lleva a cabo por que es necesario conocer la población sembrada en cada pocillo individual, para que todos los pocillos de estudio tengan la misma población y se pueda realizar una comparación entre ellos. En cada pocillo se siembran 10.000 células.

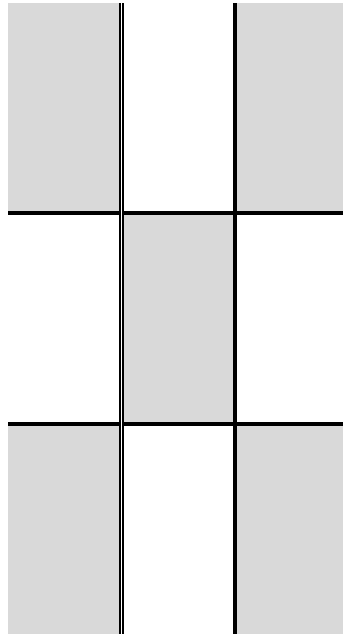
Para la realización del ensayo, es preciso que la cadena celular haya mantenido al menos una duplicación en el frasco de cultivo, es decir, el tiempo necesario mínimo que debe transcurrir entre dos subcultivos debe de ser superior al tiempo de duplicación de la cadena celular a estudiar.

Para proceder al contaje celular, es necesario tripsinizar el cultivo, para romper los enlaces de las células y el sustrato, y posteriormente se centrifuga en un tubo falcom durante 5 minutos a 1000 r.p.m. Pasado el tiempo es necesario añadir el doble de medio que la cantidad de tripsina añadida, para neutralizar el efecto de ésta y resuspender el pellet formado.

La forma de realizar el contaje puede llevarse a cabo de dos formas diferentes:

1) Placa de contaje

- a. Se prepara un eppendorf de 2 mL que contenga: 250 μ L de suero, 35 μ L de azul tripam y se resuspende todo bien.
(El azul tripam es un preparado comercial que da color y facilita el contaje: si la célula está viva absorbe el azul tripam, lo metaboliza y lo expulsa, quedando la célula incolora; si la célula está muerta, absorbe el azul tripam y que queda teñida de azul)
- b. Se toman 15 μ L de la suspensión celular y se añaden al eppendorf, agitando bien la mezcla, sin formar burbujas.
- c. De la solución de 300 μ L se toman 9 μ L y se añaden, cuidadosamente, a la placa que contaje celular que se lleva al microscopio.
- d. En el microscopio, se observa una cuadrícula de 9X9 cuadrados, divididos en grupos de 3X3, como se muestra a continuación. De los cuales se cuentan las células vivas de los cuadrados de las esquinas y el central, como se muestra en las casillas sombreadas.



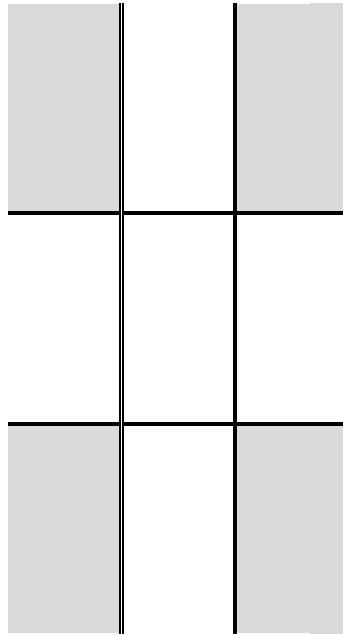
e. Para conseguir 10.000 células se realiza el siguiente cálculo:

$$n^{\circ} \text{ células contadas} \cdot 40 = x \text{ células}/\mu\text{L}$$

$$\mu\text{L de suspensión con 10.000 células} = 10.000/x = \mu\text{L}$$

2) Cristal de conteo

- Se prepara un eppendorf de 2 mL que contenga: 30 μL de azul tripam.
- Se toman 30 μL de la suspensión celular y se añaden al eppendorf, agitando bien la mezcla, sin formar burbujas.
- De la solución de 60 μL se toman 10 μL y se añaden, cuidadosamente, al cristal de conteo celular y se lleva al microscopio.
- Es necesario que el cristal de conteo celular esté limpio y bien cerrado, para evitar contaminaciones o pérdidas de solución.
- En el microscopio, se observa una cuadrícula de 9X9 cuadrados, divididos en grupos de 3X3, como se muestra a continuación. De los cuales se cuentan las células vivas de los cuadrados de las esquinas, como se muestra en las casillas sombreadas.



f. Para conseguir 10.000 células se realiza el siguiente cálculo:

$$n^{\circ} \text{ células contadas} \cdot \frac{2}{4} = x \cdot 10^4 \text{ células}/_{mL} = x \cdot 10 \text{ células}/_{\mu L}$$

$$\mu L \text{ de suspensión con } 10.000 \text{ células} = \frac{10.000}{x \cdot 10} = \mu L$$

4.7.2. Cálculo de las concentraciones a estudiar

Conocida la concentración de la alícuota de trabajo inicial, en este caso 200 μM , se realizan los cálculos correspondientes a las concentraciones finales requeridas en el pocillo de estudio, mediante la fórmula:

$$\text{Concentración}_{\text{alícuota}} \cdot \text{Volumen}_{\text{alícuota}} = \text{Concentración}_{\text{pocillo}} \cdot \text{Volumen}_{\text{pocillo}}$$

4.7.3. Diseño del experimento

Una vez que se conocen los volúmenes a añadir de solución celular y de fármaco en cada pocillo, se realiza el diseño del experimento, calculando el volumen a añadir en cada pocillo de cada solución, teniendo en cuenta que el volumen máximo es de 100 μL .

El experimento se realiza de la siguiente forma:

- 1) Blanco: sólo se añade medio de cultivo.
Es necesario para eliminar la absorción debida al medio.
- 2) Control: se añade medio de cultivo y solución celular.
Es necesario para comprobar que no ha habido ninguna contaminación externa que haya podido afectar a las células.
- 3) Experimento 1, 2, 3,...: se añade medio de cultivo, la solución celular y el fármaco a estudiar, siempre aumentando la concentración.

Al finalizar el diseño se obtiene una tabla como la siguiente, en la que se detalla la cantidad a añadir de: solución celular, medio de cultivo y fármaco.

	SC (μ L)	Fármaco (μ L)	Medio (μ L)
B	-	-	100
C	X	-	100 - X
1	X	C1	100 - X - C1
2	X	C2	100 - X - C2
3	X	C3	100 - X - C3
4	X	C4	100 - X - C4
...	X	C...	100 - X - C...

Tabla 4. Diseño del experimento

4.7.4. Preparación de las placas del ensayo

Antes de realizar el experimento es necesario hacer unas operaciones previas, a fin de que todo se haga de forma eficiente y siguiendo las normas de asepsia y de manipulación necesarias:

- 1) Separar en un eppendorf una cantidad suficiente de solución celular para realizar el experimento, ya que al ser necesario pipetear continuamente, se evitan contaminaciones a todo el cultivo.
- 2) Separar en un tubo Falcom una cantidad de medio de cultivo necesaria para realizar el experimento, por el mismo motivo anterior: no pipetear

continuamente desde la solución inicial, evitando así posibles contaminaciones.

- 3) Preparar la solución farmacológica, si es necesario hace alguna dilución.
- 4) Nombrar la placa de ensayo.
 - a. En la tapa debe aparecer:
 - *El nombre del cultivo
 - *Día y hora en la que se realiza el experimento
 - *Día y hora en la que se espera leer el experimento
 - *Pocillos marcados en los que se va a realizar el experimento, siempre por duplicado (de forma paralela, uno encima de otro) y dejando una fila exterior libre, para evitar posibles evaporaciones.
 - b. En el interior, en los bordes, se han de marcar los pocillos en los que se va a realizar el experimento, de forma que a la hora de realizarlo no exista confusión.

4.7.5. Realización del ensayo

El orden y cuidados seguidos en la realización de los ensayos se detallan a continuación:

- 1) Se añade la solución celular correspondiente en cada pocillo. Evitando la creación de pompas y logrando que toda la solución quede en el fondo del pocillo, pero sin tocarlo con la punta de la pipeta.
Al estar la placa libre de otras soluciones, no es necesario cambiar de punta en cada ocasión, a menos que se comiencen a crear pompas indeseadas.
- 2) Se añade el medio de cultivo en los pocillos del experimento. Es muy importante cambiar de punta siempre y prestar especial atención al pocillo individual de cada caso.
- 3) Se añade el fármaco. En esta ocasión también es muy importante cambiar de punta y prestar especial atención a la operación.
- 4) Se rellenan los pocillos libres dejados en el perímetro del experimento con 100 μ L de medio para evitar evaporaciones.
- 5) Se tapa el experimento y se rotula la fecha y hora en la que será leído. Esta fecha es la correspondiente al tiempo de duplicación de la línea en estudio.

- 6) Se lleva la placa del experimento a incubadora a 37° de temperatura y en una atmosfera al 5% de CO₂ durante el periodo de duplicación celular correspondiente.

4.7.6. Medida de la absorbancia y cálculo de la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) y al 100% (IC₁₀₀)

Pasado el tiempo de duplicación de la línea del ensayo es necesario hacer una medida de la proliferación celular. Para ello se ha de añadir al experimento una solución especial que permita realizar la colorimetría del experimento y realizar una medida de la absorbancia.

Para ello se añaden 20 µL de CellTiter 96 a cada pocillo del experimento y se deja actuar durante 90 minutos antes de leer los resultados.

La lectura se realiza en un lector de placas multiscaner a 492 nm, siendo el resultado una medida de la densidad óptica directamente proporcional al número de células vivas.

Para determinar las concentraciones inhibitorias al 50% y al 100% de los antagonistas, se usa la fórmula de la ecuación de la recta, que se obtiene con la recta de regresión de los puntos conocidos y validados del experimento (mediante Microsoft Excel) procedentes de la absorbancia obtenida para cada concentración, usando el método de los mínimos cuadrados donde:

- 1) Conocido Y: concentraciones usadas
- 2) Conocido X: absorbancias obtenidas

La función tendencia devuelve el valor Y (concentración de antagonista) correspondiente al que queremos extrapolar mediante la recta de regresión $Y=mX+b$.

4.8. Análisis estadístico de los resultados

Los datos se expresan como media \pm SD. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics v.19 para Microsoft Windows.

La homogeneidad de la varianza se ensayó usando el test de Levene. Si las varianzas eran homogéneas, los datos se analizaron mediante el uso de la prueba de ANOVA de una vía con la corrección de Bonferroni's para comparaciones múltiples. Para las no homogéneas se usa el test estadístico de T3 Dunnet.

Como nivel de significancia se toma la $p \leq 0,05$ ó $p \leq 0,01$ y se usa la desviación típica para determinar el error interno de los datos.

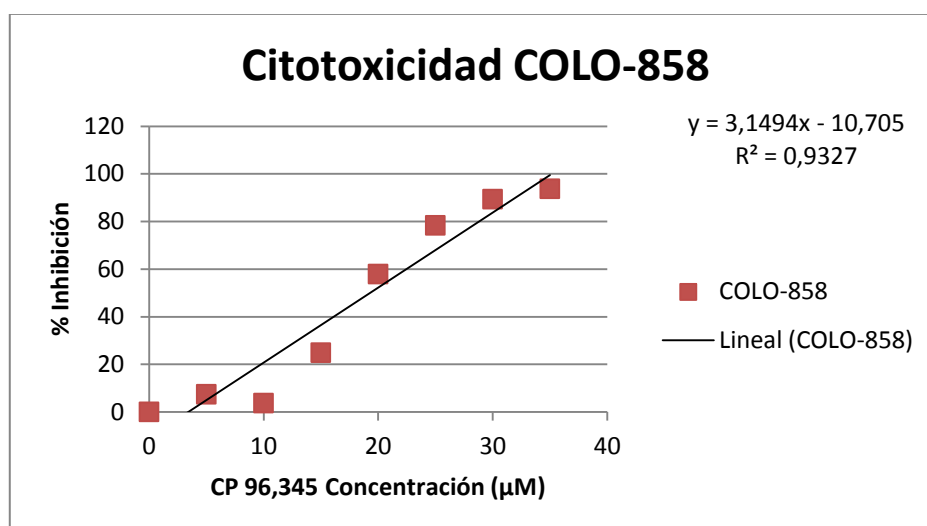
5. RESULTADOS

5.1. Mantenimiento y cultivo de las líneas celulares

Las líneas celulares se cultivan con sus medios de crecimiento para su duplicación y mantenimiento, atendiendo a las normas del fabricante, previamente a la realización de los experimentos.

5.2. Inhibición de CP-96.345 sobre las líneas COLO 858 y MEL H0

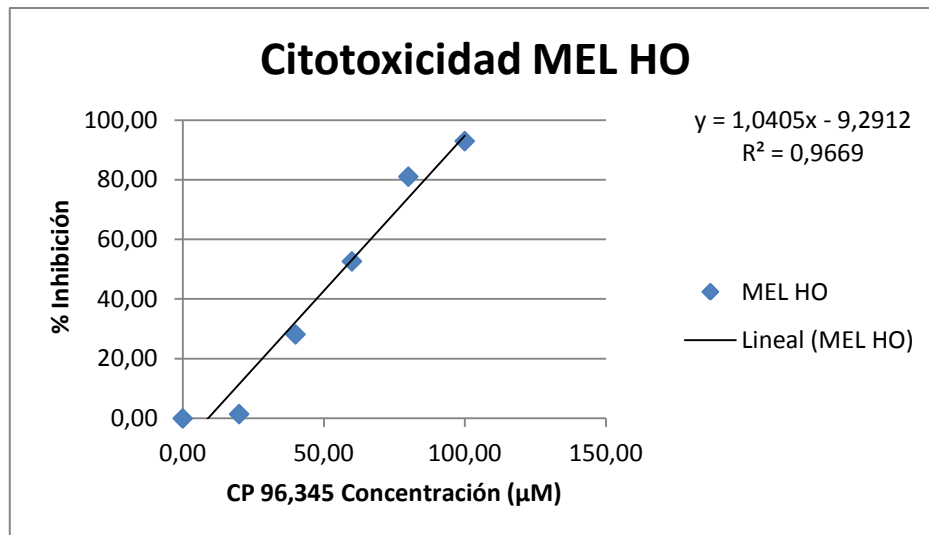
La inhibición del crecimiento celular de las líneas de melanomas por el antagonista CP-96,345 se observan en las figuras siguientes.



Gráfica 1. Citotoxicidad de COLO-858 con CP-96.345

CP 96.345 vs	Concentración (μM)	0	5	10	15	20	25	30	35
COLO-858	% Inhibición	0,00	7,40	3,70	24,87	57,89	78,35	89,36	93,71

Tabla 5. Resultados de citotoxicidad de COLO-858 con CP-96.345



Gráfica 2. Citotoxicidad de MEL HO con CP-96.345

CP 96.345 vs	Concentración (μM)	0	20	40	60	80	100
MEL HO	% Inhibición	0,00	1,46	28,18	52,67	81,09	92,99

Tabla 6. Resultados de citotoxicidad de MEL HO con CP-96.345

Se puede apreciar una dependencia lineal al aumentar la concentración citotóxica aplicada en el estudio: a mayor concentración, mayor poder de inhibición (mayor reducción de la densidad óptica en el pocillo medido).

Se comprueba que el ajuste lineal por mínimos cuadrados de los resultados es bastante bueno, dado que ambos poseen un coeficiente de correlación lineal cercano a la unidad, $R^2 > 0,9$.

Del análisis estadístico se comprueba que los experimentos pertenecen a grupos independientes, existe homogeneidad de las varianzas (Test de Levene) y que el nivel de significancia es $p \leq 0,05$ ó $p \leq 0,01$. (Ver anexo 5 y anexo 6)

Este antagonista, CP-96.345, presenta una dosis de IC_{50} diferente para cada línea, siendo de $19,28\mu M$ para la línea celular COLO-858 y de $56,98\mu M$ para la línea MEL HO. La máxima inhibición, es decir, la IC_{100} se consigue $35,15\mu M$ y $105,04\mu M$ respectivamente.

CP 96,345

COLO-858		MEL HO	
IC 50	19,28	IC 50	56,98
IC 100	35,15	IC 100	105,04

Tabla 7. IC₅₀ e IC₁₀₀ del antagonista CP-96.345 en las líneas COLO 858 y MEL HO

5.3. Inhibición de [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP sobre las líneas COLO 858 y MEL HO

La inhibición del crecimiento celular de las líneas de melanomas por el antagonista artificial de la SP se observan a continuación de forma gráfica.

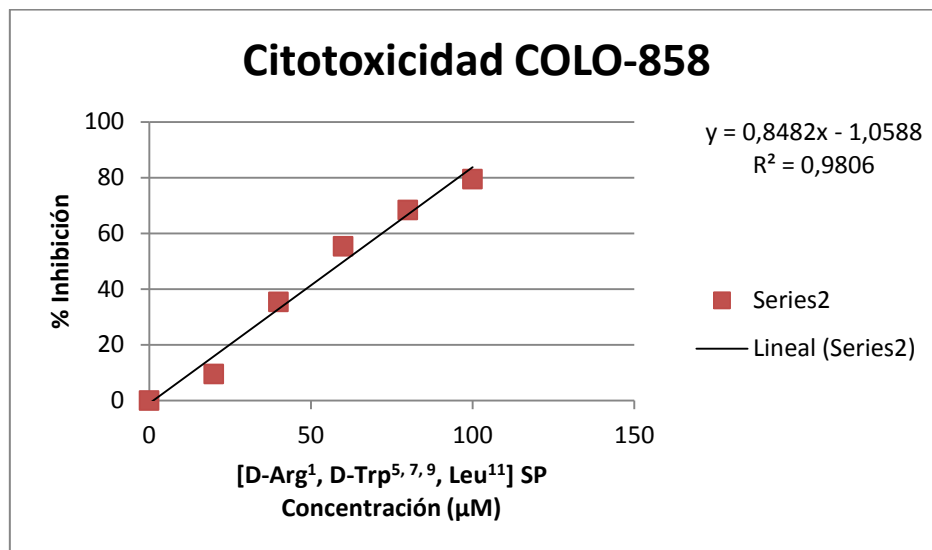
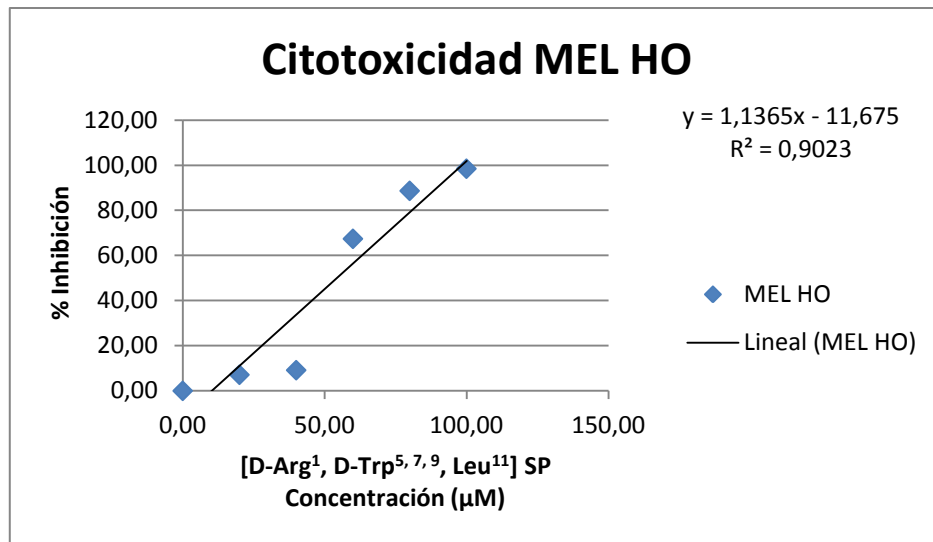


Gráfico 3. Citotoxicidad de COLO-858 con [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP

(D-Arg ¹ , D-Trp ^{5,7,9} , Leu ¹¹) SP vs COLO-858	Concentración (μM)	0	20	40	60	80	100
	% Inhibición	0,00	9,53	35,40	55,35	68,37	79,45

Tabla 8. Resultados de citotoxicidad de COLO-858 con [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP



Gráfica 4. Citotoxicidad de MEL HO con [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP

(D-Arg ¹ , D-Trp ^{5,7,9} , Leu ¹¹) SP vs MEL-HO	Concentración (μM)	0	20	40	60	80	100
	% Inhibición	0,00	7,12	9,15	67,42	88,69	98,52

Tabla 9. Resultados de citotoxicidad de MEL HO con [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP

Al igual que el caso del antagonista anteriormente estudiado, se puede apreciar una dependencia lineal al aumentar la concentración citotóxica aplicada en el estudio: a mayor concentración, mayor poder de inhibición (mayor reducción de la densidad óptica en el pocillo medido).

Se comprueba que el ajuste lineal por mínimos cuadrados de los resultados es bastante bueno, dado que ambos poseen un coeficiente de correlación lineal cercano a la unidad, $R^2 > 0,9$.

Del análisis estadístico se comprueba que los experimentos pertenecen a grupos independientes, existe homogeneidad de las varianzas (Test de Levene) y que el nivel de significancia es $p \leq 0,05$ ó $p \leq 0,01$. (Ver anexo 7 y anexo 8).

Este antagonista, [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP, presenta una dosis de IC₅₀ diferente para cada línea, siendo de 60,20μM para la línea celular COLO-858 y de 56,81μM para la línea MEL HO. La máxima inhibición, es decir, la IC₁₀₀ se consigue 119,15μM y 94,94μM respectivamente.

[D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP

COLO-858		MEL HO	
IC 50	60,20	IC 50	56,81
IC 100	119,15	IC 100	94,94

Tabla 10. IC₅₀ e IC₁₀₀ del antagonista [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP en las líneas COLO 858 y MEL HO

Todos los resultados se obtuvieron mediante la ecuación de la recta dada por los puntos correspondientes a la concentración de antagonista frente a la densidad óptica medida, observándose una disminución de ésta a medida que aumenta la concentración aplicada.

5.4. Imágenes

A continuación, se muestran imágenes de las placas de ensayo:

- Imagen A: muestra una placa de ensayo de proliferación terminada; se puede apreciar los pocillos de estudio nombrados y la placa rotulada con la fecha de realización y la fecha de lectura del ensayo.
- Imagen B: muestra una placa de ensayo con el CellTiter añadido en los pocillos de estudio.
- Imagen C y D: muestran la placa de ensayo trascurrido 90 minutos. Tiempo necesario para que las células vivas metabolicen el CellTiter.

Se aprecia que a menor inhibición los pocillos poseen mayor densidad óptica, lo que indica que las células han metabolizado y expulsado todo el CellTiter. Mientras que a mayor inhibición, los pocillos mantienen el color anterior, es decir, no existen células vivas.

Imagen A

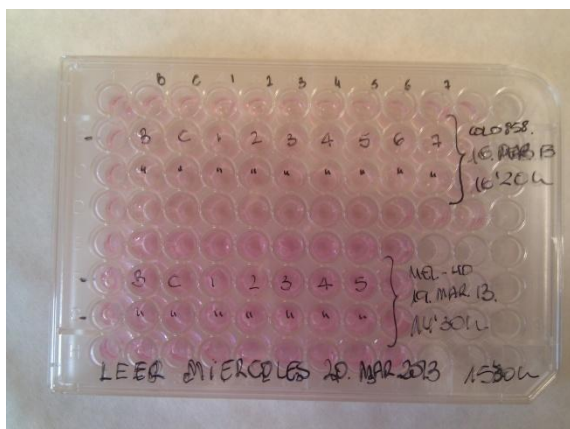


Imagen B

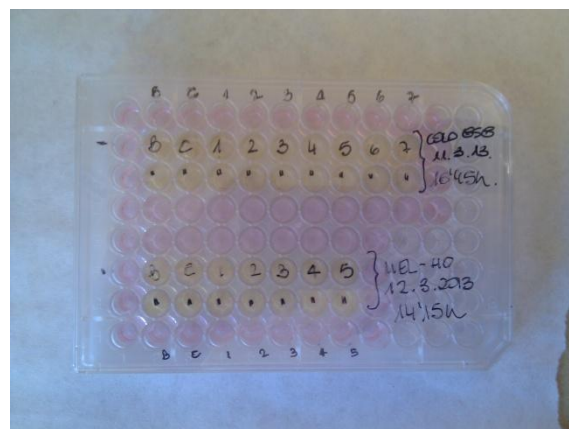


Imagen C



Imagen D

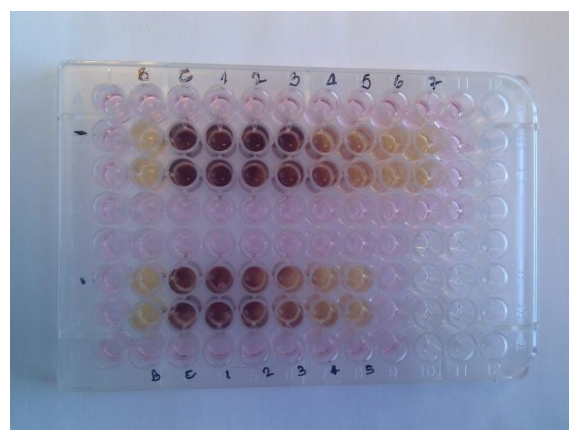


Figura 12. Imágenes de las placas de ensayo de proliferación.

6. COMPARACIÓN CON OTROS FÁRMACOS

La investigación de la inhibición de proliferación de las líneas celulares de melanoma mediante los antagonistas del receptor NK-1, ha sido objeto de estudio por el grupo de Doctor Miguel Muñoz. Es por ello que se puede realizar una comparación con los resultados obtenidos por el grupo con otros antagonistas como son L-732.138, L-733.060 y MK-869 (Aprepitant).

6.1. Descripción de los antagonistas

6.1.1. L-732.138

De entre los antagonistas no peptídicos altamente selectivos y específicos para los receptores NK-1 humanos con estructuras químicas heterogéneas, el L-733,060 ($C_{20}H_{19}F_6NO$), es un antagonista de los receptores NK-1 potente y de acción prolongada con alta afinidad para receptores humanos con una IC_{50} in vitro de 0,87 nM (Harrison T et al. 1995), peso molecular 403,36, y presenta una buena difusión en el SNC.

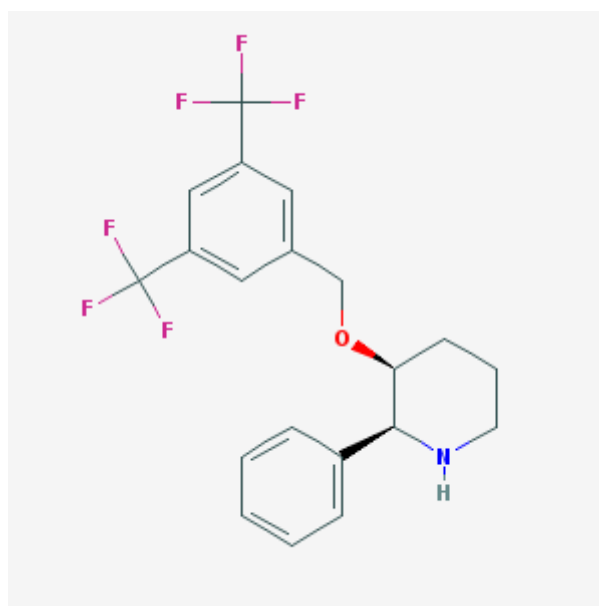


Figura 13. Estructura molecular del antagonista del RNK-1: L-733,060

Se han elaborado arios estudios preclínicos para confirmar la capacidad de L-733,060 de antagonizar los efectos de la SP vía especifica del RNK-1, como demuestran los primeros estudios de Rupniak NM et al. 1996 en el que administrando el intravenoso L-733,060 a gerbos, lograba controlar la fase de pataleo inducida farmacológicamente por la administración de análogos de la SP, consiguiendo controlar así el dolor, bloqueando específicamente los receptores para la SP. Kramer M et al.

(1998) utilizó esta molécula junto a otros antagonistas no peptídicos como MK 869 en estudio in vivo para el tratamiento de la ansiedad y depresión en animales de experimentación.

Bang R et al. (2003) han demostrado que el L-733,060 puede ser un buen antiinflamatorio y protector hepático bloqueando los RNK-1 reduciendo así la inflamación, edema, infiltración neutrófila, la apoptosis y necrosis del hepatocito en un modelo de inflamación hepática en ratón.

La SP vía de los RNK-1 es uno de los mediadores de los efectos psicoestimulantes de cocaína y anfetaminas (Loonam TM et al. 2003), y responsable en parte de la degeneración de las terminaciones dopaminérgicas nigroestriatales secundaria al consumo de estas drogas. L-733,060 ha sido una de las moléculas empleadas en el estudio experimental en ratones que confirmó el papel de la SP y su RNK-1 en la lesión degenerativa en el área nigroestriada inducida por metanfetamina, la cual aumenta los niveles de SP en el estriado, (Yu J et al. 2002). Estos hallazgos abren nuevas vías terapéuticas a enfermedades degenerativas como la Enfermedad de Huntington y el Parkinson, y un nuevo aspecto a considerar en la terapia frente a la adicción a drogas.

En el año 2004 se utilizó el L-733,060 para inhibir la migración de las células de carcinoma de mama (Lang K et al. 2004).

Por último, recientemente ha sido descrito que el L-733,060 actúa como un agente antitumoral en líneas celulares tumorales humanas de melanomas, gliomas, neuroblastomas y retinoblastomas (Muñoz M et al. 2004a, b; 2005a, b; 2010a) así como carcinoma de páncreas (Muñoz et al. 2006a), carcinoma de laringe (Muñoz et al. 2008), y carcinoma gastrointestinal (Rosso et al. 2008) y en leucemias linfoblásticas (Muñoz et al. 2010 (DOI 10.1007/s10637-010-9594-0)). Además de producir inhibición de las células tumorales, concentración dependiente, producen muerte celular vía apoptosis.

6.1.2. L-733.060

El antagonista de receptor NK-1 no peptídico, L-732,138 demuestra un antagonismo competitivo y selectivo para dicho receptor. Es 1000 veces más potente en el receptor NK-1 humano clonado que receptores NK-2, NK-3, y aproximadamente 200 veces más

potente en RNK-1 humano que de rata (MacLeod AM et al. 1994). Se conoce que la administración de este antagonista produce atenuación de hiperalgesia (Cahill CM and Coderre TJ 2002) e incluso es capaz de antagonizar la permeabilidad vascular inducida por H3 antagonista usado para bloquear la acción de la histamina en receptores H3 .

El L-732,138 como agente antitumoral, se conoce a través de estudios científicos a nivel mundial, los más reciente son: en retinoblastoma (Muñoz et al. 2007b), carcinoma de laringe (Muñoz et al. 2008) y en varias líneas de neuroblastoma (Muñoz et al. 2006, 2007a).

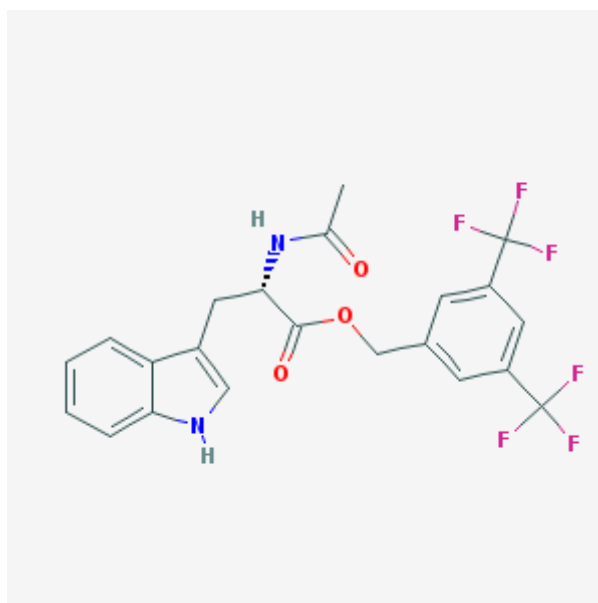


Figura 14. Estructura molecular del antagonista del RNK-1: L-732,138

6.1.3. MK- 869 (Aprepitant)

MK-869, denominado comercialmente: Aprepitant, se compone de un núcleo morfolina con dos sustituyentes unidos a carbonos adyacentes del anillo. Estos grupos son sustituto trifluorometil fenil etanol y el grupo fluorofenil. Es un sólido cristalino blanco, con peso molecular de 534,43, insoluble en agua, moderadamente soluble en etanol y ligeramente soluble en acetonitrilo. Es el único antagonista de receptores NK-1 aceptado por la FDA para uso humano, como antiemético, principalmente frente a vómitos inducido por la quimioterapia. Presenta otros efectos terapéuticos como antidepressivo, para tratar el dolor, migraña,... y sin embargo, en ensayos in Vitro se ha demostrado que este fármaco, también tiene efectos antitumoral; se ha estudiado en

muchos tipos de cáncer: glioma, neuroblastoma, carcinoma de páncreas, de laringe, gástrico, de colon (Muñoz et al 2009); en melanoma y en leucemias (Muñoz et al. 2010 a, 2010 (DOI 10.1007/s10637-010-9594-0)).

Al igual que los antagonistas de los receptores NK-1 anteriormente descritos, produce inhibición de las células tumorales concentración dependiente y muerte celular vía apoptosis (concentración de la cromatina y fragmentación nuclear) (Muñoz et al. 2010 a).

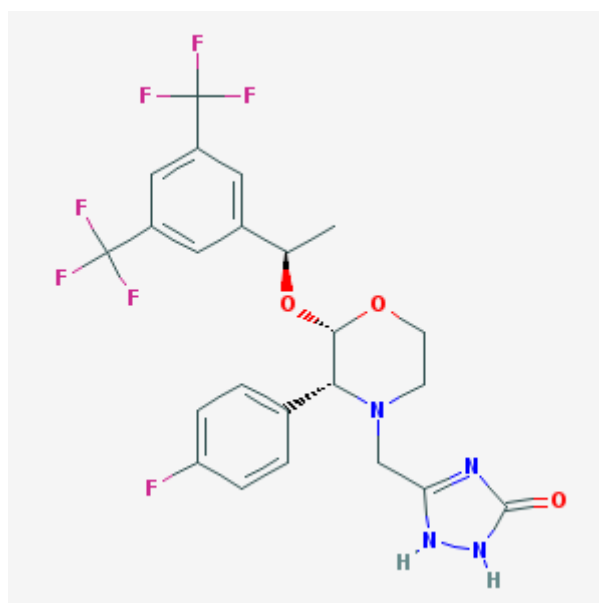


Figura 15. Estructura molecular del antagonista del RNK-1: Aprepitant

Aprepitant está conjugado en más del 95% con proteínas plasmáticas. El volumen aparente de distribución a concentración estable es 70 L aproximadamente en el ser humano. Atraviesa la placenta en ratas y conejos y cruza la barrera hematoencefálica en el hombre.

Existe otro compuesto denominado Fosaprepitant. El principio activo de Ivemend®, el fosaprepitant, es un «profármaco» del aprepitant. Esto significa que se convierte en aprepitant una vez se encuentra en el cuerpo. Por lo tanto puede ser un antagonista de los receptores NK-1, impidiendo que sustancia se asocie a los receptores de NK-1, evitando que se produzcan las náuseas y los vómitos que se presentan con frecuencia durante la quimioterapia y después de ella.

Ante estos datos, parece que los antagonistas de los receptores NK-1 pueden jugar un papel importante y prometedor en el tratamiento antineoplásico junto con el resto de

efectos terapéuticos de los mismos, mejorando por tanto la calidad de vida del ser humano ante cualquiera de estas enfermedades.

6.2. Resultados obtenidos

Los resultados de los estudios de los antagonistas anteriores con las líneas celulares de melanomas humanos han sido publicados en diversos artículos.

La acción antitumoral del L-732.138 provoca la inhibición del crecimiento celular de manera dependiente de la concentración en las células de melanoma estudiado. La acción antitumoral específica del L-732.138 se produjo a través del receptor NK-1. (Muñoz M, Rosso M, González-Ortega A, Coveñas R., 2010). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

L-732.138			
COLO-858		MEL HO	
IC 50	44,6	IC 50	76,3
IC 100	97,6	IC 100	140,6

Tabla 11. Concentraciones de inhibición de L-732.128 para COLO-858 y MEL HO

El estudio de la capacidad inhibidora del antagonista del receptor NK-1 L-733.060, fue objeto de estudio en las líneas celulares COLO 858 y MEL HO. Se comprobó, una vez más, que la inhibición del crecimiento celular es dependiente de la concentración (Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R., 2004).

L-733.060			
COLO-858		MEL HO	
IC 50	8,7	IC 50	27,3
IC 100	17,5	IC 100	54

Tabla 12. Concentraciones de inhibición de L-733.060 para COLO-858 y MEL HO

El estudio del tratamiento de las líneas celulares tumorales COLO-858 y MEL HO con Aprepitant resultó dependiente de la concentración, a mayor dosis mayor inhibición

de la proliferación celular (Muñoz M, Rosso M, Robles-Frías MJ, Salinas-Martín MV, Coveñas R, 2010). Los resultados de IC₅₀ e IC₁₀₀ se muestran a continuación:

Aprepitant			
COLO-858		MEL HO	
IC 50	24,3	IC 50	29,6
IC 100	52,1	IC 100	56,5

Tabla 13. Concentraciones de inhibición de Aprepitant para COLO-858 y MEL HO

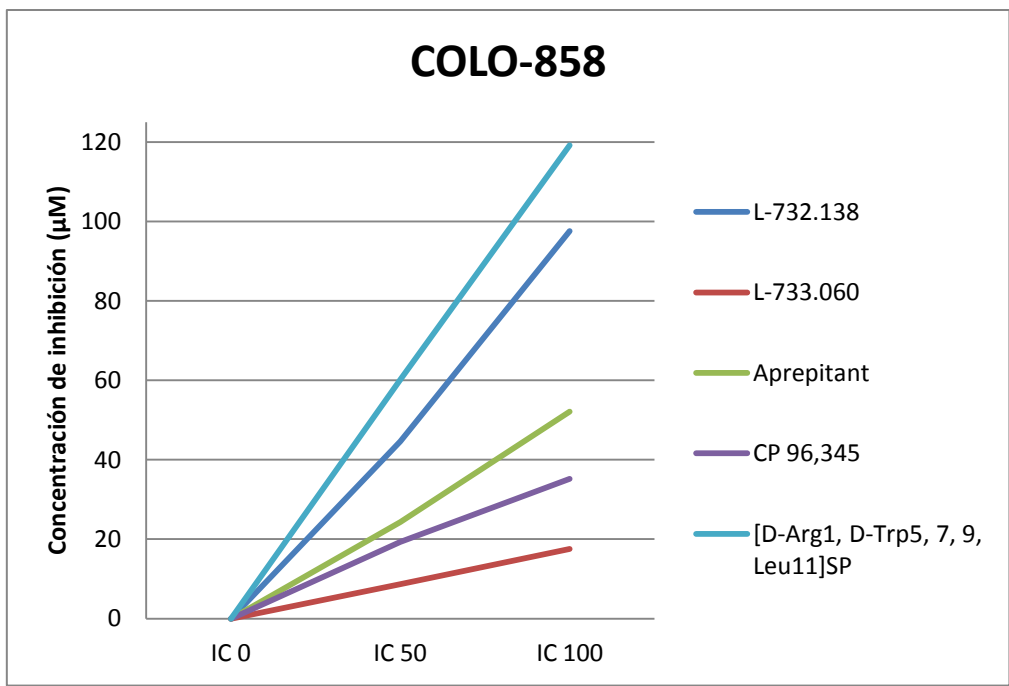
6.3. Comparación de los resultados

6.3.1. COLO-858

Los resultados de los experimentos de citotoxicidad con la línea celular COLO-858 se muestran a continuación. Se puede destacar que todos los antagonistas inhiben el crecimiento celular en concentraciones del mismo orden de magnitud, lo que hace pensar que la teoría de que actúan bloqueando los receptores NK-1 es cierta.

COLO-858	L-732.138	L-733.060	Aprepitant	CP-96,345	[D-Arg ¹ , D-Trp ^{5,7,9} , Leu ¹¹]SP
IC 0	0	0	0	0	0
IC 50	44,6	8,7	24,3	19,28	60,2
IC 100	97,6	17,5	52,1	35,15	119,15

Tabla 14. Resultados de citotoxicidad de COLO 858 con diferentes antagonistas de los receptores NK-1



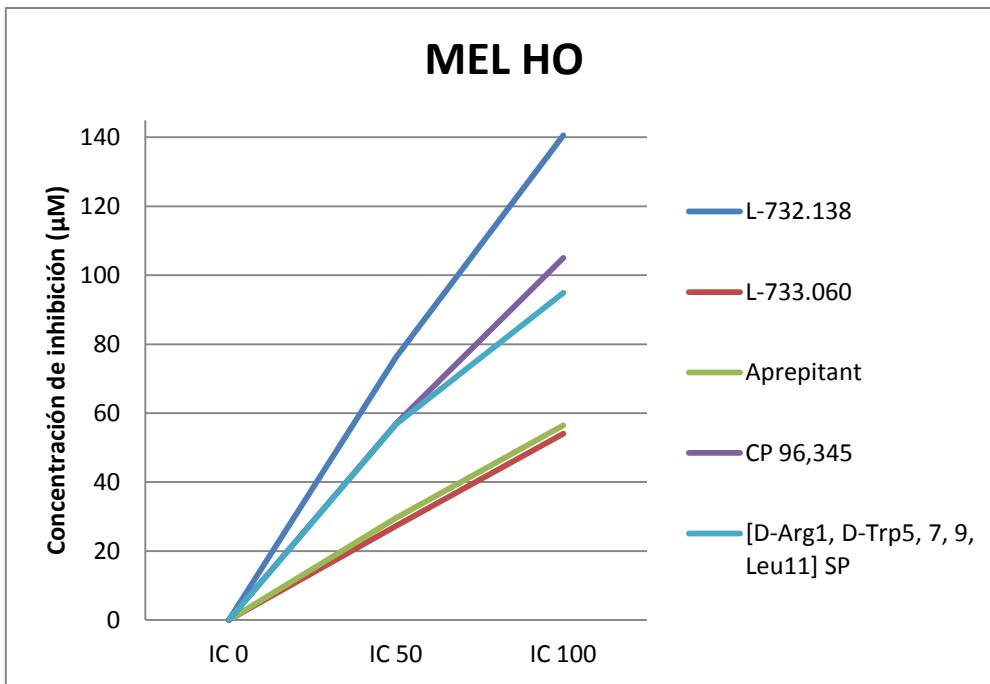
Gráfica 5. Resultados de citotoxicidad de COLO 858 con diferentes antagonistas de los receptores NK-1

6.3.2. MEL HO

De igual modo que en el caso anterior, se representan los resultados de los diferentes antagonistas estudiados.

MEL HO	L-732.138	L-733.060	Aprepitant	CP-96,345	[D-Arg ¹ , D-Trp ^{5,7,9} , Leu ¹¹]SP
IC 0	0	0	0	0	0
IC 50	76,3	27,3	29,6	56,98	56,81
IC 100	140,6	54	56,5	105,04	94,94

Tabla 15. Resultados de citotoxicidad de MEL HO con diferentes antagonistas de los receptores NK-1



Gráfica 6. Resultados de citotoxicidad de MEL HO con diferentes antagonistas de los receptores NK-1

7. DISCUSIÓN

En este estudio se ha demostrado la acción antitumoral de dos antagonistas del receptor NK-1 (el CP-96.345 y [el D-Arg¹, D-Trp^{5, 7, 9}, Leu¹¹] SP) en las líneas de melanoma humano COLO-858 y MEL-HO.

Se ha realizado una inhibición *in vitro* con resultado positivo de ambos fármacos, es decir, se ha demostrado que la muerte celular observada en este estudio se debió a un efecto tóxico específico de ambos fármacos, anteriormente citados, y no a una acción inespecífica de los mismos.

Se ha informado que las líneas celulares de melanoma estudiadas expresan varias isoformas del receptor NK-1 (Muñoz et al. Lab invest 2010). El equipo del Doctor Miguel Muñoz ha demostrado que las células de melanoma sobreexpresan el receptor NK-1 frente a las células normales, lo cual fue comprobado mediante el método de la interferencia con el método RNAm sobre el receptor NK-1, método de detección de la proteína del receptor y se ha demostrado que el receptor NK-1 es fundamental para la viabilidad de las células de melanoma. También se ha demostrado que la activación de los receptores NK-1 por SP induce la mitogénesis en varios tipos de células de cáncer (Luo W, Sharif TR, Sharif M, 1996, y Palma C, Nardelli F et al, 1999), es más, es conocido que la SP a concentraciones nanomolares produce proliferación de las diferentes líneas de melanoma (estudio realizado por el equipo del Doctor Miguel Muñoz) y que la SP se expresa en melanomas invasivos primarios y melanomas metastásicos (Khare VK, Albino AP, Reed JA, 1998). Estos datos sugieren que los receptores NK-1 y la SP podrían desempeñar un papel importante en la investigación contra el melanoma y en el desarrollo de metástasis.

La inhibición del crecimiento de las líneas celulares de melanoma humano observado después del tratamiento con los antagonistas receptor NK-1, CP 96-345 y [D-Arg¹, D-Trp^{5, 7, 9}, Leu¹¹] SP, sugieren que hay un bloqueo del receptor de NK-1 por estos antagonistas y que este bloqueo inhibe tanto la síntesis de ADN como la proliferación celular a través de la proteína quinasa activada por mitógenos vía (MAPK) (Luo W, Sharif TR, Sharif M, 1996). Además, como ya se ha comentado, el efecto inhibitor del crecimiento células de melanoma por los antagonistas del receptor NK-1 no es debido

a un efecto tóxico inespecífico del compuesto sino a la unión específica del antagonista a los receptores NK-1.

La actividad antitumoral de los fármacos es dependiente de la dosis. Se observó toxicidad máxima a los $35'15\mu\text{M}$ de CP-96,345 para COLO 858 y $105'04\mu\text{M}$ para MEL HO. Por otro lado, el [D-Arg¹, D-Trp^{5, 7, 9}, Leu¹¹] SP presentó toxicidad máxima a los $119'15\mu\text{M}$ para COLO 858 y $94'94\mu\text{M}$ para MEL HO. Es posible que estas diferencias entre líneas estén relacionadas con el número de receptores NK-1 que expresan lo que puede estar relacionado con la etapa de la progresión del tumor y la agresividad del mismo. (COLO 858 se obtiene de un nodo linfático y MEL HO a partir de células tumorales primarias).

Los fármacos usados, CP-96.345 y [D-Arg¹, D-Trp^{5, 7, 9}, Leu¹¹] SP, poseen características químicas muy diferentes: el primero es antagonista no peptídico lipófilo, mientras que [D-Arg¹, D-Trp^{5, 7, 9}, Leu¹¹] SP es un antagonista peptídico hidrófilo (hidrosoluble). Lo que hace pensar que no es la composición química sino la estructura tridimensional del fármaco (estereoquímica) y su afinidad por el receptor lo que provoca el bloqueo del receptor NK-1 y consecuentemente bloquea las funciones fisiopatológicas de la SP en el caso de los melanomas que producen mitogénesis.

Los datos mencionados anteriormente sugieren que el tratamiento con antagonistas del receptor NK-1 en líneas celulares de cáncer que expresan SP podría tener un efecto contra el cáncer. Son necesarios más estudios para saber más sobre los mecanismos por los que los antagonistas de los receptores de taquiquinina producen la inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer.

Los antagonistas de los receptores NK-1 abren un horizonte de esperanza al tratamiento específico y efectivo del melanoma humano.

8. CONCLUSIONES

Se describe por primera vez la actividad antitumoral de los antagonistas de los receptores NK-1 CP-96.345 y [D-Arg1, D-Trp5, 7, 9, Leu11) SP en las líneas de melanoma COLO 858 y MEL HO.

La actividad antitumoral de los mismos es dosis o concentración dependiente. Es decir a mayor concentración mayor actividad antitumoral. A ciertas concentraciones se inhibe el 100 % del crecimiento de las líneas celulares de melanoma.

La actividad antitumoral de los antagonistas de los receptores NK-1 en líneas celulares de melanoma, no está relacionada con la composición química. Dicha actividad antitumoral está relacionada con la estructura tridimensional (estereoquímica), es decir con la forma de la molécula y derivado de la misma por la afinidad del receptor.

La actividad antitumoral de los antagonistas de los receptores NK-1 se puede ejercer en dos lugares distintos del receptor según sean la naturaleza de los antagonistas, los peptídicos se unen en el lugar hidrófilo, es decir en un lugar similar a la SP y sin embargo los no peptídicos que son liposolubles se unen entre los dominios 2-7 del receptor transmembrana.

Este estudio sugiere que el receptor NK-1 podría ser una nueva y prometedora diana en el tratamiento de los melanomas y que los antagonistas del receptor NK-1 pueden ser nuevos y prometedores compuestos en el tratamiento del melanoma. Por último, debido a que dicho receptor se sobreexpresa en las líneas celulares de melanoma esto le conferiría especial selectividad sobre las células de melanoma y no sobre las células normales. Este hecho es crucial en la búsqueda de nuevos fármacos contra el cáncer, ya que los citostáticos (fármacos clásicos para el tratamiento del cáncer) carecen de esa selectividad. Así el posible tratamiento de los melanomas con este tipo de compuesto carecería de los efectos secundarios deletéreos de los citostáticos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Allen JM, Hoyle NR, Yeats JC, Ghatei MA, Thomas DG and Bloom SR. Neuropeptides in neurological tumours. *J. Neuro-Oncol* 1985; 3:197-202.
2. Bang R, Sass G, Kiemer AK, Vollmar AM, Neuhuber WL, Tiegs G. Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305:31-39.
3. Betancur C, Azzi M, Rostene W. Non peptide antagonists of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. *Trends Physiol Sci* 1997; 18:372-386.
4. Bigioni M, Benzo A, Irrissuto C, Maggi CA, Goso C. Role of NK-1 and NK-2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs* 2005; 16:1083-1809.
5. Bruce S. Sachais, R. Michael Snider, John A. Lowe, and James E. Krause. Molecular Basis for the Species Selectivity of the Substance P Antagonist CP-96,345.
6. Buck SH, Burcher E. The tachykinins: a family of peptides with a brood of receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1986; 7:65-68.
7. Cahill CM. and Coderre TJ. Attenuation of hiperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. *Pain* 2002; 95: 277-285.
8. Chang MM and Leeman SE. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as Substance P. *J Biol Chem* 1970; 245:4784-90.
9. Eistetter HR, Mills A, Brewster R, Alouani S, Rambosson C, Kawashima E. Functional characterization of neurokinin-1 receptors on human U373MG astrocytoma cells. *Glia* 1992; 6:89-95.
10. Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Trends Neuroscience* 1981; 4:267-269.
11. Flageole H, Senterman M, Trudel JM. Substance P increases in vitro lymphokine-activated-killer (LAK) cell cytotoxicity against fresh colorectal cancer cells. *J Surg Res* 1992; 53: 445-449
12. Fowler CJ, Brannstrom, G. Substance P enhances forskolin-stimulated cyclic AMP production in human UC11MG astrocytoma cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1994; 16:21-28.

13. Friess H, Zhu Z, Liard V, et al. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 2003; 83:731-742.
14. Gerard NP, Garraway LA, Eddy RL Jr, Shows TB, Iijima H, Paquet JL, Gerard C Human Substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry* 1991; 30:10640-10646.
15. Gether U, Johansen TE, Snider RM, Lowe AJ, Nakanishi S, Schwartz TW. Different binding epitope for Substance P and the non-peptide antagonist, CP 96,345 on the NK1 receptor. *Nature* 1993; 362:345-348.
16. Giardina GAM., Gagliardi S, and Martinelli M. Antagonists at the neurokinin receptors- Recent patent literature. *Drugs* 2003; 6: 758-772.
17. Grady EF, Garland AM, Gamp PD, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW. Delineation of the endocytic pathway of Substance P and its seven transmembrane domains NK1 receptor. *Mol Biol Cell* 1995; 6:509-524.
18. Harmar AJ, Hyde V, Chapman K. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a four splicing variant of the rat Substance P precursor. *FEBS Lett* 1990; 275: 22-24.
19. Harrison S, Geppetti P. Substance P. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 555-576.
20. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance P receptors in human primary neoplasm: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer* 1995; 61:786-792.
21. Hökfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med* 2001; 249:27-40.
22. Kage R, McGregor GP, Thim L. Neuropeptide- γ . A peptide isolated from rabbit intestine that is derived from γ -Preprotachykinin. *J Neurochem* 1988; 50:1412-17.
23. Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K : a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys Res Commun* 1983 ; 114 : 533-540
24. Kavelaars A, Broeke D, Jeurissen F, Kardux J, Meijer A, Franklin R, Gelfand EW, Heijnen CJ. Activation of human monocytes via a non-neurokinin Substance P receptor that is coupled to G-protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *J Immunol* 1994; 153:3691-99.

25. Kawaguchi Y, Hoshimamura M, Nawa H, Nakanishi S. Sequence analysis of cloned cDNA for rat Substance P precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 139: 1040-46.
26. Khare VK, Albino AP, Reed JA. The neuropeptide/mast cell secretagogue Substance P is expressed in cutaneous melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* 1998; 25:2-10.
27. Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata E. Novel neuropeptides : neurokinin α and β , isolated from porcine spinal cord. *Proc Jpn Acad* 1983; 59 : 101-104.
28. Kramer MS, Cutler N, Feighner J et al. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central Substance P receptors. *Science* 1998; 281:1640-45.
29. Krause JE, Takeda Y, Hershey AD. Structure, functions and mechanisms of Substance P receptor action. *J Invest Dermatol* 1992; 98:2S-7S.
30. Kurtz MM, Wang R, Clements M, Cascieri M, Austin C, Cunningham B, Chicchi G, Liu Q. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. 2002; 296: 205-212.
31. Lang K, Drell TL; Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, Entschladen F. Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer* 2004; 112:231–238
32. Lang S, Sperk G. Neurochemical characterization of preprotachykinin B immunoreactivity in the rat. *Regul Pept* 1995; 57:183-192
33. Langdon S, Sethi T, Richie A, Muir M, Smyth J, Rozengurt E. Broad spectrum neuropeptide antagonists inhibit the growth of small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res* 1992; 52:4554-7.
34. Lee CM, Iversen LL, Hanley MR, Sandberg BEB. The possible existence of multiple receptors for Substance P. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1982; 318:281-287
35. Lefkowitz R.J. The superfamily of heptahelical receptors. *Nature cell Biology* 2000; 2: 133-136.
36. Loonam TM, Noailles PA, Yu J, Zhu JP, Angulo JA. Substance P and cholecystinin regulate neurochemical responses to cocaine and methamphetamine in the striatum. *Life Sci* 2003; 73:727-739.

37. Lotz M, Carson DA, Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 1987; 235:893-895.
38. Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res* 1996; 56:4983-4991.
39. Macdonald SG, Boyd ND. Regulation of Substance P receptor affinity by guanine nucleotide binding proteins. *J Neurochem* 1989; 53: 264-272.
40. MacLeod AM., Merchant KJ, Brookfield F, Kelleher F, Stevenson G, Owens AP, Swain CJ, Cascieri MA, Sadowski S Ber E, Strader CD, Fong TM. Identification L-tryptophan derivatives with potent and selective antagonist activity at the NK-1 receptor. *J Med Chem* 1994; 37: 1269-74.
41. Maggi CA, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Auton Pharmacol* 1993; 13:23-93.
42. Maggio JE. Tachykinins. *Annu Rev Neurosci* 1988; 11:13-28.
43. Martin FC, Charles AC, Sanderson MJ and Merrill JE. Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Research* 1992; 599:13-18.
44. Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S. cDNA cloning of bovine Substance K receptor through oocyte expression system. *Nature* 1987; 329: 836-838
45. Moussaoui SM, Le Prado N, BoniciB, Faucher DC, Cuine F, Ladorun PM, Garret C. Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A Substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience* 1992; 48: 969-978.
46. Muñoz M, Bernabeu-Wittel J, Coveñas R. NK-1 as a melanoma target. *Expert Opin Ther target* 2011; 15:889-97
47. Muñoz M, González-Ortega A, Coveñas R. The NK-1 receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1 receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Invest New Drugs*. 2010 (DOI 10.1007/s10637-010-9594-0)
48. Muñoz M, González-Ortega A, Sánchez-Vaderrábanos E, Ramiro-Fuentes S, Salinas-Martín MV, Carranza A, Coveñas R. Uveal melanoma expresses NK-1

- receptors and cyclosporin A induces apoptosis in human melanoma cell lines overexpressing the NK-1 receptor. *Peptides* 55 (2014) 1-12.
49. Muñoz, M; Pérez, A; Coveñas, R; Rosso, M; Castro E. Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Ital Biol* 2004a; 142:105- 112
 50. Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R. Antitumoural action of NK-1 receptor antagonist L-733,060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 2004b; 14:183-188.
 51. Muñoz M, Rosso M, Aguilar FJ, González-Moles MA, Redondo M, Esteban F. NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract Substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEp-2. *Invest New Drugs* 2008; 26: 111-118
 52. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem* 2010c;17:504-16.
 53. Muñoz M, Rosso M and Coveñas R. Neuropeptides and cancer: focus on Substance P/neurokinin-1 receptor system research. In: *Neuropeptides Research Trends*. Bernice A. Levine (ed.) Nova Science Publishers, New York 2007c; pp. 97-119.
 54. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. NK-1 receptor antagonists as new anti-tumoural agents: action on human neuroblastoma cell lines. In: Fernandes JA, ed. *Focus on Neuroblastoma Research*. New York, NY: Nova Science Publishers; 2007a: 31-56.
 55. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. The NK-1 receptor is involved in the antitumoral action of L-733,060 and in the mitogenic action of Substance P on human pancreatic cancer cell lines. *Lett. Drug Des. Discov.*, 2006a; 3: 323-329.
 56. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R, Montero I, González-Moles MA, Robles MJ. Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: antitumor action of its antagonists, L-732,138. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007b; 48: 2775-81
 57. Muñoz M, Rosso M, González-Ortega A, Coveñas R. The NK-1 receptor antagonist L.732,138 induces apoptosis and counteract Substance P- relate mitogenesis in humas melanoma cell lines. *Cancers* 2010; 2:611-23
 58. Muñoz M, Rosso M, Perez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarriego C and Piruat. The NK-1 receptor is involved in the antitumoral action of L-733,060 and the
-

- mitogenic action of Substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides* 2005a; 39:427-432.
59. Muñoz M, Rosso M, Perez A, Covenas R, Rosso R, Zamarriego C, Soult JA, Montero I. Antitumoral action of the neurokinin-1-receptor antagonist L-733,060 and mitogenic action of Substance P on human retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005b; 46:2567-70.
60. Muñoz M, Rosso M, Robles-Frias MJ, Salinas-Martín MV, Rosso R, González-Ortega A, Coveñas R. The NK-1 receptor is expressed in human melanoma and is involved in the antitumor action of the NK-1 receptor antagonist aprepitant on melanoma cell lines. *Lab Invest.* 2010a; 90:1259-69.
61. Muñoz M, Rosso M, Soult JA and Coveñas R. Antitumoural action of neurokinin-1 receptor antagonists on human brain cancer cell lines. In: *Brain Cancer Therapy and Surgical Interventions*, Yang AV (ed.). New York, Nova Science Publishers; 2006b; pp. 45-75.
62. Nakanishi S. Mammalian tachykinin receptors. *Annu Rev Neuroscience* 1991; 14:123-136.
63. Nakanishi S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations and regulation. *Physiol Rev* 1987; 67:1117-42.
64. Nawa H, Doteuchi M, Igano K, Inouye K, Nakanishi S. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from Substance P in its pharmacological profile. *Life Sci* 1984; 34: 1153-60.
65. Nawa H, Kotani H, Nakanishi S. Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature* 1985; 312: 729-734.
66. Nilsson J, Von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by Substance P and Substance K. *Nature* 1985; 315:61-63.
67. Orosz A, Schrett J, Nagy J, Bartha L, Schön I and Nyéki O. New short chain analogs of a Substance P antagonist inhibit proliferation of human small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 1995; 60:82-87.
68. Ozo D, Segura JJ, Jimenez-Rubio A, García-Pergañeda A, Bettahi I, Guerrero JM, Calvo JR. Identification of G-protein coupled receptor subunits in normal human dental pulp. *J Endod* 2000; 26:16-19.
69. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:1652-63.

70. Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, Lowry PJ. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 2003; 100:6245-50.
71. Palma C, Bigioni M, Irrissuto C. Anti-tumour activity of tachykinin NK-1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer* 2000; 82:480-487.
72. Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA. Substance P activates responses correlated with tumor growth in human glioma cells line bearing tachykinin NK-1 receptors. *Br J Cancer* 1999; 79:236-243.
73. Patacchini R, Lecci A, Holzer P, Maggi CA. New discovered tachykinins raise new questions about their Peripherals roles and the tachykinin nomenclature. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 1-3.
74. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ. Specific stimulation of human T lymphocytes by Substance P. *J Immunol* 1983; 131:1613-15.
75. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Reviews. The Amer Soc Pham Exp Therap* 1983; 35:85-141.
76. Pintado CO, Pinto FM, Pennefather JN, Hidalgo A, Baamonde A, Sánchez T, Candenas ML, A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Bio reprod.* 2003; 69, 940.
77. Pinto FM, Almeida TA, Hernández M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol* 2004; 494:223-239.
78. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK-1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides* 1997; 31:537-563.
79. Reeve JG, Bleehen NM. [D-Arg¹, D-Trp^{5, 7, 9}, Leu¹¹] SP induces apoptosis in lung cancer cell lines in vitro. *Biochem Bioph Res Com* 1994; 199:1313-19.
80. Regoli D, Boudon A, Fauchere J. Receptors and antagonists for Substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 1994; 46:551-599.
81. Regoli D, Drapeau G, Dion S, D'Orleans-Juste P. Receptors for Substance P and related neurokinins. *Pharmacology* 1989; 38:1-15.
82. Rollandy I, Dreux C, Imhoff V, Rossignol B. Importance of the presence of the N-terminal tripeptide of Substance P for the stimulation of phosphatidylinositol

- metabolism in rat parotid gland: a possible activation of phospholipases C and D. *Neuropeptides* 1989; 13: 175-185.
83. Rosso M, Robles-Frias MJ, Coveñas R, Salinas-Martín MV, Muñoz M. The NK-1 receptor is involved in the antitumor action of L-733,060 and in the mitogenic action of Substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumor Biol.* 2008
84. Rozengurt E, Sinnott-Smith J. Bombesin stimulation of DNA synthesis and cell division in cultures of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80:2936-40.
85. Rupniak NM, Carlson E, Boyce S, Webb JK, Hill RG. Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK-1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils. *Pain* 1996; 67:189-195.
86. Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T. Pharmacological blockade or genetic deletion of Substance P (NK-1) receptors attenuates neonatal vocalization in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacol* 2000; 39:1413-21.
87. Seckl MJ, Higgins T, Wildmer F, Rozengurt E. [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP: A novel potent inhibitor of signal transduction and growth in vitro and in vivo in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57:51-4.
88. Sharif TR, Luo W, Houghron PJ, Sharif M. Substance K peptide induces mitogenesis by activating the mitogen-activated protein kinase signalling pathway through the Substance P receptor (NK-1 subtype) in human astrocytoma. *Cell Pharmacol* 1996; 3:441-449.
89. Sitohy B., El Salhy M. Changes in the colonic enteric nervous system in rat with chemically induced colon dysplasia and carcinoma. *Acta Oncol* 2002; 41:543-549.
90. Snider RM, Constantine JW, Lowe IJ et al. A potent nonpeptide antagonist of the Substance P (NK-1) receptor. *Science* 1991; 251:435-437.
91. Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RF. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 101-132
92. Studer RO, Trzeciak H and Lergier W. Isolierung and Aminosäuresequenz von Substanz P aus Pferdedarm. *Helv Chim Acta* 1973; 56:860-866.
93. Tatemoto K, Lundberg JM, Jörnvall H. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Comm* 1985; 128:947-953
-

94. Teichberg VI, Cohen S, Blumbreg S. Distinct classes of Substance P receptors for Substance P. Receptors revealed by a comparison of the activities of Substance P and some of its esgments. *Regul Pept* 1981;1:327-333.
95. Treager GW, Niall HD, Potts JT, Leeman SE and Chang MM. Synthesis of Substance P. *Nature New Biol*, 1971; 232:87-89.
96. Von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor Substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 1931; 72: 74-87.
97. Woll PJ, Rozengurt E. [D-Arg¹, D-Trp^{5, 7, 9}, Leu¹¹] SP, a potent bombesin antagonist in murine Swiss 3T3 cells, inhibits the growth of human small cell lung cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 35:1859-63.
98. Yu J, Cadet JL, Angulo JA. Neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonists abrogate methamphetamine-induced striatal dopaminergic neurotoxicity in the murine brain. *J Neurochem* 2002; 83:613-622.
99. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ, Hina is hematopoietic.specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nature Immunology* 2000; 1:392-397.
100. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA. NK-1 receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol* 1990; 100:11-14.

Otras referencias bibliográficas:

- Estadísticas de cáncer de los Estados Unidos, 2004. *Rev Panam Salud Pública/Pan Am J Public Health* 2004;15:202-203
- SIGN, 2005 The Scottish Intercollegiate Guidelines Network
- NCCN, 2007. The National Comprehensive Cancer Network
- US Preventive Services Task Force. Screening for breast cancer, 2002
- ICSI, 2005 Institute for Clinical Systems Improvement
- Dynamed. Breast cancer, Ebsco industries; 2007
- MacMahon B, Pugh TF. Principios y métodos de Epidemiología. La Prensa Médica Mexicana S.A. de C.V. México. 2ª edición en español 1988. Estudios de cohortes

Direcciones de webs usadas:

- www.scbt.com
- www.aecc.es
- www.ncbi.nlm.nih.gov
- www.tocris.com
- www.sigmaaldrich.com

10. ANEXOS

10.1. Figuras

- * **Figura 1.** Estructuras de las principales Taquicininas en mamíferos.
- * **Figura 2.** Esquema de la estructura de los genes humanos PPT-A, PPT-B y PPT-C. Los exones de cada uno de los genes están expresados por números. Las isoformas del RNAm del gen PPT-A (α , β , γ y δ) y los productos codificados por cada exón están indicados. Se incluye la localización cromosómica de cada gen.
- * **Figura 3.** Estructura de un receptor de la familia de los Receptores acoplados a Proteínas G o de los siete dominios transmembranas. En la parte superior (A) se ilustra una representación de estos receptores, en plano, señalando su topología. En la parte inferior (B), se ilustra una representación del receptor en tres dimensiones, visto desde la cara extracelular y señalando la zona de interacción con la hormona.
- * **Figura 4.** Receptor asociado a Proteína G genérico: 7 dominios transmembrana y 6 bucles.
- * **Figura 6.** Regulación de la Proteína G trimérica. (Figura procedente de Cooper's MARBAN)
- * **Figura 6.** Disposición transmembrana de RNK-1, RNK-2 y RNK-3.
- * **Figura 7.** Imagen tridimensional de la molécula de SP.
- * **Figura 8.** Diferentes sitios de unión en el RNK-1 para la SP y un antagonista no peptídico.
- * **Figura 9.** Mecanismos de acción de la SP
- * **Figura 10.** Estructura molecular del antagonista del RNK-1: CP-96,345
- * **Figura 11.** Estructura molecular de la SP y del antagonista del RNK-1 [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- * **Figura 12.** Imágenes de las placas de ensayo de proliferación.
- * **Figura 13.** Estructura molecular del antagonista del RNK-1: L-733,060
- * **Figura 14.** Estructura molecular del antagonista del RNK-1: L-732,138
- * **Figura 15.** Estructura molecular del antagonista del RNK-1: Aprepitant

10.2. Tablas

- * **Tabla 1.** Estructura de las Taquicininas
- * **Tabla 2.** Receptores de las Neuroquininas y sus ligandos
- * **Tabla 3.** Fases del Melanoma
- * **Tabla 4.** Diseño del experimento
- * **Tabla 5.** Resultados de citotoxicidad de COLO-858 con CP-96.345
- * **Tabla 6.** Resultados de citotoxicidad de MEL HO con CP-96.345
- * **Tabla 7.** IC₅₀ e IC₁₀₀ del antagonista CP-96.345 en las líneas COLO 858 y MEL HO
- * **Tabla 8.** Resultados de citotoxicidad de COLO-858 con [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- * **Tabla 9.** Resultados de citotoxicidad de MEL HO con [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- * **Tabla 10.** IC₅₀ e IC₁₀₀ del antagonista [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP en las líneas COLO 858 y MEL HO
- * **Tabla 11.** Concentraciones de inhibición de L-732.128 para COLO-858 y MEL HO
- * **Tabla 12.** Concentraciones de inhibición de L-733.060 para COLO-858 y MEL HO
- * **Tabla 13.** Concentraciones de inhibición de Aprepitant para COLO-858 y MEL HO
- * **Tabla 15.** Resultados de citotoxicidad de MEL HO con diferentes antagonistas de los receptores NK-1
- * **Tabla 14.** Resultados de citotoxicidad de COLO 858 con diferentes antagonistas de los receptores NK-1

10.3. Gráficas

- * **Gráfica 1.** Citotoxicidad de COLO-858 con CP-96.345
- * **Gráfica 2.** Citotoxicidad de MEL HO con CP-96.345
- * **Gráfica 3.** Citotoxicidad de COLO-858 con [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- * **Gráfica 4.** Citotoxicidad de MEL HO con [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- * **Gráfica 5.** Resultados de citotoxicidad de COLO 858 con diferentes antagonistas de los receptores NK-1
- * **Gráfica 6.** Resultados de citotoxicidad de MEL HO con diferentes antagonistas de los receptores NK-1

10.4. Otros

- * **ANEXO 1:** Ficha técnica de CP-96.345
- * **ANEXO 2:** Hoja de Seguridad de CP-96,345
- * **ANEXO 3:** Ficha técnica de [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- * **ANEXO 4:** Hoja de Seguridad de [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- * **ANEXO 5:** Análisis estadístico del ensayo COLO-858 vs CP-96.345
- * **ANEXO 6:** Análisis estadístico del ensayo MEL HO vs CP-96.345
- * **ANEXO 7:** Análisis estadístico del ensayo COLO-858 vs [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP
- * **ANEXO 8:** Análisis estadístico del ensayo MEL HO vs [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] SP