

Tesis Doctoral

IMPORTANCIA DE LA SUSTANCIA P Y SU RECEPTOR NK-1R EN EL CÁNCER DE TIROIDES



Inmaculada Isorna Retamino

Directores:

Prof. Dr. Miguel Muñoz Sáez

Prof. Dr. Francisco Esteban Ortega

Prof Dr. Juan Solanella Soler

Departamento de Cirugía. Universidad de Sevilla.

*A Miguel Muñoz,
ojalá cumplas pronto tu sueño de curar el cáncer.*

A mi familia,

A Fran,

AGRADECIMIENTOS

Hacer esta tesis ha supuesto un reto profesional y personal en el que, como en muchas ocasiones importantes de la vida, los momentos de dificultad e incertidumbre dan lugar a la aparición de grandes satisfacciones y alegrías. Cuando echo la vista atrás no puedo si no llenarme de gratitud al recordar a todas las personas que me han brindado su ayuda de manera desinteresada, permitiendo que este trabajo haya podido salir adelante. Sé que es imposible resumir en unas pocas líneas lo que siento por cada una de ellas, pero no por ello voy a dejar de intentarlo.

En primer lugar tengo que agradecer el apoyo recibido por mis directores de tesis.

Paciencia, ilusión, entusiasmo, ánimo, empuje y apoyo incansable es lo que he recibido, con gran generosidad, durante muchos meses del doctor Miguel Muñoz. Él que es capaz como nadie de transmitir la ilusión por el conocimiento de lo desconocido y el amor y respeto por la ciencia. Y su sueño, cada día más cerca sin duda, de curar el cáncer ha resultado inspirador. Sin su inestimable guía no habría sido posible escribir esta tesis. Espero sinceramente ver dentro de poco el Premio Nacional de Investigación y el Nobel de Medicina en sus manos.

Han sido fundamentales el apoyo y la ilusión puestos en todo momento por los doctores Francisco Esteban y Juan Solanellas, maestros en el campo de la Otorrinolaringología y modelos a seguir en el ámbito clínico y de la investigación. Me han demostrado una enorme generosidad, siempre con una sonrisa, estando siempre disponibles para esta doctorando.

Cuando pienso en las personas que me han brindado su colaboración, me viene a la mente la ayuda totalmente desinteresada que he recibido del doctor Manuel Limón, jefe del Servicio de Anatomía Patológica del hospital de Mérida por el suministro y gestión de las muestras del biobanco que han hecho posible la realización de esta investigación.

Al doctor Rafael Martínez, jefe del Servicio de Anatomía Patológica del hospital Virgen de Valme, con el que he pasado muchas horas frente al microscopio revisando muestras. Una persona muy generosa. Tendrá mi gratitud por su inestimable ayuda en esta tesis siempre.

Es de justicia reconocer el apoyo que en todo momento he recibido de mis compañeros y amigos: Paco Sánchez, Juan Urbano, Vicente Guillén, María Martínez, Alicia González-Palomino, Rebeca González Hidalgo, Eva Pereira, Andrés Paulino y María Ángeles Herreros siempre me han transmitido la ilusión y el ejemplo por el trabajo bien hecho.

Al doctor David Castro, por compartir sus conocimientos y sus experiencias.

Mostrar mi agradecimiento a Esther Rosso, por su colaboración en el proceso de la inmunohistoquímica y valoración de las muestras.

Gracias de la manera más profunda a mis padres, Rosario y Fernando, a los que debo casi todo lo bueno que me ha pasado en la vida. Son dos excelentes modelos a seguir, que han hecho posible que sea la persona que soy.

A mis hijos, Marina y Elías, que me dan la alegría y las ganas de seguir mejorando en la vida, para ofrecerles lo mejor de mí.

Pero aun teniendo los mejores directores de tesis y la colaboración de cuantos compañeros y amigos me han ayudado, la realización de esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional, la comprensión, la edición, los buenos consejos, el continuo ánimo de la persona con la que tengo la suerte de compartir mi vida. Gracias, Fran.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

AVP: Arginina vasopresina.

BSA: Albúmina de suero bovino.

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico.

CGRP: Proteína relacionada con el gen de la calcitonina.

DAB: 3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato.

DAG: Diacilglicerol.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DTT: Ditiotreitól.

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetracético.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EL: Bucle extracelular.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares.

GABA: Ácido G-aminobutírico.

GDP: Guanosín bifosfato.

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G.

GRB2: Proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento.

GRP: Gastrin-releasing peptide.

GTP: Guanosín trifosfato.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HK1: Hemocinina-1.

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Bucle intracelular.

IP3: Inositol trifosfato.

MAPK: Proteín-cinasas activadas por mitógenos.

NK-1R: Receptor de la Neurokinina 1.

NK-2R: Receptor de la Neurokinina 2.

NK-3R: Receptor de la Neurokinina 3.

NKA: Neurokinina A.

NKB: Neurokinina B.

NPG: Neuropeptido G.

NPK: Neuropeptido K.

PBS: Solución tamponada de fosfato salino.

PIP2: Fosfatidil inositol bifosfato.

PLC: Fosfolipasa C.

PPT: Preprotaquicinina.

PVDF: Membranas de Polifluoruro de Vinilideno.

RT-PCR: Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Inversa.

SBF: Suero bovino fetal.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SHC: SH2-containing domain.

SNC: Sistema nervioso central.

SNP: Sistema nervioso periférico.

SP: Sustancia P.

TGF: Factor de crecimiento transformante.

TM: Región transmembrana.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. TIPOS DE CÁNCER DE TIROIDES.	5
1.1.1. CÁNCERES DIFERENCIADOS.....	5
1.1.2. CÁNCER MEDULAR.....	5
1.1.3. CÁNCER INDIFERENCIADO O ANAPLÁSICO.....	6
1.2. INCIDENCIA Y MORTALIDAD.	7
1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER.	10
1.3.1. EL CÁNCER COMO PROCESO MICROEVOLUTIVO.....	10
1.3.2. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	10
1.3.3. PROTO-ONCOGENES Y GENES SUPRESORES TUMORALES.....	11
1.3.4. FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA CANCEROSA	12
1.3.5. PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	13
1.4. LA SUSTANCIA P.	14
1.5. LAS TAQUICININAS.	18
1.5.1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.5.2. PÉPTIDOS DE LA FAMILIA DE LAS TAQUICININAS.....	19
1.5.3. ESTRUCTURA GENÉTICA.....	20
1.5.4. ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LAS TAQUICININAS.....	21
1.6. NK-1R: RECEPTORES DE LAS TAQUICININAS.	24
1.6.1. TIPOS DE RECEPTORES.....	24
1.6.2 ESTRUCTURA GENÉTICA.....	28
1.6.3. LAS ISOFORMAS DEL NK-1R.....	29
1.7. FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE LA SP Y EL NK-1R.	31
1.8. FUNCIONES DE LAS TAQUICININAS Y SU DISTRIBUCIÓN.	37
1.8.1. EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	37
1.8.1.A. NEOCORTEX.....	37
1.8.1.B. NÚCLEOS CAUDAL Y PUTAMEN.....	37
1.8.1.C. GLOBO PÁLIDO.....	38
1.8.1.D. SUSTANCIA NEGRA	38
1.8.1.E. HIPOCAMPO.....	39
1.8.1.F. NÚCLEOS DE LA ESTRÍA TERMINAL Y AMÍGDALA.....	39
1.8.1.G. EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO.....	40
1.8.1.H. NÚCLEO ESPINAL DEL TRIGÉMINO.....	41
1.8.1.I. NÚCLEO DORSAL DEL VAGO, GANGLIO VAGAL Y GANGLIO GLOsofaríngeo.....	41

1.8.1.J. GANGLIOS AUTÓNOMOS PREGANGLIONARES.....	41
1.8.1.K. NÚCLEOS MOTORES CRANEALES Y NÚCLEOS DE ASTA ANTERIOR DE LA MÉDULA.....	42
1.8.1.L. GLÍA.....	42
1.8.2. LAS TAQUICININAS EN TEJIDOS PERIFÉRICOS.....	42
1.8.2.A. OJO.....	42
1.8.2.B. VÍA AERO-DIGESTIVA SUPERIOR.....	43
1.8.2.C. TRACTO GASTROINTESTINAL.....	45
1.8.2.D. SISTEMA HEPATOBILIAR.....	46
1.8.2.E. PÁNCREAS.....	46
1.8.2.F. APARATO RESPIRATORIO.....	47
1.8.2.G. SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	48
1.8.2.H. SISTEMA UROLÓGICO.....	49
1.8.2.I. ÓRGANOS GENITALES.....	49
1.8.2.J. PLACENTA.....	50
1.8.2.K. SISTEMA ADRENAL.....	52
1.8.2.L. SISTEMA MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	52
1.8.2.M. PIEL.....	53
1.8.3. TAQUICININAS EN LA INFLAMACIÓN Y EL SISTEMA INMUNITARIO.....	53
1.8.3.A. INFLAMACIÓN.....	54
1.8.3.B. SISTEMA INMUNITARIO.....	56
1.8.3.C. CICATRIZACIÓN DE HERIDAS Y FUNCIONES TRÓFICAS.....	59
1.8.4. PAPEL DE LAS NEUROKININAS EN LA NOCICEPCIÓN.....	60
1.9. ANTAGONISTAS DEL NK-1R.....	61
1.9.1. ANTAGONISTAS DEL NK-1R PEPTÍDICOS.....	61
1.9.2. ANTAGONISTAS DEL NK-1R NO PEPTÍDICOS.....	62
1.9.2.A. ANTAGONISTA L-733,060.....	62
1.9.2.B. ANTAGONISTA L-732,138.....	63
1.9.2.C. APREPITANT.....	63
1.10. ANTAGONISTAS DEL NK-1R: APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....	66
1.10.1. TRASTORNOS AFECTIVOS.....	66
1.10.2. EL DOLOR.....	67
1.10.3. INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA.....	68
1.10.4. EMESIS POSTQUIMIOTERAPIA.....	69
1.10.5. SEGURIDAD DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R.....	71
1.11. ACTIVIDAD ONCOGÉNICA DE LA SP Y DEL NK-1R.....	73
1.11.1. ONCOGÉNESIS Y SP-NK-1R.....	73

1.11.1.A. CÁNCER DE MAMA.....	73
1.11.1.B. CÁNCER PANCREÁTICO.....	75
1.11.1.C. LEUCEMIA.....	76
1.11.1.D. CÁNCER DE SNC Y PERIFÉRICO.....	77
1.11.1.E. CÁNCER DE PULMÓN.....	78
1.11.1.F. MELANOMA.....	81
1.11.1.G. RETINOBLASTOMA.....	83
1.11.1.H. OSTEOSARCOMA.....	83
1.11.1.I. HEPATOBLASTOMA.....	85
1.11.2. IMPLICACIÓN DEL COMPLEJO SP/NK-1R EN LA PROGRESIÓN TUMORAL.....	87
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	91
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3.1. MATERIAL FUNGIBLE.....	93
3.2. MATERIAL INVENTARIABLE.....	95
3.3. MATERIAL BIOLÓGICO: ANTICUERPOS Y TEJIDO TIROIDEO.....	96
3.4. MÉTODO DE TRABAJO.....	97
3.4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	97
3.4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	97
3.4.3. MUESTRAS.....	97
3.4.4. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	97
3.5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS E INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA.....	98
3.5.1. REALIZACIÓN DE CORTES Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	98
3.5.2. RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA INDUCIDA POR CALOR.....	98
3.5.3. INHIBICIÓN DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA.....	98
3.5.4. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	98
3.5.5. PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN INSTRUMENTO AUTOSTAINER LINK.....	99
3.5.6. DESHIDRATACIÓN DEL TEJIDO.....	99
3.5.7. MONTAJE.....	99
3.5.8. CONTROL DE CALIDAD.....	100
3.6. VALORACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	101
3.6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	101
IV. RESULTADOS.....	103
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO.....	104
4.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP Y EL NK-1R.....	106
4.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP.....	108
4.3.1. EXPRESIÓN SP EN TUMORES TIROIDEOS.....	108

4.3.1.A. EXPRESIÓN SP EN LOS DIFERENTES TIPOS DE CARCINOMA TIROIDEOS.....	111
4.4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL NK-1R.....	124
4.4.1. TEJIDO TIROIDEO LIBRE DE TUMOR.	124
4.4.2. EXPRESIÓN NK-1R EN TUMORES TIROIDEOS.....	124
4.4.2.A EXPRESIÓN NK-1R EN LOS DIFERENTES TIPOS DE CARCINOMA TIROIDEOS. .	128
V. DISCUSIÓN.....	139
5.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.	142
5.1.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LASP.....	142
5.1.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL NK-1R.....	143
5.2 DISCUSIÓN DE LA ACCIÓN DEL COMPLEJO SP/NK-1R EN EL CANCER DE TIROIDES Y DEL PAPEL DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R EN EL TRATAMIENTO DEL MISMO. .	143
5.2.1 ACTIVIDAD MITOGÉNICA DE LA SP.....	144
5.2.2. ESTIMULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS.....	147
5.2.3 INDUCCIÓN DE METÁSTASIS.....	148
5.2.4 RELACIÓN ENTRE SP, INFLAMACIÓN, DOLOR Y CÁNCER.....	149
5.2.5. RELACIÓN ENTRE, COMPORTAMIENTO EMOCIONAL, SP Y CÁNCER.....	151
5.2.6 POSIBLES USOS CLÍNICOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R EN EL CÁNCER DE TIROIDES.....	152
5.3. INVESTIGACIONES FUTURAS RELACIONADAS CON LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R.	153
VI. CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	157

I. INTRODUCCIÓN

La frecuencia de los tumores de la glándula tiroidea es elevada, del 3 al 5% de todos los tumores, y aumenta proporcionalmente a la edad de la población. En realidad, esta frecuencia es mucho más elevada cuando se consideran los datos ecográficos y de autopsias, lo que subraya el carácter quiescente de muchos nódulos. Se trata de los tumores malignos más comunes de los órganos endocrinos (>92%)¹.

En las últimas 3-4 décadas, su incidencia en todo el mundo ha ido en aumento.

Los cánceres de tiroides incluyen un amplio espectro de tumores con diferente epidemiología, actividad biológica y pronóstico^{2,3}.

El predominio femenino es unánimemente reconocido y es considerado cuatro veces superior a la incidencia en el hombre. Esto está en relación con la influencia de los esteroides sexuales^{3,4}. Sin embargo, en los hombres los tumores son sustancialmente más agresivos^{2,3,5}.

Otros factores parecen ser importantes:

- **Influencias ambientales:** Las diferencias étnicas y los factores dietéticos/ambientales también desempeñan un papel en el desarrollo de carcinoma de tiroides. El organismo humano está expuesto a diversas formas de radiación⁶ incluye la radiación interna de radioisótopos naturales, la radiación externa de La Tierra. La radiación espontánea y la de ambientes volcánicos (prevalencia de basalto), con aumento de las concentraciones de diversos elementos químicos (por ejemplo: B, Fe, Va y ²²²Rn) en el agua potable en zonas como Islandia, Hawái y Sicilia⁷.

La contaminación del medio ambiente por bifenilos policlorados. El aumento de la ingesta de nitratos (de los vegetales verdes y jamón) conduce a un mayor riesgo de carcinoma de tiroides en hombres⁸.

- **Aporte de yodo insuficiente:** Que favorece la aparición de tumores de la glándula tiroidea al provocar una hipersensibilidad a la tirotropina y limitar las posibilidades de síntesis de T₃ (triyodotironina) y de T₄ (tetrayodotironina), lo que causa una elevación de la tirotropina. Muchos países presentan situaciones de carencia yodada relativa⁹.
- **Efecto estimulante de la TSH y otras enfermedades del tiroides:** Otro factor estimulante de cáncer de tiroides es el aumento de los niveles de TSH que conducen a la actividad tiroidea alterada y procesos inmunológicos que conducen a la producción de citoquinas.

Algunas enfermedades tiroideas benignas están asociadas con carcinoma, como la tiroiditis de Hashimoto, que es un factor predisponente para la aparición de carcinomas de tiroides, especialmente a consecuencia de una terapia ineficaz y prolongada^{3,10,11}. La

relación entre la enfermedad de Graves y el carcinoma de tiroides también se ha estudiado, pero sin encontrarse una clara correlación^{11,12}.

- **Impacto genético:** Se conoce la existencia de familias con bocios nodulares o multinodulares particularmente evidente en los gemelos monocigóticos, quienes presentan una concordancia del 70%. Esto está en relación con un trastorno de la hormonogénesis tiroidea, aunque el origen exacto de estas alteraciones no ha sido aún precisado. De la misma manera, se conoce la existencia de formas familiares de cáncer de tiroides, a veces asociadas a otras patologías^{3,12}.
- **Radiaciones ionizantes:** Que favorecen la aparición de tumores de la glándula tiroidea y especialmente de cánceres papilares. Esto ha sido demostrado después de las explosiones atómicas y después de la catástrofe de Chernóbil¹³. La irradiación en los niños y los adolescentes es especialmente peligrosa¹⁴. El tiempo de aparición de un cáncer es muy largo, variando entre 10 y 40 años^{15,16,17}.

El diagnóstico de tumor de la glándula tiroidea se basa principalmente en el examen clínico en una zona fácilmente accesible.

En todos los casos, este examen debe ser seguido de exámenes complementarios y en particular de un análisis de laboratorio. No obstante, los exámenes complementarios generalmente no permiten afirmar la naturaleza benigna o maligna del tumor (nódulo aislado) o de uno de sus componentes (bocio multinodular). Sólo el examen histológico aporta una certeza.

La determinación de tirotrópina constituye el examen de base junto con las determinaciones de T₃ y T₄. La determinación de tirocalcitonina debe solicitarse cuando los elementos clínicos o los antecedentes familiares hacen sospechar un cáncer medular de tiroides.

Dentro de las técnicas de examen morfológico la ecografía y la radiología simple representan los exámenes más simples y menos costosos. La gammagrafía, la tomografía computadorizada y resonancia magnética, no constituyen exámenes de rutina reservándose estas pruebas para casos concretos¹⁸.

La punción-aspiración con aguja fina es sin duda el examen que crea más controversia entre los especialistas. Algunos lo consideran esencial para el diagnóstico y otros estiman que posee muchas desventajas por la dificultad en su interpretación¹⁹.

El examen histológico intraoperatorio es de interés considerable, puesto que determina inmediatamente la decisión de proseguir o no la operación, ya que tiene un alto valor predictivo positivo de malignidad. Y, en caso de respuesta positiva, puede realizarse inmediatamente el

tratamiento quirúrgico necesario. La presencia de microcánceres constituye un elemento importante de riesgo de error en esta prueba.

El diagnóstico se formula generalmente después de la exéresis quirúrgica durante el examen anatomopatológico, pero algunos elementos clínicos pueden sugerir malignidad desde un principio como: el crecimiento rápido del nódulo, la parálisis de una cuerda vocal, la fijación a las estructuras contiguas o la presencia de adenopatías cervicales.

El tratamiento y el pronóstico varían según las formas histológicas, que son fundamentalmente los cánceres diferenciados, el cáncer medular y el carcinoma anaplásico.

1.1. TIPOS DE CÁNCER DE TIROIDES.

1.1.1. CÁNCERES DIFERENCIADOS.

Los cánceres diferenciados de la glándula tiroidea se desarrollan a partir de células foliculares. Son el carcinoma papilar y el folicular:

- El carcinoma papilar representa aproximadamente el 65% de los cánceres tiroideos. Aparece principalmente en adultos jóvenes con una preponderancia femenina de tres a uno. Si bien la afección ganglionar es frecuente, las metástasis son más raras (aproximadamente el 10%). Es un tumor con un muy buen pronóstico y mayor tasa de supervivencia. Más del 85% de los pacientes sobreviven 40 años²⁰.
- El carcinoma folicular es mucho más raro que el carcinoma papilar. Su frecuencia es del 5 al 16%, según las series, y afecta sobre todo a mujeres entre 30 y 40 años. La punción-aspiración no es útil en este caso debido a la dificultad de diferenciar citológicamente los adenomas benignos de los cánceres. Tiene un peor pronóstico que el carcinoma papilar.

El tratamiento es principalmente quirúrgico y requiere un control postoperatorio riguroso. Habitualmente, comporta los elementos siguientes: radioyodo, hormonoterapia sustitutiva e inhibidora y, de forma excepcional, una irradiación externa^{21,22,23,24}.

1.1.2. CÁNCER MEDULAR.

El cáncer medular de tiroides se desarrolla a partir de células C, secretoras de calcitonina, emigradas de la cresta neural.

Representa del 5 al 10% de los cánceres tiroideos. Aparece generalmente en mujeres de mediana edad, ya sea de manera esporádica en el 60 al 70% de los casos o en el marco de formas familiares (30 al 40% de los casos).

El diagnóstico de cáncer medular es generalmente considerado ante un bocio uni o bilateral, acompañado a veces de una diarrea motora y rubor facial.

El diagnóstico puede establecerse a partir del examen histológico con inmunomarcadores tras la exéresis de un nódulo frío. Pero la confirmación se obtiene esencialmente gracias a las determinaciones de los marcadores tumorales:

- La calcitonina es el más específico y el más sensible.
- El antígeno carcinoembrionario no es específico, pero está elevado en el 80% de los casos.

- Otros marcadores tumorales como la calcitonina (PDN 21) o la CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina).

El pronóstico del cáncer medular de la tiroides depende, esencialmente, de la extensión ganglionar y visceral. El tratamiento quirúrgico constituye el acto terapéutico esencial. La cobaltoterapia postoperatoria cervicomedial completa el tratamiento en algunos casos²⁵.

1.1.3. CÁNCER INDIFERENCIADO O ANAPLÁSICO.

Es uno de los cánceres más agresivos, cuyo pronóstico es extremadamente negativo a corto plazo.

Estos tumores son generalmente de tamaño importante y ampliamente invasivos, con presencia de reestructuraciones necróticas y hemorrágicas.

La incidencia es de alrededor del 3%. Aparece generalmente en mujeres de más de 50 años.

La manifestación clínica más corriente es la aparición de una masa cervical de evolución rápida, acompañada de disfonía, disfagia e incluso de disnea. Una invasión locorregional y metastásica se encuentra en el 60% de los pacientes. La supervivencia media es inferior a 4 meses.

Ninguna medida terapéutica tomada permite mejorar la supervivencia²⁶.

1.2. INCIDENCIA Y MORTALIDAD.

El aumento de la incidencia de los cánceres de tiroides afecta a todas las razas y grupos étnicos globalmente^{1,11}. La forma más común es el carcinoma papilar, que constituye aproximadamente el 85% de todos los casos^{1,3}. Se asume que esto es debido al aumento de la detección de formas pequeñas iniciales de cáncer (<1 cm), microcarcinomas papilares^{1,2,11}. Se ha objetivado un aumento en la incidencia de este tipo de cáncer en muchos países y sectores⁵ (figura 1).

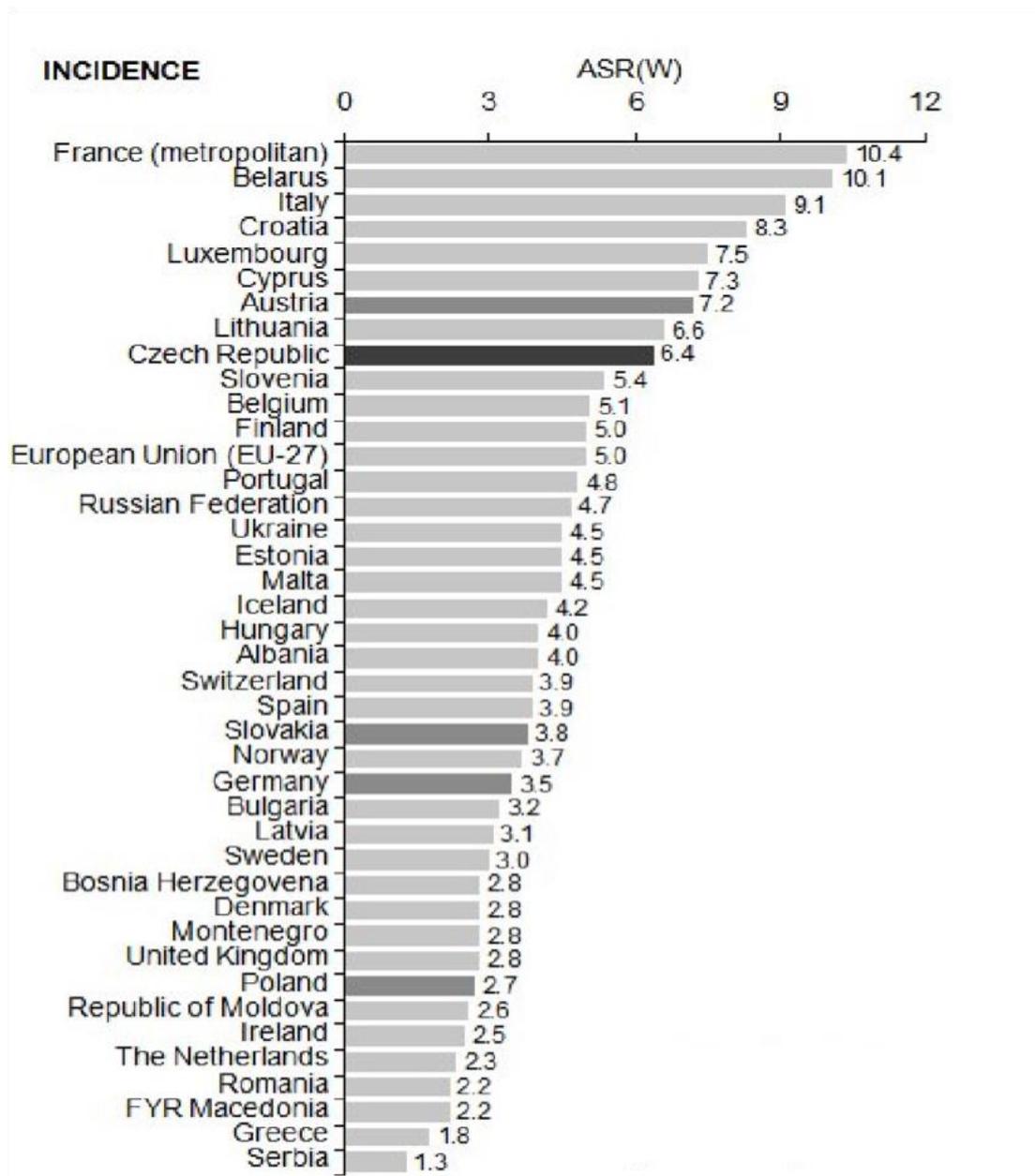


Figura 1. Incidencia del cáncer de tiroides en países europeos y vecinos.

La incidencia del cáncer folicular y medular no ha cambiado³, mientras en el carcinoma anaplásico se ha encontrado una ligera disminución de incidencia del 1 al 2%⁴, durante el mismo período de tiempo.

La tasa de mortalidad por cáncer en todo el mundo de tiroides varía de 0,2 a 1,2 en los hombres y de 0,4 a 2,8 en las mujeres por cada 100.000 personas. A pesar de que hay diferencias geográficas, la mortalidad por cáncer de tiroides no supera el 1%^{1,3}. En general, la mortalidad es significativamente menor que la morbilidad³ (figura 2).

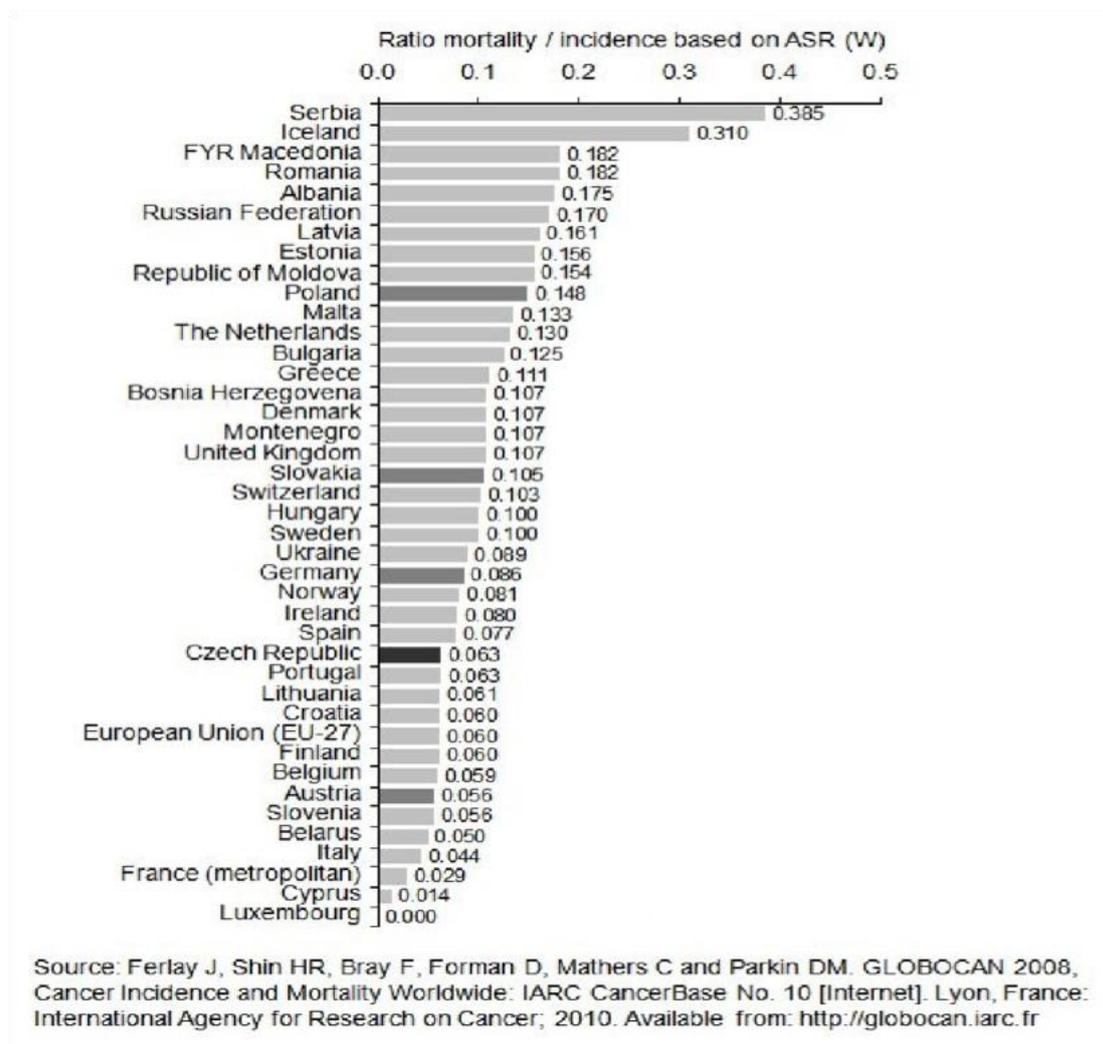


Figura 2. Mortalidad por cáncer de tiroides en los países europeos.

En España, Lope V et al. realizaron un estudio en el que concluyeron que donde existe mayor riesgo relativo de padecer cáncer de tiroides en nuestro país es en las Islas Canarias, Lugo, La Coruña y las zonas occidentales de Asturias y Orense. El patrón de mortalidad observada coincide con las zonas de España donde el bocio ha sido declarado endémico⁴ (figura 3).

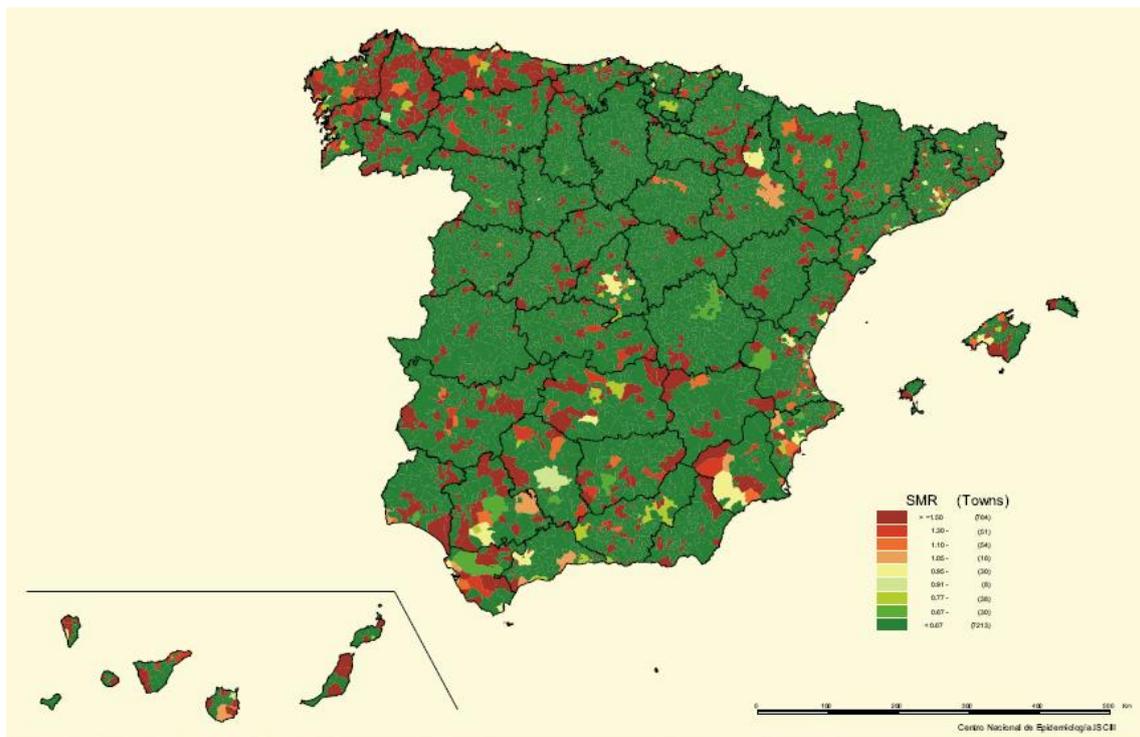


Figura 3. Distribución de la mortalidad por cáncer de tiroides en España.

1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER.

1.3.1. EL CÁNCER COMO PROCESO MICROEVOLUTIVO.

Según su definición, las células cancerosas crecen desafiando los controles normales y son capaces de colonizar e invadir los tejidos de su entorno. En estos tejidos pueden originar tumores secundarios o metástasis que ya resultan muy difíciles de erradicar quirúrgicamente.

Parece que la mayoría de los cánceres se originan a partir de una sola célula que ha experimentado una mutación inicial. No obstante, la progenie de esta célula ha de sufrir otros cambios a posteriori. Para que algunas de estas células se conviertan en cancerosas será necesario un gran número de mutaciones adicionales. Este fenómeno de progresión tumoral, de mucho tiempo de duración, refleja numerosos cambios evolutivos por mutación y selección natural entre las células somáticas.

El tratamiento del cáncer de forma racional requiere un conocimiento de las propiedades especiales que tienen las células cancerosas al progresar, multiplicarse y extenderse. Se encuentran entre estas propiedades las alteraciones en las vías de señalización celular, que capacitan a las células del tumor para ignorar las señales que proceden de su entorno y que normalmente mantiene la proliferación celular bajo un estricto control. De esta forma, las células pueden primero proliferar libremente en su tejido original y luego realizar metástasis sobreviviendo y proliferando en otros tejidos. Además, también como parte de su proceso de evolución, las células cancerosas ignoran las señales de suicidio y eluden las limitaciones programadas de proliferación.

Puesto que son necesarias muchísimas mutaciones para proporcionar este gran conjunto de propiedades dañinas, quizás no sorprenda que casi todas las células cancerosas dispongan de propiedades adicionales que las transforman en muy mutables ya que han tenido que adquirir uno o varios defectos en distintos aspectos del metabolismo de su ADN. Esta inestabilidad genética les facilita la adquisición del complejo conjunto de alteraciones necesarias para la progresión tumoral^{27, 28, 29 30}.

1.3.2. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER.

Las tasas de progresión y de evolución de los tumores se ven aceleradas tanto por los agentes mutagénicos (iniciadores tumorales) como por agentes no mutagénicos (promotores tumorales) que afectan a la expresión génica, estimulan la proliferación y alteran el balance ecológico entre células mutantes y no mutantes.

La mayoría de los agentes que producen cáncer son mutagénicos, como los carcinógenos químicos y ciertos virus, así como diversas formas de radiación.

Dado que muchísimos factores de los que contribuyen al desarrollo de un cáncer son controlables, es posible prevenir muchos de ellos.

Se desconocen todavía los principales factores ambientales que inciden sobre el cáncer. Algunos factores identificados son el humo del tabaco y algunas infecciones provocadas por virus.

La epidemiología es una herramienta muy útil para identificar estas causas y revelar nuevas formas de prevenir la enfermedad. La aproximación epidemiológica no requiere conocer de qué forma actúan los agentes productores de cáncer. Puede relacionar factores que no son simplemente mutagénicos como la edad a la que se tiene el hijo primero o los virus.

1.3.3. PROTO-ONCOGENES Y GENES SUPRESORES TUMORALES.

Los genes relacionados con el cáncer pueden clasificarse en dos grupos en función de si sus mutaciones provocan una pérdida o un incremento en la función del gen. Las mutaciones que inducen una pérdida de función de los genes supresores de tumores conllevan la pérdida de los mecanismos de inhibición de la proliferación que tratan mantener un número adecuado de células. Las mutaciones que implican un aumento de función permiten a las células proliferar de modo anormal. Estas últimas son mutaciones dominantes y los genes mutados son conocidos como oncogenes.

Los oncogenes pueden ser identificados por su capacidad para transformar unas líneas celulares en células con proliferación cancerosa. Muchos de ellos fueron descubiertos porque producían cáncer en animales de experimentación cuando eran introducidos mediante infección por un vector vírico que había tomado material genético de una célula huésped anterior. Los oncogenes también se pueden localizar examinando su presencia en genes diana de células cancerosas humanas, de mutaciones de activación o de translocaciones cromosómicas que indiquen la presencia de un gen crítico del cáncer.

Las mutaciones en genes supresores de tumores generalmente son recesivas, es decir, no se produce una pérdida del control hasta que han sido inactivadas las dos copias del gen. Los métodos utilizados actualmente para encontrar este tipo de genes se basan en busca en el genoma de las células cancerosas señales de pérdida de genes que, a menudo, se manifiestan en heterocigosis en una región cromosómica específica.

Otra aproximación se centra en el estudio de los cánceres familiares. Estas formas hereditarias de tumores poco frecuentes han permitido el descubrimiento de genes supresores de tumores cuya pérdida es bastante común en muchos tipos de cánceres. Estos individuos son proclives a padecer cánceres y heredan habitualmente una copia defectuosa y una copia funcional de un gen supresor de tumores. Presentan una gran predisposición al desarrollo de cáncer puesto que una sola mutación en una célula somática es suficiente al haber heredado la otra mutación para

crear una célula que pierda totalmente la función de uno de los genes supresores de tumores. La reciente aparición de la secuencia del genoma humano y la disponibilidad cada vez mayor de potentes herramientas para la búsqueda sistemática de mutaciones significativas en el ADN, permitirán disponer de un catálogo más completo de los genes críticos del cáncer³¹ (tabla 1).

Oncogenes
Ciclina D1
Receptor del Factor de crecimiento epidérmico
STAT3 (Transductor de señal y activador de la transcripción 3)
AIS (p40/p73L)
EMS1 (Cortactina)
Met
Genes supresores tumorales
p53
Rb
p16/p21/p27
FHIT (Gen de la triada histidina-frágil)

Tabla 1. Oncogenes y genes supresores tumorales en cáncer de cabeza y cuello.

1.3.4. FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA CANCEROSA.

Estudios en animales transgénicos y en embriones en desarrollo han resultado ser de gran ayuda para identificar las funciones de muchos genes relacionados con el cáncer. La mayoría de genes que en las células cancerosas presentan mutaciones, tanto los oncogenes como los genes supresores de tumores, codifican componentes de las vías que regulan el comportamiento proliferativo y social de las células del organismo en particular, así como los mecanismos cuyas señales permiten a las células dentro de un mismo entorno dividirse, diferenciarse o morir. Otros genes relacionados con el cáncer participan en el mantenimiento de la integridad del genoma y lo previenen frente a las lesiones. Algunos de los cambios moleculares que permiten a las células salir del tumor original y crecer en tejidos ajenos, o sea producir metástasis, aun son muy pocos conocidos.

Los virus ADN, como los papilomavirus, pueden favorecer el desarrollo del cáncer secuestrando proteínas derivadas de los genes supresores de tumores. En particular la proteína Rb (Retinoblastoma), que regula la división celular. Así como también regula la proteína p53, que actúa como freno de emergencia en la división celular de las células que presentan alguna lesión genética y también en las células senescentes con telómeros más cortos, esta acción es llevada a cabo mediante la proteína E6 viral la cual se fija a p53 e inactivándolo. La proteína p53 juega un doble papel, regulando tanto la progresión a través del ciclo celular, como el inicio de la apoptosis. Por tanto, la inactivación de p53, que se producen en aproximadamente la mitad de todos los cánceres

humanos, es doblemente peligrosa: permite a las células senescentes y con lesiones genéticas continuar replicando su ADN, incrementando las lesiones, y por otro lado, eludir la apoptosis. La pérdida de la función de p53 puede contribuir a la inestabilidad genética de muchos tumores metastásicos.

El general, las etapas en la progresión de un tumor pueden correlacionarse con mutaciones que activan oncogenes específicos e inactivan genes supresores de tumores. Sin embargo, en formas distintas de cánceres e incluso en pacientes con la misma forma de la enfermedad, hay combinaciones distintas de estas mutaciones, lo cual refleja que éstas se producen al azar. Aun así, repetidamente se encuentran los mismos tipos de lesiones genéticas, lo cual sugiere que existe un número limitado de maneras a través de las cuales se puede vencer los sistemas de defensa contra el cáncer.

1.3.5. PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.

Debemos continuar investigando para tener un mayor conocimiento de la biología molecular del cáncer. Este conocimiento debería conducir a mejores sistemas para diagnosticar y tratar la enfermedad. Se pueden diseñar tratamientos antitumorales para destruir preferentemente las células tumorales aprovechando las propiedades que las distinguen de las células normales, entre ellas los defectos que presentan en los mecanismos de reparación del ADN, en las vías de apoptosis y en los controles de ciclo celular.

Comprendiendo los mecanismos normales de control y cómo se alteran en los cánceres específicos es posible diseñar fármacos dirigidos al cáncer de forma más precisa. Conociendo mejor qué genes son amplificados, cuáles son delecionados y cuáles mutados en las células de un tumor determinado, se podrán empezar a diseñar tratamientos más precisos y específicos para cada paciente^{32,33,34,35,36}.

1.4. LA SUSTANCIA P.

En 1929, Ulf Von Euler, un joven farmacólogo, comenzó a trabajar en el Instituto Karolinska bajo las órdenes del Dr. Henry Dale (figura 4). Por aquella época se habían publicado una serie de artículos en los que se discutía la hipótesis de una neurotransmisión química.

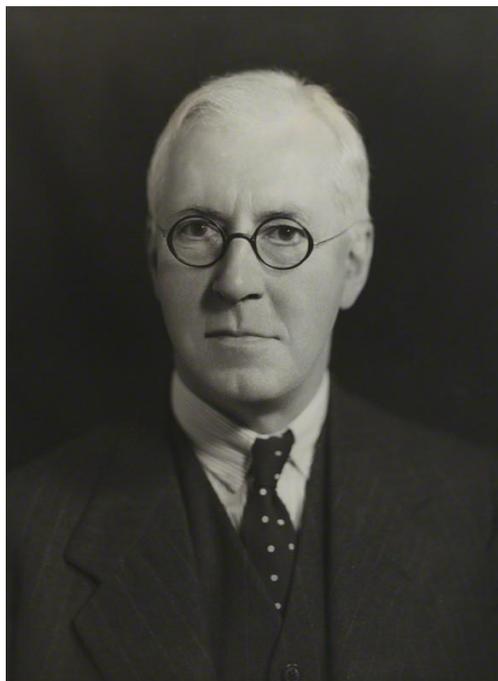


Figura 4. Dr. Henry Dale (1875-1968) Imagen: National Portrait Gallery, London.

Henry Dale acababa de publicar que la acetilcolina podría tener una función neurotransmisora, por ello no es de extrañar que le sugirieran al joven Euler que investigara sobre la distribución de la acetilcolina en el tracto digestivo. Esto lo llevó a cabo utilizando un fragmento de intestino de conejo en un baño orgánico. Obtuvo como resultado una buena estimulación en el fragmento; no obstante, el hecho de que al aplicar atropina, este efecto no se revirtiera del todo desconcertaba a los investigadores. En 1936 fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina, por sus estudios sobre excitación y transmisión química de los impulsos nerviosos.

En 1931 Ulf Von Euler y John Gaddum (figura 5) publican el primer artículo referente a la sustancia P; en él se describía la existencia en el cerebro y en el intestino de un factor resistente a la atropina que estimulaba el músculo liso y disminuía la presión sanguínea³⁷. Dicho factor fue denominado sustancia P (SP). La P proviene de “powder” como referencia al polvo seco de acetona que quedaba en los extractos de tejido cerebral e intestinal de sus investigaciones.

Von Euler fue profesor de fisiología del instituto Karolinska (Estocolmo) y durante su carrera llevó a cabo descubrimientos tan importantes como la noradrenalina y las prostaglandinas. En 1970 fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina por sus descubrimientos concernientes a las transmisiones químicas en las terminaciones nerviosas y el mecanismo de almacenaje y de inactivación de estos neurotransmisores.

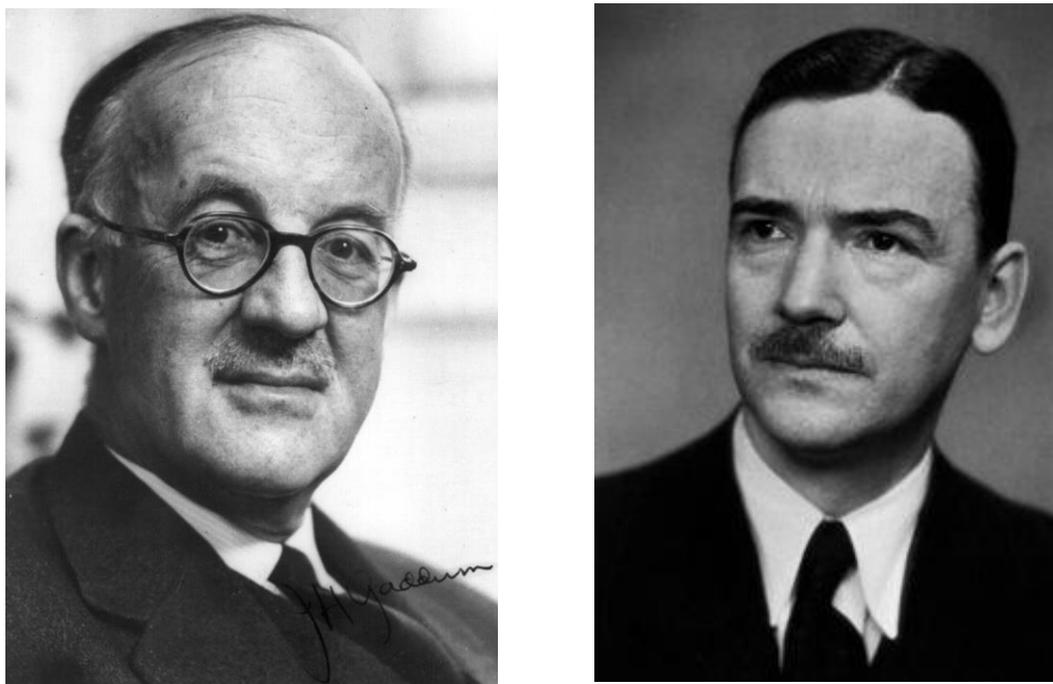


Figura 5. John Gaddum (1900-1965) y Dr. Ulf Von Euler (1905-1983). Imágenes: National Portrait Gallery of London y The Nobel Foundation.

Jonh Gaddum trabajó en el Instituto Nacional de investigación Médica en Londres con Henry Dale. Su trabajo ayudó a definir los conceptos de antagonismo y agonismo en los receptores moleculares del receptor. Él describe las interacciones particulares entre el LSD y receptores de serotonina. De 1933 a 1935, Gaddum fue profesor de Farmacología en la Universidad de Londres.

No fue hasta 1949 cuando Bengt Pernow, a las órdenes de Euler, retomó el trabajo sobre la SP. Como resultado de estos trabajos obtuvieron la purificación de la SP así como diversos datos acerca de su distribución y funciones biológicas³⁸. Pernow describió la distribución de la SP en el cerebro comprobando de este modo que los niveles eran mucho más altos en la sustancia gris que en la blanca; así mismo, demostró unos niveles altísimos en la sustancia negra mesencefálica, el diencefalo y particularmente en el hipotálamo. En la médula espinal demostró que la región dorsal tenía mayores concentraciones que la ventral y además comprobó como la SP se expresaba también en los nervios periféricos, en especial a los nervios del sistema autónomo, los ganglios espinales y el tronco simpático. En el tracto gastrointestinal, la capa muscular con su plexo nervioso mostraba una mayor concentración de SP que en el resto de las capas. Por último, comprobó como en niños

con la enfermedad de Hirschprung, caracterizada por la ausencia total de células ganglionares en la parte distal rectosigmoidea manteniéndose intacta la proximal, la parte distal carecía por completo de SP, presentando una distribución normal en la proximal³⁹. Por entonces, en Australia, Fred Lembeck publicó sus descubrimientos acerca de la función neurotransmisora sensitiva de la SP⁴⁰.

No fue hasta los principios de los 70 en Boston cuando Susan Leeman (figura 6) et al. identificaron la SP como un undecapéptido (figura 7)⁴¹, siendo los primeros en sintetizar el compuesto⁴² y llevar a cabo un ensayo radioinmunológico⁴³. Gracias a estas investigaciones, los efectos de la SP pudieron ser monitorizados en modelos fisiológicos^{44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58}.



Figura 6. Dra. S. E. Leeman (1930-). Imagen procedente de “Boston University School of Medicine”.

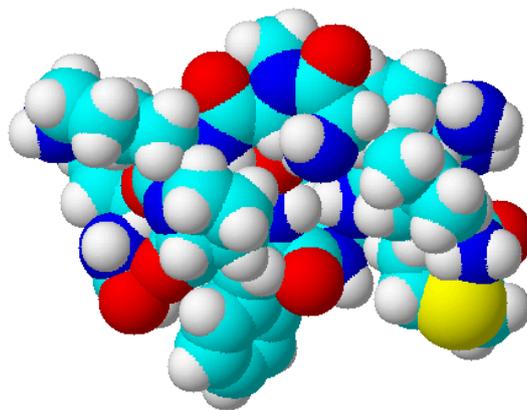


Figura 7. Modelo tridimensional SP. Imagen generada con SweetMollyGrace 1.3.

Durante la segunda mitad del siglo pasado, la SP ha sido una de las moléculas que más extensamente han sido estudiadas, pensándose además que era la única taquicinina hallada en mamíferos que actuaba como neuropéptido. Esto continuó así hasta 1983 cuando Kangawa y Kimura ⁵⁹ descubrieron la Neurokinina A (NKA) y la Neurokinina B (NKB). Paralelamente se

describió la presencia de péptidos de esta familia de taquicininas en animales no mamíferos, como los invertebrados, de manera que las taquicininas quedan establecidas como una de las mayores familias de péptidos conocida hasta el momento con más de 40 miembros.

1.5. LAS TAQUICININAS.

1.5.1. INTRODUCCIÓN.

La mayor familia peptídica descrita en el reino animal, es la familia de las taquicininas. Han sido aisladas más de 40 taquicininas entre animales invertebrados (insectos, gusanos y moluscos), procordados y vertebrados (piel, tracto gastrointestinal, sistema nervioso, etc.).

Se han realizado diversas clasificaciones de los NP según diferentes criterios, como son su localización tisular o estructura y secuencia de aminoácidos; este hecho ha llevado a dividir a los neuropéptidos en familias a veces con funciones similares o incluso solapadas. En la tabla 2 se muestran los principales neuropéptidos de mamíferos y se incluyen algunos de los recientemente descubiertos.

<p>HIPOTALÁMICOS</p> <p>Hormona liberadora de tirotropina (TRH) Somatostatina (SS) Hormona liberadora de corticotropina (CRH) Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) Orexinas A y B (hipocretinas 1 y 2)</p> <p>HIPOFISARIOS</p> <p>Vasopresina Oxitocina Hormona adrenocorticotropa (ACTH) Hormona estimuladora de melanocitos Prolactina Hormona de crecimiento (GH) Hormona estimulante del foliculo (FSH) Hormona luteinizante (LH) Hormona estimulante del tiroides Secretoneurina</p> <p>PÉPTIDOS GASTROINTESTINALES Y PANCREÁTICOS</p> <p>Péptido intestinal vasoactivo (VIP) Colecistocinina (CCK) Gastrina Insulina Glucagón Motilina Amilina Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) Galanina Secretina Neuropéptido Y Polipéptido pancreático Péptido tirosina-tirosina</p>	<p>PÉPTIDOS OPIOIDES</p> <p>Metencefalina (Met-Enk) Leu-enkefalina (Leu-Enk) Dinorfina β-endorfina</p> <p>TAQUICININAS</p> <p>Sustancia P Neurokinina A (Sustancia K) Neurokinina B Neuropéptido K</p> <p>OTROS</p> <p>Angiotensina II Bombesina Bradicinina Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) Neurotensina Neuropéptido FF Péptido natriurético cerebral</p> <p>NUEVOS</p> <p>Péptido regulador de la cocaína y anfetaminas Endomorfina 1 y 2 Nociceptina/Orfanina Nocistatin Péptido liberador de prolactina Urocortina Cortistatina Apelina</p>
---	--

Tabla 2. Clasificación de los principales neuropéptidos de mamíferos (resaltado el grupo de las taquicininas, objeto de estudio de este trabajo). García-López, Martínez-Martos, Mayas, Carrera, & Ramírez-Expósito, 2002).

Como ya se ha comentado, la primera taquicininina, la SP, fue identificada en 1931 y caracterizada 40 años después. Otros miembros de la familia son la NKA y NKB que fueron

identificados en mamíferos por diferentes grupos entre 1983 y 1984^{59,60,61}. Estos péptidos, en general, se encuentran ampliamente repartidos tanto por el sistema nervioso central (SNC) como periférico (SNP) y actúan principalmente como neurotransmisores. En el sistema nervioso autónomo (SNA) actúa esencialmente como un componente noradrenérgico no-colinérgico^{62,63,64,65,66,67,68,69,70,71}. No obstante, recientes estudios han cambiado el concepto que se tenía sobre la distribución de las taquicininas, comprobando como tanto la SP, la NKA, la NKB y otro miembro de las taquicininas denominada hemocinina-1 (HK1) se producen también en células no neurales, sugiriendo una amplia distribución de las taquicininas por todo el organismo^{72,73,74,75,76,77,78,79}.

1.5.2. PÉPTIDOS DE LA FAMILIA DE LAS TAQUICININAS.

Se han descrito hasta la fecha, en mamíferos seis taquicininas: SP, NKA, NKB, neuropéptido K (NPK), neuropéptido Y (NPY) y HK1^{37,41,80} (figura 8).

TAQUICININAS EN MAMÍFEROS

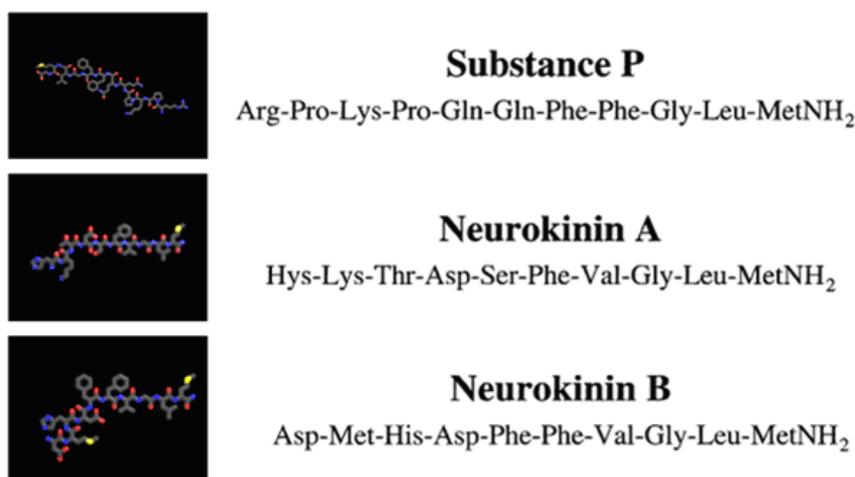


Figura 8. Estructuras de las principales taquicininas en mamíferos. Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3.

NPK y NPY son formas extendidas del segmento N-terminal de la NKA75. Estos péptidos se caracterizan por compartir un C-terminal común determinado por la siguiente secuencia de aminoácidos: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂^{81,82,83,84,85}.

Mientras que la secuencia de aminoácidos de la SP, NKA y NKB es idéntica en mamíferos, la secuencia de HK-1 parece variar entre el ratón, la rata y los humanos. En mamíferos, como ya se ha señalado, los péptidos de las taquicinas se expresan principalmente en los tejidos neurales^{86,87,88}. La SP y la NKA están presentes tanto en el SNC como en el SNP, en este último aparecen en los tejidos inervados por neuronas primarias aferentes sensibles a la capsaicina^{40,58,89,90,91,92,93,94} siendo liberadas en las terminaciones nerviosas tanto en la médula espinal como en los tejidos periféricos realizando una actividad neurotransmisora excitatoria^{95,96,97,98}. El sistema nervioso no es la única localización de la SP, como ya se comentó, así pues ésta se expresa en células endoteliales humanas, las células de Leydig de ratón, diversas células inflamatorias e inmunes de humanos, ratas y ratones^{99,100,101,102}. Además se han encontrado precursores del NKB en placentas humanas y de ratas, en úteros así como en otras células reproductoras en ratón^{103,104,105,106}. Por último, la HK1 se expresa principalmente en células no neurales y se piensa que tiene un papel importante en la señalización intercelular, específicamente, en las comunicaciones entre el sistema nervioso y otros sistemas biológicos.

1.5.3. ESTRUCTURA GENÉTICA.

La sustancia P, la neurokinina A, el neuropéptido K y el neuropéptido Υ se encuentran codificados en el gen preprotaquicnina-A (PPT-A) o gen TAC-1 (tabla 3).

TAQUICININA	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS *
Sustancia P (SP) (11 aa)	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH ₂
Neurokinina A (NKA) (10 aa)	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
Neurokinina B (NKB) (10 aa)	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
Neuropéptido K (NPK) (36 aa)	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
Neuropéptido γ (NP γ) (21aa)	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-MetNH ₂
Hemokinina-1 (HK-1) (11 aa)	Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH ₂
Endokinina A (EKA) (47 aa)	Asp-Gly-Gly-Glu-Glu-Gln-Thr-Leu-Ser-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Trp-Val-Ile-Val-Ala-Leu-Glu-Glu-Gly-Ala-Gly-Pro-Ser-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH ₂
Endokinina B (EKB) (41 aa)	Asp-Gly-Gly-Glu-Glu-Gln-Thr-Leu-Ser-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Trp-Glu-Gly-Ala-Gly-Pro-Ser-Ile-Gln-Leu-Gln-Leu-Gln-Glu-Val-Lys-Thr-Gly-Lys-Ala-Ser-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-MetNH ₂
Endokinina C (EKC) ^b (14 aa)	Lys-Lys-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-LeuNH ₂
Endokinina D (EKD) ^b (14 aa)	Val-Gly-Ala-Tyr-Gln-Leu-Glu-His-Thr-Phe-Gln-Gly-Leu-LeuNH ₂

Tabla 3. Secuencia de los diferentes neuropéptidos que integran la familia de las taquicinas de mamíferos. (a) Los aminoácidos subrayados son los que conforman la secuencia C-terminal común de las TK. En negrita se representa el residuo aromático o alifático correspondiente. (b) Péptido relacionado con las TK (*tachykinin-like*).

Solamente se conoce la organización de este gen en unas cuantas especies de mamíferos^{107,108,109,110}. En ratas y humanos, el gen está compuesto por siete exones, en ratones únicamente por seis. En humanos, a partir de la transcripción primaria del gen se obtienen cuatro isoformas de ARN mensajero (α , β , γ y δ) que difieren en sus combinaciones de los exones. El ARN mensajero β -PPT-A contiene los siete exones del gen mientras que el ARN mensajero α -PPT-A pierde el exón 6, el γ pierde el exón 4, por último, el ARN mensajero δ -PPT-A pierde los exones 4 y 6. La secuencia del exón 3 codifica la SP, mientras que la secuencia del 6 codifica la NKA. La secuencia que produce el NPY está presente en los exones 3, 5 y 6 mientras que la que produce la NPK se encuentra en los exones 3, 4, 5 y 6.

La secuencia precursora de la SP está por tanto codificada por las 4 isoformas posibles, en cambio la secuencia de NKA está presente en el ARN mensajero β y γ -PPT-A, la secuencia de NPY en el ARN mensajero γ -PPT-A y por último, la secuencia de NPK es únicamente codificada por ARN mensajero β -PPT-A^{111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121}. La translación de esos ARN mensajeros y su procesamiento postranslacional es lo que determina las distintas taquicinas. Es importante tener en cuenta diferentes circunstancias, por ejemplo la SP puede expresarse de manera aislada, mientras que la NKA siempre se expresa acompañada de SP. Hay ciertos estudios sobre las diferentes concentraciones de las distintas isoformas de ARN mensajero PPT-A en los distintos tejidos que muestran un incremento relativo en las concentraciones de las isoformas γ y β , en concreto las que expresan SP y NKA¹⁰⁶.

La NKB es la única secuencia conocida hasta el momento que se obtiene del gen PPT-B o gen TAC-3^{122,123}. En humanos y ratas, el gen está compuesto por siete exones y la secuencia que codifica la NKB se encuentra en el exón 5.

Se ha demostrado que la estructura primaria de la HK-1 es diferente en humanos de la hallada en ratones y ratas. La HK-1 está producida por el tercer gen PPT-C o TAC-4^{72,73}. El gen PPT-C está compuesto por cuatro exones y la secuencia que codifica la HK-1 se encuentra en el exón 2.

1.5.4. ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LAS TAQUICININAS.

Tanto en los vertebrados superiores como en distintos grupos de invertebrados, se han aislado taquicinas^{81,124,125,126}. La estructura primaria de las taquicinas son estructuras muy conservadas desde el punto de vista de la evolución, en especial la secuencia C-terminal compuesta por Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ y que precisamente es donde reside la función biológica de estos péptidos⁸⁵. Todas las especies a lo largo de la escala de la evolución expresan taquicinas o péptidos relacionados con ellas.

La SP o sus péptidos relacionados, son los más abundantes de toda la familia y aparecen con estructura similar tanto en mamíferos como en otros vertebrados. Únicamente existen

pequeñas sustituciones como por ejemplo el cambio de un aminoácido por otro de similares propiedades^{127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143}.

La NKA de mamíferos, reptiles y aves tienen la misma estructura primaria diferenciándose únicamente en dos aminoácidos^{144,145,146}.

El NPY y péptidos relacionados se han encontrado también en otras especies de vertebrados como la serpiente pitón y el aligátor entre otros^{147,148}. Los péptidos "pseudo" taquicinina se han aislado en invertebrados compartiendo con los vertebrados alrededor de un 30% de la secuencia; no obstante, la secuencia C-terminal relacionada con su actividad es diferente y por esta razón se le denominan péptidos "pseudo" taquicinina^{149,150,151,152,153,154,155,156}.

A pesar de ello, existen excepciones como la sustancia aislada en las glándulas salivares del mosquito *Aedes aegypti*, denominada sialokinina¹⁵⁷ que conserva la secuencia C terminal de los vertebrados. Se plantea la posibilidad de que exista una relación entre este fenómeno y el hecho de que esta sustancia entre en contacto con un huésped vertebrado.

La gran estabilidad estructural de estos péptidos a través de la evolución sugieren una fuerte presión selectiva, es decir que mutaciones que conlleven sustituciones conservativas en sus secuencias de aminoácidos, favorecen la supervivencia. Esta presión selectiva, junto al pequeño tamaño de las moléculas de las taquicininas hace difícil establecer relaciones filogenéticas.

Así, el estudio de los genes completos, incluyendo intrones y otras regiones no codificantes podría ser útil para el estudio de la evolución de los neuropéptidos.

No obstante todavía se desconocen la mayoría de los genes que codifican las taquicininas y sus péptidos relacionados. Con los conocimientos actuales no se puede asegurar que los genes PPT-A, B, C y otros genes que codifican péptidos relacionados con las taquicininas procedan de un gen ancestral común, no obstante, hay varios hechos experimentales a tener en cuenta:

- A. La presencia de taquicininas o péptidos relacionados en todas las especies vivientes, incluidos invertebrados y las similitudes existentes en sus secuencias de aminoácidos.
- B. La similar distribución de las taquicininas en los tejidos de los organismos estudiados: sistema nervioso, glándulas salivares, intestino...
- C. El hecho por el cual en algunos casos la conformación activa de la SP y de los péptidos relacionados en insectos conforman sitios similares de unión al receptor.
- D. La observación de que el spantide (un antagonista selectivo de receptores de taquicininas) actúa tanto en receptores de taquicininas de mamíferos como de insectos.

Todos estos hechos sugieren un origen común de las taquicininas y de los péptidos relacionados con ellas las cuales derivarían de un gen común ancestral^{127,158}.

1.6. NK-1R: RECEPTORES DE LAS TAQUICININAS.

1.6.1. TIPOS DE RECEPTORES.

Los efectos biológicos de las taquicinas están mediados a través de 3 tipos de receptores denominados NK-1R (receptor de la neurokinina-1), NK-2R (receptor de la neurokinina-2) Y NK-3R (receptor de la neurokinina-3).

Además, existe una variante del NK-3R denominado NK3BR o NK-4R. Estas moléculas pertenecen a la familia A (tipo rhodopsina) de los GPCRs, una gran superfamilia de proteínas que conforman aproximadamente el 1% de todo el genoma y juegan un papel clave en los mecanismos de señalización celular^{72,159,160,161,162}.

Los GPCRs, son unas proteínas transmembrana responsables de la transducción de señales mediadas por estímulos ambientales como luz, olor, sabor, así como hormonales, neurotransmisión y otros tipos de comunicación intercelulares.

Los GPCRs 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 9).

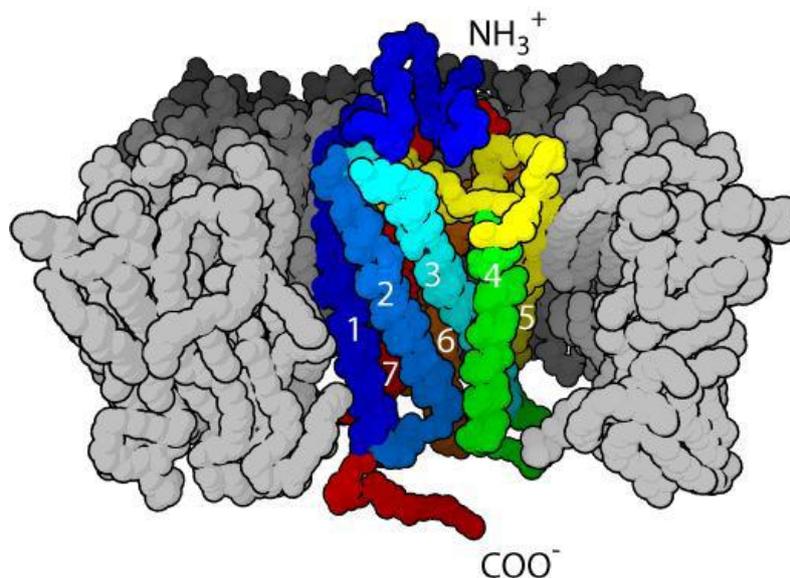


Figura 9. Receptor asociado a proteína G genérico: 7 hélices transmembrana y 6 bucles. Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3.

Aunque los GPCRs comparten una topología común, cada uno tiene ciertas características diferenciadoras pudiendo variar especialmente en el tamaño del amino-terminal extracelular, los bucles citoplasmáticos y el grupo carboxilo terminal.

Basándonos en esas diferencias, los GPCRs de mamíferos han sido clasificados en 3 tipos: A, B y C. La familia A (rhodopsin-like o adrenergicreceptor-like) es con diferencia la mayor de las tres y se caracteriza por una estructura amino-terminal corta y unos residuos ácidos constantes en cada hélice transmembrana.

La proteína G acoplada es un heterotrímero constituido por una subunidad α con actividad GTPasa y dos subunidades β y γ que forman un dímero. El dímero β - γ se desacopla de la subunidad α cuando se activa la proteína G. Existen varias isoformas de estas subunidades cuya combinación define los distintos tipos de proteínas G. Existen 16 isoformas de subunidad α que se obtienen por 'splicing' alternativo, 5 isoformas de subunidad β y 14 isoformas de γ (figura 10).

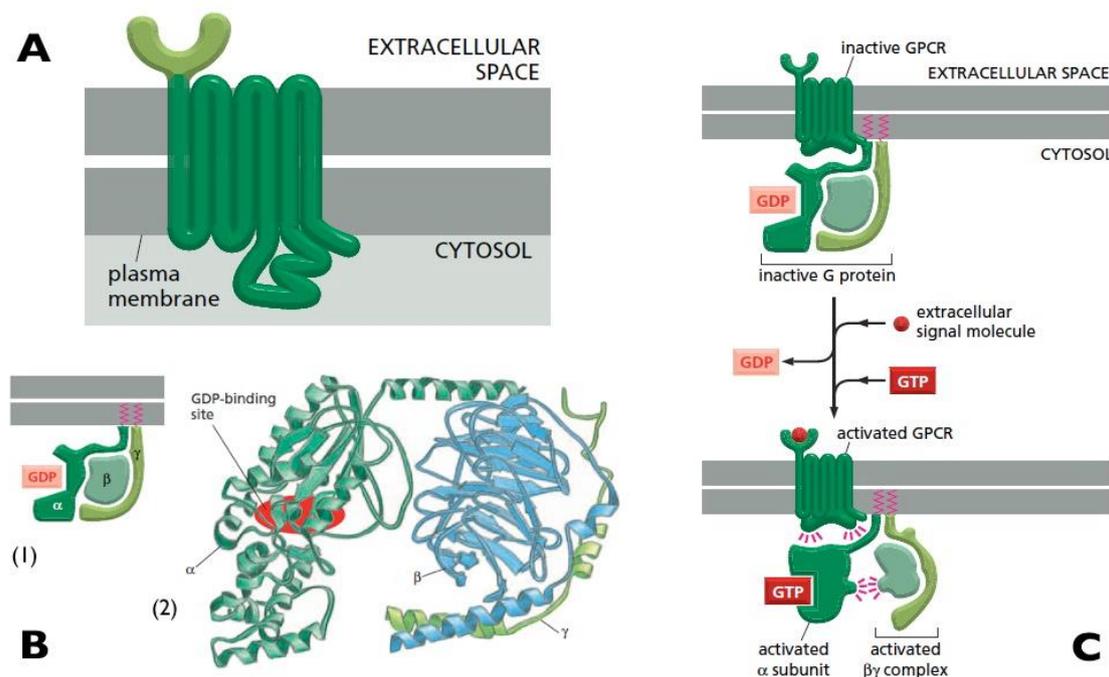


Figura 10. Receptor acoplado a proteína una proteína G. A. Estructura del receptor con sus siete dominios transmembrana. B. Estructura de una proteína G inactiva con sus subunidades α , β y γ en una representación esquemática (1) y tridimensional (2). C. Activación de la proteína G tras la unión del receptor transmembrana a su ligando (Modificado de Alberts et al., 2008, pp. 904-906).

En estado de reposo el trímero está asociado y la subunidad α está unida a GDP. Cuando el receptor se une al ligando se producen cambios conformacionales en las asas intracelulares del receptor que disocian el trímero activando la proteína G. La subunidad α se separa del dímero β - γ y se une al GTP. La subunidad α y el dímero β - γ por separado pueden actuar sobre una gran gama de efectores diferentes como la adenilato ciclasa, las fosfodiesterasas, la fosfolipasa C o canales iónicos. Todos ellos activan cascadas de señalización intracelular. La proteína G activada actuará sobre un efector u otro según el isotipo de sus subunidades α , β y γ (figura 11). Cada subtipo tiene un rango

de hidrólisis diferente. La duración del efecto de la proteína G activada depende de la actividad GTPasa de la subunidad α . Una vez hidrolizado el GTP el trímero se reasocia y se inhibe la activación de efectores.

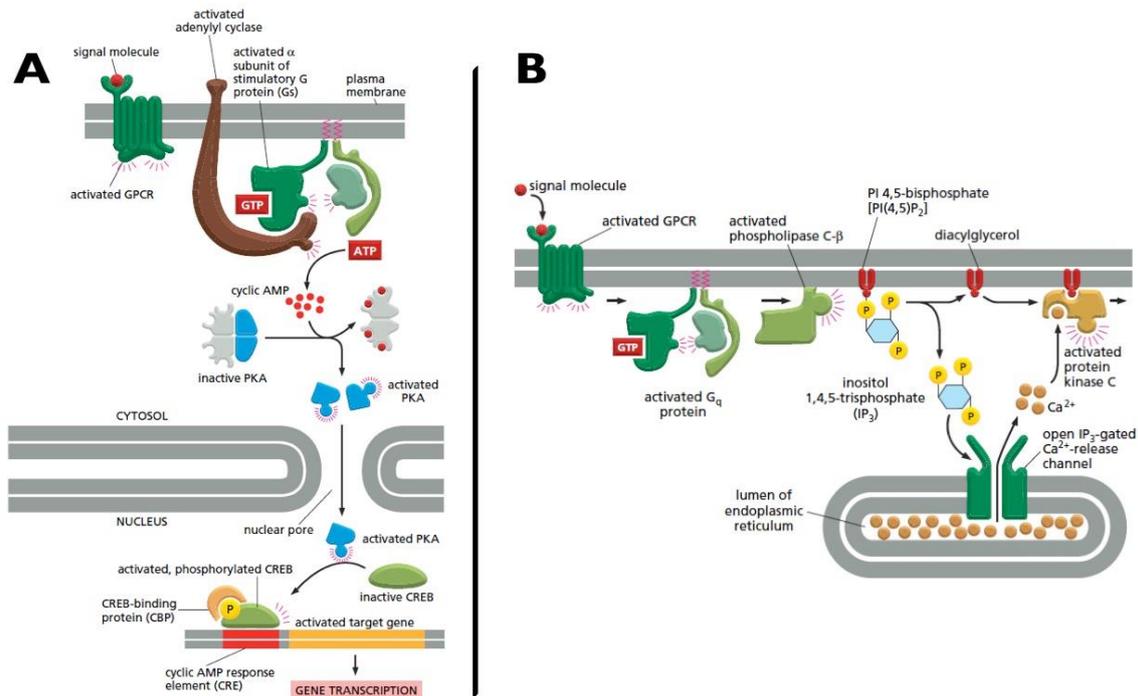


Figura 11. Mecanismos efectorios de la proteína G. A. Vía de la adenilato ciclasa y proteincinasa A (PKA). B. Vía del fosfatidil inositol bifosfato (modificado de Alberts et al., 2008, p. 909 y 911).

Igual que en otros miembros de esta superfamilia, los receptores de las taquicinas parecen tener 7 dominios hidrofóbicos transmembrana (TM I-VII) con 3 bucles extracelulares (EL 1, EL 2 y EL 3), 3 bucles intracelulares (IL 1, IL 2 e IL3), una formación aminoterminal extracelular así como otra formación carboxiterminal citoplasmática¹⁶⁴.

Cuando Nakanishi y col.¹⁶⁵ clonaron el primer receptor relacionado con la SP, el conocimiento de la presencia de los receptores de neuropéptidos, hasta entonces se basaba en estudios de unión y análisis farmacológicos. Hoy en día se dispone de la estructura física de los receptores descritos hasta la fecha para los mamíferos (figuras 12 y 13).

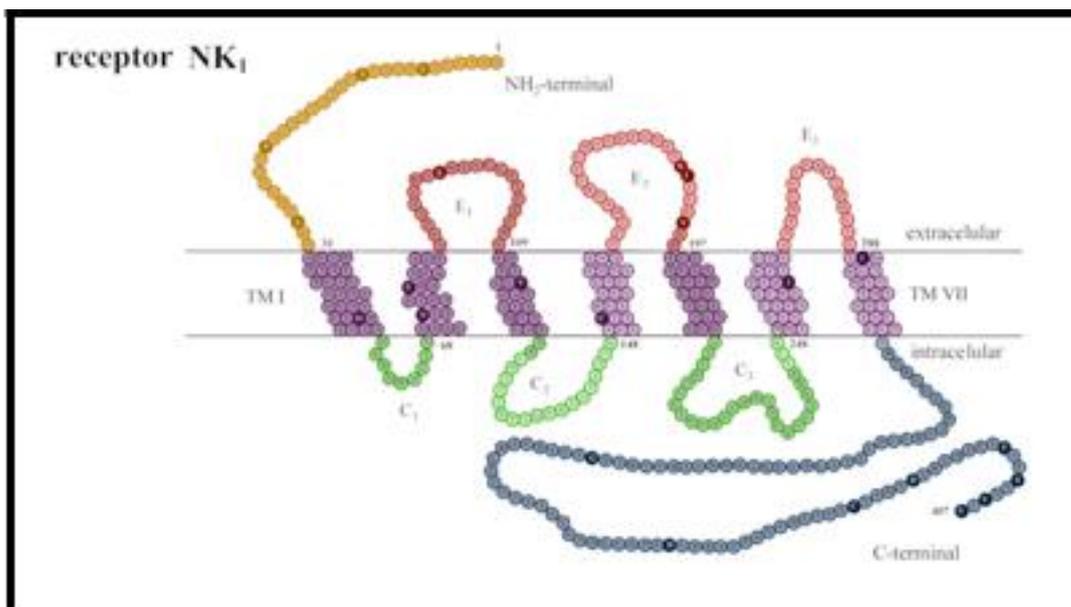


Figura 12. Receptor de la neurokinina-1. Imagen procedente de Almeida et al.¹⁶⁶.

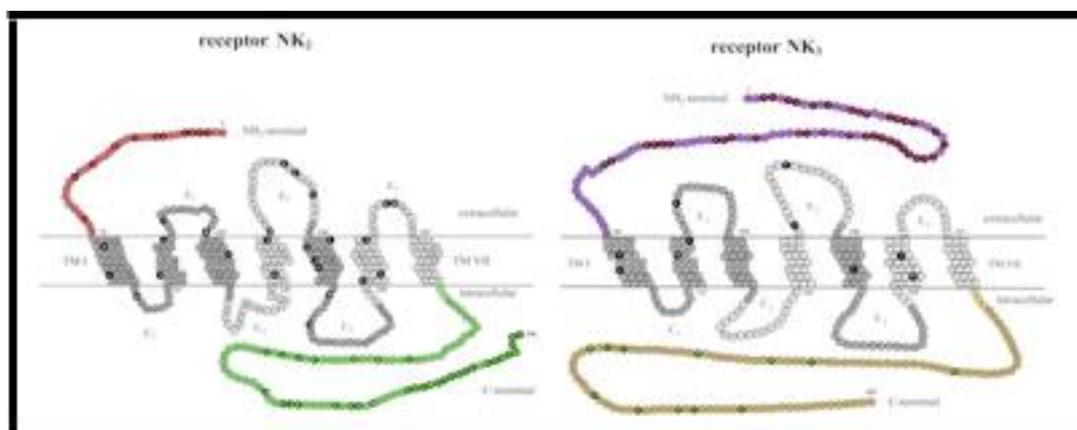


Figura 13. Receptor de la Neurokinina-2 y 3. Imagen procedente de Almeida et al.¹⁶⁶

Receptores de taquicinina de diferentes especies de mamíferos se han clonado. En todos ellos se ha podido demostrar que el NK-1R es una proteína compuesta por 407 aminoácidos^{165,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181}.

El NK-2R humano tiene 398 aminoácidos en cambio y es mayor que el de la rata con 390 aminoácidos; por otro lado, el NK-2R del cobaya tiene 402 aminoácidos.

Por último, el NK-3R es el mayor de todos en todas las especies, siendo este tamaño a expensas de la región aminoterminal. Conteniendo 465, 452 y 440 aminoácidos en humanos, ratas y cobaya respectivamente.

Los receptores de las taquicinas poseen una moderada selectividad a las taquicinas endógenas. Así, la SP, la NKA y la NKB actúan como agonistas de los 3 receptores; no obstante, no todos se unen con la misma afinidad. Así pues el ligando preferido para el NK-1R es la SP, para el NK-2R la NKA y para el NK-3R la NKB (tabla 4).

Receptores y sus ligandos	
NK-1R	SP>NKA>NKB
NK-2R	NKA>NKB>SP
NK-3R	NKB>NKA>SP

Tabla 4. Receptores de las neurokininas y sus ligandos preferidos.

Parece ser que NPK y NKY no solo actúan como precursores del NKA, si no que podrían incluso tener un papel como neurotransmisores. NPK y NKY tienen mayor afinidad con NK-2R pero también presentan una alta afinidad con el NK-1R. Recientes estudios farmacológicos indican que la HK-1 tanto de ratón, rata, como humanos actúa como agonista del NK-1R produciendo, al menos en los tejidos periféricos, idénticos efectos que la SP^{75,86,88,89,90,182,183,184,185,186,187,188}.

En mamíferos los receptores de las taquicinas se encuentran distribuidos dentro de cada especie de forma heterogénea. El NK-1R se expresa ampliamente tanto en el SNC como en el SNP y está presente en las neuronas, músculo, endotelio, vascular y diferentes tipos de células inmunitarias entre otras. El NK-2R se encuentra en el SNP principalmente aunque también se expresa de manera selectiva en ciertos núcleos cerebrales, por el contrario, el NK-3R se encuentra en el SNC principalmente, mientras que en los tejidos periféricos se identifica en el útero y placenta de ratas y humanos, pulmón, hígado, el sistema portal, el sistema músculo esquelético humano, y vena mesentérica de ratas y ciertas neuronas entéricas del intestino de diversas especies^{79,80,105,106,107,162,189,190,191,192,193,194,195,196,197}.

1.6.2 ESTRUCTURA GENÉTICA.

Los genes que codifican los 3 receptores de las taquicinas se encuentran en el cromosoma 2 teniendo la misma organización estructural todos. Como ocurre con otros receptores de esta familia, los receptores de las taquicinas tienen 7 dominios transmembrana de carácter hidrofóbico (TM I-VII), con 3 asas extracelulares (EL 1-3) y 3 asas intracelulares (IL 1-3). Las regiones codificantes de estos genes están divididas en 5 exones, con sus intrones localizados en idénticas posiciones para todos ellos^{167,168,171,173,175,176,178,181}.

El exón 1 contiene la región que codifica hasta la parte final de TM III y la región 5' no traducida. El exón 2 contiene IL 2, TM IV y EL 2. El exón 3 contiene TM V e IL 3. El exón 4 codifica el

TM VI, EL 3 y TM VII. Por último el exón 5 codifica el grupo C-terminal citoplasmático y la región 3' no traducida (figura 14).

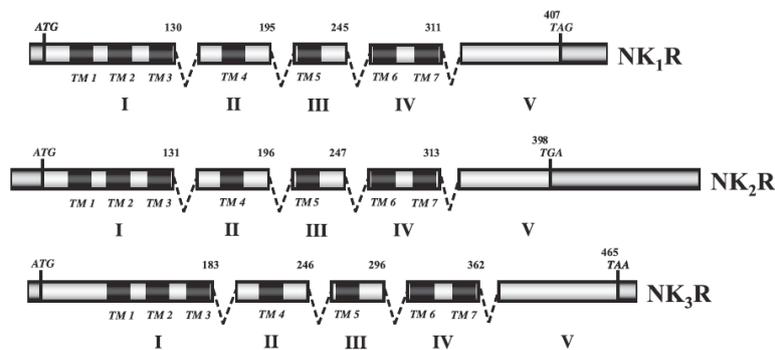


Figura 14. Representación esquemática de la organización de los genes que codifican los receptores taquicinérgicos humanos. Las regiones codificantes de los genes se dividen en cinco exones (I-V) separados entre sí por cuatro intrones (señalados por líneas discontinuas). Los segmentos transmembrana codificados por cada exón aparecen con color negro e identificados con las letras TM (1-7). También se indican las posiciones de los aminoácidos en los lugares de *splicing* (Jocelyn N. Pennefather et al., 2004).

1.6.3. LAS ISOFORMAS DEL NK-1R.

La existencia de dos isoformas del NK-1R presentes en las glándulas submaxilares de la rata, que se diferenciaban en la longitud del extremo carboxi-terminal fue demostrada por Kage et al^{198,199}. En la especie humana también han sido clonadas y estudiadas (figura 15). Estas dos isoformas se diferencian en la longitud del polipéptido generado, pero poseen los mismos dominios de unión, la forma larga posee 407 aminoácidos, mientras que la corta tan sólo 311. El menor número de residuos se debe al dominio intracelular ya que en esta región parece situarse el mecanismo implicado en la fosforilación dependiente de cinasas de los GPCRs. Por consiguiente, la forma corta parece tener una menor capacidad para la internalización del receptor. La forma larga se expresa predominantemente en determinados sitios del cerebro humano, en cambio la forma corta se expresa a lo largo del SNC y los tejidos periféricos.

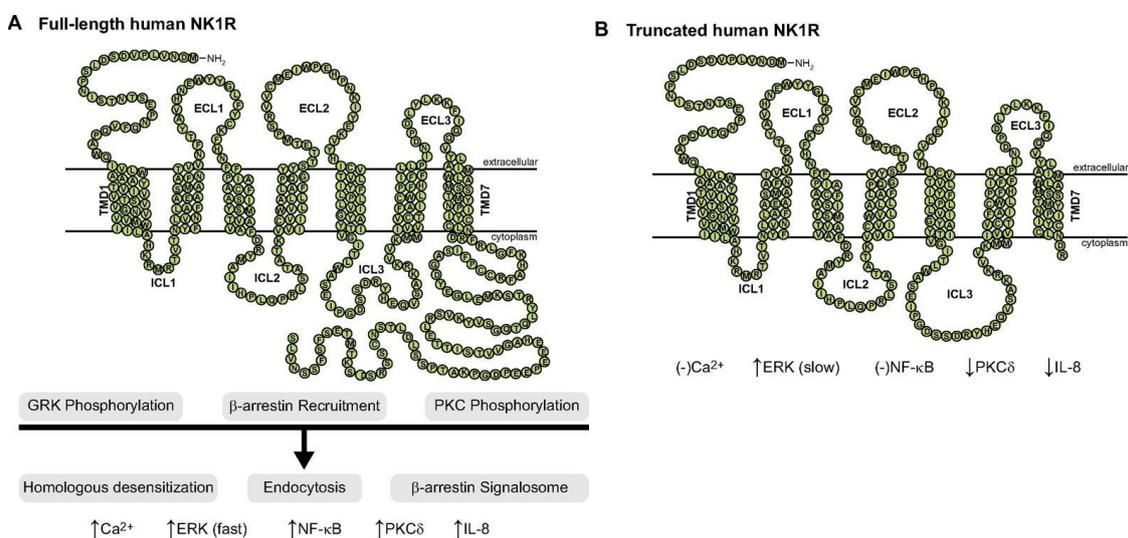


Figura 15. Representación esquemática de las isoformas del NK-1R.

Las características de la unión ligando-receptor de la forma larga del receptor coinciden con la caracterizada en los tejidos de las especies mamíferas estudiadas por el momento, de tal forma que la SP es el mayor agonista. Por el contrario, la forma corta del receptor parece tener una afinidad al menos diez veces menor que la forma larga.

Los estudios de Fong et al.²⁰⁰ en 1992, indican por tanto que existen múltiples formas del NK-1R humano y que la diferente activación de la respuesta intracelular podría estar en relación con la complejidad de los efectos biológicos de la SP. Estos datos sugieren que la forma corta podría representar un sistema efector diferente. Diversos estudios de secuenciación de proteínas apuntan que las dos isoformas provienen de un corte y empalme alternativo del pre-ARN mensajero.

1.7. FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE LA SP Y EL NK-1R.

Por la acción de unas proteasas específicas, las taquicininas son liberadas de sus precursores. Los típicos puntos de corte son las parejas Lys-Arg, Arg-Arg y Arg-Lys, siendo esta acción llevada a cabo por seis grupos de enzimas proteolíticas denominadas convertasas. La amidación del grupo COOH terminal tras la proteólisis es generada por la secuencia precursora Gly-Leu-Met-Gly-Lys-Arg, en la cual Gly actúa como el donante de la amida.

Las taquicininas de la terminación nerviosa, son liberadas por un mecanismo calcio-dependiente como respuesta tras la aplicación de un estímulo ya sea fisiológico o no (potasio, despolarización por capsaicina, estimulación eléctrica). Pueden ser atacadas e inactivadas, una vez que son liberadas, por varias enzimas proteolíticas con diferente afinidad por cada una de ellas, de modo que el péptido más vulnerable parece ser la SP, mientras que aquellos que tienen en su N-terminal el residuo pGlu parecen más resistentes al ataque de las proteasas. Tres enzimas parecen mostrar una función predominante, en la degradación proteolítica de la SP: dipeptidyl-amino peptidasa, postprolina endopeptidasa y catepsina-D.

La estimulación del NK-1R genera diversos segundos mensajeros, que de manera secuencial pueden desencadenar ciertos mecanismos efectoros, mecanismos reguladores de la excitabilidad celular y la modulación de ciertas funciones celulares. Aparentemente existen tres segundos mensajeros que podrían llevar a cabo estas funciones (figura 16)^{201,202,203,204,205,206}: tanto la subunidad α -GTP como las subunidades β y γ están relacionadas con la regulación de las funciones efectoras de la SP.

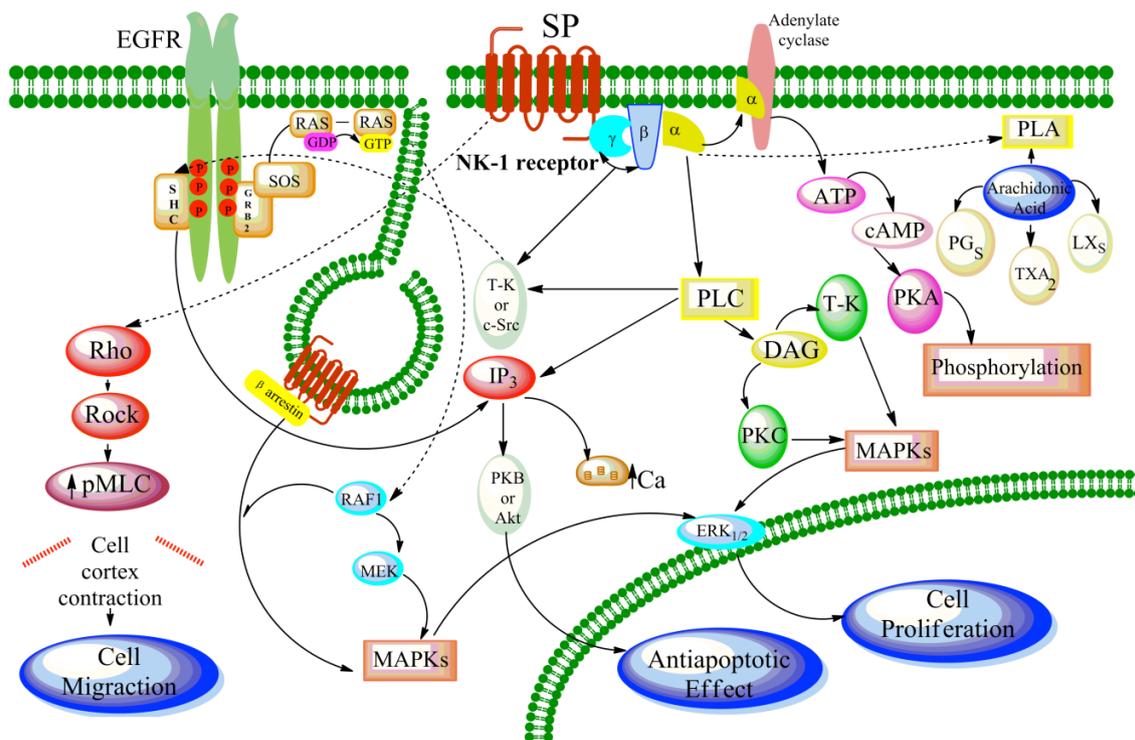


Figura 16. Representación esquemática de las vías de señalización intracelular tras la activación del NK-1R por la SP (ATP: adenosín trifosfato; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol trifosfato; LXs: leucotrienos; MAPKs: protein-quinasa activadas por mitógenos; PGs: prostaglandinas; PKA: proteína quinasa A; PKB: proteína quinasa B; PKC: proteína quinasa C; PLA: fosfolipasa A; PLC: fosfolipasa C; pMLC: fosforilación de la cadena ligera de la miosina; T-K: tirosinaquinasa; TXA2: tromboxano A2) (Imagen tomada de Rosso, Muñoz, & Berger, 2012).

El DAG actúa vía protein-quinasa para abrir los canales de calcio tipo L en la membrana plasmática. La respuesta de los tejidos depende por tanto del aumento de los niveles de calcio intracelular. La activación de la fosfolipasa C, la cual transforma el fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) en inositol trifosfato (IP3) y en diacilglicerol (DAG). IP3 actúa en receptores específicos del retículo endoplasmático incrementando los niveles intracelulares de calcio al liberar los depósitos de calcio.

La activación de la fosfolipasa A2, desencadena la movilización del ácido araquidónico. Y la activación de la adenilato ciclasa, la cual produce un incremento de los niveles de adenosin monofosfato cíclico (cAMP).

Se supone que la SP penetra en la fase lipídica de la membrana plasmática adaptando parcialmente la conformación de una α -hélice y que entonces difunde en la membrana hasta el sitio de unión del receptor. Otras moléculas como NPK, NKA y NKB también pueden unirse a dicho receptor (figura 17) pero con menor afinidad que la SP 207.

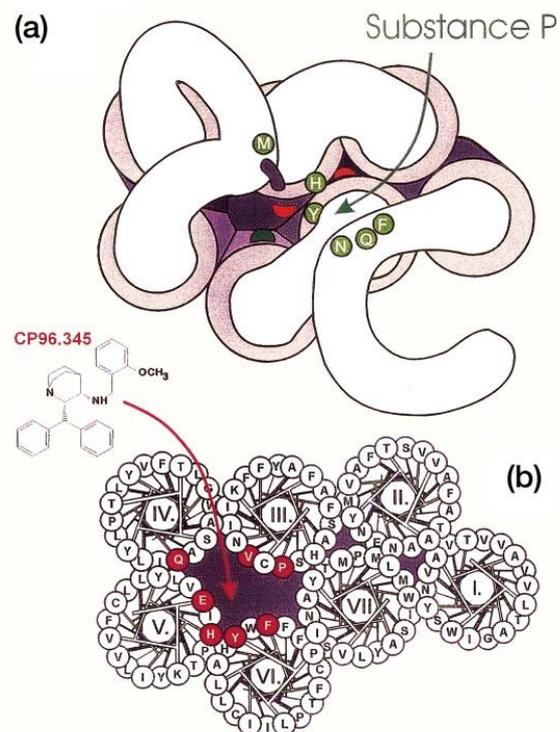


Figura 17. Representación esquemática que muestra los sitios de unión de la SP (a) y del antagonista no peptídico CP-96,345 en el NK-1R (b). La primera imagen muestra la visión extracelular en la que se representan los bucles y la región N-terminal. Los círculos verdes representan los residuos que interactúan con la SP. En la segunda imagen las siete regiones transmembrana se muestran como hélices, y los círculos rojos representan los sitios de unión del antagonista CP-96,345 (Imagen tomada de Hokfelt et al., 2001, p. 30).

Tras la internalización del complejo SP/NK-1R ha sido estudiada la ruta endocelular en profundidad por Grady et al.208 Gracias a los estudios con microscopio confocal utilizando SP marcada y anticuerpos frente a NK-1R, se puede conocer al detalle la ruta intracelular así como los procesos de degradación de la SP y reciclaje de los NK-1R (figuras 18-20).

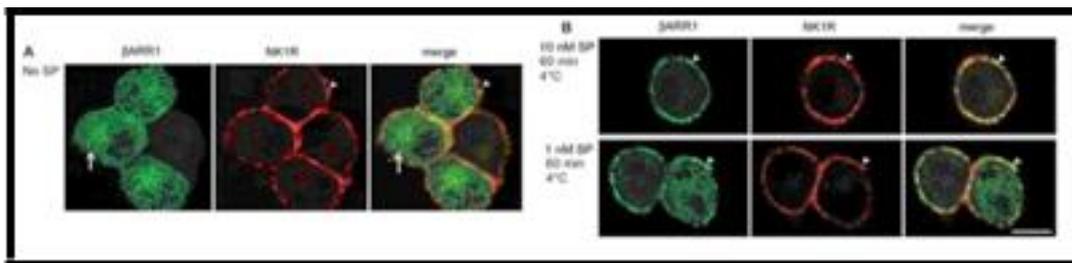


Figura 18. Translocación transmembrana de la β -arrestina 1-GFP. En la secuencia A, el medio no contiene SP. En la secuencia B, las células fueron incubadas con 10nM o 1 nM de SP durante 60 minutos a una temperatura de 4°C.

Tras la fijación de las células se procede a identificar los NK-1R mediante inmunofluorescencia. Así mismo, mediante el anticuerpo β -ARR1 se procede a localizar la β -arrestina. En la secuencia A se observa que los NK-1R se sitúan en la membrana celular mientras que la β arrestina se distribuye por el citosol. La incubación con concentraciones nanomolares (10 y 1) de SP induce la translocación de β -arrestina 1-GFP desde el citosol hacia la membrana timpánica. Imagen procedente de Graddy et al.²⁰⁸.

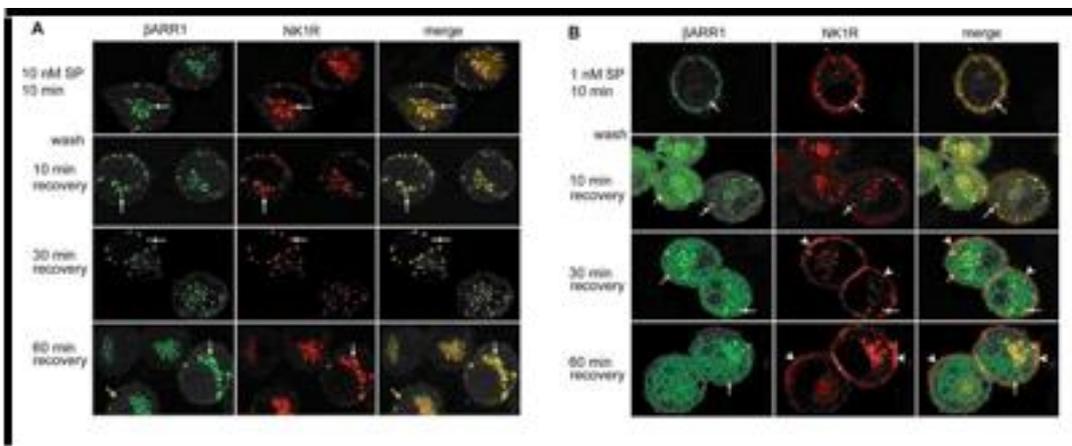


Figura 19. La SP estimula el tráfico de β -arrestina 1-GFP. Las células son incubadas con 10 nM (secuencia A) o con 1 nM (secuencia B) de SP durante 10 minutos a 37°C. A continuación se lavan y se incuban de nuevo por un periodo entre 0 y 60 minutos a 37°C. Posteriormente se fijan y se realiza la localización mediante inmunofluorescencia del NK-1R y de la β -arrestina. La estimulación con 10 nM de SP induce una endocitosis mediada por β -arrestina 1 y NK-1R tanto en la membrana plasmática como en los endosomas perinucleares durante al menos 60 minutos. Tras este periodo se constata que la β -arrestina vuelve parcialmente hacia el citosol. Así mismo, la estimulación con 1 nM de SP induce una respuesta de menor intensidad a la anterior, así, se produjo la endocitosis de β -arrestina 1 y el NK-1R en las últimas fases del experimento. Se constató además una mínima depleción de β -arrestina 1 en el citosol. Tras 30 minutos el NK-1R se detectó en la membrana celular de nuevo. Imagen procedente de Graddy et al.²⁰⁸).

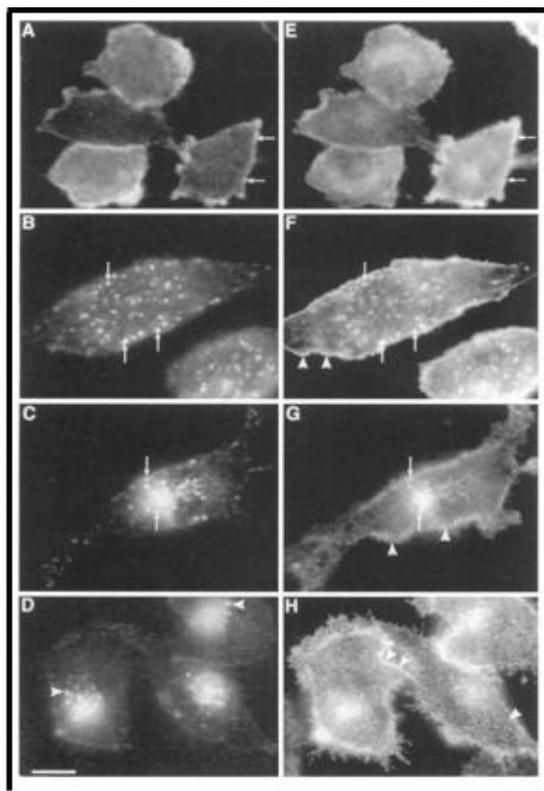


Figura 20. Detección de la inmunorreactividad de cy3-SP (paneles de la izquierda) y NK-1R (paneles de la derecha). Las células se incubaron con 100 nM de cy3-SP durante 60 minutos a 4°C, posteriormente fueron lavadas y vuelta a incubar con un medio sin SP durante 0 minutos (A y E), 10 minutos (B y F), 30 minutos (C y G) y 120 minutos (D y H). A continuación fueron fijadas y mediante inmunorreactividad se localizó a cy3-SP y NK-1R. Ambas moléculas se expresan en la misma localización excepto a los 120 minutos cuando se aprecia que la SP se queda internalizada en la célula mientras que el NK-1R va volviendo a la membrana celular. Imagen procedente de Graddy et al. ²⁰¹.

Se ha podido demostrar que el NK-1R y la SP, mediante un mecanismo dependiente de clathrina en los denominados endosomas tempranos son rápidamente internalizados. En estado basal, en ausencia de SP, el NK-1R se encuentra en la membrana plasmática. Tras la exposición de las células a la SP, el receptor y ésta se agrupan en dicha membrana desplazándose de manera conjunta hacia el interior de la célula por medio de endocitosis conformando los endosomas tempranos. Para demostrar que este mecanismo es dependiente de clathrina se modificó el medio añadiendo sustancias que bloquean la endocitosis por esta vía, como son la sucrosa hiperosmolar o deplecionando potasio. No obstante, es posible que éste no sea el único mecanismo de entrada como así aseguran los autores de dicho estudio. Varios minutos tras la administración de SP no se detecta ésta en la superficie celular, por el contrario, los estudios mediante anticuerpos dirigidos frente al NK-1R indican una parcial internalización de dicho receptor. La discrepancia entre la internalización casi completa del ligando frente a la parcial del receptor, podría estar relacionado con el estado de afinidad del receptor. Únicamente aquellos receptores con una alta afinidad para

su ligando serían internalizados quedando remanentes en la membrana plasmática aquellos con menor afinidad. Una vez que el complejo SP/NK-1R se internaliza, se dirige a la región perinuclear donde se va a producir una acidificación del endosoma hasta llegar a un pH inferior a 6,2 a partir del cual la SP se disocia del receptor. A las 4 horas tras la liberación de SP, se comprueba que los receptores NK-1R aparecen en la membrana plasmática de nuevo. Esto puede ser explicado mediante tres teorías: 1) La inserción de receptores preformados, 2) La síntesis de nuevos receptores, 3) El reciclaje de los receptores internalizados. La primera posibilidad no puede ser descartada del todo, aunque los estudios realizados en el estadio basal no mostraron NK-1R en el interior de la célula en tanta cantidad que nos hagan pensar en esta posibilidad. En contra de la segunda posibilidad aparece el hecho de que la ciclohexamida, un inhibidor de la síntesis proteica, no evita la aparición de los receptores en la membrana plasmática. Por último, la teoría del reciclaje se fundamenta en que el uso de agentes que previenen la acidificación de las organelas (bafilomicina A, monesina, cloroquina y NH_4Cl) reduce de forma sensible la reaparición de los receptores en la membrana plasmática. El ligando por el contrario va a sufrir una degradación enzimática en el interior de los endosomas ya que no aparece 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 respuesta de la SP; de este modo, tras la internalización de los mismos, la célula se hace insensible a la SP, volviendo a responder a ésta tras el reciclaje de los receptores en su vuelta a la membrana plasmática. De este modo, en la respuesta celular frente a la SP, se consigue la regulación.

1.8. FUNCIONES DE LAS TAQUICININAS Y SU DISTRIBUCIÓN.

1.8.1. EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Tanto en los cuerpos celulares como en las fibras nerviosas, el SNC presenta una gran inmunorreactividad para la SP. La NKA tiene una distribución similar a la de la SP. Respecto a la NKB no se conoce la distribución exacta con el mismo grado de detalle que el resto. Las taquicininas están implicadas además de su papel como transmisor sensorial, en una variedad de funciones como el control de las actividades motoras, funciones autónomas y endocrinas, así como procesamiento de la memoria^{209,210,211,212,213}.

1.8.1.A. NEOCORTEX.

Si nos fijamos en el neocortex, la SP se encuentra a bajas concentraciones; no obstante, existen determinados estudios²¹⁰ que otorgan a la SP papel más relevante del que se había asumido. En el neocortex de monos se ha determinado la existencia de dos tipos de células que presentan inmunorreactividad para la SP y NKA. El primer grupo de células, de menor cuantía pero mayor tamaño, tiñe intensamente tanto para las taquicininas como para somatostatina y NPY. El segundo grupo, más abundante que el anterior, pero de menor tamaño, tiñe débilmente para las taquicininas, presentando además inmunorreactividad para el GABA. El primer grupo está presente en las capas II, III y VI, así como en la sustancia blanca adyacente al córtex. El segundo grupo celular se encuentra en las capas IV y V. Respecto a las fibras nerviosas, se aprecia que se tiñen para las taquicininas en todas las capas del neocortex. El NKB está presente en grandes concentraciones en las capas IV y V de los cerebros de ratas.

Mediante iontoforesis se ha podido comprobar que la SP induce una excitación prolongada de las neuronas corticales de ratas, en especial de las capas V y VI. Otros estudios²¹⁵, muestran que la privación visual produce una disminución de la inmunorreactividad de taquicininas en las neuronas del córtex visual en monos. Esto sugiere que cambios en la percepción sensorial pueden inducir cambios en la síntesis de neurotransmisores como las taquicininas en la corteza cerebral²¹⁶.

1.8.1.B. NÚCLEOS CAUDAL Y PUTAMEN.

Los núcleos estriados muestran altos niveles de inmunorreactividad a SP. La tinción se lleva a cabo en los axones terminales y en los cuerpos neuronales. Existen dos tipos de neuronas en los núcleos estriados de ratas que tiñen para SP: por un lado, neuronas de mediano tamaño, espiculadas. El otro grupo de neuronas, de menor número y no espiculadas, conforman los circuitos neuronales locales del núcleo.

Del total de las neuronas de los núcleos estriados de ratas, tres cuartas partes aproximadamente son catalogadas del primer tipo, espiculadas y proyectadas hacia la sustancia

negra, el área tegmental ventral y el globo pálido. Los núcleos estriados de los mamíferos están compuestos por dos compartimentos distintos, la matriz y el estrioso. Estos compartimentos están dispuestos como un mosaico y presentan diferentes propiedades neuroquímicas. El estrioso presenta menor nivel de acetilcolinesterasa que la matriz y altos niveles de SP, dinorfina y encefalina así como endopeptidasas las cuales degradan estos péptidos. Contiene altos niveles de dopamina y receptores muscarínicos, además.

Diversos estudios indican la existencia en este núcleo de grandes concentraciones del NK-1R presentando por el contrario muy bajos niveles para NK-2R Y NK-3R^{217,218,219}.

1.8.1.C. GLOBO PÁLIDO.

El principal origen de la SP en el globo pálido proviene de la proyección existente a través de las neuronas del núcleo estriado. En los primates, el segmento interno del globo pálido y el pálido ventral se encuentra ocupado por una estrecha red nerviosa muy inmunorreactiva a SP; por el contrario, el segmento externo presenta, para ésta, una tinción muy débil. Así como las fibras nerviosas tiñen para SP, los cuerpos celulares de primates no presentan inmunorreactividad para este neuropéptido. Los terminales nerviosos que presentan reactividad para la SP, dinorfina o encefalina en el globo pálido muestran una morfología característica en ovillo de lana donde los terminales nerviosos peptidérgicos envuelven a las dendritas receptoras por completo^{220,221}.

1.8.1.D. SUSTANCIA NEGRA.

La sustancia negra es de las zonas que mayor concentración de SP posee de todas las regiones cerebrales. Se ha podido observar esta distribución en cerebro de ratas donde se aprecia una intensa inmunorreactividad en las fibras nerviosas así como en dos diferentes tipos de botones sinápticos. La pars compacta de la sustancia negra es una de las principales fuentes productoras de dopamina; estas áreas se proyectan hacia el núcleo estriado y otras áreas del SNC. Se ha podido comprobar mediante microscopía electrónica que los terminales que presentan inmunorreactividad positiva para SP hacen sinapsis directamente con las células dopaminérgicas de la sustancia negra. El hecho de que la SP active las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales se ha visto reforzado por varios estudios²²².

La infusión de SP en la sustancia negra produce un incremento marcado de los comportamientos estereotipados de las ratas como son el olisqueo y el aseo, siendo éstos bloqueados con la infusión de 6-hidroxidopamina en el núcleo caudado. Una inyección intranigral de SP produce una elevación de los niveles de dopamina así como de ácido homovanílico en el ganglio estriado ipsilateral. El hecho de que una inyección intranigral de GABA y dinorfina A produzcan una disminución de la liberación de dopamina en el núcleo estriado sugiere que la SP

actúa como un neurotransmisor estimulador de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, mientras que el GABA y la dinorfina A actúan como inhibidores.

Existe un mecanismo de *feedback* opuesto de la dopamina sobre la SP. Los axones dopaminérgicos contactan directamente con las neuronas productoras de SP que se hallan en el núcleo estriado. La administración de un agonista indirecto de la dopamina o bien la administración de un inhibidor de su recaptación va a producir una elevación de la SP en la sustancia negra. Por otro lado, el bloqueo de las sinapsis dopaminérgicas mediante un antagonista de la dopamina va a producir una disminución de los niveles de SP en la sustancia negra.

Se ha comprobado cómo en la enfermedad de Párkinson²²³, donde existe una menor concentración de dopamina en la sustancia negra, existe una disminución de la concentración de SP.

Tanto la sustancia negra como el área tegmental ventral contienen también NKA. Aunque su distribución es similar a la de la SP, la cantidad de esta taquicinina es levemente inferior a la SP. La NKA tiene una acción excitatoria sobre las neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas de la sustancia negra. Lévesque et al afirman que el sistema de regulación de la vía dopaminérgica no es el mismo para la NKA que para la SP²²⁴.

1.8.1.E. HIPOCAMPO.

Dentro del hipocampo, las fibras nerviosas que contienen SP se hallan principalmente en las capas piramidal y granular, en cambio, los cuerpos neuronales que expresan alrededor de su núcleo SP se hallan principalmente en la capa polimórfica. A pesar de que las concentraciones de SP en los mamíferos son bajas en esta región, son de 2 a 10 veces superiores que en otras áreas corticales de monos y humanos. Además se ha demostrado la existencia de receptores para las taquicininas.

El hipocampo y la amígdala están implicados en diversas funciones relacionadas con la memoria; así, algunos estudios realizados con ratones sometidos a descargas eléctricas muestran una mayor retención de memoria tras la administración intracerebral de taquicininas^{225,226,227}.

Se piensa que el origen de las terminaciones nerviosas que contienen SP puede ser el núcleo supramamilar y el hipotálamo posterior.

1.8.1. F. NÚCLEOS DE LA ESTRÍA TERMINAL Y AMÍGDALA.

La amígdala y los núcleos del lecho de la estría terminal están relacionados con la regulación del comportamiento sexual, habiéndose detectado así una concentración y distribución diferente de SP entre ambos sexos. Las ratas hembra presentan menor nivel de SP en estas áreas que los machos, además, las áreas que presentan una gran densidad de SP son dos veces mayores

en ratas macho que en hembras. La castración de machos adultos produce una disminución de la inmunorreactividad de la SP en la amígdala^{228,229}.

La concentración de SP en la amígdala cerebral es considerablemente alta en las ratas, no así en humanos donde su concentración es bastante baja. El área entre el núcleo amigdal central y medial es donde se encuentra la mayor cantidad de células positivas para SP. Estas neuronas no solo conforman un denso plexo intrínseco en la amígdala sino que proyectan haces hacia el lecho de la estría terminal y el hipotálamo lateral. Se ha demostrado además la presencia de receptores de las taquicininas en estas áreas.

1.8.1.G. EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO.

El hipotálamo de los mamíferos contiene altas concentraciones de SP, de hecho esta sustancia fue aislada por primera vez en extractos hipotálamo de bovino. La distribución de la SP en el hipotálamo varía mucho entre cada especie. En humanos, la región tuberal basal es la zona más rica en SP. El origen de las fibras nerviosas que contiene SP no se conoce del todo aunque se piensa que procede de la amígdala²³⁰.

Mediante microscopía electrónica algunos estudios²³¹ han demostrado la existencia de axones inmunorreactivos a SP contactando con la lámina basal de los capilares en el sistema portal hipotalámico en la eminencia mediana.

El lóbulo hipofisario anterior contiene una gran cantidad de fibras portadoras de SP que se localizan alrededor de las células hipofisarias.

Se ha demostrado, mediante inmunofluorescencia²³² la existencia de receptores de la SP en estas células. La aplicación intraventricular de SP, en ratas, produce una inhibición de la liberación de la hormona de crecimiento, mientras que la aplicación de un antagonista produce el incremento de los niveles plasmáticos de esta hormona. La SP produce una elevación en plasma de prolactina²³³.

En la rata, la inyección intracerebroventricular de SP produce una típica respuesta de defensa basada en aumento de la presión sanguínea, frecuencia cardiaca, actividad simpática eferente y vasoconstricción visceral. Aumento en el estado de conciencia, aumento de motricidad, arañazos, mordiscos y aseado. La parte anterior y ventromedial del hipotálamo es considerada la zona diana donde afecta la SP, se ha demostrado que la microinyección de SP en estas áreas evoca respuestas similares.

La SP puede tener un papel muy importante en el control del comportamiento sexual. Existen gran cantidad de neuronas inmunorreactivas para SP que contienen receptores para estrógenos en los núcleos hipotalámicos ventromediales de ratas hembra. Se ha demostrado que

estos núcleos son diana de la acción de las hormonas que regulan el comportamiento sexual. En las ratas macho, la inyección de antagonistas de la SP en la región preóptica anterior del hipotálamo inhibe la respuesta sexual mientras que la aplicación de SP la estimula^{234,235}.

Respecto a los cuerpos neuronales, prácticamente el 100% de ellos expresan SP en su interior. Todas las regiones del tálamo presentan fibras nerviosas que contienen SP, a excepción de los núcleos centromediales y posterolaterales, pudiendo proceder estas fibras del hipotálamo, regiones pretalámicas y terrenos del cerebro medio²³⁶.

1.8.1.H. NÚCLEO ESPINAL DEL TRIGÉMINO.

En la sustancia gelatinosa del núcleo espinal del trigémino en ratas, es similar la distribución de SP a la que se puede observar en la médula espinal. La distribución principal de estas fibras competen a la lámina I y II. En pacientes sometidos a una neurotomía trigeminal se objetiva una disminución de la captación de SP en dicho núcleo, lo que indica que las fibras positivas para SP se originan principalmente en neuronas primarias aferentes cuyos cuerpos ganglionares se hallan en el ganglio de Gasser. Tras una estimulación eléctrica de la pulpa dental en los conejos se objetiva un incremento de los niveles de SP en el núcleo trigeminal espinal; por el contrario, la aplicación local de morfina en dicha región produce el efecto contrario. Esto sugiere que el efecto analgésico de los opioides está modulado en parte por la SP al reducir la liberación de SP por las neuronas primarias aferentes.

Determinados estudios indican que la liberación de SP tanto a nivel central como periférico por las terminaciones nerviosas produce también una autoactivación de dichas terminaciones inducidas por una actividad autorreceptora de la SP^{237,238,239}.

1.8.1.I. NÚCLEO DORSAL DEL VAGO, GANGLIO VAGAL Y GANGLIO GLOsofaríngeo.

Tanto en gatos como en ratas, se ha detectado la presencia de varicosidades y cuerpos celulares positivos a SP en el núcleo dorsal del vago²⁴⁰.

En conejos, los ganglios glossofaríngeo y vagal, poseen gran cantidad de cuerpos neuronales positivos a SP²⁴¹.

1.8.1.J. GANGLIOS AUTÓNOMOS PREGANGLIONARES.

En la médula torácica y lumbar la principal localización de las neuronas simpáticas preganglionares es el núcleo intermediolateral. Este núcleo se tiñe intensamente para SP en numerosas especies de mamíferos. Se han hallado además NK-1R en esta área. La aplicación de SP en este núcleo induce una actividad excitatoria. La administración intratecal de SP produce un

aumento de la tensión arterial y taquicardia. Esta reacción se ve acompañada de una elevación de los niveles de epinefrina y norepinefrina en plasma. Se piensa por tanto que estos dos neurotransmisores median la actividad de la SP a este nivel.

Los núcleos parasimpáticos sacros, regulan las funciones del tracto urinario bajo, el intestino grueso y los órganos sexuales. Se han observado también tanto fibras que contienen SP como receptores^{242,243}.

1.8.1.K. NÚCLEOS MOTORES CRANEALES Y NÚCLEOS DE ASTA ANTERIOR DE LA MÉDULA.

Mediante microscopía electrónica, se ha comprobado que las fibras nerviosas que contienen SP hacen sinapsis con las dendritas de las motoneuronas de la médula espinal así como del núcleo del hipogloso. Se piensa que las taquicininas juegan un papel importante en la regulación de ciertos núcleos motores ya que la aplicación mediante iontoforesis de SP sobre las motoneuronas de gatos induce la despolarización de las mismas. El asta anterior de la médula contiene gran cantidad de SP y en esta región el origen de estas fibras procede del núcleo del rafe de la médula. Una hemitransección en C1 provoca una disminución de aproximadamente el 70% de la SP en C6-C7 ipsilateral. Otra fuente puede ser las neuronas aferentes primarias ya que la neurectomía a nivel dorsal provoca una disminución de los niveles de SP^{244,245}.

1.8.1.L. GLÍA.

Se piensa que la SP y la NKA podrían tener un papel en la regulación de la respuesta glial frente al daño del SNC. Recientes estudios indican la existencia de receptores de taquicininas en líneas celulares de glía, astrocitos y líneas celulares de astrocitomas^{246,247}.

1.8.2. LAS TAQUICININAS EN TEJIDOS PERIFÉRICOS.

La SP puede aparecer o bien en el interior de fibras nerviosas o bien sin relación con células neuronales, a lo largo de los tejidos periféricos. En el primer caso, las fibras suelen proceder de ramas periféricas de neuronas primarias aferentes cuyos cuerpos celulares se encuentran en los ganglios existentes en la raíz de la espina dorsal. Otras proceden de neuronas de los ganglios entéricos. Por último y en menor cuantía, están las que proceden de los ganglios autónomos. Las neuronas que se encuentra en la retina son un caso especial²⁴⁸.

1.8.2.A. OJO.

POLO ANTERIOR.

En diferentes regiones del polo anterior del ojo como la cornea, iris y cuerpo ciliar, se ha podido documentar la existencia de neuronas inmunorreactivas para SP en numerosas especies. El

hecho de que en conejos, ratas y ratones se produzca una disminución de la concentración de SP al inducir una denervación quirúrgica del trigémino, indica que las fibras nerviosas existentes tienen como origen este nervio. Las fibras existentes en el iris proceden de las neuronas parasimpáticas procedentes de los nervios ciliares y estas neuronas expresan igualmente SP en sus fibras.

La irritación mecánica, química o bien por medio de la estimulación antidrómica del trigémino produce una reacción caracterizada por miosis, hiperemia conjuntival e iridial, ruptura de la barrera hematoacuosa y elevación de la presión intraocular. Existen muchas pruebas que inducen a pensar que esta reacción podría estar mediada por la SP. La inyección intraocular en el conejo de SP induce miosis, extravasación de proteínas hacia el humor acuoso y una elevación de la presión intraocular; así mismo, la inyección de un antagonista de la SP induce la respuesta contraria en aquellos casos de traumatismo ocular, estimulación antidrómica del nervio trigémino o tras la inyección de SP intraocular. Se ha visto como la SP induce una contracción del músculo esfínter del iris, y como con la aplicación de un antagonista de la SP es revertida esta acción^{249,250}.

RETINA.

La retina de mamífero contiene SP, NKA, NKB y NPK.

Zalustsky y Miller ²⁵¹ demostraron que pequeñas cantidades de SP (<1 micromolar) excitaban al 78% de las células ganglionares de conejos, produciendo además una despolarización de algunas células amacrinas. La NKA produce la misma acción que la SP.

Se ha demostrado que el uso de antagonista de la SP no produce una alteración en las propiedades receptoras de las células ganglionares, sino que se piensa más bien que pudiera tener una acción moduladora de la excitabilidad de estas neuronas actuando como cotransmisor principalmente del GABA. Pero también de otros neurotransmisores^{252,253}.

1.8.2.B. VÍA AERO-DIGESTIVA SUPERIOR.

CAVIDAD ORAL.

Los niveles de SP en estos tejidos son de los más altos a nivel periférico. Se piensa que la SP podría tener un papel predominante en la transmisión del dolor a este nivel así como cierto papel en la respuesta vasodilatadora que acompaña a esta sensación. A estas conclusiones se han llegado mediante la estimulación antidrómica del trigémino y la aplicación de antagonistas de la SP^{59,254}.

LENGUA.

Se ha detectado la existencia de fibras que contienen SP en la lengua de humanos, ratas y gatos. En los humanos, la región apical del epitelio lingual contiene fibras inmunorreceptoras para SP que median la sensación de quemazón que aparece con la capsaicina o la pimienta^{56,255}.

Se piensa que en la fisiopatología del síndrome de la boca-lengua urente, la SP y la CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) pueden tener un papel relevante en este sentido^{256,257}.

GLÁNDULAS SALIVARES.

Se ha podido comprobar como las ratas tienen una concentración muy superior en estas regiones que en el resto de los tejidos periféricos, así mismo estos hallazgos, pero en menor cuantía, pueden extrapolarse al perro y ratón. Entre todas las glándulas salivares de ratas, la que mayor cantidad de SP tiene son las parótidas seguidas de submandibulares y submaxilares. Se ha comprobado así mismo la existencia de NKA en las glándulas salivares de las ratas. La función de las fibras sensoriales que contienen SP no está del todo clara. La SP tiene una potente acción estimuladora de la salivación en ratas, perros, hurones y cobayas. En cambio esta acción no se objetiva en ratones, hámster, gatos y conejos. Esta acción, se comprueba también al administrar NKA. Se ha podido comprobar que la aplicación de capsaicina en la parótida de rata, tanto *in vivo* como *in vitro* induce un pequeño incremento en la secreción salivar. Esto hace pensar que dicha inervación contribuye al mecanismo de salivación mediado por taquicininas. Varios estudios han podido dilucidar que en las glándulas salivares de hurones y ratas, la SP junto con la acetilcolina se liberan por medio de las fibras parasimpáticas, mientras que la acetilcolina es responsable del mayor componente de la respuesta secretora neuromediada, las taquicininas y posiblemente otros péptidos²⁵⁸.

FOSAS NASALES.

En el tracto respiratorio de numerosos mamíferos se ha demostrado la presencia de SP y de NKA. En la mucosa nasal, las fibras que contienen SP se encuentran, a nivel intra e infraepitelial, alrededor de arterias, arteriolas, vénulas y glándulas exocrinas. En la mucosa nasal de los gatos la mayoría de estas fibras también contienen CGRP, estando el origen de estas fibras en el ganglio de Gasser^{259,260,261}.

LARINGE.

En la capa mucosa se encuentra la inervación sensitiva de la laringe. Existen numerosas terminaciones de fibras nerviosas tanto mielínicas como amielínicas que, partiendo de la capa submucosa forman un plexo que se dirige hacia el epitelio. Lima-Rodríguez y Nunes²⁶² estudiaron la distribución de la SP y CGRP en este tejido demostrando que este plexo nervioso contiene ambos neuropéptidos, estimando que llevarían a cabo funciones relacionadas con la nocicepción. En ratas se ha encontrado un plexo nervioso con fibras inmunorreactivas para SP y CGRP repartido por toda la superficie del epitelio. Este plexo nervioso es particularmente abundante en los ventrículos presentando además una densidad mayor en los territorios dorsales que en los ventrales. La epiglotis es también una zona con una gran inervación por estos neuropéptidos. La red nerviosa

intraepitelial deriva de los troncos nerviosos que lindan con las capas profundas del epitelio y que provienen del tejido conectivo subyacente a través de la lámina propia. El plexo se distribuye por todo el grosor del epitelio y, a diferencia de en humanos, las fibras alcanzan la superficie epitelial. La única diferencia entre la expresión de CGRP y SP es que esta última es de menor intensidad que la primera pero ambas poseen la misma localización (figura 21).

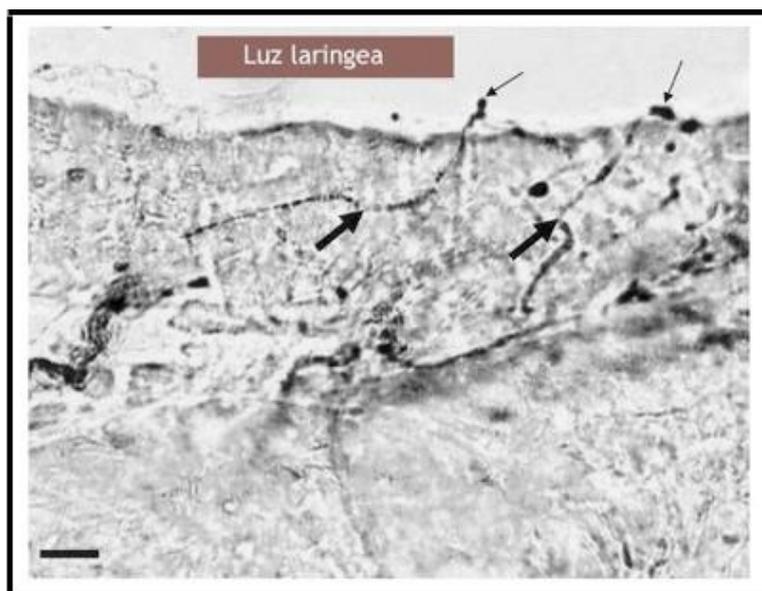


Figura 21. Inmunorreactividad de la SP en fibras nerviosas de mucosa laríngea. Las flechas indican las terminaciones nerviosas. Imagen procedente de Lima-Rodrigues et al.²⁶².

1.8.2.C. TRACTO GASTROINTESTINAL.

Se sabe que la SP y la NKA se expresan en distintas vías neurales a lo largo del tracto digestivo de mamíferos. Estos datos están apoyados por los estudios llevados a cabo por Holzer y Holzer-Petsche^{263,264} por un lado y Furness y Corta por otro²⁶⁵. La liberación de taquicinas bien por neuronas intrínsecas entéricas, bien por neuronas aferentes primarias va a producir una respuesta eferente mediada a través de tres receptores diferentes de neurokininas. Estos receptores: NK-1R, NK-2R y NK-3R, se encuentran en las neuronas entéricas, el músculo intestinal, el epitelio, el sistema vascular y el sistema inmunitario entérico, cada uno dispuesto de tal manera que permite a la SP y a la NKA influir sobre la secreción de electrolitos y fluidos y mediar la respuesta inmune y vascular, y también sobre la motilidad intestinal.

En el intestino el papel principal de las taquicinas es regular la motilidad. Las taquicinas tienen la función tanto de estimular como de inhibir la motilidad intestinal y dicha acción es llevada a cabo mediante el tipo y la localización de los receptores de taquicina. Respecto a la estimulación de la contracción, los NK-1R abundan principalmente en las células intersticiales de Cajal mientras que los NK-2R están presentes en las células musculares. Los NK-3R por su parte

se encuentran diseminados por todas las neuronas entéricas y median predominantemente la acción constrictora de la musculatura intestinal mediada por un mecanismo colinérgico. Por otro lado, la SP y NKA pueden producir una depresión motora a través de la liberación de transmisores con función inhibitoria como el óxido nítrico, efecto mediado principalmente por los NK-1R y NK-2R.

Las taquicininas también participan en el control neural de la actividad secretora del intestino por medio de los NK-1R y NK-2R actuando sobre los enterocitos estimulando la secreción tanto de ácido clorhídrico como de bicarbonato. Además la SP y el NKA, por mediación de los NK-1R y NK-3R existentes en las neuronas entéricas van a participar en la función de las neuronas secreto-motoras que causan una secreción de iones medida por la liberación de acetilcolina o el péptido vasoactivo intestinal. Por otro lado, las taquicininas también pueden ser liberadas desde los axones de las neuronas entéricas cercanas a las células epiteliales induciendo la liberación de clorhídrico a través de un mecanismo tipo reflejo axonal.

Tanto la estimulación química como mecánica de la mucosa, así como la distensión de la musculatura producen una excitación de las neuronas primarias sensitivas que se encuentran en el plexo mioentérico. Esta respuesta va a producir la liberación de taquicininas produciendo una actividad excitadora ascendente y una inhibición motora descendente mediada principalmente por el NK-3R.

1.8.2.D. SISTEMA HEPATOBILIAR.

En la vesícula, las fibras que contienen SP predominan en los plexos ganglionares y musculares. La inyección intravenosa de SP en perros produce una disminución del flujo biliar basal unido a una disminución en la excreción de ácidos biliares y electrolitos. En el hígado, estas fibras aparecen tanto en el parénquima como en el tejido conectivo, así como en el sistema vascular hepático. La SP además tiene la propiedad de bloquear la secreción de bilis inducida por la colecistoquinina. Las fibras aferentes procedentes del vago, las cuales expresan SP, producen mediante estimulación colinérgica una contracción de la musculatura lisa de la vesícula biliar. La NKA posee una actividad mucho más intensa que la SP en esta región, lo que sugiere que debe existir una gran cantidad de NK-2R. Estudios demuestran que la SP y la capsaicina producen una estimulación del nervio esplénico que induce una extravasación plasmática en las vesículas de los cobayas por esto se piensa que las taquicininas pueden estar relacionadas con la inflamación existente por una colecistitis^{266,267}.

1.8.2.E. PÁNCREAS.

Se ha comprobado la existencia de fibras inmunorreactivas a SP tanto en ratas como en cobaya en el páncreas. Existe una distribución dual de estas fibras, esta distribución doble sugiere

que las fibras median funciones diferentes. Por un lado, las de origen extrínseco, provenientes de los ganglios dorsales de la médula espinal y las de origen intrínseco, procedentes de los cuerpos neuronales del ganglio local. Las primeras se distribuyen alrededor de los vasos sanguíneos, de los acinis y del ganglio local. Las segundas se distribuyen en los islotes de Langerhans y alrededor de los ductos pancreáticos.

La SP es un potente inhibidor de la secreción de las células ductales en ratas por un lado, y un débil estimulante de la secreción de amilasa de las células acinares de otras especies.

Respecto a la función en el páncreas endocrino su respuesta es variable. En los perros estimula la producción tanto de insulina como glucagón, mientras que en las ratas se produce el efecto contrario^{268,269}.

1.8.2.F. APARATO RESPIRATORIO.

Las taquicininas son unos de los agentes con mayor potencia broncoconstrictora de los que se conocen. Diversos estudios realizados en cobayas han demostrado que tanto el NK-1R como el NK-2R están relacionados con esta actividad.

En el árbol bronquial del cobaya y gato el origen de las fibras nerviosas proviene de la rama sensitiva del vago, por el contrario, en los pulmones el origen proviene tanto del nervio vago como del torácico espinal. En la vía aérea inferior de ratas y cobayas, se encuentran casi en su totalidad fibras que son positivas tanto para SP como para CGRP ²⁷⁰.

Se piensa que las taquicininas pueden tener un papel relevante en algunas enfermedades crónicas de la vía aérea como el asma. La exposición de la mucosa de la vía aérea de irritantes mecánicos o químicos, como la capsaicina, el humo del tabaco y la formalina produce una respuesta que consiste en broncoconstricción, estornudo, aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, secreción mucosa y estimulación de la actividad mucociliar²⁷¹. Esta respuesta puede reproducirse mediante la estimulación antidrómica de los nervios responsables.

Tanto la SP como la NKA producen un aumento en la permeabilidad vascular en la vía aérea de cobayas, una vasodilatación en el flujo nasal en gatos y dilatación de vascular broncopulmonar en perros. La SP es en este caso, más potente que la NKA y NKB para esta respuesta.

Tanto la SP como la capsaicina inducen a la producción de mucosidad nasal en ratas, esta acción es inhibida por un antagonista de la SP. La producción de mucosidad en la vía aérea tiene dos orígenes: las glándulas seromucosas a nivel submucoso y las células caliciformes de la capa epitelial. La SP también estimula la producción de moco en otros niveles como en la tráquea y los bronquios. A este nivel la SP es más potente que las otras dos taquicininas estudiadas.

Se ha detectado un incremento del aclaramiento mucociliar en relación con la SP. No obstante, estudios *in vitro* han demostrado que no se debe a una acción directa, sino que el origen es la estimulación de las neuronas postganglionares parasimpáticas eferentes. Esta respuesta también se ha obtenido mediante la estimulación con humo de tabaco, bradiquininas y capsaicina^{272,273,274}.

1.8.2.G. SISTEMA CARDIOVASCULAR.

CORAZÓN.

Existen numerosas localizaciones en las que se pueden encontrar fibras que contengan tanto SP como CGRP en el corazón. En algunos estudios realizados en cobayas^{275,276} se objetiva que en las paredes de las aurículas y ventrículos, las válvulas, las inmediaciones de vénulas, los vasos coronarios y las células cardíacas ganglionares se expresa SP. Otras especies estudiadas son los perros, los gatos, las ovejas, incluso en los humanos²⁷⁷.

Se sugiere que algunas de las fibras existentes podrían estar vinculadas con la transmisión del dolor que se produce en la isquemia cardíaca, la claudicación intermitente o en los aneurismas disecantes. La SP produce una intensa vasodilatación en las arterias coronarias de los perros, este fenómeno se ha comprobado también *in vivo* en humanos. El mecanismo de regulación del flujo por medio de la SP podría ser una respuesta autodefensiva frente a la isquemia cardíaca²⁷⁸.

VASOS SANGUÍNEOS.

La existencia de fibras inmunoreactivas para SP en la capa adventicia así como en el límite entre ésta y la capa media en varios vasos sanguíneos como las arterias cerebrales felinas, las arterias intestinales del cobaya y el sistema portal murino se demuestra en diversos estudios²⁷⁹. El origen principal de estas fibras perivasculares es sensorial.

La acción que la SP desarrolla es una potente vasodilatación, llevándose a cabo en el endotelio por medio de los NK-1R. Esta acción parece estar relacionada con la liberación por parte de las células endoteliales de algún factor relajante¹⁸².

CUERPO CAROTÍDEO.

La SP puede estar relacionada con el mecanismo desencadenado frente a la hipoxia tanto en el cuerpo carotídeo como el núcleo solitario^{280,281}. Existen gran cantidad SP que proviene de las células glómicas y las terminaciones nerviosas de las células sensitivas. La aplicación tanto de SP como de NKA produce una estimulación de los quimiorreceptores existente a este nivel; así mismo, la aplicación de un antagonista de las taquicinas, bloquea el estímulo ocasionado por la hipoxia sobre el cuerpo carotídeo.

1.8.2.H. SISTEMA UROLÓGICO.

RIÑÓN Y URÉTERES.

La SP es una de las moléculas con mayor poder vasodilatador y natriurético de los que se conocen. La infusión intrarrenal de SP produce un aumento del flujo renal, del volumen de orina y de la excreción de sodio en el gato. Por otro lado, produce un incremento del filtrado glomerular en conejos. Estos efectos están supuestamente relacionado con la acción vasodilatadora de la SP sobre el endotelio de las arteriolas aferentes del riñón. Se ha demostrado además que la SP induce la supresión de la liberación de renina.

La SP junto con CGRP se expresa en la pelvis renal y los uréteres en forma de una densa red de fibras nerviosas. Se localizan fundamentalmente cerca de las células del músculo liso, alrededor de los vasos sanguíneos y tanto intra como bajo el epitelio. Existen gran cantidad de varicosidades nerviosas alrededor de los vasos sanguíneos presentes en la cortical renal, a menudos cercanas a los túbulos y glomérulos renales. En el gato, el origen de estas fibras son los ganglios de la raíz dorsal en L1-L3.

Varios estudios muestran que la liberación de taquicininas en el sistema pieloureteral no sólo induce cambios inflamatorios ante un estímulo irritante, sino que además favorece la motilidad de la musculatura pieloureteral para favorecer la pronta eliminación de los irritantes^{282,283}. En los cobayas, tanto la SP como la NKA inducen un aumento del peristaltismo ureteral por medio de la contracción de las células musculares circulares presentes a este nivel.

VEJIGA URINARIA.

En la vejiga urinaria existen numerosas fibras nerviosas que contienen SP, NKA y CGRP en su interior. Éstas provienen principalmente de fibras sensitivas según los estudios que se han realizado en ratas y cobayas²⁸⁴.

Como en otras regiones, la SP estaría relacionada con la transmisión del dolor a este nivel en distintas patologías vesicales²⁸⁵. La aplicación local de taquicininas y capsaicina a este nivel produce contracción de la musculatura lisa de la vejiga, lo que indica que las taquicininas podrían estar relacionadas con el mecanismo reflejo de la micción. Esta contracción, mediada por los NK-1R y NK-2R, se debe a la actuación tanto de la SP como de la NKA sobre las células de la musculatura lisa mediante una acción directa y otra indirecta mediante la estimulación de neuronas parasimpáticas.

1.8.2.I. ÓRGANOS GENITALES.

En el útero, ovarios y vagina también se pueden encontrar fibras positivas para SP, NKA y CGRP. El origen de estas fibras son los ganglios de la raíz dorsal. A este nivel las taquicininas

producen un aumento de la vascularización así como induce la contracción uterina. Algunos estudios²⁸⁷ en ratas mediante la aplicación de capsaicina intratecal indican que la SP podría tener un papel importante en la fertilidad, ya que esta acción produjo una marcada reducción de la fertilidad en ratas^{287,288,289}.

En humanos la SP tiene una respuesta bifásica respecto a la motilidad de los espermatozoides, a bajas concentraciones ($4 \times 10^{-7} M$) produce un leve incremento, a altas concentraciones ($>10^{-6} M$) una marcada reducción de la motilidad²⁹¹.

La vesícula seminal, los testículos, el epidídimo y los vasos deferentes de ratas, gatos y cobaya contienen SP. Se ha encontrado también SP en las células de Leydig humanas. A este nivel, la SP estimula la contracción de los vasos deferentes y la vesícula seminal.

1.8.2.J. PLACENTA.

La SP y el receptor NK-1R están distribuidos ampliamente por el cordón umbilical y la placenta en humanos (figura 22). La concentración es mayor en la decidua y en los trofoblastos de las membranas coriónicas. También existe gran concentración, en las células endoteliales y en los miocitos de los vasos placentarios, tanto en arterias como en venas, de las membranas placentarias y el cordón umbilical^{292,293}.

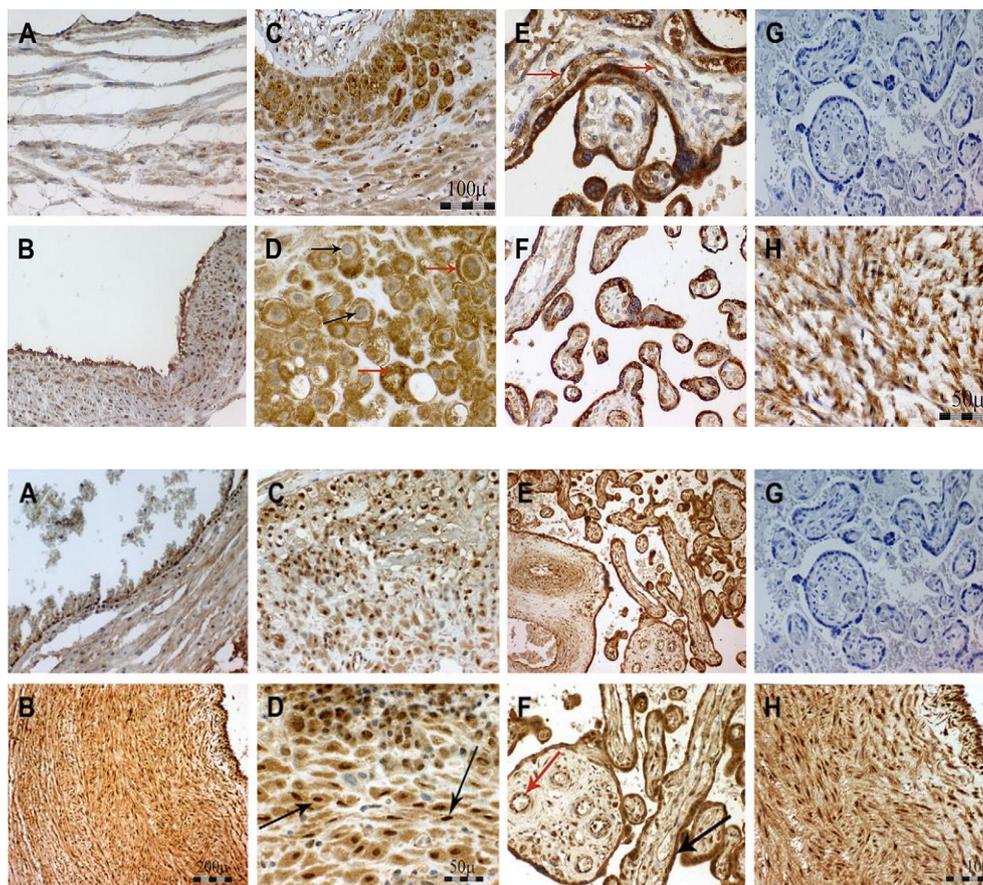


Figura 22. Inmunolocalización de NK-1R y SP en: A- receptores endoteliales de las células venosas placentarias; B- miocitos arteriales del endotelio placentario; C y D- decidua; E y F- en vellosidades coriónicas; G- control; H- miocitos.

Parece que existe un efecto vasodilatador inducido por SP, NK-B y por producción endógena de prostaglandinas por las células endoteliales de las venas del cordón umbilical. Parece que el sistema SP/NK-1R está envuelto en la regulación de la circulación feto-placentaria sobre todo en los grandes vasos del cordón umbilical (tanto arteria como venas).

La SP en el receptor NK-1R parecen tener también implicaciones en la regulación autocrina^{294,295,296,297}, paracrina^{292,298} y endocrina de la placenta. Tiene la capacidad de producir proliferación celular²⁹⁹ y neoangiogénesis³⁰⁰.

Por tanto, la disregulación de este sistema en la placenta puede estar implicado en la génesis de patologías durante el embarazo como la pre-eclampsia³⁰¹, parto pretérmino y abortos^{302,303,304}.

Las células de Hofbauer son macrófagos placentarios que se encuentran en el estroma de la membrana coriónica en íntima unión con los capilares fetales. Estas células modulan las vasculogénesis placentaria, induce proliferación celular y neoangiogénesis, expresando altos

niveles de factor de crecimiento placentario. En numerosas complicaciones durante el embarazo se ven alteraciones de la apariencia expresión y número de las células de Hofbauer.

Investigaciones recientes han demostrado la presencia de SP y receptor NK-1R en aproximadamente el 90% de todas las células de Hofbauer de la placenta. Tanto en el núcleo celular como en el citoplasma. Estos hallazgos sugieren que la SP está involucrada en la regulación biológica de las funciones de las células de Hofbauer y por lo tanto en el normal desarrollo y crecimiento placentario^{305,306,307,308,309,310}.

1.8.2.K. SISTEMA ADRENAL.

Las glándulas adrenales de numerosas especies de mamíferos expresan SP. Los humanos son los que lo hacen a mayor concentración sobre todo en la médula adrenal. En la cortical, las células cromafines también expresan SP, pero en menor medida.

Se ha comprobado que la SP tiene dos efectos en relación con la liberación de catecolaminas inducida por los agonistas nicotínicos. A altas concentraciones, la SP induce una inhibición en la liberación de catecolaminas. Mientras que a bajas concentraciones produce una protección contra la desensibilización de la respuesta nicotínica^{311,312}.

1.8.2.L. SISTEMA MÚSCULO ESQUELÉTICO.

MÚSCULO ESQUELÉTICO.

A este nivel expresan SP las fibras nerviosas de las fibras musculares y de los vasos sanguíneos. El músculo sóleo contiene 3 veces más SP que el músculo extensor digital largo y se piensa que el porcentaje de SP está en relación con lo marcada que sea la vascularización muscular.

La aplicación local de SP y NKA sobre la musculatura de conejos producen un aumento del flujo y la dilatación de las arteriolas transversas. Este mecanismo se encuentra bloqueado con la aplicación de antagonistas de las taquicininas. Lo que indica que la SP podría tener un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo hacia los músculos esqueléticos^{313,314}.

HUESO Y ARTICULACIONES.

La SP tiene un papel muy importante en la inflamación neurogénica así como la transmisión del dolor en procesos agudos como la artritis o degenerativos como la artrosis.

En el hueso se pueden encontrar fibras inmunorreactivas para SP y CGRP tanto en la cortical como en la médula ósea, así como en los tejidos blandos alrededor del hueso. Estas fibras son especialmente abundantes cerca de las epífisis y periostio. También son muy abundantes en la membrana sinovial así como en la red perivascular existente a este nivel en humanos. Se piensa que

la SP podría tener un papel regulador de la mielopoyesis ya que induce la proliferación de los progenitores fagocitarios procedentes de la médula ósea^{315,316}.

1.8.2.M. PIEL.

La sustancia P esta presente en las fibras C de la piel, lo cual indica que también cumple un papel en la nocicepción. Diversos estudios en humanos, muestran inmunorreactividad para SP en los terminales nerviosos de las fibras existentes en la dermis papilar y epidermis. También se objetiva en los corpúsculos de Meissner así como en las inmediaciones de las glándulas sudoríparas y los vasos sanguíneos^{317,318}.

1.8.3. TAQUICININAS EN LA INFLAMACIÓN Y EL SISTEMA INMUNITARIO.

Se sabe que las fibras C aferentes primarias están relacionadas con la inflamación y la respuesta inmunitaria, teniendo además un papel relevante en la patogénesis de las enfermedades alérgicas³¹⁹ e inflamatorias³²⁰, así mismo, pueden tener un papel relevante en la cicatrización de las heridas y el mantenimiento de la integridad tisular (figura 23 y 24).

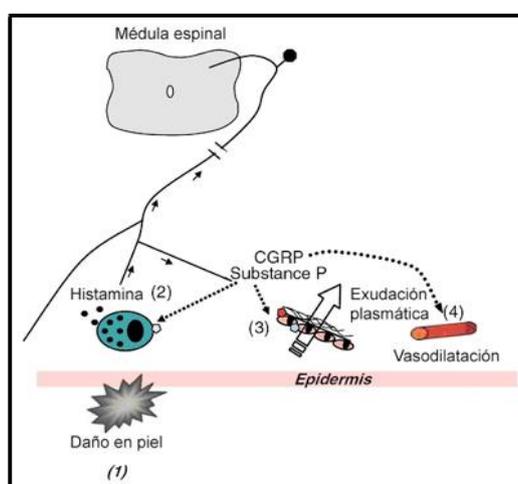


Figura 23. Esquema sobre los eventos que ocurren tras producirse un daño en la piel. Tras el daño (1) suele ocurrir una activación de los mastocitos y una liberación de histamina. Ésta activa los terminales de las neuronas sensitivas mediante el receptor de histamina 1 (2) de tal modo que produce una estimulación ortodrómica de la médula espinal y antidrómica alrededor de la piel afectada. Esto último produce la liberación de neuropéptidos a este nivel. La SP puede actuar por medio de los NK-1R en las células endoteliales de las vénulas o posiblemente estimulando la liberación de aún más histamina por parte de los mastocitos produciendo una extravasación plasmática donde ha ocurrido el daño (3). La SP puede incluso incrementar el flujo sanguíneo, no obstante, es el CGRP, actuando a través de su receptor el que produce una respuesta más potente y duradera de vasodilatación cutánea (4) y enrojecimiento alrededor de la herida. Imagen procedente de Brain y Cox³²¹.

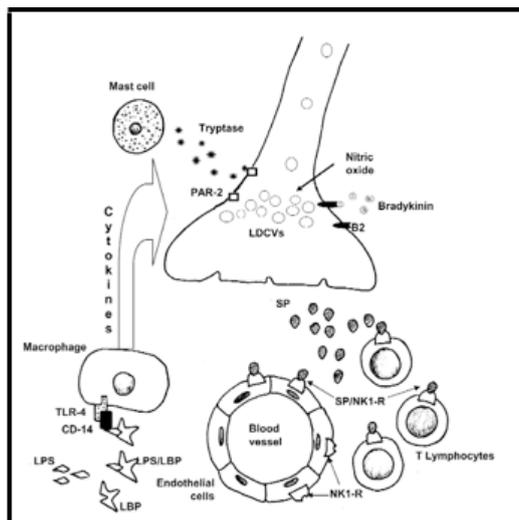


Figura 24. Factores que determinan la liberación de SP desde las terminaciones nerviosas sensitivas. La SP se libera a partir de la terminación nerviosa mediante la fragmentación del PAR-2 (receptor activado por proteasas-2) por medio de la triptasa. Además, la liberación es estimulada por otros factores como la unión de la bradiquinina con el receptor B2, la acción de las citoquinas o el óxido nítrico. La SP ya liberada se une al NK-1R que expresan las células endoteliales causando vasodilatación y formación de edema, ambos componentes característicos de la inflamación neurogénica. Además, la SP también reacciona con las células inmunitarias induciendo reacciones como la proliferación de los linfocitos T. Imagen procedente de Lundy et al³²².

1.8.3.A. INFLAMACIÓN.

CONTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS AFERENTES SENSIBLES A CAPSAICINA.

La triple respuesta cutánea desencadenada ante un daño mecánico, térmico o químico, descrita por Lewis³²³, consiste en la aparición de eritema local, tumefacción y la aparición de un halo alrededor del sitio del daño.

El eritema se debe a un aumento del flujo sanguíneo debido a la vasodilatación, la tumefacción aparece por el incremento de la permeabilidad venular lo que conduce a una extravasación plasmática y por último, el enrojecimiento perilesional se debe a una vasodilatación arteriolar secundaria a un reflejo axonal. Al realizar una estimulación de los nervios sensitivos (pulpa dental, piel, ojo, mucosa respiratoria, gastrointestinal o urogenital), ya sea antidrómica u ortodrómica, se produce una respuesta similar a la triple respuesta, lo que se denomina la inflamación neurogénica. Tanto la inflamación neurogénica, como la respuesta inflamatoria inducida por daño químico o térmico se reducen o incluso anulan mediante el pre-tratamiento con capsaicina; estos hallazgos indican que las fibras C nociceptivas sensibles a capsaicina están relacionadas con esta respuesta³²⁴.

EL PAPEL DE LAS TAQUICININAS EN LA INFLAMACIÓN.

La estimulación eléctrica, mecánica o térmica en la piel, el ojo, la pulpa dental y el pulmón, conducen a una liberación de SP por parte de las fibras nerviosas de esos tejidos³²⁵.

En la piel humana, al inyectar SP, se produce la clásica respuesta de eritema, tumefacción, dolor y picor. Por el contrario, la aplicación de NKA produce una respuesta mucho más débil que no incluye ni picor ni dolor. A nivel intravascular, la SP produce un aumento de la vasodilatación cutánea y de la extravasación plasmática³²⁶.

Se han utilizado varios antagonistas de la SP, incluidos anticuerpos anti-SP, obteniéndose como resultados una disminución de la respuesta inflamatoria frente a los mismos estímulos antes mencionados³²⁷. Todos los datos indican que las taquicinininas tienen un papel relevante en la inflamación.

TUMEFACCIÓN Y EXTRAVASACIÓN PLASMÁTICA.

A diferencia del eritema perilesional que induce la SP, la tumefacción solamente se inhibe con la aplicación de anestésico local. El tratamiento con antihistamínico no previene esta respuesta. En la piel de las ratas se ha comprobado que tanto la estimulación nerviosa como la inyección de SP producen un aumento de la permeabilidad venular induciendo una extravasación plasmática. Este efecto se supone que es mediado a través de una acción directa a través de los NK-1R existentes alrededor de los capilares venosos en la piel.

ERITEMA Y VASODILATACIÓN.

La vasodilatación que ocurre alrededor del sitio del daño cutáneo se debe al reflejo axonal producido por las ramas terminales de las neuronas sensoriales sensibles a la capsaicina. Se ha visto que esta respuesta es inhibida mediante el tratamiento con anestésicos locales o con capsaicina. Por otro lado, se piensa que esta respuesta inducida por la SP está en relación con la liberación de histamina. Ciertos estudios han demostrado que el uso de antihistamínicos reduce así mismo esta respuesta³²⁸. En estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha visto que la SP induce la liberación de histamina por parte de los mastocitos. El NKA tiene una acción similar pero mucho más débil. Esta actividad queda inhibida por el uso de antagonistas de la SP.

El dolor que acompaña la inflamación es un indicador de que se produce una excitación de neuronas nociceptivas. La histamina liberada por los mastocitos tiene la capacidad de estimular los terminales nerviosos de las fibras sensibles a la capsaicina desencadenando con ello el reflejo axonal. En estudios⁶⁹ *in vitro* se ha comprobado que estas neuronas excitadas por la histamina contienen en su interior SP y CGRP y que este efecto es llevado mediante los receptores de histamina H1.

Tras la activación del relejo axonal por medio de la histamina, se produce una liberación de SP (y otros péptidos) en los terminales nerviosos sensitivos. La SP liberada al medio supone a su vez un incremento recíproco en la liberación de histamina por los mastocitos. Estas mutuas activaciones de las fibras aferentes y los mastocitos tienen la función de prolongar y expandir la respuesta inflamatoria en cascada.

ACTIVACIÓN DE LEUCOCITOS.

La respuesta vascular lleva consigo una migración de los leucocitos a través de las paredes de los vasos hacia los tejidos inflamados produciendo un infiltrado de granulocitos y macrófagos. Tanto la denervación quirúrgica como el pretratamiento con capsaicina en ratas producen una disminución de la migración leucocitaria.

La aplicación de SP sobre músculo de conejo produce, además de la vasodilatación, una agregación plaquetaria y una migración de leucocitos a través de las paredes vasculares. Se piensa que la SP actuaría mediante dos mecanismos, por un lado, parece inducir cierta quimiotaxis leucocitaria y por otro el incremento de la permeabilidad vascular favorece la extravasación de leucocitos³²⁹.

Otros efectos demostrados son el incremento en la actividad fagocitaria de los macrófagos de cobayas, así como aumento de la liberación de enzimas lisosomales, anión superóxido y metabolitos del ácido araquidónico³³⁰.

La degranulación de mastocitos inducida por la SP también puede aumentar la migración leucocitaria³³¹.

1.8.3.B. SISTEMA INMUNITARIO.

La SP puede influir sobre los leucocitos a través de las citoquinas. No obstante, existen otros mecanismos como la estimulación directa sobre los linfocitos³³² (figura 25).

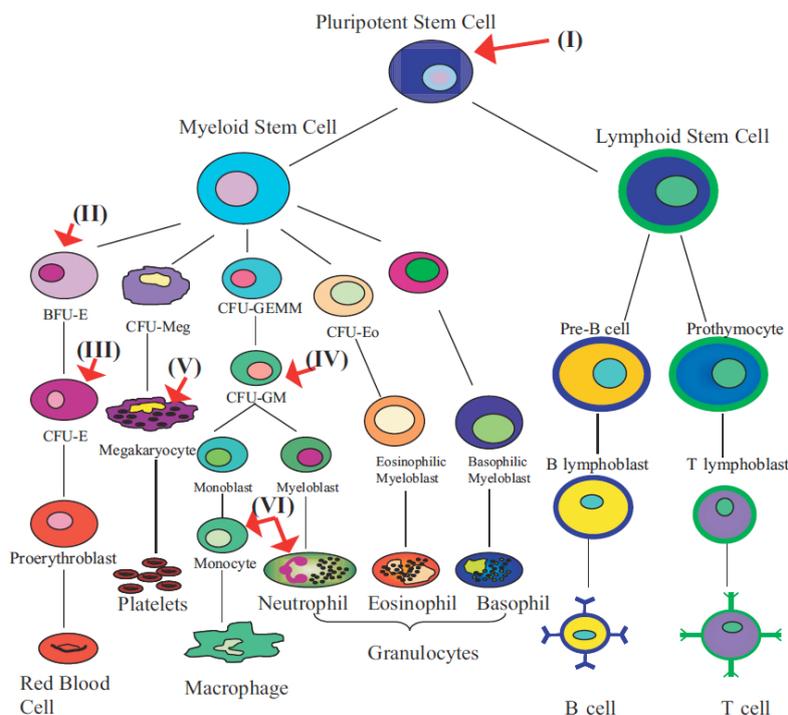


Figura 25. Resumen de las acciones hematopoyéticas de la SP y NKA. (I) La SP tiene un efecto estimulador sobre los progenitores primitivos de la m.o. (II) La SP estimula la proliferación de los progenitores eritroides precoces (BFU-E) y tardíos (CFU-E). (III-VI) La SP tiene un efecto sinérgico con diversas citoquinas para inducir la proliferación de las colonias mixtas mieloide-eritroide. Las flechas indican estimulación hematopoyética por la SP. Estos efectos son contrarrestados por la acción de la NKA y SP1-4. Imagen tomada de H. S. Kang et al., 2004, p. 341.

En la siguiente tabla se presenta el efecto de la SP sobre las distintas células del sistema inmunitario (tabla 5).

Linfocitos
Potente quimiotaxis.
Cofactor en la diferenciación a linfocito T.
Incrementa la secreción de inmunoglobulina.
Estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias de los linfocitos T.
Estimula la actividad de los linfocitos Natural Killer.
Estimula la proliferación de linfocitos T.
Los linfocitos pueden producir SP.
Monocitos/Macrófagos
Potente quimiotaxis.

Estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias.
Induce la "explosión oxidativa".
Estimula la síntesis y liberación de metabolitos del ácido araquidónico.
Los macrófagos expresan NK-1R y segregan SP.
Neutrófilos
Potente quimiotaxis.
Estimula la degranulación.
Incrementa la adherencia a células epiteliales (por medio de la regulación de la expresión de moléculas de adhesión).
Estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias.
Mastocitos
Media entre los mastocitos y las terminaciones nerviosas.
Induce la degranulación.
Induce la liberación de histamina y serotonina.
Estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias.
Eosinófilos
Potente quimiotaxis.
Estimula la activación, degranulación, liberación de O ₂ ⁻ y tromboxano.
Los eosinófilos pueden segregar SP.

Tabla 5. Efectos de la SP sobre las células del sistema inmunitario.

Tanto *in vitro* como *in vivo*, las concentraciones nanomolares de SP inducen la proliferación linfocitaria en humanos y ovejas. En ratones, la SP produce un incremento de la síntesis de IgA e IgM, pero no de IgG. Se ha demostrado en diversas especies la existencia de NK-1R tanto en linfocitos B, T como en las células natural killers (NK).

Existen fibras inmunorreactivas para SP y CGRP en los ganglios linfáticos y el timo de numerosas especies. La infusión de SP a este nivel produce un incremento en el flujo de linfa y en la producción de linfocitos. El tratamiento neonatal con capsaicina en ratas produce que el número de linfocitos de los nódulos se reduzca en un 80%³³³. En este aspecto la NKA fue más potente que la SP. En este estudio se constató además que la aplicación de un antagonista de la SP produce en ratas una disminución de la producción de anticuerpos frente a un antígeno.

Estudios recientes señalan el probable papel de la enzima convertora de angiotensina y un sistema renina-angiotensina propio de la medula ósea, a través del cual la angiotensina II actuaría de forma conjunta y coordinada con la SP y otros NP en la regulación de la hematopoyesis³³⁴.

La génesis y progresión de los tumores están íntimamente relacionadas con el sistema inmune, de manera que las células inmunes pueden actuar tratando de detener la tumorigénesis o facilitando la progresión de la misma a distintos niveles. Este planteamiento unido a una serie de datos experimentales ha llevado a algunos autores a formular la hipótesis de que el SNC podría ser capaz de monitorizar y modular la formación de tumores a través de interacciones del eje neuro-inmuno-endocrino en la fisiopatología de la tumorigénesis (figura 26).

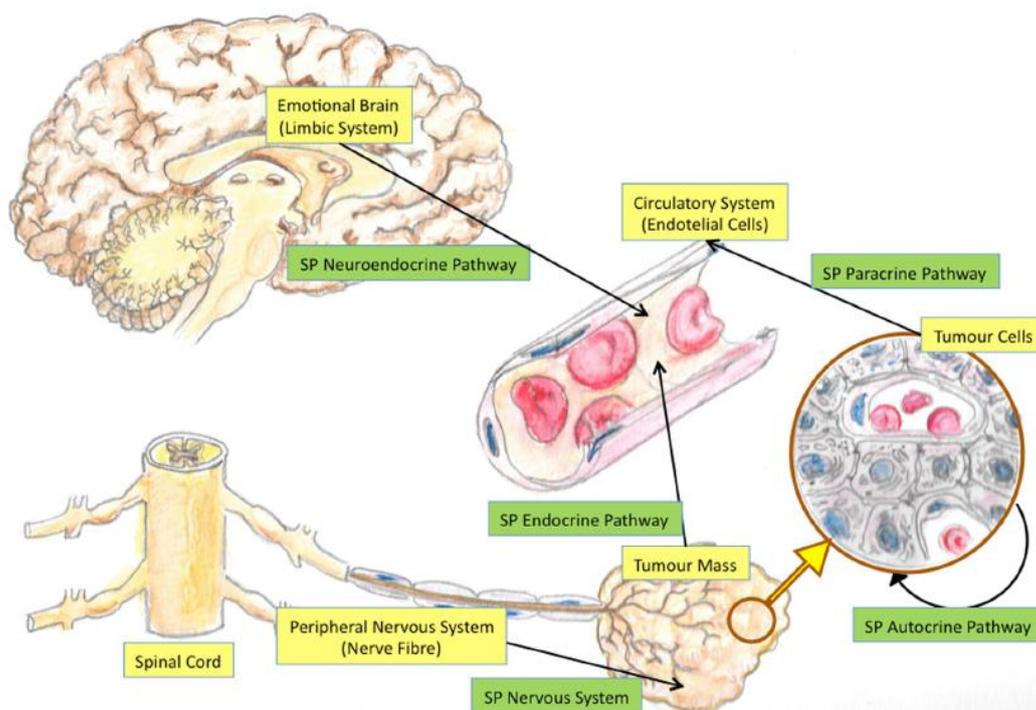


Figura 26. Modelo propuesto de interacción entre el sistema nervioso, endocrino, inmune y células tumorales. Las células tumorales liberan compuestos, como citoquinas o factores de crecimiento, que pueden influir en la función cerebral. No se tiene certeza de que el sistema nervioso libere sustancias que modulen el crecimiento del tumor de manera directa; en cambio la comunicación bidireccional del tumor con las células inmunes y las consiguientes interconexiones entre el sistema inmune con el nervioso constituirían la base de esta monitorización y modulación indirecta de la tumorigénesis por parte del cerebro (imagen tomada de Mravec et al., 2006, p. 112).

1.8.3.C. CICATRIZACIÓN DE HERIDAS Y FUNCIONES TRÓFICAS.

Las neuronas sensoriales sensibles a capsaicina llevan a cabo una función trófica de los tejidos³³⁵. Al aplicar capsaicina sobre ciertos tejidos animales se inducen cambios como opacificaciones corneales, lesiones en piel, disminución de la viabilidad de injertos así como el incremento de la susceptibilidad para desarrollar una úlcera gastroduodenal.

La SP y el NKA inducen la síntesis de ADN en diversos tejidos estudiados y así en el tejido vascular³³⁶ se ha constatado, un aumento las células endoteliales en estudios *in vitro* y un crecimiento de los capilares en estudios *in vivo*. Esta acción se lleva a cabo mediante la estimulación de los NK-1R.

1.8.4. PAPEL DE LAS NEUROKININAS EN LA NOCICEPCIÓN.

La mayoría de las fibras C-aférentes que expresan SP pertenecen a distintos tipo de nociceptores que se activan mediante estímulos térmicos, químicos y mecánicos ya sea en la piel o bien por distensión visceral³³⁷.

A partir de sus terminales tanto centrales como periféricas, estas neuronas, al ser estimuladas, liberan SP, NKA y CGRP. A nivel central, la liberación de SP ejerce su actividad a través de un efecto denominado potencial postsináptico excitador de baja velocidad que actúa sobre las neuronas de segundo orden en la médula espinal y tronco cerebral. Esta activación produce, modulación del reflejo protector de flexión, la percepción del dolor, así como varios reflejos autónomos y respuestas endocrinas.

A nivel periférico, los axones de estas fibras C aferentes presentan una gran distribución colateral en una gran variedad de tejidos como piel, vísceras y ganglios autónomos. Cuando las terminaciones de estas fibras son estimuladas se envían impulsos, por un lado hacia las ramas de los axones periféricos para inducir el reflejo axonal, por otro lado, hacia los ganglios autónomos y por último hacia el SNC para transmitir la señal de dolor.

Se ha demostrado que determinados pacientes que, presentan una reducción de la concentración de SP en los axones de la sustancia gelatinosa, presentan una disminución de la sensibilidad al dolor³³⁸.

1.9. ANTAGONISTAS DEL NK-1R.

El NK-1R se expresa a lo largo del SNC y de los tejidos periféricos en mamíferos. Gracias a las herramientas farmacológicas de las que se dispone hoy en día (agonistas y antagonistas) se puede, por un lado esclarecer las funciones fisiológicas del NK-1R y por otro establecer las posibles aplicaciones terapéuticas de los antagonistas de los NK-1R.

A finales del siglo pasado se desarrollaron una serie de ligandos para el NK-1R de tipo no peptídico y peptídico. Dentro de los peptídicos, se encuentran agonistas y antagonistas con secuencias cíclicas y lineales. Por otro lado dentro de los no-peptídicos existen sustancias con distintos orígenes químicos como esteroides, derivados piperidínicos y derivados del triptófano³³⁹.

1.9.1. ANTAGONISTAS DEL NK-1R PEPTÍDICOS.

A lo largo de los años 80^{340,341} se desarrollaron diversos antagonistas peptídicos derivados de la SP; no obstante, los resultados no fueron alentadores debido a numerosas limitaciones como su escasa potencia, cierta actividad residual como agonista parcial, inducción a la degranulación de mastocitos y neurotoxicidad. El primer antagonista de origen peptídico que se desarrolló fue el Spantide (DArg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Leu-NH₂). Para evitar estos efectos y con el fin de aumentar la potencia y la selectividad se desarrolló el Spantide II (figura 27). Estos dos antagonistas son de tipo peptídico lineal. Con posterioridad se desarrollaron otros antagonistas peptídicos de tipo cíclico como el FK²²⁴ que tiene la particularidad de actuar sobre el NK-1R y NK-2R lo cual podría tener ciertas aplicaciones terapéuticas o el L-668,169 con una gran afinidad sobre el NK-1R. Las investigaciones posteriores se encaminaron a desarrollar un antagonista mediante la deleción progresiva de aminoácidos con el fin de conseguir la estructura con menor peso molecular que mantuviera una alta afinidad y selectividad. Estos estudios llevaron al desarrollo de los antagonistas tripeptídicos; entre ellos, el FR 113680 fue el que mejor resultado obtuvo.

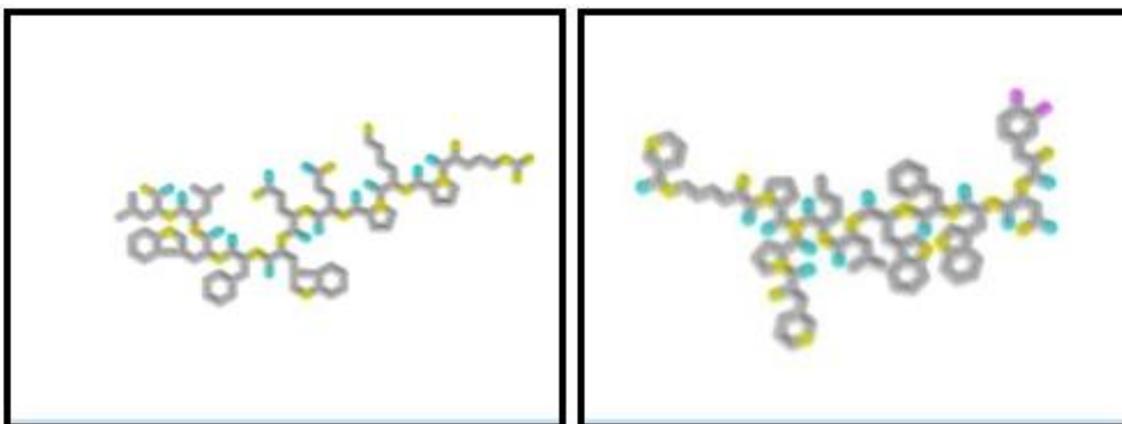


Figura 27. Los antagonistas peptídicos del NK-1R SPANTIDE y SPANTIDE II. Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3.

Los principales agonistas peptídicos del NK-1R son, además de la SP, Septide (figura 28), GR 73632 y Cycloseptide. Por otro lado, los principales antagonistas de tipo peptídico son el Spantide y Spantide II.

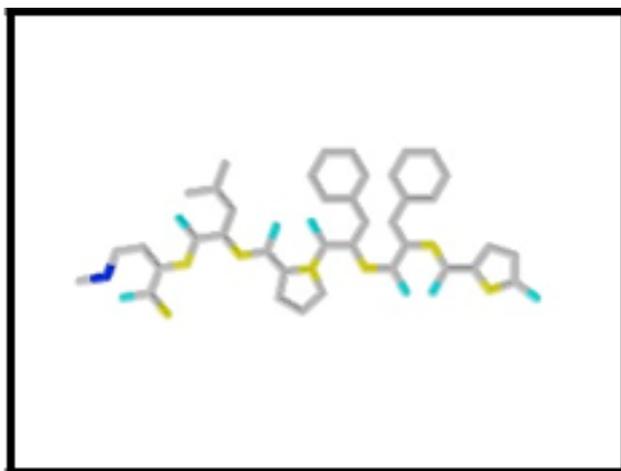


Figura 28. El agonista del NK-1R SEPTIDE. (Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

1.9.2. ANTAGONISTAS DEL NK-1R NO PEPTÍDICOS.

Los antagonistas no peptídicos se desarrollaron a partir de inicios de los años 90^{70,342} cuando tres diferentes grupos de investigación divulgaron sus resultados. Desde entonces hasta ahora se han desarrollado un gran número de fármacos de estas características. Estos antagonistas se pueden clasificar en relación al tipo de estructura química de la que proceden.

En este sentido se pueden encontrar antagonistas tipo esteroideos, como el WIN 51708, tipo perhidroisoindolanos, como el RP 67580, RP 73467 o el RPR 100893. Dentro del grupo de los quinuclidinos destacan el CP 96345, sintetizado por primera vez por Schneider, y L-709,210. En el grupo de las benzilamino piperidinas se encuentran el CP 99994, GR 203040, GR 205171 y CP 122,721. Dentro de las benzileter piperidinas destaca el L-733,060 y otros como el L-741,671 y L-742,694. Por último dentro de los derivados del triptófano destacan el L-732,138 y otros como el L-737,488 y PD 154075.

1.9.2.A. ANTAGONISTA L-733,060.

El L-733,06 (2S,3S)-3-[[3,5-bis(trifluorometil)benzil]oxi]-2- fenilpiperidina), es un fármaco desarrollado por los laboratorios Merck, Sharpe & Dohme. Se trata de un antagonista no peptídico del NK-1R que pertenece a la familia de la benzileter piperidinas. Presenta un IC₅₀ de 1.0 nM en el NK-1R humano. Su peso molecular es 403.361. Es activo por vía oral^{343,344} (figura 29).

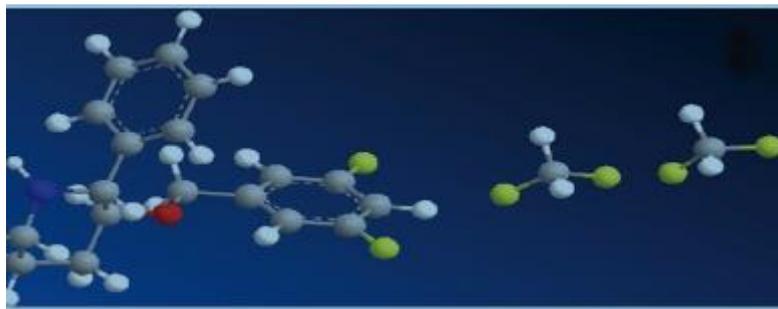


Figura 29. Representación tridimensional de la estructura química de L-733,060. Los átomos de carbono están representados en gris, hidrógeno en blanco, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y flúor en amarillo (modificado de Rosso et al., 2012, p. 10).

1.9.2.B. ANTAGONISTA L-732,138.

El L-732,138 (N-Acetil-L-triptófano 3,5-bis(trifluorometil)benzil ester) es otro fármaco desarrollado también por Merck, Sharpe & Dohme. Al igual que el caso anterior es un antagonista no peptídico del NK-1R. Este fármaco pertenece a los antagonistas basados en el triptófano. Su IC₅₀ es 1.6 nM. Soluble en alcohol y en acetato de etilo, su peso molecular es 472.4³⁴⁵ (figura 30).

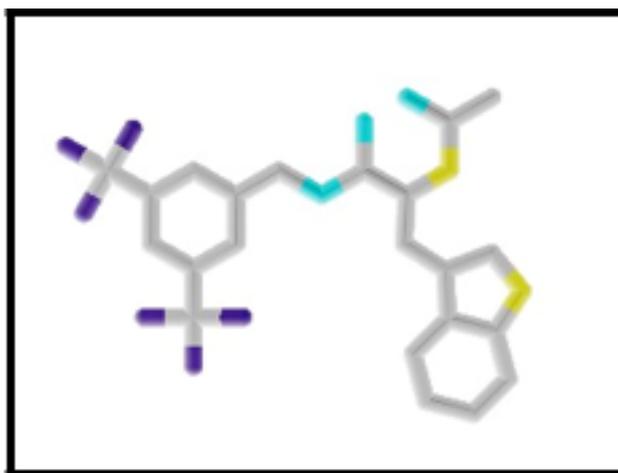


Figura 30. El antagonista no peptídico del NK-1R L-732,138. Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3.

1.9.2.C. APREPITANT.

El Aprepitant³⁴⁶ es un antagonista de los receptores de la SP/NK-1R. Es un sólido cristalino blanco a blancuzco, con un peso molecular de 534.43. Es prácticamente insoluble en agua siendo moderadamente soluble en etanol y acetato isopropílico y ligeramente soluble en acetonitrilo. Descrito químicamente como 5-[[[2 R,3 S]-2-[1 R]-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etoxi]-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinil]metil]-1,2-dihidro-3 H-1,2,4-triazol-3-ona (figura 31).

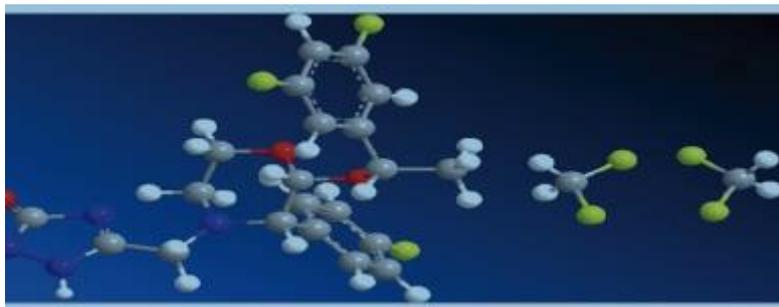


Figura 31. Representación tridimensional de la estructura química del Aprepitant. Los átomos de carbono están representados en gris, hidrógeno en blanco, nitrógeno en azul, oxígeno en rojo y flúor en amarillo (modificado de Rosso et al., 2012, p. 10).

Los estudios de tomografía de emisión de positrones en animales y seres humanos con Aprepitant han demostrado que cruza la barrera hematoencefálica y ocupa los receptores encefálicos NK-1R. En modelos en animales, se ha demostrado que inhibe la emesis inducida por agentes quimioterapéuticos citotóxicos, entre ellos, cisplatino, mediante acciones centrales. Los estudios en animales y seres humanos demuestran que Aprepitant aumenta la actividad antiemética del antagonista de los receptores de 5-HT₃ ondansetrón y el corticosteroide dexametasona y que inhibe las fases agudas y tardías de emesis inducida por cisplatino.

La concentración plasmática máxima media se alcanza aproximadamente a las 4 horas y la biodisponibilidad oral absoluta media del Aprepitant es de aproximadamente el 60% al 65%. Su farmacocinética es no lineal sobre toda la gama posológica clínica. En adultos jóvenes sanos, el aumento de $ABC_{0-\infty}$ (área bajo la curva) es 26% superior a lo proporcional a la dosis entre dosis únicas de 80 mg y 125 mg administradas en estado alimentado.

Tras la administración oral de una dosis única del Aprepitant 125 mg en el día 1 y 80 mg una vez al día en los días 2 y 3, el ABC_{0-24h} es aproximadamente 19.6 mcg_h/mL y 21.2 mcg_h/mL en el día 1 y día 3, respectivamente. La concentración plasmática máxima media de 1.6 mcg/mL y 1.4 mcg/mL se alcanza en aproximadamente 4 horas en el día 1 y día 3, respectivamente.

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

El metabolismo ocurre principalmente mediante oxidación en el anillo de morfolina y sus cadenas laterales. Los estudios *in vitro* con microsomas hepáticos humanos indican que se metaboliza principalmente por CYP3A4 con metabolismo menor por CYP1A2 y CYP2C19. No se detecta metabolismo por CYP2D6, CYP2C9 o CYP2E1. En adultos jóvenes sanos, da cuenta de aproximadamente el 24% de la radiactividad plasmática sobre 72 horas después de una dosis oral

única de 300 mg de Aprepitant-[C14], lo que indica una presencia sustancial de metabolitos en el plasma. Se han identificado siete metabolitos en el plasma humano que sólo son débilmente activos.

Después de la administración de una dosis única IV de 100 mg del profármaco de Aprepitant-[C14] a sujetos sanos, el 57% de la radiactividad se recupera en la orina y el 43% en las heces.

La depuración plasmática aparente fluctúa entre aproximadamente 62 y 90 mL/min. La vida media terminal aparente fluctúa entre aproximadamente 9 y 13 horas. Se elimina principalmente mediante metabolismo no siendo excretado por vía renal.

Aprepitant es un inhibidor moderado de CYP3A4. No debe usarse concomitantemente con pimozida, terfenadina, astemizol o cisaprida. La inhibición de la isoenzima 3A4 de citocromo P450 (CYP3A4) por Aprepitant podría conducir a concentraciones plasmáticas elevadas de estos fármacos, que potencialmente podrían ocasionar reacciones graves o que ponen en peligro la vida.

1.10. ANTAGONISTAS DEL NK-1R: APLICACIONES TERAPÉUTICAS.

En el momento actual, la única aplicación terapéutica para los antagonistas del NK-1R es su uso como antiemético en los vómitos inducidos por quimioterapia siendo el Aprepitant el único fármaco antagonista de la SP aprobado por la Food and Drug Administration y la Agencia Europea del Medicamento³⁴⁷.

Se ha relacionado la SP con varios actos fisiológicos como son la emesis inducida por quimioterapia, cambios en el tono cardiovascular, la regulación de la motilidad gastrointestinal, el desarrollo del sistema inmune, la estimulación de la secreción salival y pancreática, la contracción de la musculatura lisa vascular y extravascular, la vasodilatación, incluso se ha relacionado con la aparición de migraña, asma y bronquitis crónica, así como con el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis.

El estudio con antagonistas de la SP y con mutaciones genéticas en ratones ha ayudado a mejorar el conocimiento del papel de la SP en el dolor y en la respuesta al estrés³⁴⁸.

Ahora haremos un breve repaso de los distintos campos médicos donde se están desarrollando novedades terapéuticas e investigando sobre los antagonistas de los NK-1R y la acción de la SP.

1.10.1. TRASTORNOS AFECTIVOS.

La relación existente entre la SP y el desarrollo de enfermedades psiquiátricas como son la ansiedad y la depresión se ha objetivado. Hay numerosos estudios^{349,350,351} que apoyan esta afirmación y que investigan nuevos tratamientos para dichas enfermedades basándose en la fisiopatología de la SP.

Ensayos clínicos a doble ciego realizados en ratones indican que tras la administración de antagonistas del NK-1R, se produce un incremento a largo plazo de la transmisión de serotonina en el hipocampo³⁵². Esta propiedad es común a todos los antidepresivos conocidos y parece estar mediada por un incremento tiempo-dependiente en el índice de serotonina neuronal. Estas observaciones hacen pensar en la futura posibilidad del uso de los antagonistas del NK-1R como una nueva clase de agente antidepresivo y ansiolítico, e implican a la SP en la aparición de enfermedades psiquiátricas. Un artículo publicado en la revista Science³⁵³ comparó el antagonista del NK-1R Aprepitant con otros antidepresivos en un grupo de pacientes diagnosticados de depresión moderada-severa. Además de un gran efecto antidepresivo, se constató la ausencia de interacciones con el sistema monoamino lo que se traduce en un menor número de efectos secundarios y de interacciones medicamentosas.

1.10.2. EL DOLOR.

Electrofisiológicamente se ha comprobado que la aplicación iontoforética de SP en las astas dorsales de la médula causa una estimulación lenta, diferida y prolongada. Esta lentitud en la respuesta fue la primera prueba que la excluía como un transmisor primario de la vía aferente. Nuevas investigaciones mostraron que la SP modulaba la transmisión sináptica a dicho nivel, jugando un papel como potenciador de los inputs, ya fueran estimuladores o inhibidores. Comportándose como neurotransmisor del dolor, se ha demostrado que tiene una función facilitadora, de forma que la morfina, al impedir su liberación, bloquea el dolor³⁵⁴.

La SP está presente en las fibras-C, que son las aferentes primarias relacionadas con la neurotransmisión del dolor. Se ha comprobado que está relacionada con los mecanismos dolorosos, ya que si se inyectan antagonistas de la SP en la médula espinal sobreviene una acción analgésica, además también reducen el tiempo de acción frente a los estímulos dolorosos y dan lugar a otras respuestas de comportamiento. Por otro lado, los analgésicos opiáceos, morfina y los morfínomiméticos inhiben la liberación de la SP en el núcleo trigeminal, que transmite la información dolorosa. Por lo tanto parece que existe alguna relación entre la SP y los neurotransmisores opioides endógenos implicados en los procesos de analgesia del SNC.

Las denominadas encefalinas y endorfinas son compuestos naturales, de estructura química semejante a la morfina (morfínomiméticos). Se han relacionado con receptores opioides (lipoproteínas) presentes en el tálamo, la sustancia gris periacueductal, los núcleos del rafe, el sistema límbico, el locus ceruleus, la sustancia gelatinosa medular, etc. Se intentó determinar si la expresión diferenciada del CGRP o de la SP en una gama de tumores hipofisarios estaba relacionada con la presencia o ausencia del dolor de cabeza. Usando técnicas inmunohistoquímicas se concluyó que el mecanismo que provocaba dolor de cabeza asociado a tumores hipofisarios seguía siendo indeterminado y que el significado de la presencia de CGRP y de SP en estos tumores era desconocida, pero no parecía estar relacionada con el dolor de cabeza o la actividad endocrina del tumor³⁵⁵.

Se investigaron los cambios neuroquímicos que ocurrían en el asta dorsal de la médula espinal en un modelo de dolor neuropático por cáncer en ratón. Para ello se inocularon células del sarcoma de Meth-A en la vecindad del nervio ciático, dando lugar al crecimiento de una masa tumoral que englobaba al propio nervio. Los niveles de SP y CGRP se elevaron, pero no de forma tan prolongada como el dynorphin A, que además lo hizo de forma paralela al aumento de células c-Fos-positivas en la medula. De forma que en este modelo el aumento de dynorphin A se podía asociar al dolor espontáneo, pero no así los niveles de SP y CGRP³⁵⁶.

Otros estudios³⁵⁷ han investigado el papel de la capsaicina (presente en alimentos como las guindillas) como estímulo nociceptivo sobre ciertas células nerviosas, provocando la liberación de

SP, responsable de la transmisión de las señales dolorosas dentro de nuestro sistema nervioso. La capsaicina desencadena la liberación de este neurotransmisor e inhibe la producción de más cantidad del mismo en el organismo. Con el uso prolongado de capsaicina se gasta, en parte, la SP de las células nerviosas y así se alivia el dolor crónico (un estado que requiere la presencia de SP).

En Cleveland, en la Case Western Reserve University, Deal et col.³⁵⁸ evaluaron los efectos de la capsaicina, tanto en pacientes con artritis reumatoide como con osteoartritis. Descubrieron un alivio significativo del dolor cuando se aplicaba tópicamente crema con capsaicina en las rodillas dolorosas, cuatro veces al día. En la artritis reumatoide, el tratamiento redujo el dolor a aproximadamente la mitad, mientras que en la osteoartritis disminuyó hasta alrededor de un tercio. Además de reducir la transmisión del dolor, la capsaicina también la producción del enzima colagenasa y de prostaglandinas, reduciendo tanto el dolor como la inflamación³⁵⁹. Uno de los resultados más sorprendentes de dicho estudio fue que los nervios sensoriales producen su propia respuesta antiinflamatoria. De esta forma la activación de las señales dolorosas que llevaba a cabo la capsaicina producía la liberación de un poderoso antiinflamatorio natural.

1.10.3. INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA.

La inflamación neurogénica conlleva la liberación de SP, en respuesta al dolor o a la infección, desde los nervios sensitivos.

La formación de edema, consecuencia de la permeabilidad vascular, es un proceso fuertemente mediado por la SP que se encuentra en las fibras-C. Esta acción, al igual que la del factor C5a, se produce tras la unión a la proteína G de sus respectivos receptores.

Por otro lado la SP y la angiotensina II provocan una vasodilatación endotelial y en consecuencia están directamente relacionadas con la aparición de hipotensión y bradicardia, esta potente actividad hipotensora no es bloqueada por la atropina³⁶⁰.

La SP también se ve implicada en ciertas reacciones por hipersensibilidad. En un estudio realizado en Japón, se evaluó el papel de la SP en las reacciones pulmonares adversas inducidas por Paclitaxel que causaba una extravasación de plasma y un edema marcados en pulmones con una disminución concomitante de la presión parcial arterial de oxígeno. Dichas reacciones fueron revertidos por LY303870, un antagonista del NK-1R, constatándose que los niveles de SP en el plasma y en el líquido del lavado broncoalveolar aumentaron después de la inyección del Paclitaxel. En 13 pacientes, aumentó el nivel en plasma de la SP pero no de la histamina durante la infusión del Paclitaxel, de forma significativa ($p < 0.05$). Por lo que se concluía que la SP, se podía implicar en la hipersensibilidad producida por el Paclitaxel³³⁵ más que la histamina.

1.10.4. EMESIS POSTQUIMIOTERAPIA.

Inducidos por la quimioterapia, las náuseas y vómitos desempeñan un papel importante en la calidad de vida de los pacientes, e influyen decisivamente en el mantenimiento de la quimioterapia. Por lo que, un control adecuado de las mismas salvaría vidas potencialmente, mejorando al menos los resultados del tratamiento quimioterápico³⁶².

Los fármacos antieméticos disponibles en la actualidad, no son completamente eficaces en la prevención de náuseas y vómitos. Durante el primer día se constata la incomodidad de los pacientes. Pero la mitad de ellos, al menos, siente náuseas y sufre vómitos también en su casa.

Los antagonistas del NK-1R constituyen un nuevo grupo de fármacos dirigidos a otro tipo de receptores y con un mecanismo de acción diferente al de los antagonistas del receptor 5-HT₃³⁶³, que actúan entre el segundo y el quinto día posteriores a la quimioterapia y que son efectivos en el 70% de los casos.

Navari et col.³⁶⁴ investigaron la posibilidad de que un antagonista del NK-1R pudiera prevenir las náuseas y los vómitos agudos y retardados en los pacientes sometidos a tratamientos de quimioterapia, dado que se sabe que la SP está en las regiones del troncoencéfalo asociadas con los vómitos. El estudio se realizó con pacientes en tratamiento con Cisplatino. Todos recibieron Granisetron y Dexametasona previo al tratamiento con Cisplatino y posteriormente se aleatorizaron en tres brazos, dos de los cuales contenían el antagonista de NK-1R a diferente dosis y pauta, y el tercero que contenía placebo. El 93% de los pacientes de los dos primeros grupos no tuvieron vómitos en la fase aguda, en comparación con el 67% del tercer grupo. También en la fase de vómitos retardados se encontró beneficio en los pacientes tratados con el antagonista del NK-1R.

Este estudio demostró así, que el antagonista del NK-1R proporcionaba un beneficio adicional, más allá del tratamiento antiemético estándar en la prevención de náuseas y vómitos agudos y retardados.

Se realizaron dos estudios, con al menos 520 pacientes en cada estudio, 365 controlados, aleatorios, doble ciegos, paralelos y multicéntricos. Uno llevado a cabo en centros de Europa, Estados Unidos, Sudáfrica y Taiwán, y el otro en Centroamérica y Sudamérica. Los pacientes recibieron Cisplatino (70 mg/m²) y fueron agrupados de forma aleatoria para recibir ya sea terapia estándar con receptor antagonista 5-HT₃ (Ondansetrón) y Dexametasona prequimioterápica y Dexametasona postquimioterapia (días 2-4) o terapia estándar más Aprepitant prequimioterapia y en los días 2 y 3 postquimioterapia.

Los pacientes que participaron de estos estudios fueron registrando sus experiencias en diarios que ellos mismos completaban. La respuesta completa (no emesis, no rescate) en el grupo de Aprepitant en ambos estudios fue significativamente más alto, el período agudo (83%-89%) y el

período diferido (68%-75%), en comparación con la del grupo bajo terapia estándar, el período agudo (68%-78%) y el período diferido (47%-56%).

Las náuseas mejoraron en el grupo bajo Aprepitant en mayor porcentaje, con una mejoría del 20 por ciento en esa protección. Manteniendo su eficacia antiemética en la prevención de las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia hasta en seis ciclos de quimioterapia.

Aprepitant fue generalmente bien tolerado, siendo las reacciones adversas más frecuentes la astenia o fatiga. Otros acontecimientos adversos experimentados fueron la diarrea, las náuseas (después del día 5 del estudio), el hipo (4,6%), la astenia (2,9%), el aumento de alaninotransferasa (2,8%), el estreñimiento (2,2%), las cefaleas (2,2%) y la anorexia (2,0%).

Se ha demostrado que la SP es liberada desde las fibras nerviosas primarias y que existe una amplia distribución de la misma tanto en el SNC, como en el SNP. Debido a esta amplia distribución es importante tener un método adecuado para manejar y controlar las dosis terapéuticas de los fármacos antagonistas de los NK-1R, evitando en lo posible efectos tóxicos por sobredosis.

En este sentido un estudio utilizó las imágenes obtenidas mediante tomografía por emisión de positrones con un trazador selectivo de NK-1R, el [(18)F]SPA-RQC, para determinar los niveles de ocupación de los NK-1R alcanzados a nivel central, tras la administración de dosis relevantes de Aprepitant (fármaco antagonista de los NK-1R) en individuos sanos.

Para ello se desarrollaron dos estudios placebo-control, simple-ciego y aleatorizados, cuyos resultados mostraron que la ocupación de los NK-1R en el cerebro era predicha por las concentraciones plasmáticas del Aprepitant, por lo que éstas podían ser utilizadas para controlar las dosis administradas de forma terapéutica para patología del SNC³⁶⁶.

Los estudios arriba mencionados, conforman la base sobre la que se apoyó la Food and Drug Administration, en marzo de 2003 para aprobar Aprepitant. También está aprobado en Canadá, Singapur, Malasia, América Central y del Sur, Inglaterra y Europa, convirtiéndose de esta forma en el primer fármaco antagonista del NK-1R comercializado.

Como pauta se pueden seguir los regímenes utilizados en diferentes estudios clínicos: Aprepitant 125 mg el día 1 y 80 mg los días 2 y 3; Dexametasona 12 mg el día 1 y 8 mg los días 2, 3 y 4; Ondansetrón 32 mg sólo el día 1.

Los estudios sobre los efectos del nuevo tratamiento indican que disminuyen los síntomas a partir del primer ciclo de quimioterapia y esto se mantiene hasta el sexto inclusive.

En combinación con otros antieméticos, Aprepitant está indicado en la prevención de las náuseas y vómitos agudos o diferidos, relacionados con cursos iniciales y repetidos de quimioterapia altamente emetogénica, incluyendo altas dosis de cisplatino.

1.10.5. SEGURIDAD DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R.

En los ensayos clínicos en humanos llevados a cabo con antagonistas del NK-1R, se ha demostrado que, en general, son seguros y no causan serios efectos secundarios. El único antagonista del receptor NK-1R que está comercializado actualmente es el Aprepitant.

En ensayos clínicos controlados con placebo en pacientes con depresión mayor, el Aprepitant a dosis de 300mg al día fue bien tolerado. Y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a efectos secundarios respecto a placebo.

La mayoría de los ensayos clínicos llevados a cabo son para el uso del Aprepitant como prevención de náuseas y vómitos en pacientes sometidos a tratamiento con quimioterapia altamente emetogénica con cisplatino, o como antiemético postquirúrgico.

Por ello en la mayoría de los estudios se coadministra Aprepitant (día 1: 125 mgs; días 2-3: 80 mgs) con dexametasona y un antagonista de los receptores de serotonina 5-HT₃ (ondansetrón, granisetron, palonosetrón). En estos estudios se objetiva la seguridad y la buena tolerancia del mismo y la reducción de las náuseas y los vómitos. Pero se encuentran también algunos efectos secundarios que pueden ser achacados a los otros fármacos o a la terapia quimioterápica en si. Como son, anorexia, astenia, estreñimiento, diarrea, dolor abdominal, mareos, cefaleas, hipo, infección y neutropenia.

De hecho la reducción del 40% de la dosis de dexametasona en uno de los grupos del ensayo, demostró reducir la susceptibilidad a la neutropenia y a la infección³⁶⁷.

En estudios de seguridad en sujetos sanos se ha demostrado que a dosis de Aprepitant: día 1: 125 mgs; días 2-5: 80 mgs, no produce ningún efecto la función propulsiva en estómago, en intestino delgado o colon.

Es importante saber las interacciones medicamentosas que puedan suceder durante la administración de Aprepitant junto con otros fármacos.

Por ejemplo no altera el metabolismo de ondansetrón, granisetron, palonosetrón, hidrodolasetron, vinorelbine, thiotepa, dinaciclib o digoxina. Pero las dosis de dexametasona o de metilprednisolona deben ser reducidas cuando se administra Aprepitant. Ya que se ha demostrado que el Aprepitant aumenta el nivel plasmático de los corticosteroides^{367,368,369,370}.

Aprepitant también reduce la eficacia de los anticonceptivos orales y no altera la farmacocinética de la ciclofosfamida^{367,371,372,373}.

Aprepitant debe ser usado con precaución ya que induce acumulación de metabolitos tóxicos de algunos fármacos como ifosfamida, midazolam y algunos quimioterápicos (docetaxel, paclitaxel, irinotecan, por ejemplo). En pacientes en tratamiento con warfarina también hay que tener más un control más exhaustivo.

El Aprepitant es metabolizado principalmente por el citocromo P450 en el hígado. Por esto es bien tolerado en pacientes con insuficiencia renal severa y en enfermedad renal terminal^{374,375,376}.

Se llevó a cabo un estudio comparativo en el que se demostró que una dosis intravenosa de fosaprepitant de 150 mgs, es igual de segura y de efectiva que el tratamiento durante tres días con Aprepitant vía oral^{367,376,378}.

1.11. ACTIVIDAD ONCOGÉNICA DE LA SP Y DEL NK-1R.

1.11.1. ONCOGÉNESIS Y SP-NK-1R.

La implicación de la SP en la oncogénesis está avalada por numerosas publicaciones^{377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400}. Dentro de estas publicaciones podemos destacar las realizadas sobre líneas celulares *in vitro* y las realizadas sobre muestras de tejidos tumorales:

- Líneas celulares de gliomas y astrocitomas humanos: U373 MG, U138 MG, UC11 MG y GAMG.
- Líneas celulares de neuroblastomas humanos: SKN-BE.
- Líneas celulares de retinoblastomas humanos: WEI-Rb-1 y Y-79.
- Líneas celulares de melanomas humanos: COLO679, COLO858 y MEL-HO.
- Líneas celulares de cáncer pancreático humano: CAPAN-1 y ASPC-1.
- Líneas celulares de cáncer de pulmón humanos: de células pequeñas (NCI- H69, H128, H417, COR-L88 y COR-L51), de células grandes (COR-L23), adenocarcinoma (MOR) y carcinoma escamoso (LUDLU-1).
- Líneas celulares de cáncer de mama humanos: MDA-MB-231.
- Líneas celulares de cáncer colorrectal humanos: HT-29.
- Líneas celulares de adenocarcinoma gástrico.
- Líneas celulares de cáncer de laringe: Hep-2 de carcinoma de células escamosas.
- Líneas celulares de osteosarcomas humanos.
- Líneas celulares de hepatoblastoma humano: HepT1, HepG2 y HuH6.
- Líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda: T-ALL BE-13 y B-ALL SD-1.
- Muestras de tejido de mucosa yugal con liquen plano oral.
- Muestras de diferentes tipos de cáncer de laringe.
- Muestras de diferentes tipos de cánceres orales.

De manera detallada se presentan los estudios que existen hasta la actualidad sobre la actividad oncogénica de la SP y el NK-1R:

1.11.1.A. CÁNCER DE MAMA.

En el año 2000 Singh y colaboradores realizaron un estudio³⁸³, en el que se investigó el papel de PPT-I y de sus receptores (NK-1R y NK-2R) en el cáncer de mama y sus metástasis, para ello se utilizó el análisis cuantitativo con RT-PCR, ELISA e hibridación *in situ*.

Se demostró una expresión creciente de PPT-I y de NK-1R comparando las células epiteliales mamarias normales (n=2) y biopsias benignas de mama (n=21), con líneas celulares de cáncer de mama (n=7) y biopsias malignas de mama (n=25). Los niveles de NK-2R eran altos en células normales y malignas. Los antagonistas específicos del NK-1R y NK-2R inhibieron la proliferación celular, sugiriendo un estímulo autocrino o intercrino por los péptidos de PPT-I en el cáncer de mama.

El antagonista del NK-2R no demostró ningún efecto sobre la proliferación de células normales pero medió en la proliferación de las células tumorales. Los extractos citosólicos de las células malignas de las células tumorales aumentaron la traducción de PPT-I mientras que los extractos de las células epiteliales mamarias normales no causaron ningún cambio.

Los datos sugieren que los péptidos de PPT-I y sus receptores pueden ser importantes en el desarrollo del cáncer de mama. Considerando que los péptidos de PPT-I son moduladores hematopoyéticos, estos resultados se podían ampliar para entender la integración con la metástasis temprana de células tumorales en la médula ósea, su sitio predilecto de metástasis. La señal de transducción molecular para los péptidos PPT-I y el mecanismo que aumenta la traducción del mRNA de PPT-I podrían conducir a estrategias innovadoras para los tratamientos y la metástasis del cáncer de mama.

La migración activa de células tumorales, requisito crucial para el desarrollo de la metástasis y la progresión del cáncer, es regulado por distintas sustancias incluyendo los neurotransmisores. La mayoría de los pacientes que sufren cáncer de mama no mueren debido al tumor primario sino al desarrollo de metástasis.

En una investigación realizada por Lang y colaboradores³⁹¹ se analizó la migración de las células tumorales del carcinoma de mama MDA-MB-468 y de próstata PC-3, dentro de una matriz tridimensional de colágeno utilizando videomicroscopía y análisis de la trayectoria de la migración asistido por ordenador para analizar la actividad migratoria de estas células en respuesta a diversos neurotransmisores. La migración de las células tumorales fue inducida por la norepinefrina, la dopamina y la SP, demostrándose que dicha migración puede ser inhibida utilizando un antagonista específico de los receptores γ 2- adrenales, el receptor D2 o el NK-1R, respectivamente. Todos los neurotransmisores investigados activaron perceptiblemente el ciclo de Krebs. Además se detectaron cambios en la expresión genética hacia un tipo de célula tumoral con mayor motilidad, incluyendo una alta regulación por parte de la integrina γ 2, que es un receptor esencial para la adherencia del colágeno en la migración. Por el contrario el gen para la supresión del tumor, gelsolin, disminuyó su regulación. Estas dos importantes alteraciones fueron confirmadas por flujocitometría e immunoblotting, respectivamente.

Los neurotransmisores inducen así un tipo de célula tumoral metastatogénica por la regulación directa de la expresión del gen y un incremento de la actividad migratoria, la cual se puede prevenir por los antagonistas de los neurotransmisores. En un estudio previo⁴⁰² se había mostrado que la metencefalina, la SP, la bombesina, la dopamina y la norepinefrina tenían un efecto estimulante en la migración de las células del cáncer de mama MDA-MB-468. Todo ello evidencia que en la migración de células del cáncer de mama existe una fuerte implicación reguladora de estos neurotransmisores.

1.11.1.B. CÁNCER PANCREÁTICO.

La expresión del NK-1R ha sido analizada cuantitativamente por RT-PCR, hibridación in situ, inmunohistoquímica y Western-Blot, en muestras tumorales pancreáticas, en tejidos pancreáticos humanos normales y en líneas celulares de cáncer pancreático. El NK-1R y su ligando la SP están implicados en la patogénesis de ciertos tumores neuronales. Además, se ha analizado mediante sulforhodamine B la influencia de los análogos de la SP y de los antagonistas del NK-1R (MEN 11467) en el crecimiento celular del cáncer pancreático.

Por RT-PCR, se ha comprobado que el mRNA del NK-1R estaba incrementado un 36.7 % ($p < 0.001$) en muestras de cáncer pancreático humano comparado con controles normales. Los niveles incrementados de la expresión del NK-1R no estaban relacionados con el grado del tumor sino con un estadio avanzado del cáncer.

Por hibridación in situ e inmunohistoquímica, la inmunorreactividad y el mRNA del NK-1R fueron escasas y débilmente presentes en células acinares y ductales de páncreas sano. En contraste, se detectaron intensas señales del mRNA del NK-1R y de inmunorreactividad en la mayoría de las células de cáncer.

Mediante análisis de Western-Blot, se comprobó que el NK-1R estaba incrementado un 26 % ($p < 0.01$) en muestras pancreáticas del cáncer en comparación a los controles sanos.

El mRNA del NK-1R fue detectado en cinco líneas celulares de cáncer pancreático por RT-PCR, encontrándose los niveles más altos en células CAPAN-1 y el más bajo en células ASPC-1. Los análogos del SP estimularon el crecimiento celular del cáncer pancreático, dependiendo del nivel de la expresión del NK-1R, constatándose que este efecto se podría bloquear por un antagonista selectivo del NK-1R.

Estos resultados ilustran que el NK-1R está activo en la patogenia del cáncer pancreático humano y tiene el potencial de contribuir al crecimiento de células cancerígenas³⁸¹.

Al examinar el [D-Arg(1),D-Trp(5,7,9),Leu(11)]SP (SP-A) en los cánceres pancreáticos ductales, en otro estudio⁴⁰³. El SP-A actúa mediante su unión a la proteína G del receptor acoplado a

proteína G, antagonizándola. Para este estudio se utilizó una línea celular de cáncer pancreático (el HPAF-II), demostrándose que el SP-A inhibía la movilización de Ca^{2+} inducida por el neuropéptido, así como la síntesis de ADN y el crecimiento *in vitro*.

El SP-A también disminuyó perceptiblemente el crecimiento del tumor de HPAF-II en ratones más allá del período de tratamiento, así mismo, redujo marcadamente la angiogénesis asociada al tumor HPAF-II *in vivo*.

Los resultados demuestran que SP-A atenúa el crecimiento del tumoral del cáncer pancreático por medio de un mecanismo dual que suma características antiproliferativas y antiangiogénicas.

1.11.1.C. LEUCEMIA.

Se ha demostrado expresión de SP en el citoplasma de las células blásticas en la leucemia linfoblástica aguda, examinando dos líneas celulares: T-ALL BE-13 y B-ALL SD-1. Y que concentraciones muy pequeñas, nanomolares, de SP inducen mitogénesis en estas células. Las células expresan gran cantidad de receptores NK-1R y después de unirse la sustancia P al receptor comienza una fuerte acción mitogénica.

Al administrar antagonistas del receptor NK-1R como L-773,060, L-732,138 y Aprepitant, se produce la inhibición del crecimiento celular gradualmente de en relación a las concentraciones de SP. Esto sugiere que los antagonistas bloquean al receptor y como resultado se observa la muerte por apoptosis de las células blásticas. Este efecto se observó en las dos líneas celulares estudiadas⁴⁰⁴.

La determinación de la expresión de la SP en células neoplásicas de la médula ósea en pacientes con leucemia linfoblástica aguda infantil, mediante la determinación de ARN mensajero y de niveles de producción de proteínas, es en lo que se centró un estudio anterior de Nowicki y colaboradores⁴⁰⁵ También se intentó demostrar una correlación de la SP tanto con factores de riesgo de la leucemia, como con los fracasos terapéuticos.

Hay muchos estudios que sugieren que los antagonistas de los receptores de NK-1R pueden ser una nueva terapéutica prometedora para el tratamiento de las leucemias. Además de su acción antitumoral se producen otras acciones beneficiosas como las antiinflamatorias, analgésicas, ansiolíticas y antieméticas. Además de efecto neuroprotector y hepatoprotector.

La principal limitación de todos estos estudios es que están en fase preclínica y la mayoría de ellos están realizados *in vitro*, hay que esperar a futuros ensayos clínicos, que nos demuestren su utilidad *in vivo*⁴⁰⁶

1.11.1.D. CÁNCER DE SNC Y PERIFÉRICO .

Se ha investigado la relación entre la SP y los antagonistas de los NK-1R y distintos tipos de tumores que se desarrollan en el SNC.

Se realizó un estudio *in vitro*⁴⁰⁷ para valorar la capacidad inhibitoria de un potente antagonista de acción prolongada del NK-1R, el L-733,060, sobre el crecimiento tumoral de dos líneas celulares tumorales.

Utilizando un rango de concentraciones de 2.5 μM a 20 μM contra la línea celular del neuroblastoma SKN-BE y de 10 μM a 25 μM para la línea celular del glioma GAMG. Se utilizó el coulter counter para determinar el número de células viables, seguido por el uso de un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio], método colorimétrico para evaluar viabilidad de las células en este análisis de la citotoxicidad.

El L-733,060 inhibió el crecimiento de las dos líneas celulares estudiadas de una manera dosis-dependiente. Los valores de IC 50 fueron de 11.6 μM (30h) y 10.2 μM (72h) para SKN-BE; y 21.3 μM (48h) y 19.9 μM (96h) para GAMG.

Estos resultados indicaban que el L-733,060 (antagonista del NK-1R) actuaba como agente antitumoral de amplio espectro. Esta nueva acción, se divulgó en este estudio por primera vez, sugiriendo que el L-733,060, antagonista del NK-1R, es una terapéutica prometedora para el tratamiento tanto del neuroblastoma humano como del glioma humano.

Los astrocitos portan receptores funcionales a muchos neurotransmisores, incluyendo la SP, que ejerce sus actividades biológicas uniéndose a su NK-1R. La SP es un estímulo importante para los astrocitos en el desarrollo del SNC y proporciona un acoplamiento para las interacciones bidireccionales entre las células y las neuronas gliales. En tumores cerebrales, las células gliales malignas que se originan de astrocitos vía los NK-1R, son accionados por las taquicininas (SP y NKA) lanzando mediadores solubles como son las citoquinas y de esta forma aumentan su índice proliferativo y promueven la progresión del tumor.

En este sentido numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*⁴⁰⁸, apoyan el papel de la SP como inductora de gliomas humanos y de la progresión tumoral, así como promueven la posibilidad del uso de los antagonistas selectivos del NK-1R como acercamiento terapéutico a los gliomas malignos.

En uno de estos estudios⁴⁰⁹ se ha demostrado por experimentos mediante Western-blot que la SP induce una síntesis transitoria del regulador transcripcional del gen Egr-1 en células humanas de glioma, sugiriendo de este modo que la SP ejerce efectos a largo plazo en las células del glioma.

En tumores desarrollados en ratones, tras ser trasplantados con células humanas de glioma U373 MG de forma subcutánea, la presencia de SP fue observada por inmunohistoquímica. Aunque la administración del SP exógeno no afectó perceptiblemente al tamaño ni al desarrollo del U373 MG, el papel de la SP en la progresión del glioma in vivo fue destacado por la inhibición del crecimiento tumoral inducida por los antagonistas humanos altamente específicos y selectivos del NK-1R (MEN11467 y MEN11149). La actividad antitumoral de estos antagonistas fue revertida parcialmente por la administración concomitante de SP exógena. Estos resultados sugieren un nuevo acercamiento terapéutico para el tratamiento de gliomas malignos con los antagonistas del NK-1R 395.

En un estudio realizado por Berger⁴¹⁰ en 2005 se investigaba la implicación de otras taucicinas, distintas a la SP, en la aparición de astrocitomas. De este modo se compararon los efectos del SP con los de la HK-1 en la línea celular humana del astrocitoma U-251 MG, que expresan altos niveles del NK-1R. Se observó que la HK-1 y la SP estimulaban la movilización de Ca^{2+} e inducían la expresión creciente del mRNA de la citoquina. Finalmente se concluía que no existían diferencias cualitativas en las respuestas al SP y al HK-1, sugiriendo que ambos péptidos actuaban a través de los NK-1R en células U-251 MG. Además, se demostró la expresión del mRNA TAC4 en gliomas, lo que indica una posible implicación de HK-1 en la biología del glioma.

En relación al tratamiento del glioblastoma se ha publicado una guía en 2013 con posibles tratamientos alternativos a la terapéutica habitual dado el bajo porcentaje de supervivencia de este tumor. En esta guía se ha incluido el tratamiento con Aprepitant dado que la SP estimula el crecimiento tumoral en gliomas y se ha demostrado que los antagonistas del receptor NK-1R inhiben la proliferación celular e inducen la apoptosis. Además de tener un efecto antiangiogénico e inhibidor de la migración celular. A todos estos beneficios se le suman los pocos efectos secundarios de esta medicación y que se manifiestan rara vez⁴¹¹.

1.11.1.E. CÁNCER DE PULMÓN.

En las últimas décadas no ha habido un aumento significativo en la supervivencia de los pacientes de cáncer de pulmón a pesar de su sensibilidad inicial a la radio y a la quimioterapia por lo que es importante seguir buscando nuevos tratamientos.

En un reciente estudio realizado en 2012 por el Dr. Muñoz y colaboradores⁴¹¹ se han estudiado dos líneas celulares de cáncer de pulmón, una de cáncer de pulmón de células no pequeñas COR-L23 y otra de cáncer de células pequeñas H-69. Se demostró la presencia de SP y de NK-1Rs en ellas.

En ambas líneas celulares se ha evidenciado que existe expresión de isoformas de NK-1R y mRNA para el NK-1R, también se ha visto la sobreexpresión de los genes para taucicina 1. Se ha

demostrado como SP induce la proliferación celular tanto en la línea de cáncer de pulmón de células pequeñas como en la línea celular de células no pequeñas COR-L23.

El Aprepitant, L-733.060 y L-732,138 inhibieron la proliferación celular en ambas líneas celulares de forma dependiente al aumento de concentración. La inhibición del crecimiento del tumor fue por el efecto antagonico sobre el receptor NK-1R y se produjo la muerte celular mediante apoptosis.

Por todas estas observaciones, se presume que los antagonistas del NK-1R pueden ser buenos candidatos para futuros tratamientos contra el cáncer de pulmón.

En estudios anteriores realizados por Mackinnon y colaboradores⁴¹² se demostraba que los antagonistas de SP estimulaban la apoptosis y la actividad del c-jun-N-terminal cinasa en células de cáncer de pulmón de células pequeñas; siendo esta actividad neuropéptido-independiente. El [Arg(6),D-Trp(7,9),N(me)Phe(8)]-sustancia P (6-11), antagonista de SP bloquea el crecimiento celular del cáncer de pulmón de células pequeñas, para las líneas celulares H69 y H510 respectivamente. Pero su mecanismo exacto de acción sigue siendo confuso.

Además, el antagonista de SP por sí mismo inducía la inflamación (aumento del 59% en el volumen del edema comparado al control) y reforzaba (por un 35-40%) la formación de edema in vivo inducida por bradiquinina. También se demostraba en este estudio que el antagonista de SP estimulaba la actividad básica de la G-proteína en las membranas de la célula de cáncer de pulmón de células pequeñas. Pudiendo esta novedosa actividad explicar la acción anticáncer completa en células de cáncer de pulmón de células pequeñas y podría también explicar la actividad del antagonista de SP en cánceres no neuropéptido-dependientes.

Estos resultados se ampliaron y se demostró que el estímulo que ejercía el antagonista de P sobre el c-jun-N-terminal cinasa y la apoptosis era dependiente de la generación de ROS (especie reactiva del oxígeno), que era inhibida por la anoxia o la presencia de N-acetil cisteína.

El antagonista de SP no era intrínsecamente un donante de radicales libres de oxígeno sino que estimulaba la generación de radicales libres específicamente dentro de las células de cáncer de pulmón de células pequeñas e incrementaba la actividad transcripcional del factor redox-sensible AP-1 en un 61%. En armonía con lo descrito con anterioridad, el antagonista de SP reducía los niveles celulares del glutatión en un 38% y estimulaba la producción de ceramida y la peroxidación lipídica (112%).

En estudios realizados en la fase I, se comprobó que el antagonista de SP aumentaba la inhibición del crecimiento inducida por el Etopósido.

Los resultados obtenidos sugerían que el antagonista de SP podría ser particularmente eficaz como tratamiento adicional a la quimioterapia estándar en el cáncer de pulmón de células pequeñas. Radicando la importancia de estos resultados en el posible uso clínico de este novedoso compuesto en el futuro desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos en el tratamiento de este tipo de cáncer tan agresivo⁴¹³.

Como se vio en el anterior estudio el antagonista de SP inhibía la señal de transducción mitogénica del neuropéptido y el crecimiento del cáncer de pulmón de células pequeñas *in vitro* e *in vivo*; posteriormente, utilizando las líneas celulares GLC14, 16 y 19 (del cáncer de pulmón de células pequeñas), se demostró que había un aumento en la sensibilidad a los neuropéptidos, así como un incremento paralelo en la sensibilidad al antagonista de SP.

En varias líneas celulares tumorales (cáncer de pulmón de células pequeñas y resto de cáncer de pulmón, ovárico, colorrectal y pancreático) se examinó la expresión de los receptores mitogénicos para la vasopresina, el péptido liberador de gastrina, la bradiquinina y la gastrina, probándose su sensibilidad al antagonista de SP *in vitro* e *in vivo*.

Las líneas celulares tumorales exhibieron una variedad de sensibilidades a los valores de antagonista de SP (IC₅₀) a partir de 10.5 a 119 μ M). La expresión del receptor de GRP medido por PCR, fue correlacionado significativamente con la inhibición del crecimiento por antagonista de SP. Además, la introducción del receptor de GRP en fibroblastos de rata aumentó su sensibilidad al antagonista de SP.

La medida de la expresión del receptor por la reacción en cadena de la polimerasa podría proporcionar una prueba de diagnóstico conveniente para predecir eficacia al antagonista de SP clínicamente. Esta estrategia supondría una ventaja potencial en tumores que expresan el receptor neuropeptídico en cáncer de pulmón de células pequeñas y en los tumores que son relativamente resistentes a la quimioterapia convencional⁴¹⁴.

Existen una serie de neuropéptidos, particularmente la arginina vasopresina (AVP) y el péptido liberador de gastrina (GRP) que actúan como factores del crecimiento autocrinos y paracrinos; cuya propia expresión y la de sus receptores, son marcadores de enfermedad en el cáncer de pulmón de células pequeñas.

En un reciente estudio⁴¹⁵ realizado con los análogos de la sustancia-P incluyendo [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]-sustancia-P (SP-D) y [Arg(6),D-Trp(7,9),N(me)Phe(8)]-sustancia-P (6-11) (Antagonista de SP) que inhibían el crecimiento de las células de cáncer de pulmón de células pequeñas modulando las señales neuropeptídicas, se ha demostrado que la expresión de los receptores de GRP y de AVP conduce al desarrollo de un fenotipo transformado. La adición del neuropéptido proporciona una cierta protección contra la citotoxicidad inducida por el Etopósido. La expresión del receptor también conduce a una sensibilidad creciente a la inhibición del

crecimiento inducida por el análogo de SP. El SP-D y el antagonista de SP actúan mientras que los agonistas en polarización negativa en los receptores de GRP y de AVP causan un bloqueo del lanzamiento de Ca^{2+} mediado por Gq.

Ésta es la primera descripción del agonismo en polarización negativa en los receptores de AVP. Esta farmacología única gobierna las características antiproliferativas de estos agentes y destaca su potencial terapéutico para el tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas y particularmente en tumores que han desarrollado resistencia a la quimioterapia.

1.11.1.F. MELANOMA.

Varios estudios realizados por Muñoz y colaboradores el último de ellos realizado en 2014 ^{298 380 416,417,418} demuestra la implicación existente entre la SP y el desarrollo tumoral en varias líneas celulares de melanoma y de melanoma uveal. Para ello utiliza una molécula antagonista de los NK-1R, como terapia para inhibir el crecimiento tumoral, el L-733,060.

El melanoma representa el 1% de todos los cánceres y provoca aproximadamente el 65% de muertes por cáncer de piel. Actualmente no existe tratamiento eficaz. En el año 2004, Muñoz y colaboradores publicaron un estudio que, basándose en la expresión de la SP en melanomas malignos e invasivos, estudió la capacidad inhibitoria sobre el crecimiento in vitro, de un antagonista del NK-1R de potente y prolongada acción, el L-733,060 en unos rangos de concentración de 2.5-20 μ M, 10-30 μ M y 20-50 μ M en las líneas celulares del melanoma COLO 858, MEL H0 y COLO 679, respectivamente.

Se utilizó un coulter counter para determinar el número de células viables, utilizándose el compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio como método colorimétrico para evaluar la proliferación de celular.

L-733,060 inhibió el crecimiento de las tres líneas celulares de forma dosis-dependiente. La concentración de inhibición del 50% [IC(50)] fue 8.7 μ M a las 48 h y 7.1 μ M a las 96 h para COLO 858; 27.5 μ M a las 24 h y 18.9 μ M a las 48 h para los MEL H0; y 33.8 μ M a las 30 h y 31.5 μ M a las 72 h para COLO 679 (figura 32).

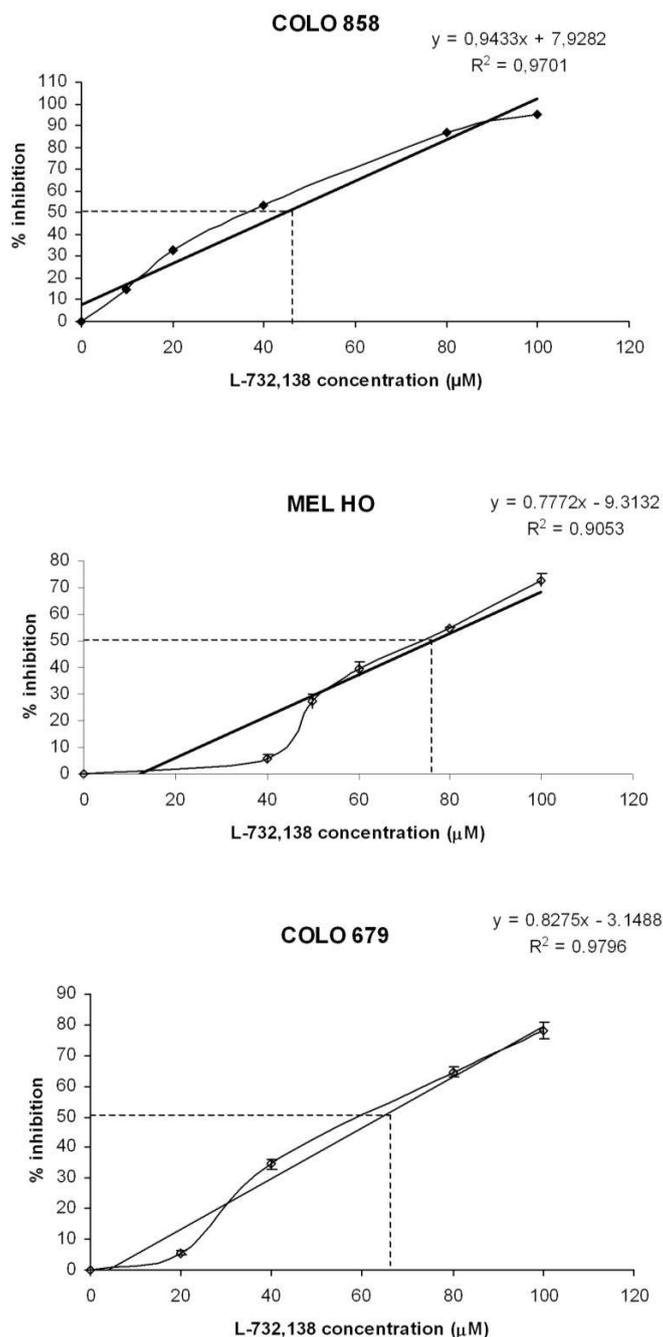


Figura 32. Porcentaje de inhibición del crecimiento de COLO 858, MEL HO y COLO 679 de melanoma humano en cultivo in vitro en relación con la adición de concentraciones crecientes (de 10 a 100) de L-732,138. Nivel de significación $p \leq 0.05$.

Estos resultados indicaban que el L-733,060 actuaba como agente antitumoral. Esta acción se demostró por primera vez en este estudio y sugería que el L-733,060 podría ser un fármaco prometedor en el tratamiento del melanoma humano.

En el ultimo estudio de 2014 de Muñoz et al, en líneas celulares de melanoma, se demostró además que el NK-1R es muy importante para la viabilidad de las células tumorales. Ya que tras la

eliminación de NK-1R en las células mediante el método de silenciamiento génico (siRNA) o “knockdown gene silencing method”, las células afectadas que no expresan NK-1R demostraron una gran disminución de proliferación y metástasis en comparación con los controles.

El método siRNA, se llevó a cabo en líneas celulares de melanoma COLO 858. Después de 72 h, encontramos $7,2 \times 10^5$ siRNA-negativas COLO 858 de control y $2,2 \times 10^5$ siRNA TAC1R COLO 858. Este experimento se repitió tres veces por duplicado. El número de células de control negativo siRNA se comparó con el número de las células siRNA TAC1R. A la hora 0, se sembraron 20.000 células COLO 858. A las 72 h, la disminución en el número de células siRNA TAC1R era bastante significativa en comparación con el número de células de control negativo siRNA.

Estos datos muestran que los receptores NK-1 desempeñan un papel importante en la viabilidad de las líneas celulares de melanoma ³⁸⁰.

1.11.1.G. RETINOBLASTOMA.

En julio de 2005 se publicó otro estudio de Muñoz et al⁴¹⁹ donde se plantea si la activación del NK-1R induce la proliferación de células tumorales del retinoblastoma. Este estudio in vitro valora la capacidad inhibitoria del L-733,060 sobre el crecimiento de la línea humana WERI-Rb-1 del retinoblastoma y contra el retinoblastoma humano línea Y-79, en concentraciones que se extienden desde 7.5 a 20 μM y de 10 a 25 μM respectivamente. Este estudio también ha tratado de determinar la capacidad de la SP para activar el crecimiento de celular de estas líneas celulares de retinoblastoma.

Las concentraciones nanomolares de SP aumentaron el crecimiento de las líneas celulares y las concentraciones micromolares de L-733,060 inhibieron el crecimiento de las dos líneas estudiadas, con y sin la administración previa de la SP. El L-733,060 inhibió el crecimiento de las líneas WERI-Rb-1 e Y-79 de forma dosis-dependiente. El IC₅₀ fue 12.15 μM a las 49 horas para WERI-Rb1 y 17.38 μM a las 40 horas para Y-79.

Los resultados demuestran que la SP es mitogénica y también indica que el L-733,060 (antagonista del NK-1R) actúa en ambas líneas celulares humanas del retinoblastoma como un agente antitumoral.

1.11.1.H. OSTEOSARCOMA.

El osteosarcoma es un tumor óseo de alto grado que se origina en el epitelio mesangial. Es el tercer tumor óseo maligno más frecuente en niños y adolescentes. Si hay metástasis presentes la supervivencia a largo plazo es menor del 20%.

En un estudio del Dr. Muñoz et al⁴⁰⁰ publicado en 2013 se analizó la expresión de NK-1R en una línea celular humana de osteosarcoma (MG-63) mediante RT-PCR y Western-Blot. Se demostró

entonces la presencia de una cantidad significativa de proteínas y ARNm de NK-1R. Más tarde se demostró la capacidad inhibitoria sobre el crecimiento celular de Aprepitant y de otros antagonistas del NK-1R como el L-733,060 and L-732,138. Todos ellos inducen inhibición del crecimiento del tumor y apoptosis.

Se observó la existencia de sinergia en la combinación de L-733,060 y fármacos citostáticos usados comúnmente en las líneas celulares de MG-63.

Concentraciones nanomolares de SP han demostrado producir un aumento del ratio de crecimiento de las células de MG-63 y concentraciones nanomolares de Aprepitant inhiben el crecimiento inducido por la SP de una manera dosis dependiente (figura 33).

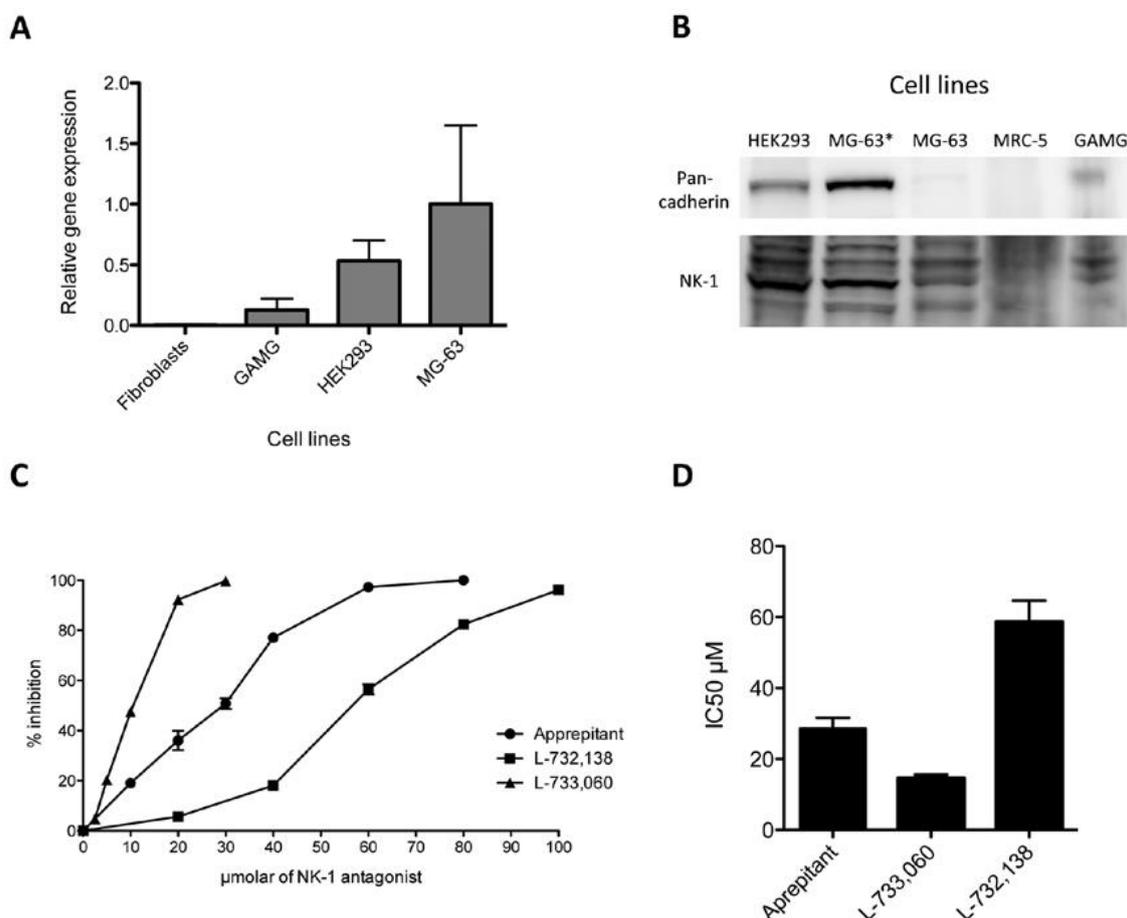


Figura 33. Expresión del receptor NK-1R e inhibición del crecimiento celular en línea celular de osteosarcoma MG-63 con concentraciones ascendentes de antagonistas del NK-1R.

In vivo, líneas celulares de MG-63 fueron xenoinjertadas en ratones, y estos separados en grupo control y grupo de tratamiento de forma aleatorizada. Una vez que el tumor resultó visible, estos fueron tratados con inyecciones subcutáneas peritumorales de fosaprepitant semanalmente

(los días 0, 7, 14, 21 y 28) con resultado de reducción del volumen del tumor de forma significativa (figura 34).

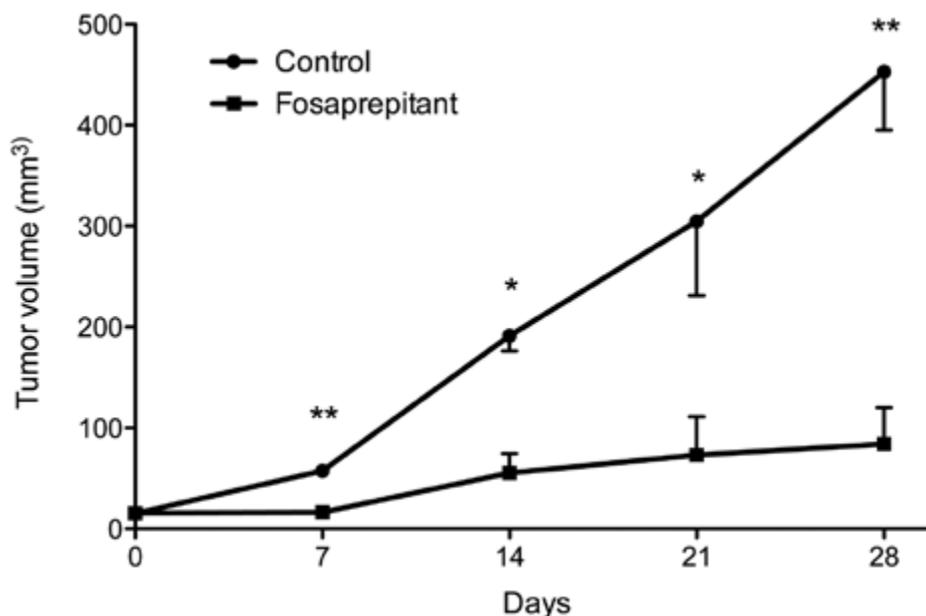


Figura 34. Tratamiento in vivo con fosaprepitant de ratones xenoinjertados con líneas celulares de osteosarcoma. Los ratones fueron observados a diario, el tamaño tumoral medido en mm³. *p<0.05, **p< 0.01.

Se demostró por tanto por primera vez que el NK-1R es expresado en líneas celulares de osteosarcoma MG-63 y que este receptor puede ser inhibido tanto in vivo como in vitro por antagonistas del NK-1R.

1.11.1.1. HEPATOBLASTOMA.

El hepatoblastoma es el tumor maligno hepático más frecuente durante la niñez. El pronóstico de este tumor es bueno si se puede producir una resección quirúrgica completa, pero si esto no es posible el pronóstico es bastante sombrío al tratarse de un tumor multirresistente a los tratamientos quimioterápicos que se conocen actualmente.

Por este motivo se realizó un estudio in vitro en tres líneas celulares de hepatoblastoma de 17 niños: HepT1, HepG2 y HuH6 e in vivo mediante xenoinjerto en ratones de la línea celular HuH6⁴²⁰, para intentar demostrar la utilidad del complejo SP-NK-1R como un potencial objetivo para el tratamiento de este tumor.

Las células del hepatoblastoma expresan predominantemente una variedad truncada de NK-1R. Los fibroblastos tienen una expresión muy pobre de NK-1R y por ello tienen una gran resistencia al tratamiento.

La estimulación de las células de hepatoblastoma con SP causa un aumento en la tasa del crecimiento del tumor y la administración de sustancias antagonistas del NK-1R producen una inhibición de este crecimiento (figura 35).

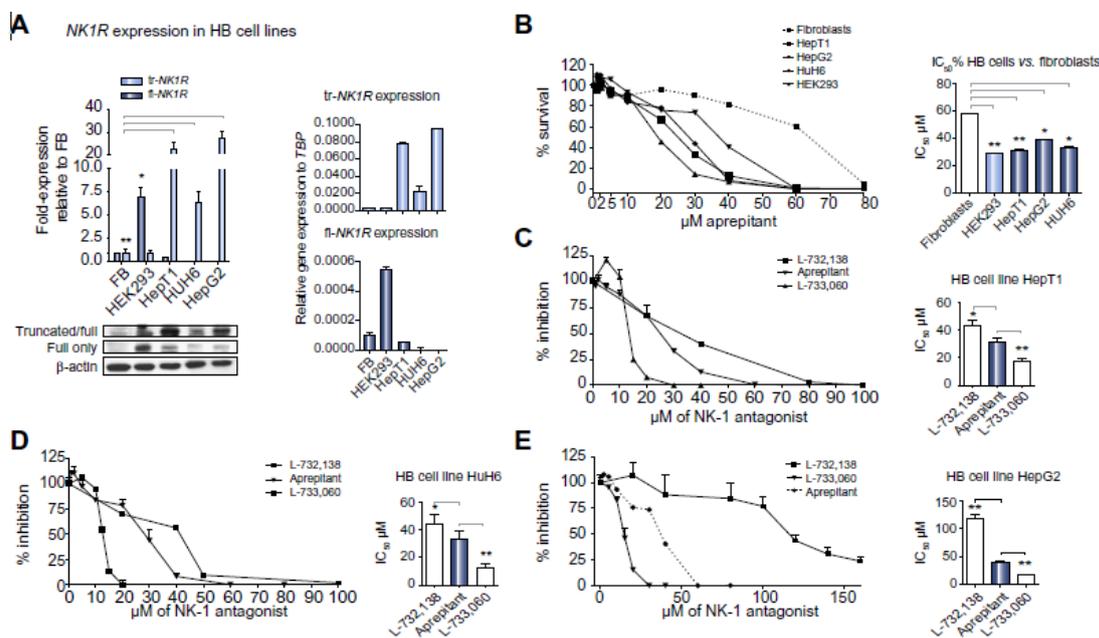


Figura 35. (A), expresión de ARNm para el NK-1R en fibroblastos humanos (FB) y tipo de expresión genética (fl, completa; tr, truncada). Niveles de expresión obtenidos por RT-PCR y Western blot. (B) supervivencia celular después del tratamiento con Aprepitant durante 48 h para las líneas celulares HuH6, HepT1, HepG2. (C-E) supervivencia celular comparando L-733,060 y L-732,138 con Aprepitant en HepT1 (C), HuH6 (D) y HepG2 (E).

Más importante aún es la observación en vivo en los ratones estudiados tras xenoinjerto de líneas celulares de hepatoblastoma HuH6. Los ratones fueron xenoinjertados de forma subcutánea con células de HuH6 humanas y posteriormente aleatorizados en dos grupos: grupo control y grupo tratamiento. Aprepitant fue administrado de manera oral todos los días cuando los tumores alcanzaron el tamaño de 75 mm³ hasta el día 24. El calibre del tumor se midió con un calibrador en mm³. Se demuestra una reducción significativa del tumor tras la administración oral de 80 mg/kg de Aprepitant durante 24 días (figura 36).

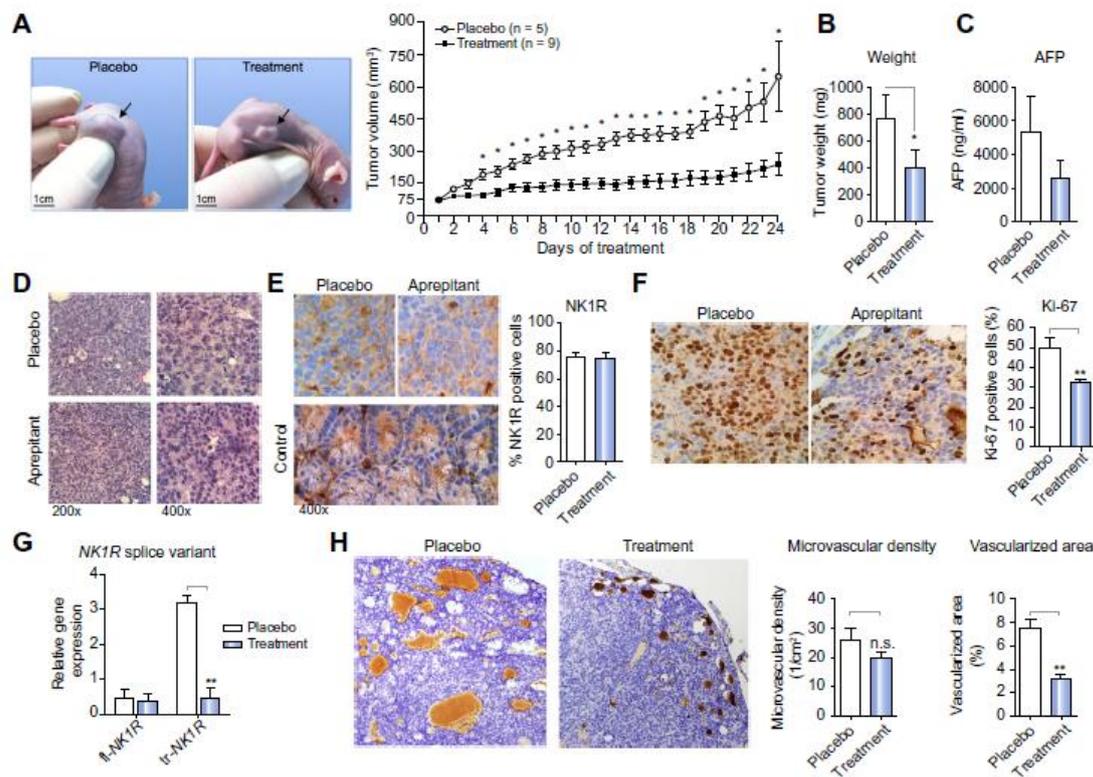


Figura 36. Tratamiento in vivo de ratones xenoinjertados con HuH6 con Aprepitant. (A). Diferencia entre grupo placebo y grupo tratamiento. En (B) y (C), se muestra el peso del tumor y los niveles de AFP respectivamente. La histología de los ratones tratados y no tratados se muestra en (D). La inmunohistoquímica del NK-1R se muestra en los paneles superiores de (E). En (F), se muestra la inmunohistoquímica de Ki-67. En (G), se presenta la variante de NK-1R. También podemos ver en (H) la angiogénesis in vivo por medio de inmunohistoquímica de CD31 y en (H) se muestra la densidad y la vascularización. *p < 0.05; **p < 0.01.

Resultó una reducción de la tasa de crecimiento del tumor, una disminución del peso y del volumen del mismo, y disminución de los marcadores tumorales específicos alfa-fetoproteína en suero. También se observó como efecto del tratamiento in vivo, la inhibición de la angiogénesis.

1.11.2. IMPLICACIÓN DEL COMPLEJO SP/NK-1R EN LA PROGRESIÓN TUMORAL.

En términos generales, cuando el complejo SP/NK-1R se activa, se produce una serie de respuestas intracelulares que conllevan la activación de la cascada de las MAPK (proteín-quinásas activadas por mitógenos). El mecanismo por el que se transmite esta señal es confuso. En última instancia se va a producir una inducción de la proliferación celular protegiendo a la célula de la apoptosis^{421,422}.

Se ha demostrado ampliamente que las células tumorales sobreexpresan los receptores NK-1R y que tras unirse a SP se induce la proliferación celular. Los receptores NK-1R usualmente están localizados en la membrana citoplasmática y en la membrana plasmática de las células

tumorales, pero en ocasiones también se puede encontrar en el núcleo de las mismas (figura 37). Las células normales expresan un número menor receptores de NK-1R y las muestras de estadios avanzados de tumores exhiben niveles mucho más altos de receptores. Dentro del mismo tumor los fenotipos más malignos, muestran un ratio mayor de NK-1R y está asociado a situaciones tumorales avanzadas y a un peor pronóstico.

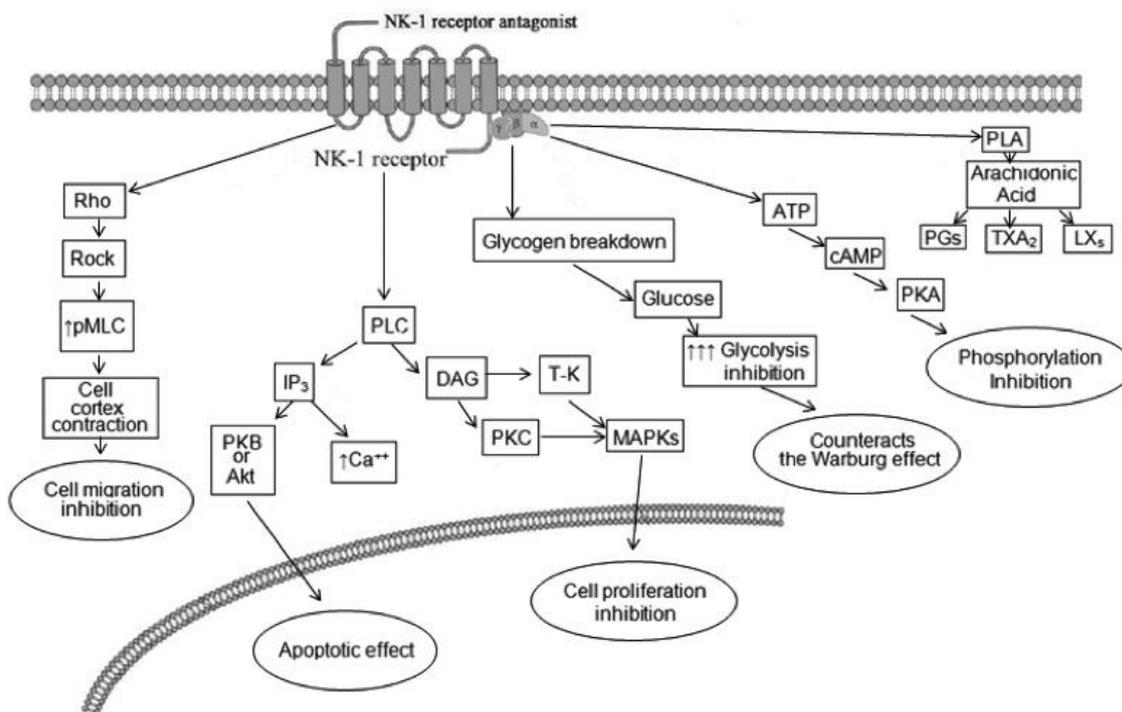


Figura 37. Cascada de señales desencadenadas por el receptor NK-1R. Al activarse mediante la SP comienza la proliferación celular, los efectos antiapoptóticos y la migración celular.

Además de inducir el crecimiento tumoral, se ha comprobado que la SP posee otras características oncológicas ya que tiene la capacidad de estimular la angiogénesis necesaria para el crecimiento tumoral. Así, la SP por medio del NK-1R va a inducir la proliferación de las células endoteliales en primera instancia y posteriormente la formación de nuevos vasos que aseguren el aporte sanguíneo al tumor. Otro fenómeno estudiado es la facultad de la SP para inducir la producción de metástasis. Por un mecanismo no del todo conocido, la SP va a favorecer la migración tumoral y con ello la diseminación metastásica. Se ha visto con anterioridad que existe un claro vínculo entre la SP e inflamación, así se piensa que la SP podría favorecer el desarrollo de tumores en tejidos con inflamación crónica. Se ha demostrado que este neuropéptido se encuentra ampliamente en estos tejidos, esto, unido a la capacidad mitogénica de la SP es la base sobre la que asienta esta teoría. Otro aspecto interesante respecto a la SP es su implicación con los desordenes afectivos, siendo especialmente importante el incremento que existe de SP en ciertas áreas cerebrales en pacientes diagnosticados de ansiedad, depresión y estrés. Esta teoría supone que existe un vínculo entre el estado emocional del paciente y la evolución del cáncer llegando incluso a

sugerir que en pacientes diagnosticado de cáncer, el hecho de tratar la depresión con fármacos o medidas psicosociales podría aumentar el tiempo de supervivencia.

En resumen, la SP es un ubicuo mediador de la inflamación que, presente a concentraciones picomolar en tejidos humanos, a concentraciones nanomolares es un mediador de la inflamación que regula la inflamación y cáncer. Aquellos tejidos sometidos a inflamación crónica y a una exposición continua a SP pueden desarrollar células tumorales. Aquellas células cancerígenas que expresen una mayor cantidad de NK-1R y por tanto presenten un fenotipo más agresivo, serán seleccionadas produciéndose un aumento de la masa tumoral dependiente de la SP. Además, tanto la inhibición como la muerte celular que aparecen en las líneas celulares tumorales al administrar los antagonistas del NK-1R, podrían ser debidos a la pérdida de esas señales mitogénicas inducidas por el NK-1R que en este caso estaría inhibido. La pérdida del balance mitogénesis/apoptosis se inclinaría hacia este último produciendo la muerte celular. No se debe olvidar que la SP es abundante en el SNC donde actúa como neurotransmisor, aunque también como una hormona la cual se disemina por todo el torrente sanguíneo. Este punto podría ser clave para entender un hecho que se comprueba en la clínica diaria que es la importancia del SNC en el control y la progresión del cáncer.

Tras unirse a su receptor NK-1R la SP regula muchas funciones fisiopatológicas en el sistema nervioso central como el comportamiento emocional, el estrés, la depresión, la émesis, las náuseas, la migraña, la adicción al alcohol y la neurodegeneración.

La sustancia P ha sido también implicada en el dolor, la inflamación, la hepatitis, la hepatotoxicidad, colestasis, prurito, miocarditis, bronquiolitis, abortos, infecciones bacterianas y virales (VIH, por ejemplo).

La SP juega un papel muy importante en el cáncer, en la proliferación celular, efecto antiapoptótico, angiogénesis, migración de las células tumorales, infiltración y metástasis.

Todo esto significa que el complejo SP/NK-1R está envuelto en la base molecular de muchas patologías humanas. Por lo tanto el conocer a fondo de esta fisiopatología es la clave para entender el funcionamiento de muchas enfermedades.

Todos estos datos hacen que los antagonistas del NK-1R deban ser considerados como una alternativa para el tratamiento de la émesis, el prurito, la depresión, la degeneración neuronal, la enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones virales y el cáncer, ya que son regulados por el complejo SP/NK-1R^{423,424,425,426,427,428}.

Se ha demostrado la presencia de SP y de NK-1R en numerosos tipos de cánceres humanos (tabla 6).

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

Tabla 6. Presencia de SP y NK-1R en muestras y líneas celulares tumorales humanas.

Pero todavía quedan muchos otros campos por investigar tanto en tejidos cancerígenos como en tejidos sanos, actualmente el grupo de investigación del Dr. Muñoz et al, tiene varias líneas de investigación abiertas en este sentido.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La hipótesis que nos planteamos en la elaboración de este trabajo es que, al igual que otros tipos de cánceres, la SP y NK-1R se expresarían y a su vez regularían la progresión de los tumores tiroideos.

En el carcinoma de tiroides probablemente se expresan la SP y NK-1R que a su vez podrían regular de manera autocrina y paracrina la progresión del cáncer.

Los objetivos globales del presente trabajo son los siguientes:

1. Estudiar la expresión, localización y distribución de la Sustancia P en tejido tiroideo humano sano.
2. Estudiar la expresión, localización y distribución del receptor NK-1R en tejido tiroideo humano sano.
3. Estudiar la expresión, localización y distribución de la Sustancia P en los diferentes tipos de cáncer de tiroides existentes y en metástasis de carcinomas tiroideos.
4. Estudiar la expresión, localización y distribución del receptor NK-1R en los diferentes tipos de cáncer de tiroides existentes y en metástasis de carcinomas tiroideos.

III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. MATERIAL FUNGIBLE.

- Micropipetas serológicas estériles de 1 a 10 μ l y de 10 a 500 μ l (Gilson International, Francia).
- Portaobjetos cargados electrostáticamente FLEX IHC (Dako, Alemania).
- Cubreobjetos FLEX (Dako, Alemania).
- Puntas de pipeta estériles de 1 a 10 μ l y de 10 a 500 μ l (Nunc Brad Products, Dinamarca).
- Papel de filtro (Auxilab, España).
- Pertex (medio sintético de montaje) (Medite, Alemania).
- Alcohol (Instrumentación técnico analítica, España).
- Xilol (Instrumentación técnico analítica, España).
- Kit de inmunohistoquímica (Dako, España): EnVision™ FLEX, High pH, (link), que contiene:
 - EnVision™ FLEX Diluyente de anticuerpo
 - EnVision™ FLEX Buffer de lavado (20x): tamponada con solución Tris, pH 7,6.
 - EnVision™ FLEX Solución de recuperación antigénica, pH bajo (50x): tampón de citrato, pH 6,1.
 - EnVision™ FLEX Cromógeno DAB+: tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina en disolvente orgánico
 - EnVision™ FLEX Sustrato buffer: contiene peróxido de hidrógeno y conservante.
 - EnVision™ FLEX / HRP: dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra contra inmunoglobulinas de conejo.
 - EnVision™ FLEX + rabbit (linker): solución tamponada con proteína estabilizante y antibiótico.
 - EnVision™ FLEX reactivo bloqueante de peroxidasa: tampón fosfato con peróxido de hidrógeno.
- Botes para rellenar con reactivos de 5 y 12 ml (Dako, España).

3.2. MATERIAL INVENTARIABLE.

- Dako Autostainer Link analizador (Dako, España).
- Dako PT link (Dako, España).
- Microtomo (Leica Geosystem, España).
- Frigorífico Superser Ecologic.
- Estufa para temperatura de 37°C y 60°C (Labline, España).
- Agitador tipo vórtex (Gene 2, Scientific industries, EEUU).
- Baño calentador (SORVALL-Heraeus, EEUU).
- Microscopio óptico Olympus BX 61.
- Objetivos Olympus serie UPLSAPO 4X, 10X, 20X, 40X y 60X.
- Cámara fotográfica digital integrada en el microscopio, Olympus modelo DP72.
- Pinzas (Pall Life Science, EEUU).
- Cubetas para tinción con tapa y gradilla de vidrio (Marienfeld, Alemania).
- Gradilla para tinción de acero inoxidable (Marienfeld, Alemania).
- Programa para fotografía digital CellSens Dimension, versión 1.4 (2010, Olympus Corporation).

3.3. MATERIAL BIOLÓGICO: ANTICUERPOS Y TEJIDO TIROIDEO.

Se emplearon los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo policlonal de conejo anti NK-1R (Sigma-Aldrich, España: Referencia 58305 y Lote 083M4759 de 2014 de; 2 ml).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti Sustancia P (Sigma-Aldrich, España: Referencia 51542 y Lote 030M4767 de 2014; 2 ml).

Las muestras de tejido tiroideo se obtuvieron del depósito del biobanco del Hospital de Mérida, contando para ello con la colaboración del Departamento de Anatomía Patológica.

3.4. MÉTODO DE TRABAJO.

3.4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.

Estudio observacional descriptivo anatómico-morfológico semicuantitativo de la expresión distribución inmunohistoquímica de la SP y los receptores NK-1R en el cáncer de tiroides.

3.4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Los pacientes que conforman el material del estudio, fueron diagnosticados y tratados quirúrgicamente en el Hospital de Mérida con finalidad curativa.

3.4.3. MUESTRAS.

En total estudiamos un número de 135 muestras, ya que para cada caso del estudio estudiamos cuatro muestras del tejido en cuestión, correspondientes a la tinción con SP, NK-1R, control negativo (sin anticuerpo primario) y tinción con hematoxilina-eosina. En cada proceso de inmunohistoquímica se incluyó también una muestra de placenta como control positivo tanto de SP como NK-1R, previamente analizado, valorado, validado y publicado por Muñoz et al.

3.4.4. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Se presentó el proyecto del estudio, previo a su realización, al Comité de Ética de la Universidad siendo considerado apto para su realización.

Estudio está sujeto a los principios adoptados por la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y posteriores revisiones.

Se han seguido las normas de Buena Práctica Clínica dictadas por la Conferencia Internacional de Armonización de Directrices sobre Buena Práctica Clínica y los requisitos de las Autoridades Sanitarias Españolas establecidos en el Real Decreto 711/2002 de 19 de julio.

Los sujetos de estudio se identificaron mediante código único de manera confidencial. Se ha cumplido lo estipulado por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal.

3.5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS E INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA.

3.5.1. REALIZACIÓN DE CORTES Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4% e incluidas en bloques de parafina según el protocolo habitual del servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Mérida.

Se realizaron cortes de los tejidos entre 3-5 μm con un microtomo y se montaron en portaobjetos destinados específicamente para inmunohistoquímica con el ancho adecuado para los instrumentos Autostainer, identificándolas mediante serie numerada.

Estas muestras de tejido parafinado se incubaron durante 24 horas en la estufa a 37°C y 30 minutos antes de la realización de la inmunohistoquímica a 60°C.

3.5.2. RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA INDUCIDA POR CALOR.

Se colocan los portaobjetos en unos peines que se introducen en el sistema PT-link específico para la recuperación del epítipo inducida por calor. Con esta técnica, se llevan a cabo la desparafinación y la rehidratación en el mismo paso de la recuperación antigénica.

Se llenan los tanques del sistema PT-link con la solución de recuperación antigénica de pH ácido citrato low diluída en agua destilada (1:10), durante 20 minutos a 96°C.

3.5.3. INHIBICIÓN DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA.

Tras este proceso, se introduce la gradilla con los portaobjetos en un tanque con una solución buffer de lavado (Tris) diluida (1:20) y a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Con este procedimiento se evita la reacción de las peroxidasa endógenas con la diaminobencidina.

3.5.4. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.

Se preparan los reactivos en los botes para rellenar con reactivos que se introducirán posteriormente en el dispositivo RACK del sistema Autostainer Link. De todas las soluciones necesarias para la realización de la inmunohistoquímica, unas se pueden incorporar directamente al RACK pues ya vienen preparadas en el kit de inmunohistoquímica (peroxidasa, hematoxilina, EnVision™ FLEX / HRP y Linker de conejo).

Sin embargo, será necesario preparar en los botes, las siguientes soluciones:

- Sustrato buffer y cromógeno DAB+ (diaminobenzidina) en una proporción de 1 gota de cromógeno por cada 20 ml de sustrato.

- Anticuerpos policlonales primarios de conejo y diluyente: se prepararán tres botellas para las distintas soluciones: una solución de diluyente comercial Dako, una solución de anticuerpo anti SP y diluyente en proporción 1:2000, y una solución de anti-NK-1R y diluyente en proporción 1:1000.

La preparación de la cantidad de solución a introducir en los botes para rellenar, ha de ser calculada según protocolo del sistema Autostainer Link.

3.5.5. PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO DE TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA EN INSTRUMENTO AUTOSTAINER LINK.

Se introducen los peines con los portaobjetos en el sistema Autostainer Link, tras identificación de los portaobjetos con etiquetas en las que constan el número de bloque, el anticuerpo empleado (anti SP o anti NK-1R), la concentración utilizada, la fecha de realización de la inmunohistoquímica y la fecha de caducidad del reactivo.

Se producirán de forma automática los procesos de incubación de los cortes en antisuero primario específico para cada anticuerpo, la incubación en anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y la incubación con diaminobencidina.

Los pasos de tinción y los tiempos de incubación óptimos recomendados son preprogramados en el software del sistema.

En el caso del número de portaobjetos de nuestro estudio, se requirió un tiempo de tres horas de procesamiento.

3.5.6. DESHIDRATACIÓN DEL TEJIDO.

Una vez completado el procedimiento de tinción, se han de montar las muestras.

Se llevan las muestras a agua destilada, se realizará la deshidratación de las muestras mediante el paso de los portaobjetos por la batería de alcoholes en el siguiente orden: 60% (30 segundos), 70% (30 segundos), 80% (30 segundos), 90% (5 minutos), 96% (5 minutos), 100% (5 minutos).

Finalmente se pasan las tres muestras por las tres cubetas de xiloles, para eliminar el alcohol: de forma rápida en las dos primeras (hasta que los cristales dejen de “lagrimear”) y en la tercera, el tiempo necesario hasta el montaje con el pegamento.

3.5.7. MONTAJE.

A cada cristal recién sacado y escurrido del xilol se le pone un cubreobjetos al que previamente se han añadido unas gotas de pegamento Pertex. La reacción del xilol y el pegamento

hace que se unan ambos materiales. Se eliminan las burbujas que se forman durante el montaje. Una vez secado, las muestras están preparadas para la visualización del resultado con el microscopio óptico.

3.5.8. CONTROL DE CALIDAD.

Los controles de la especificidad anticuerpo policlonal del reactivo mediante un suero preabsorbido, no se realizan como control de calidad, dado que los anticuerpos han sido validados para su uso por el laboratorio que los comercializa.

Cada sesión de tinción incluyó una muestra de control positivo conocido con el fin de asegurar un rendimiento correcto de todos los reactivos aplicados.

Se ha utilizado un reactivo de control negativo con cada muestra para identificar cualquier tinción no específica.

La solución que contiene diaminobencidina proporciona un color marrón en el lugar del antígeno diana reconocido por el anticuerpo primario. El color marrón está presente en la muestra de control positivo en la ubicación esperada del antígeno diana.

No hubo tinción inespecífica, que se reconocería como una tinción bastante difusa de color marrón en los portaobjetos tratados con el reactivo de control negativo.

Los núcleos se tiñen de color azul gracias a la contratinción con hematoxilina.

3.6. VALORACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Las muestras fueron valoradas e interpretadas una a una en colaboración con un especialista en Anatomía Patológica especializado en patología tiroidea. Para ello se siguió un sistema ciego de identificación de las muestras en el que no se conoce ningún dato del paciente (edad, diagnóstico, comorbilidad...) en el momento de valorar cada muestra.

Se obtuvieron fotografías de las muestras más representativas mediante un microscopio Olympus BX61, dotado con objetivos de diferentes aumentos (4X, 10X, 20X, 40X, 60X) y acoplado a una cámara fotográfica digital Olympus modelo DP72.

Para el procesamiento de las imágenes se empleó el software *CellSens Dimension* (versión 1.4, 2010, Olympus Corporation). Algunas imágenes, denominadas como “reconstruidas” en el apartado de Resultados, se obtuvieron mediante la opción que ofrece este programa de edición fotográfica de superponer diferentes imágenes obtenidas varios planos del eje Z (separados entre sí por 0.1 μm), integrando los diferentes puntos enfocados de cada plano en una sola imagen final, en la que se consigue una profundidad de campo notablemente mayor.

Los resultados del estudio inmunohistoquímico se presentan utilizando un sistema de puntuación semicuantitativo, el Allred Unit Scoring system. Se trata de un sistema de puntuación de 8 unidades. Este sistema evalúa la proporción y la intensidad de la tinción de 0 a 8.⁴²⁹

3.6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

La descripción de la muestra y su análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Microsoft Excel 2014 y el paquete estadístico SPSS v.14.

IV. RESULTADOS.

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO.

Se dispone de 135 muestras histológicas pertenecientes a pacientes diagnosticados de cáncer de tiroides de diferentes estirpes. El 63% son mujeres y el 37% hombres, con edades comprendidas entre los 11 y 76 años (media 47 años).

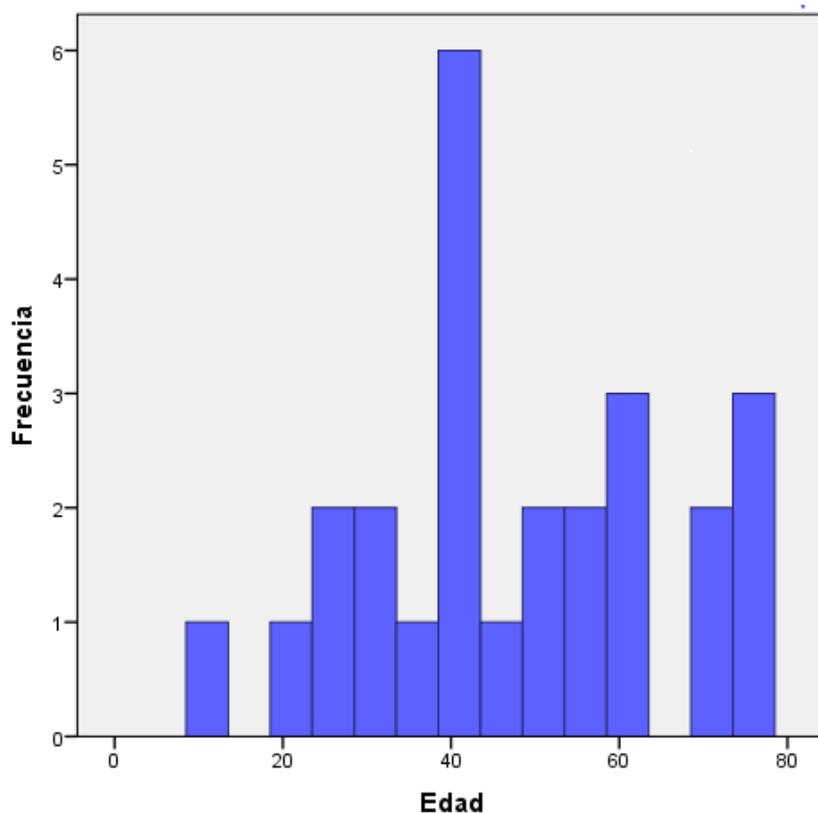


Figura 38. Distribución de edades.



Figura 39. Distribución por sexo.

De los pacientes el 30,07% no presentaban antecedentes personales de interés clínico. El 19,2% tenían antecedentes de hipertensión arterial; el 19,2% dislipemia y el 3,8% hipotiroidismo. Respecto a hábitos tóxicos el 11,5% tenían hábito tabáquico y ningún paciente era bebedor ni consumidor de otras sustancias tóxicas.

Respecto al tipo de tumor tiroideo el 34,6% de las muestras corresponden a carcinoma papilar de tiroides; el 30,8% a carcinoma folicular; el 11,5 % a carcinoma medular; el 7,7% a carcinoma anaplásico y el 15,4% a metástasis.

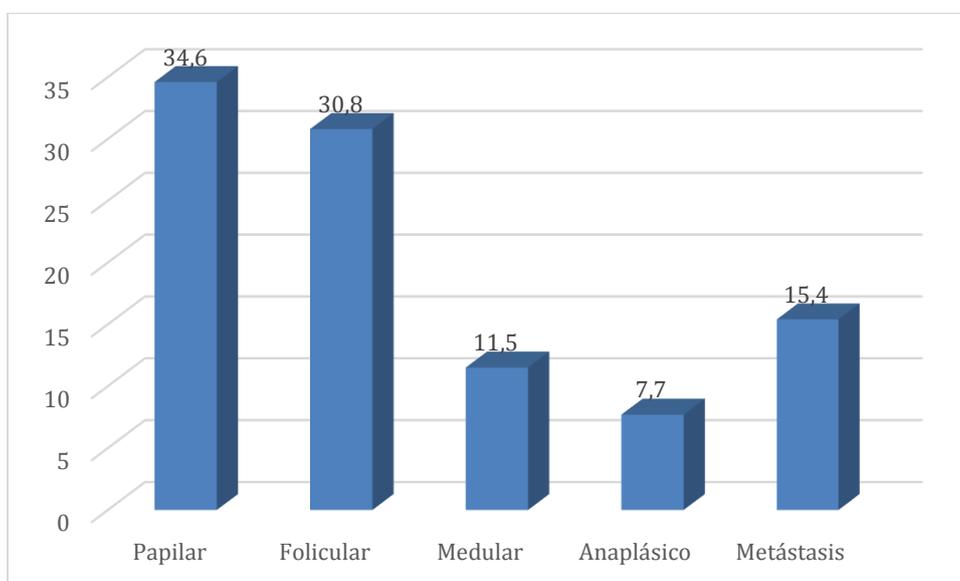


Figura 40. Distribución por tipos de tumor.

4.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP Y EL NK-1R.

Los resultados del estudio inmunohistoquímico se presentan utilizando un sistema de puntuación semicuantitativo, el Allred Unit Scoring system. Se trata de un sistema de puntuación de 0 a 8 unidades. Este sistema evalúa la proporción y la intensidad de la tinción. La puntuación representa la proporción estimada de fracción de células de tinción positiva (0 = ninguna; 1 = menos de una centésima; 2 = centésima a décima; 3 = un décimo a un tercio; 4 = un tercio a dos tercios; 5 = mayor que dos tercios).

Y la intensidad estimada de 0 a 3 (0 = ninguno; 1 = débil; 2 = intermedio; 3 = fuerte).

La puntuación total se expresa como la suma de la proporción y la intensidad de puntuaciones (por lo que oscila entre 0 y 8)⁴²⁹ (figura 41).

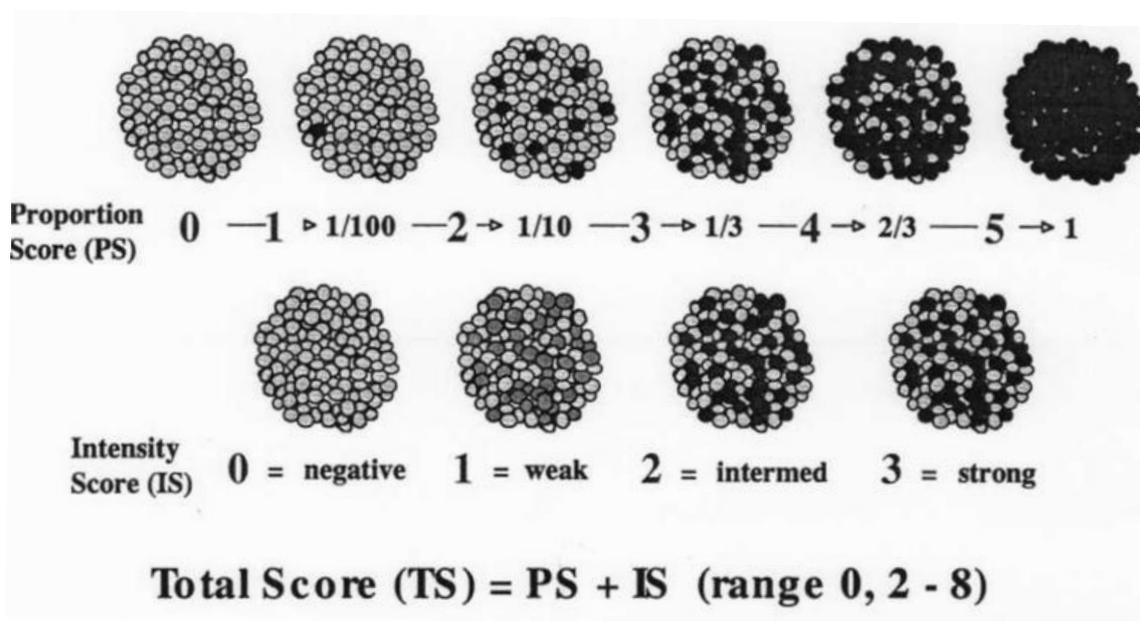


Figura 41. Sistema Allred Unit Scoring.

Si el marcador es ≥ 1 , el tejido fue aceptado como positivo. Las tasas de positividad y los resultados se compararon entre los tejidos sanos y patológicos, y entre diferentes diagnósticos patológicos (figura 42).

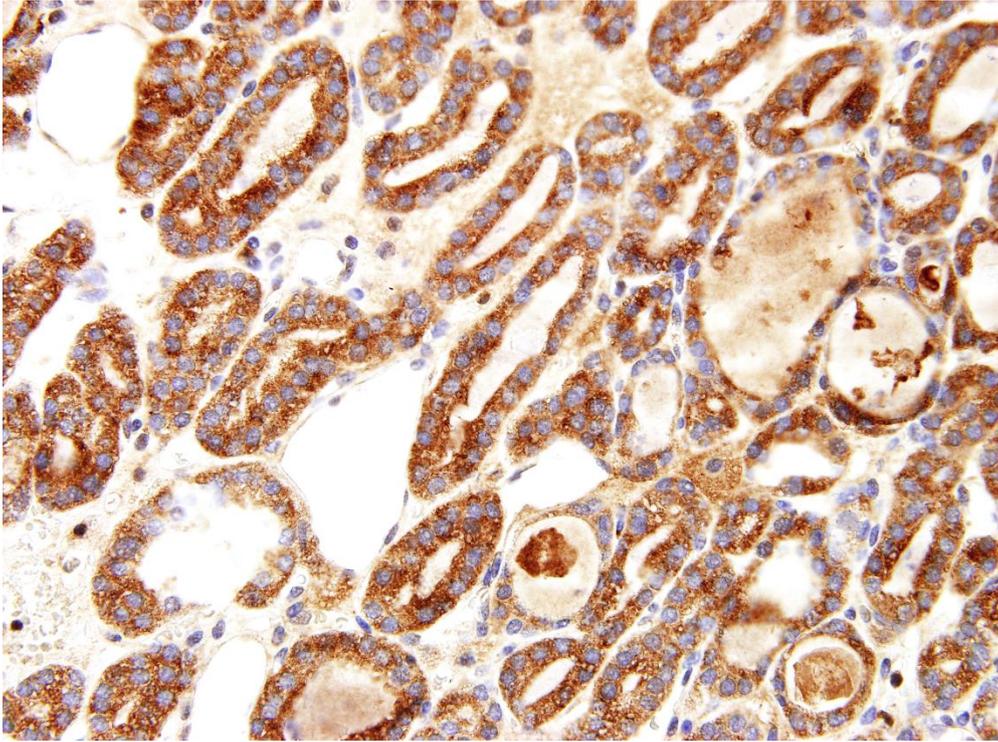


Figura 42. Expresión NK-1R en carcinoma folicular de tiroides (x40). Tinción citoplasmática: Proporción = 5 y la intensidad = 3 (Allred = 8). Tinción coloide: Proporción=3, intensidad=2 (Allred=5). Tinción nuclear: Proporción=0, intensidad=0 (Allred=0).

4.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP.

Observamos la expresión de SP en las distintas muestras de tejido sano tiroideo. Se objetiva tinción inmunohistoquímica de algunos núcleos de las células principales y del material coloide de los folículos tiroideos (compuesto fundamentalmente de tiroglobulina, yodo y enzimas para la síntesis de T3 y T4). Tanto el citoplasma de las células principales, como las células endoteliales y el tejido estromal no presentan tinción para SP en tiroides sano.

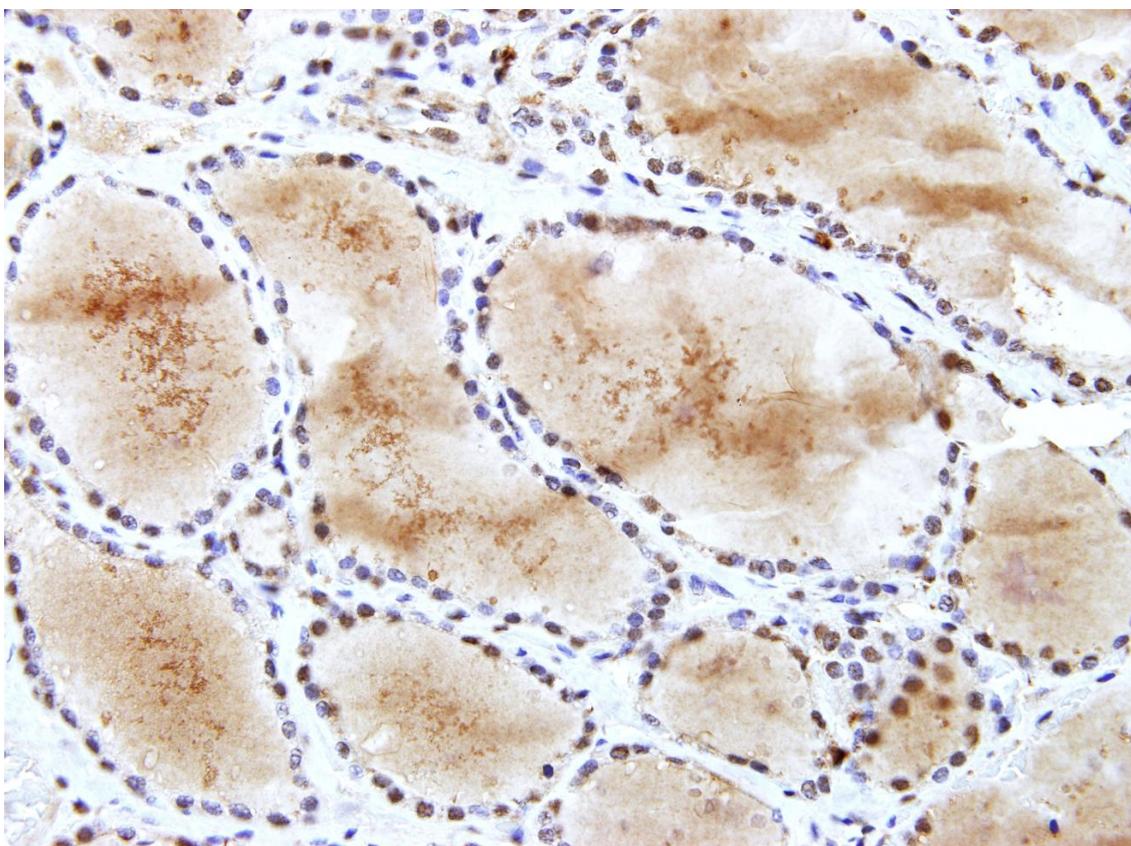


Figura 43. Expresión SP en tejido tiroideo sano. Podemos observar como se tiñen algunos núcleos (Allred:5) y el material coloide de los folículos tiroideos (Allred=6) . Tanto el citoplasma de las células principales, como las células endoteliales y el estroma no presentan tinción para SP (Allred=0).

4.3.1. EXPRESIÓN SP EN TUMORES TIROIDEOS.

De las 135 muestras de tejido tumoral obtenidas, todas expresaban en mayor o menor grado SP.

Los porcentajes de proporción e intensidad que se presentan utilizando el sistema de puntuación semicuantitativo Allred Unit Scoring System. Vemos en resumen los resultados en la tabla siguiente (tabla 7) y los vamos a analizar posteriormente de forma detallada.

score	Células principales citoplasma	Células principales núcleo	Estroma	Células endoteliales	Coloide
0	46.2%	11.5%	53.8%	0%	46.2%
1	0%	0%	0%	0%	0%
2	0%	0%	0%	0%	7.7%
3	15.4%	11.5%	11.5%	0%	3.8%
4	15.4%	19.2%	23.1%	0%	7.7%
5	7.7%	3.8%	7.7%	0%	11.5%
6	11.5%	15.4%	3.8%	0%	23.1%
7	3.8%	30.8%	0%	0%	0%
8	0%	7.7%	0%	0%	0%

Tabla 7. Expresión SP en tumores tiroideos según el sistema de puntuación Allred.

Teniendo en cuenta la distribución de la tinción, observamos que la gran mayoría de los núcleos de las células principales, el 88.5%, expresan SP en diferentes porcentajes (figura 44).

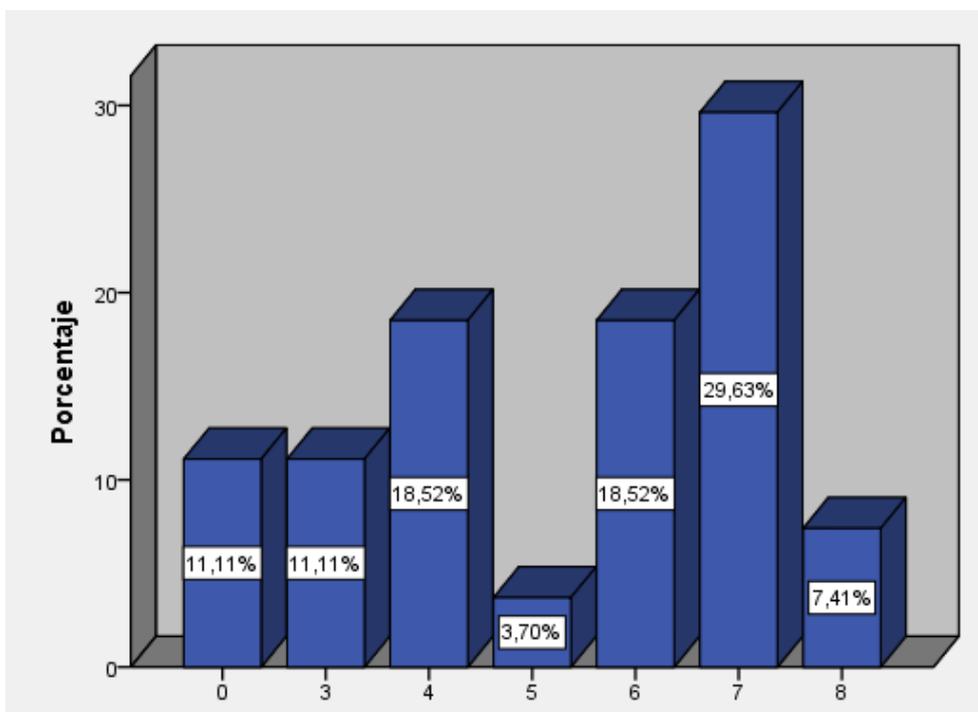


Figura 44. Porcentaje SP en el núcleo de las células principales (Allred).

Y en más de la mitad de los citoplasmas de las células principales, en el 53,8% también se observa tinción para SP con intensidad y proporción variables (figura 45).

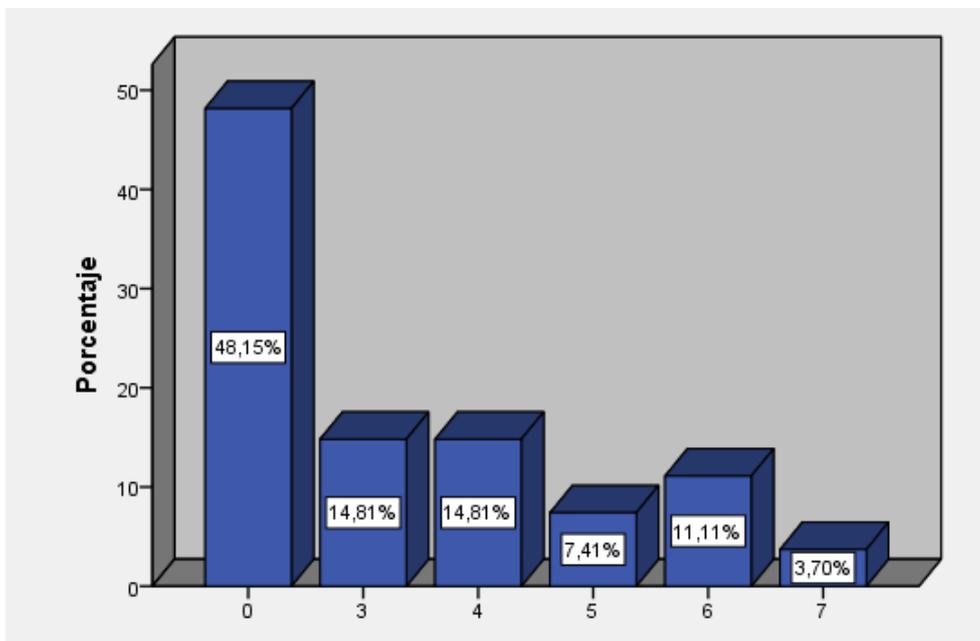


Figura 45. Porcentaje SP en citoplasma de las células principales (Allred).

Respecto a las fibras reticulares de tejido estromal tiroideo observamos expresión de SP en el 46,2% de las muestras (figura 46).

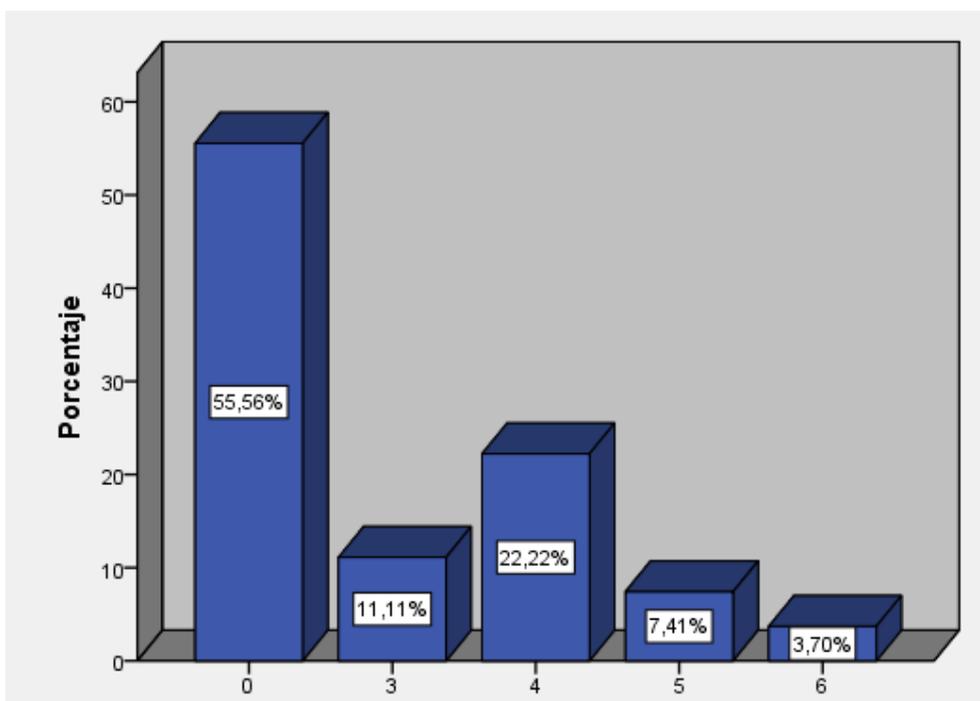


Figura 46. Porcentaje SP en fibras reticulares de tejido estromal tiroideo (Allred).

Y en el material coloide tiroideo se observa positividad en la tinción inmunohistoquímica en el 53,8% de las mismas en diferente porcentaje como se puede observar en el siguiente gráfico de barras (figura 47).

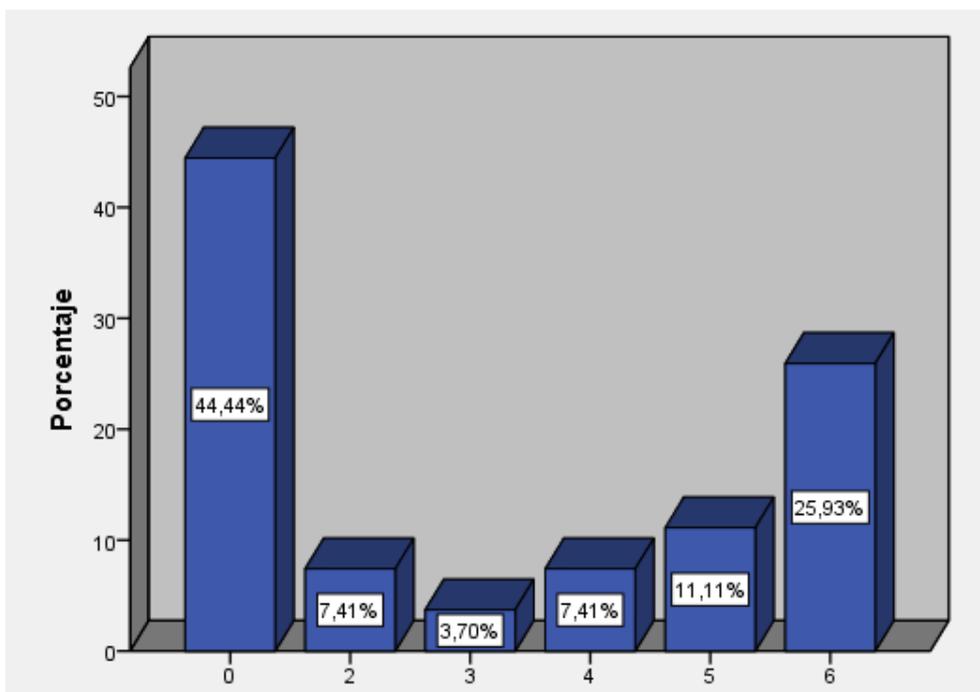


Figura 47. Porcentaje SP en material coloide tiroideo (Allred).

4.3.1.A. EXPRESIÓN SP EN LOS DIFERENTES TIPOS DE CARCINOMA TIROIDEOS.

EXPRESIÓN SP EN CARCINOMA PAPILAR.

Podemos objetivar en los tumores papilares que se produce una expresión intensa de los núcleos de las células principales, la tinción del material coloide es de intensidad y proporción moderada. No se tiñen ni el citoplasma de las células principales ni las células endoteliales y el tejido estromal con poca intensidad y en escasa proporción como podemos ver en las siguientes imágenes.

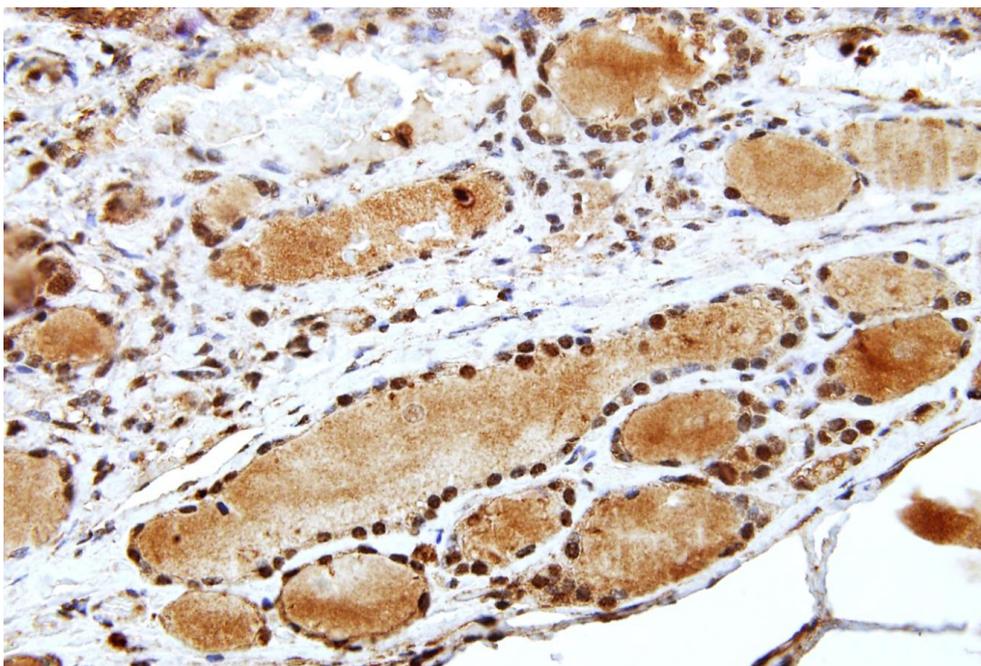


Figura 48. Expresión de SP en carcinoma papilar x 40. Expresión intensa en los núcleos de las células principales sobre todo (Allred:7) y material coloide (Allred:5). El estroma se tiñe en escasa proporción e intensidad (Allred: 3). El citoplasma de las células principales y las células endoteliales no expresan SP (Allred:0).

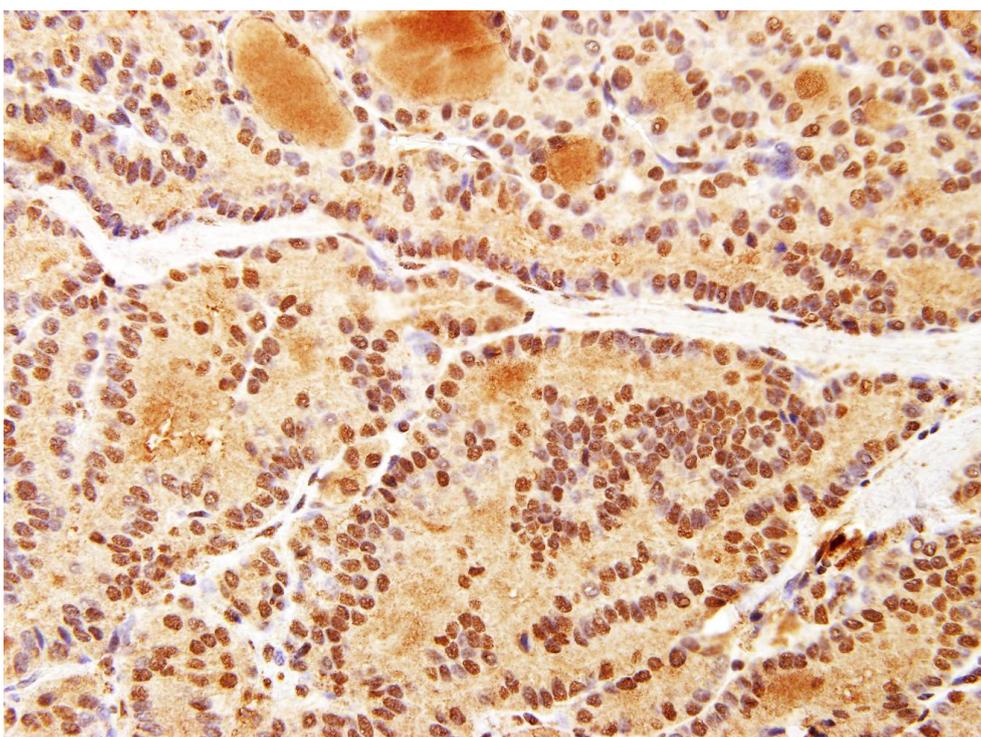


Figura 49. Expresión SP en carcinoma papilar (x40). Observamos una intensa tinción nuclear de las células principales tiroideas (Allred:8). Tinción con intensidad media y alta proporción en material coloide (Allred:6).

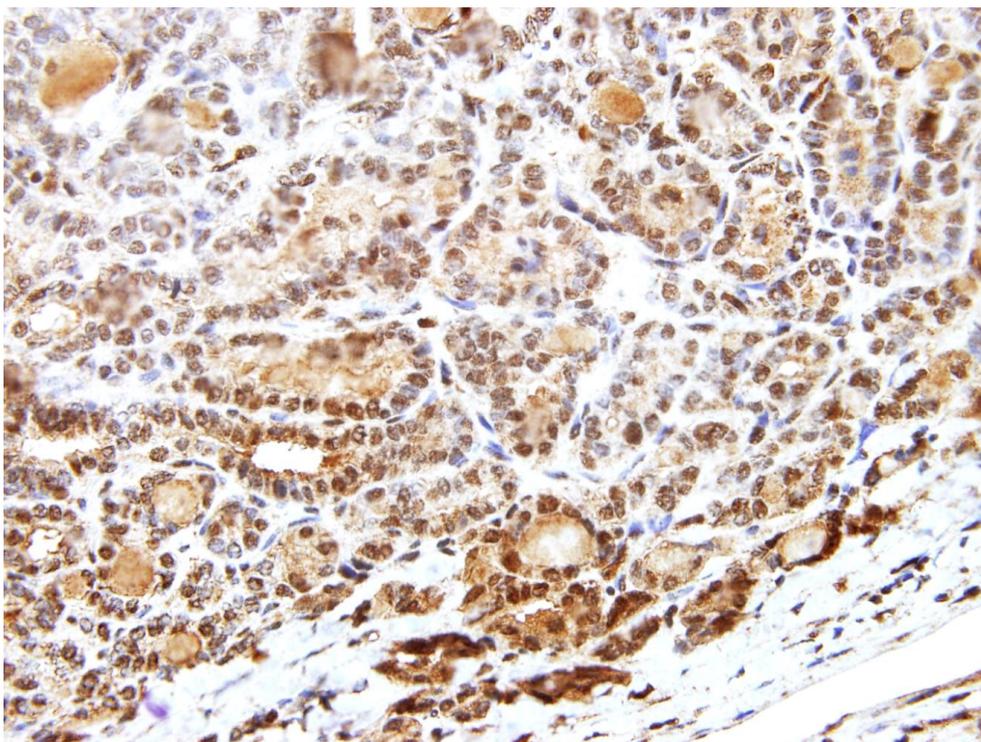


Figura 50. Expresión SP en carcinoma papilar variante folicular (x40). Observamos una intensa tinción nuclear de las células principales tiroideas (Allred:8). Tinción con intensidad media y proporción variable en material coloidal (Allred:6).

Estudiamos también la expresión SP en el carcinoma papilar variante oncocítica o de células de Hürthle. Las células oxifílicas o de Hürthle muestran un citoplasma granular abundante debido a la acumulación de mitocondrias y podemos observar los núcleos con nucleolo aparente. El comportamiento clínico es similar al del carcinoma papilar convencional.

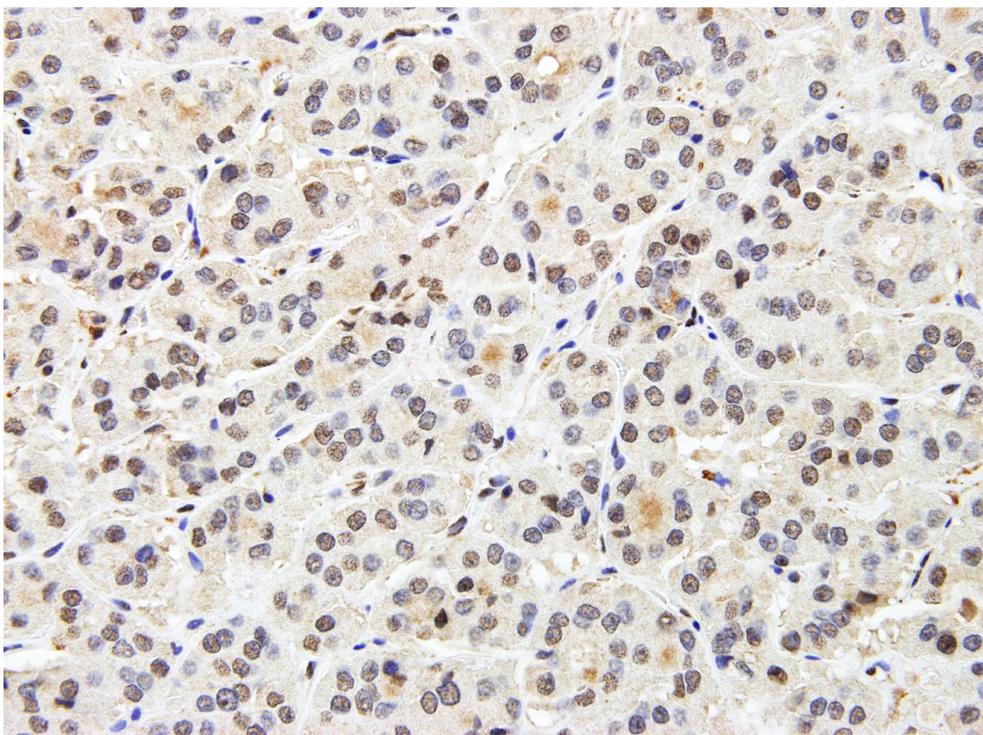


Figura 51. Expresión SP en carcinoma papilar variante oncótica (Cls. de Hürthle). Observamos tinción nuclear, más intensa en la periferia de los núcleos de las células oxifílicas (Allred:5), escasa tinción del estroma (Allred:2) y nula en células endoteliales (Allred:0).

EXPRESIÓN SP EN CARCINOMA FOLICULAR.

En las muestras de carcinoma folicular observamos un tinción muy intensa de los núcleos de las células principales (Allred:8). Tanto el material coloide como el estroma y el citoplasma presentan una tinción escasa y las células endoteliales no captan.

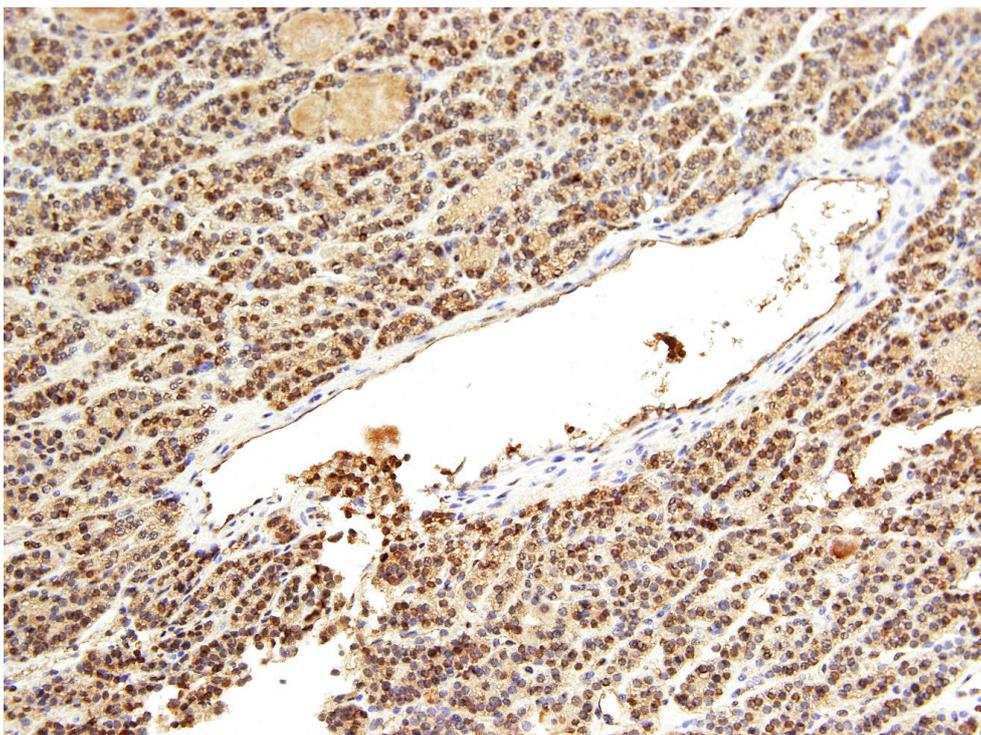


Figura 52. Expresión de SP en carcinoma folicular (x20). Núcleos de células principales con captación intensa (Allred:7), células endoteliales sin tinción (Allred:0). Coloide con expresión moderada (Allred:5).

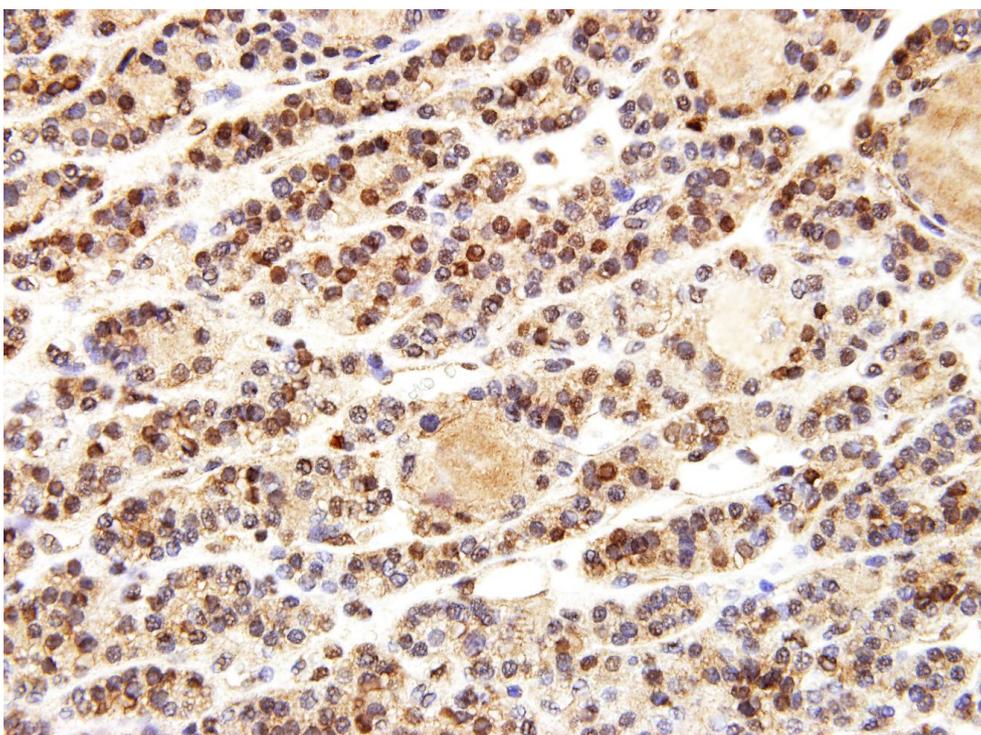


Figura 53. Expresión de SP en carcinoma folicular (detalle x40) Núcleos de células principales con captación intensa (Allred:7), células endoteliales sin tinción (Allred:0). Coloide con expresión moderada (Allred:5).

El riesgo de desarrollar un carcinoma papilar de tiroides es mayor en los pacientes con tiroiditis de Hashimoto. Este tipo de cáncer es claramente más agresivo que otros carcinomas papilares de tiroides ⁴³⁰.

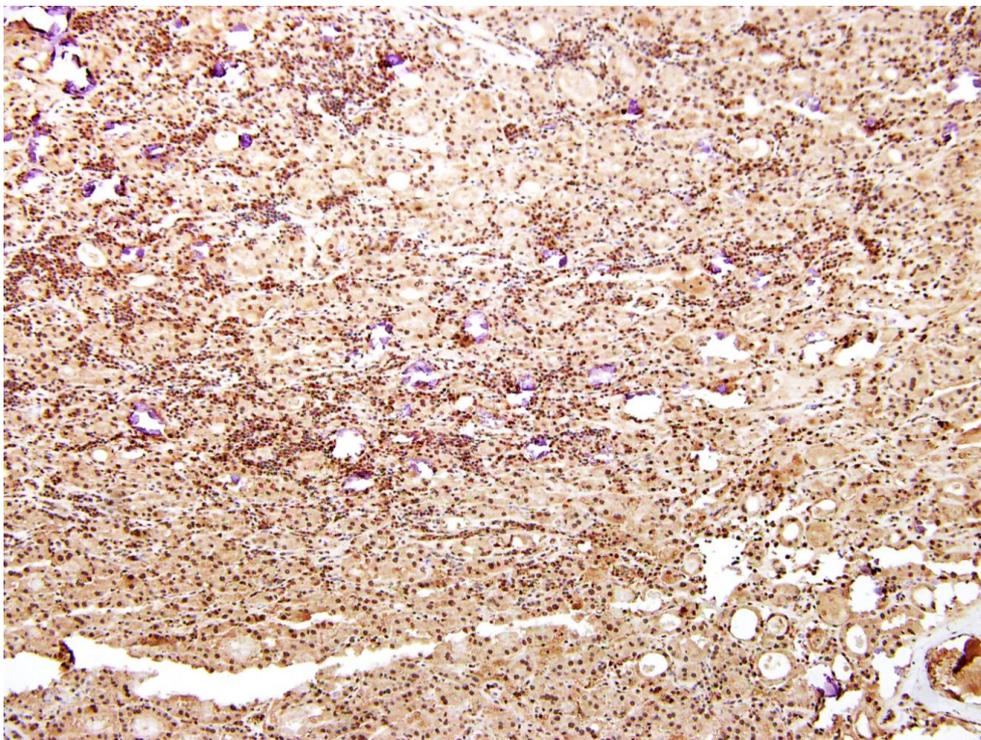


Figura 54. Expresión SP en carcinoma folicular en paciente con tiroiditis de Hashimoto previa.(x10). Podemos observar una clara tinción nuclear muy intensa (Allred: 7), y del material coloide y tejido estromal (Allred:5).

En la siguiente imagen de cáncer folicular sobre tiroiditis de Hashimoto previa, llama la atención la infiltración linfocítica y el nódulo linfoide que observamos en el centro de la imagen, propia de la tiroiditis linfocitaria crónica. Cómo la inflamación crónica produce un aumento de SP en las células afectadas y como consecuencia la aparición de cáncer.

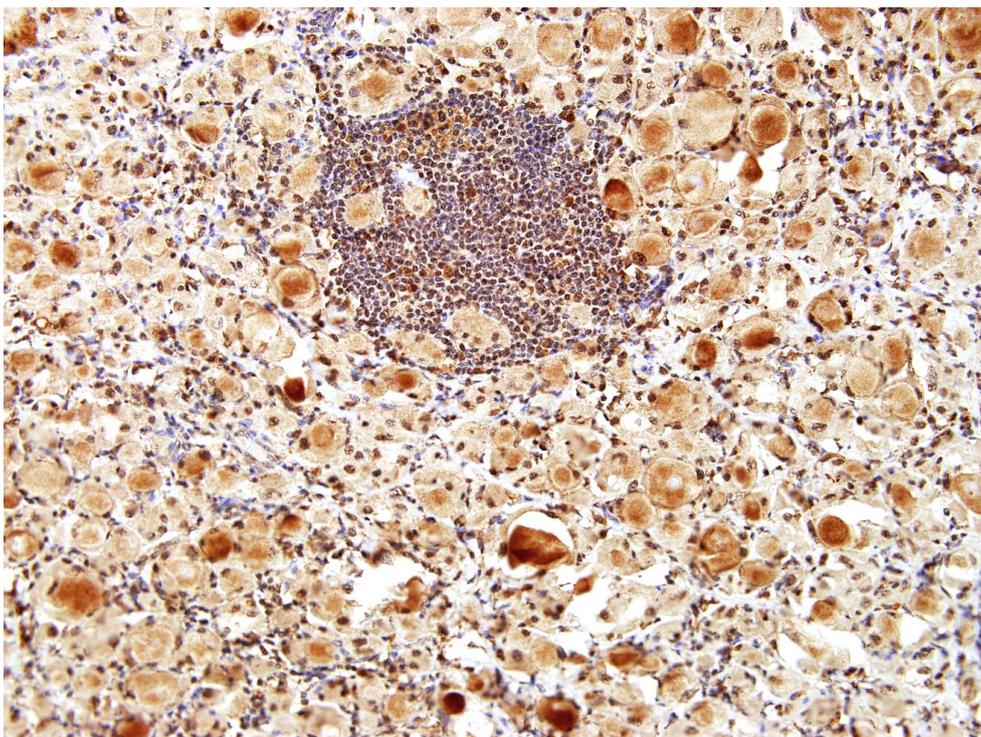


Figura 55. Expresión SP en carcinoma folicular en paciente con tiroiditis de Hashimoto previa.(x20). Infiltración linfocítica y el nódulo linfoide propia de la tiroiditis linfocitaria crónica que tiene un captación de SP de intensidad 3 y proporción 3 (Allred:6). Podemos observar una tinción nuclear intensa (Allred: 7), y del material coloide y tejido estromal (Allred: 5).

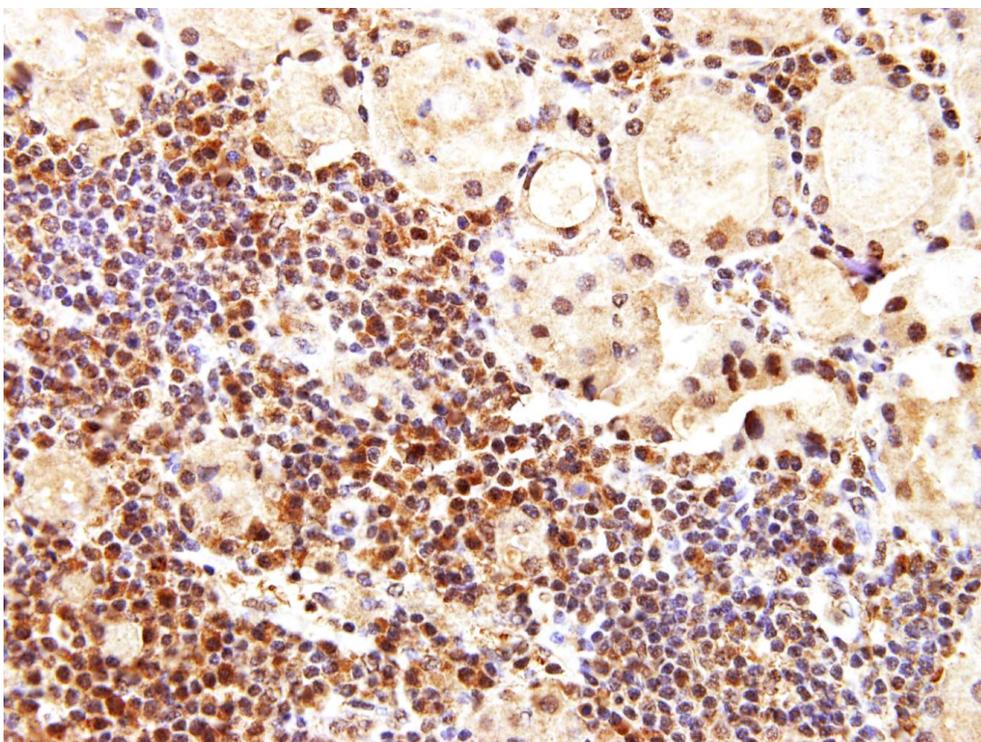


Figura 56. Expresión SP en carcinoma folicular en paciente con tiroiditis de Hashimoto previa (detalle x40).

EXPRESIÓN SP EN CARCINOMA MEDULAR.

El cáncer medular de tiroides se desarrolla a partir de las células parafoliculares o células C, secretoras de calcitonina, las cuales se encuentran en un bajo porcentaje dentro del folículo tiroideo.

En la siguiente imagen podemos observar como se tiñen estos grupos celulares de forma muy intensa, en contraste con el resto del tejido que no capta SP (figuras 57, 58 y 59).

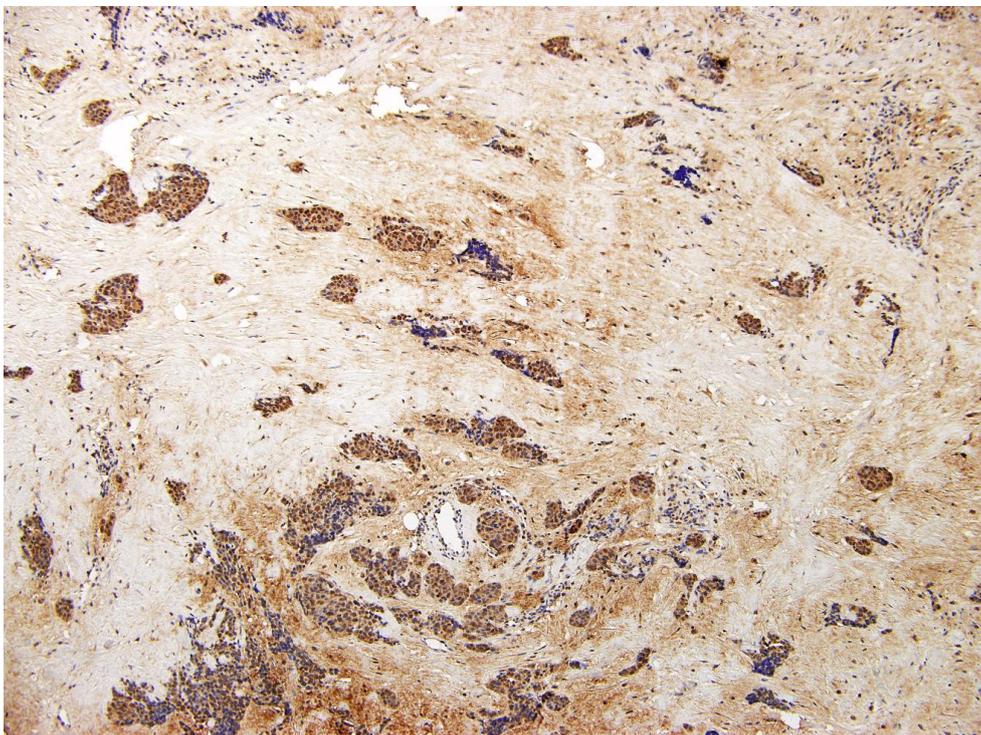


Figura 57. Expresión SP en carcinoma medular (x20). Observamos tinción marcada de los núcleos de las células parafoliculares (intensidad 3), y de forma difusa del tejido estromal, en claro contraste con la falta de captación del resto del tejido tiroideo.

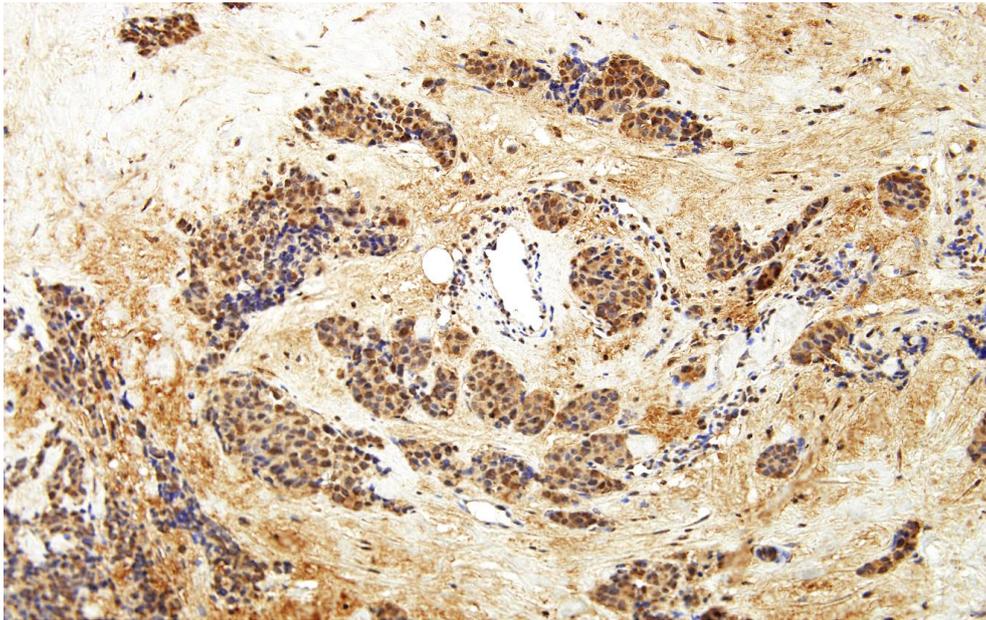


Figura 58. Expresión SP en carcinoma medular, detalle (x20).

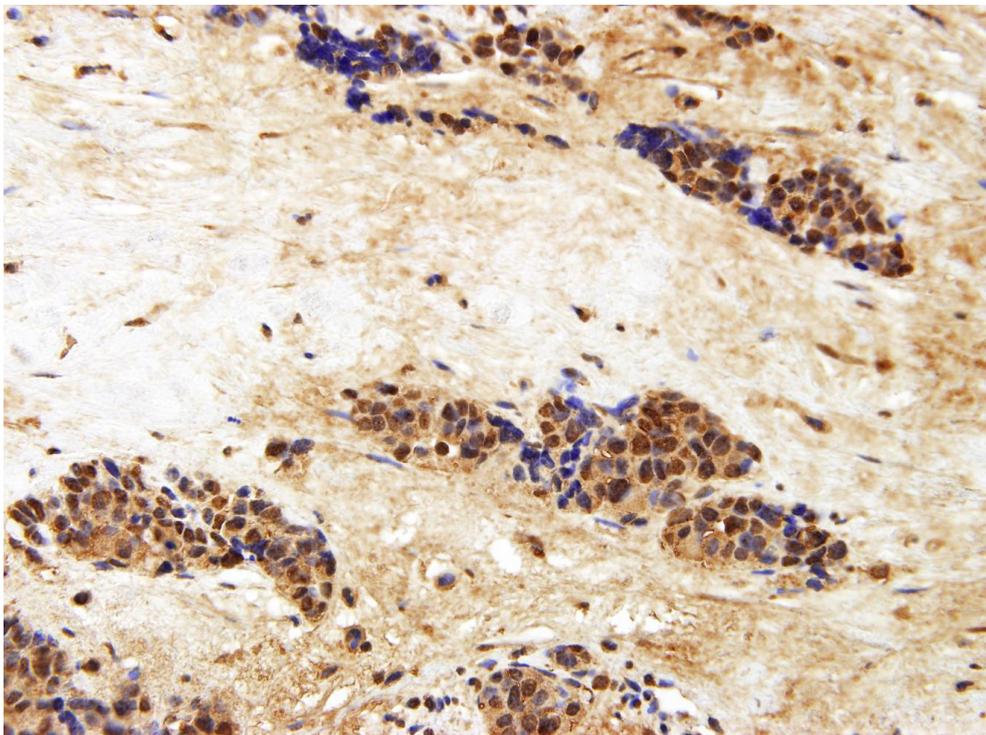


Figura 59. Expresión SP en carcinoma medular, detalle (x40).

EXPRESIÓN SP EN CARCINOMA ANAPLÁSICO.

El carcinoma anaplásico es uno de los cánceres más agresivos, de evolución rápida y cuyo pronóstico es extremadamente negativo a corto plazo.

En el siguiente corte histológico podemos observar la transición entre tejido sano y carcinoma anaplásico. Como vemos en el tejido sano la captación de SP es muy escasa y en contraposición en el carcinoma es muy intensa y de proporción variable. Esto se debe al rápido crecimiento de este tumor. Vemos como se produce una desestructuración completa de la arquitectura folicular tiroidea y como en el límite se acumula SP con mayor intensidad (figuras 60, 61 y 62).

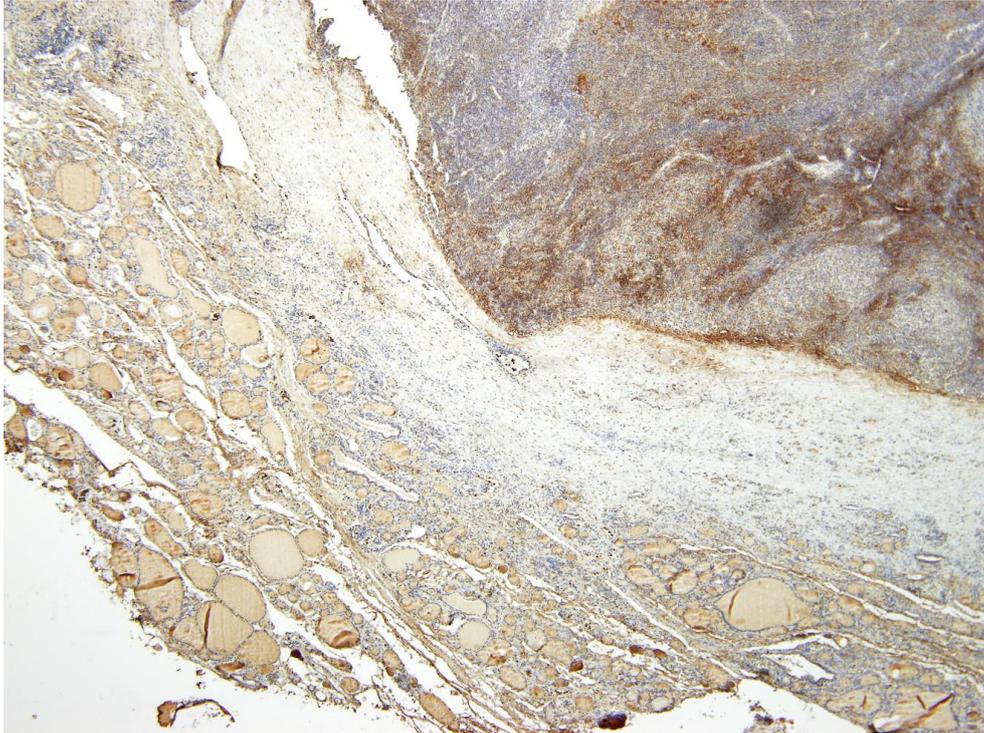


Figura 60. Transición de tejido sano a carcinoma anaplásico (x4).

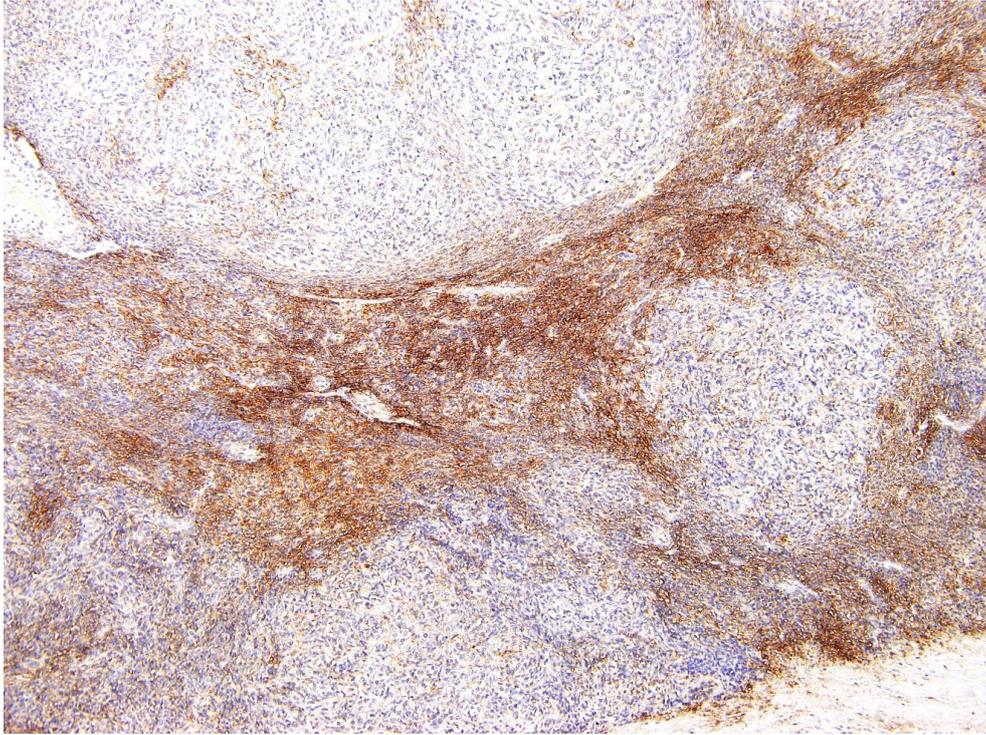


Figura 61. Expresión SP en carcinoma anaplásico (x10).

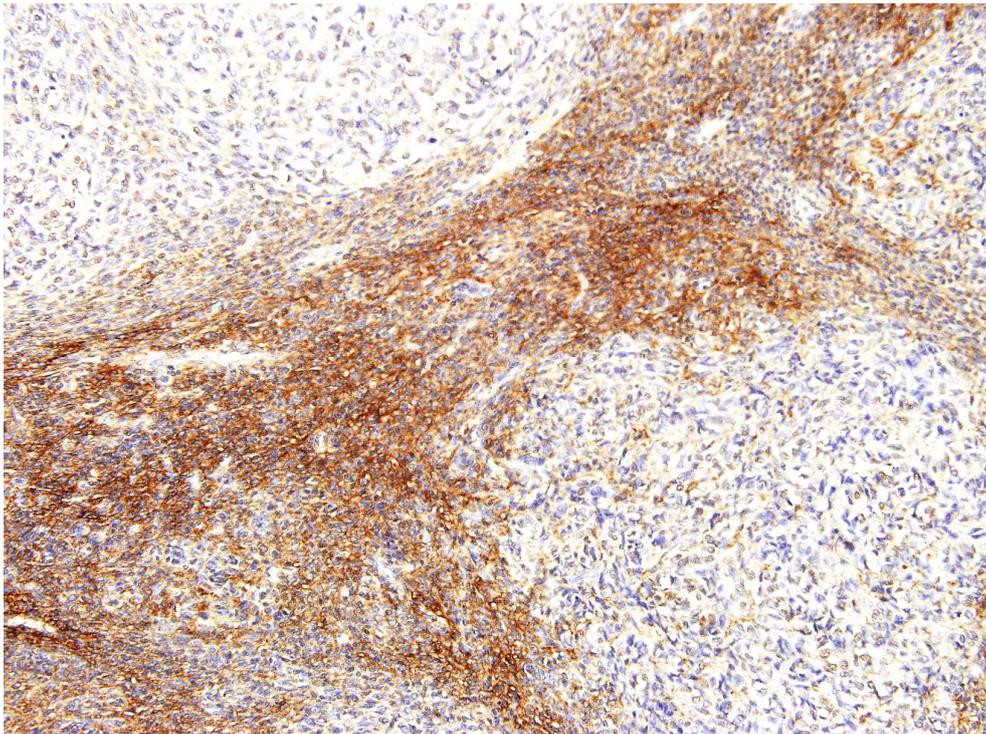


Figura 62. Expresión SP carcinoma anaplásico (x20).

EXPRESIÓN SP EN GANGLIOS METASTÁSICOS.

Podemos observar en las muestras histológicas de ganglios metastásicos una expresión de SP intensa en los núcleos de las células principales en claro contraste con el tejido linfoide sano (figuras 63, 64 y 65).

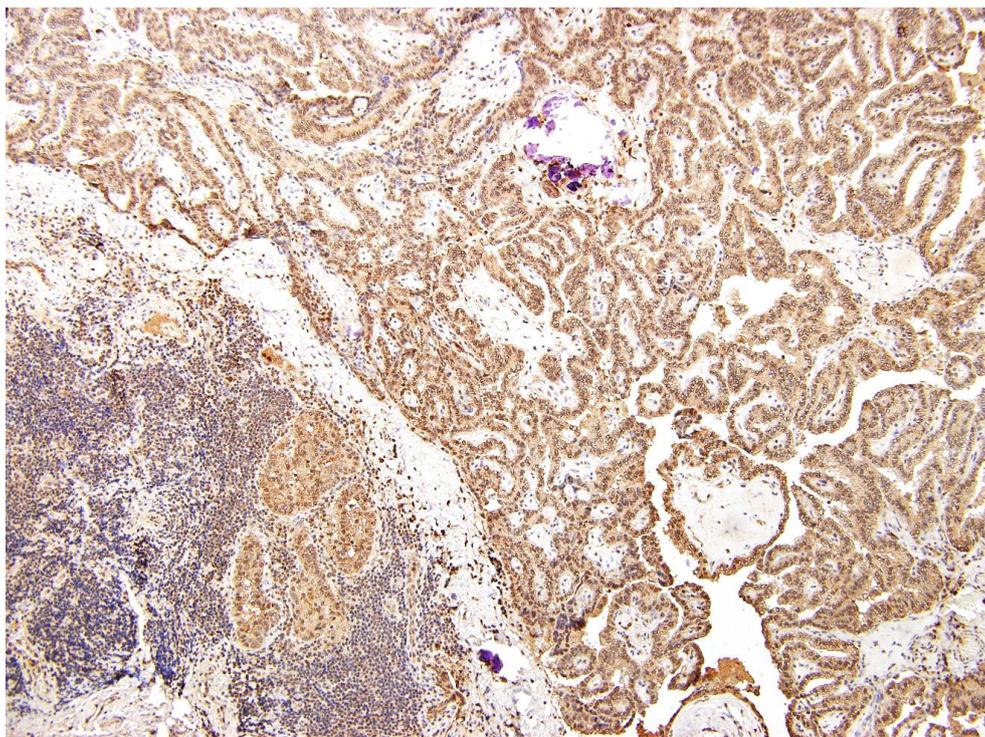


Figura 63. Expresión SP en metástasis de carcinoma papilar en ganglio cervical (x10) podemos observar la transición del tejido sano linfoide a carcinoma.

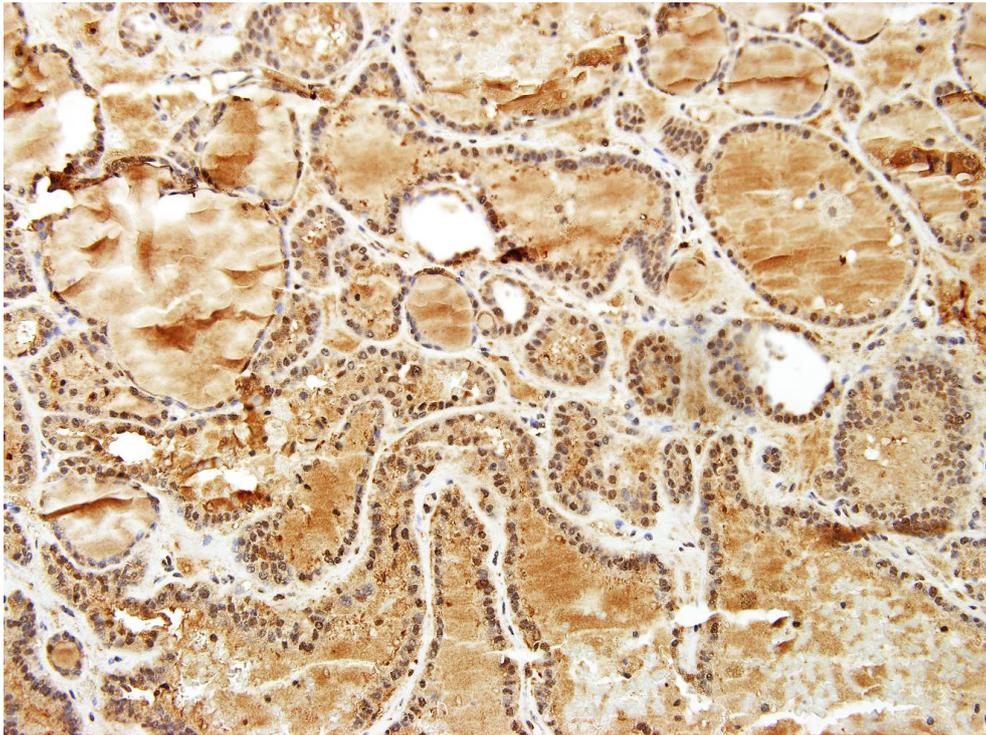


Figura 64. Expresión SP en metástasis de carcinoma papilar x20. Tinción nuclear intensa (Allred:7) y del material coloide (Allred:5).

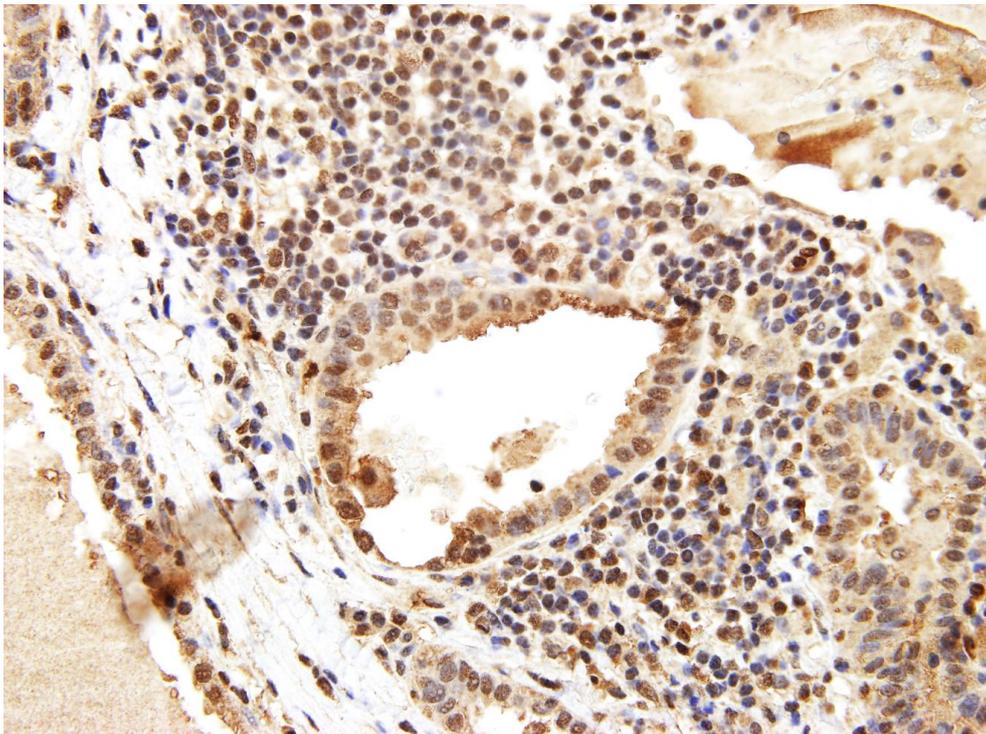


Figura 65. Metástasis (x40) detalle. En el que se objetiva como la tinción para SP además de nuclear es más intensa en la membrana células cuboidales del foliculo que son las que tienen actividad glandular.

4.4. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL NK-1R.

4.4.1. TEJIDO TIROIDEO LIBRE DE TUMOR.

Observamos la expresión del NK-1R en las distintas muestras de tejido sano tiroideo. Se objetiva tinción inmunohistoquímica escasa citoplasmática y del estroma. Tanto el núcleo de las células principales, como las células endoteliales y el material coloide de los folículos tiroideos no presentan tinción para NK-1R en tiroides sano (figura 66).

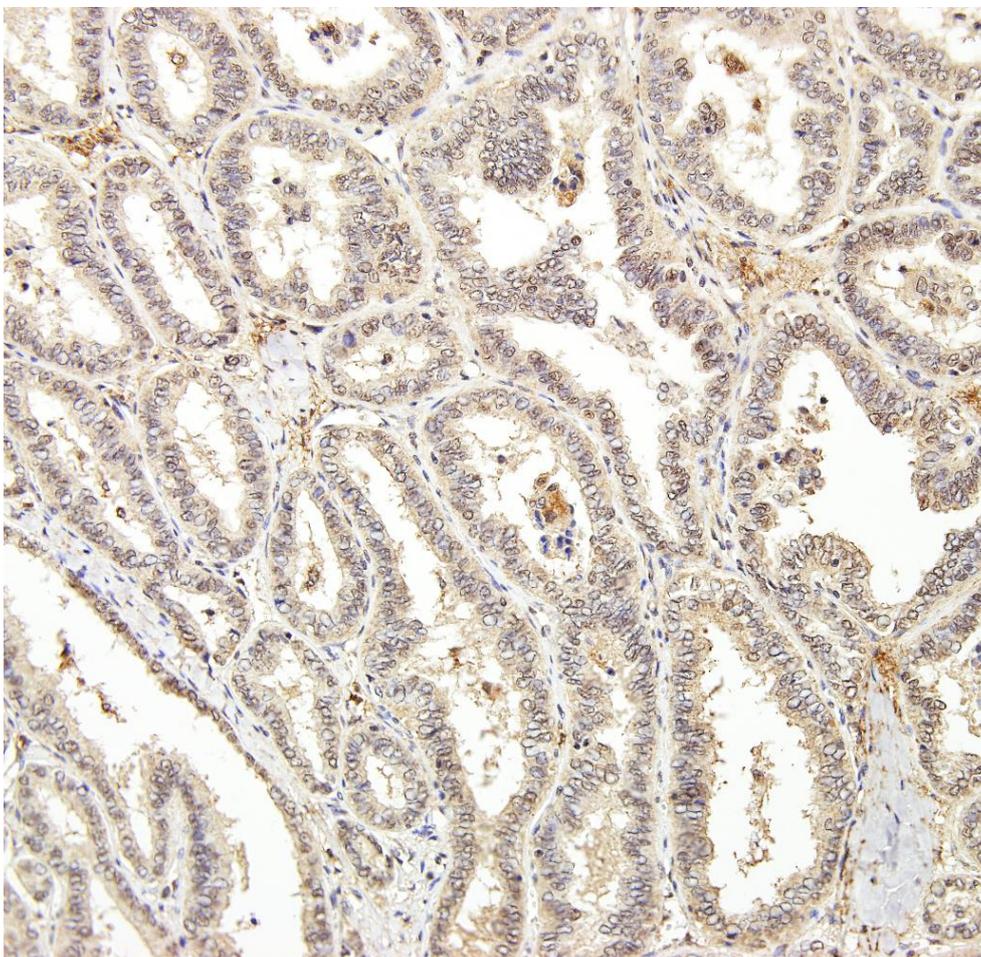


Figura 66. Expresión NK-1R en tejido tiroideo sano. Podemos observar la tinción del material citoplasmático de forma moderada (Allred:4) y de forma escasa el estroma (Allred:2). El núcleo de las células principales, las células endoteliales y material coloide de los folículos tiroideos no presentan tinción para NK-1R (Allred=0).

4.4.2. EXPRESIÓN NK-1R EN TUMORES TIROIDEOS.

De las 135 muestras de tejido tumoral obtenidas, todas expresaban en mayor o menor grado NK-1R.

Los porcentajes de proporción e intensidad se presentan utilizando el sistema de puntuación semicuantitativo Allred Unit Scoring System. Vemos en resumen los resultados en la tabla siguiente (tabla 8) y los vamos a analizar de forma detallada posteriormente.

score	Células principales citoplasma	Células principales núcleo	Estroma	Células endoteliales	Coloide
0	0%	88,5%	61,5%	0%	38,5%
1	0%	0%	0%	0%	0%
2	0%	0%	3,8%	0%	0%
3	3,8%	0%	23,1%	0%	11,5%
4	7,7%	7,7%	7,7%	0%	7,7%
5	19,2%	3,8%	0%	0%	26,9%
6	19,2%	0%	3,8%	0%	11,5%
7	34,6%	0%	0%	0%	3,8%
8	15,4%	0%	0%	0%	0%

Tabla 8. Allred expresión NK-1R en tumores tiroideos.

Teniendo en cuenta la distribución de la tinción, observamos que casi en todas las muestras existe tinción citoplasmática de las células principales en gran intensidad y proporción. El 96,3% expresa NK-1R citoplasmático en diferentes porcentajes (figura 67).

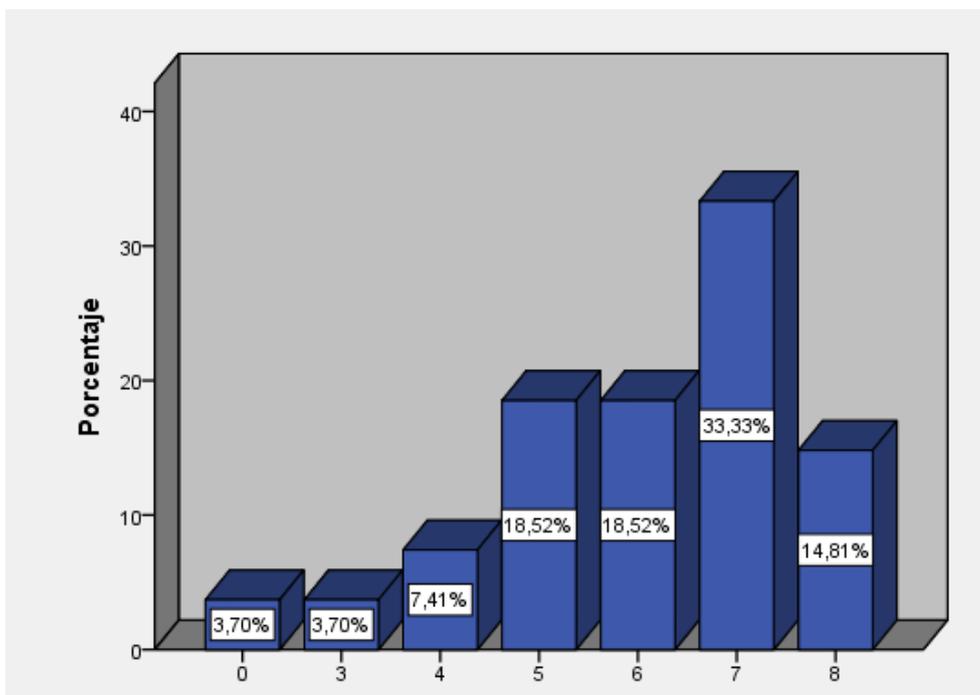


Figura 67. Porcentaje de tinción para NK-1R en citoplasma de células principales (Allred).

En un porcentaje bajo se observa tinción para NK-1R en los núcleos de las células principales, en un 14,81% (figura 68).

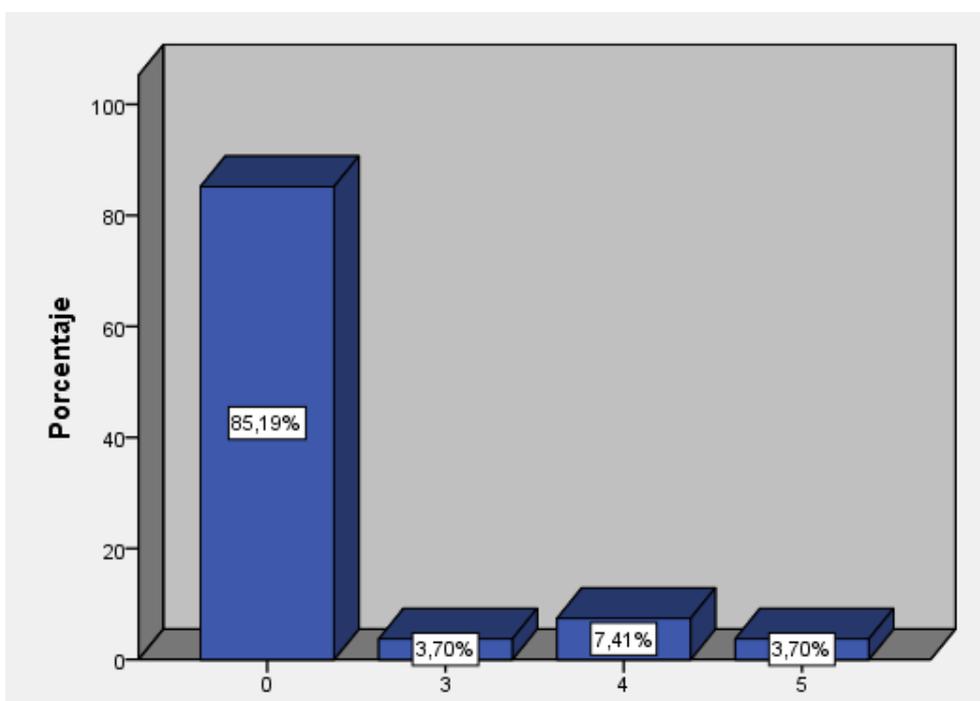


Figura 68. Porcentaje tinción NK-1R en núcleos de células principales (Allred).

Respecto al material coloide se objetiva tinción positiva en la mayoría de las muestras, el 62,96%, en diferentes porcentajes como se puede apreciar en la siguiente grafica de barras (figura 69).

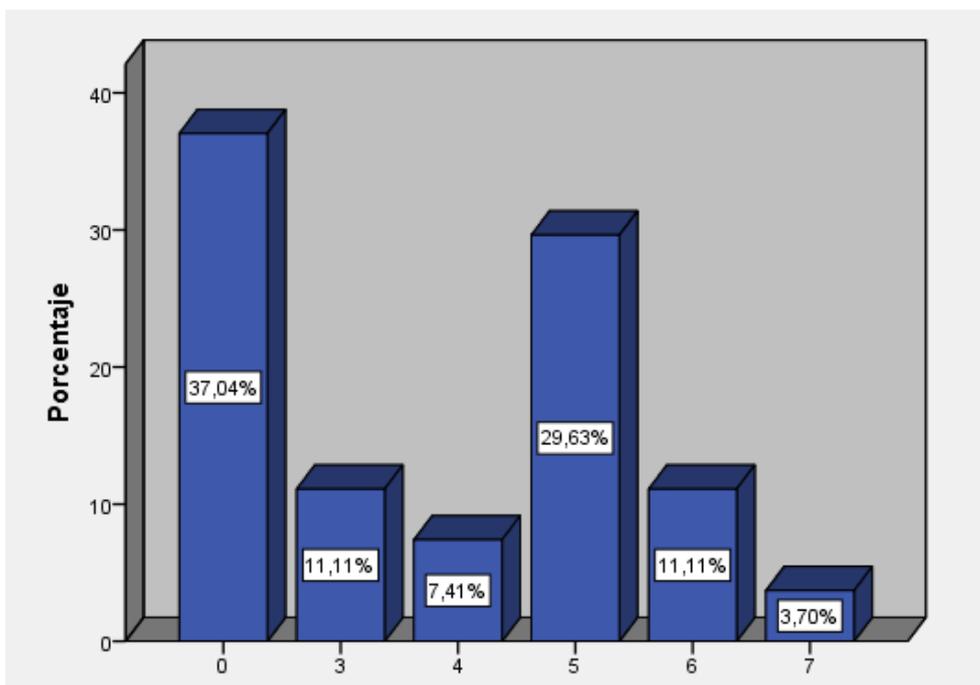


Figura 69. Porcentaje tinción coloide NK-1R escala Allred.

Respecto a las fibras reticulares del tejido estromal observamos que la mayoría del mismo no se tiñe para NK-1R. Solo el 37,04% presenta mayor o menor porcentaje de positividad en la tinción inmunohistoquímica (figura 70).

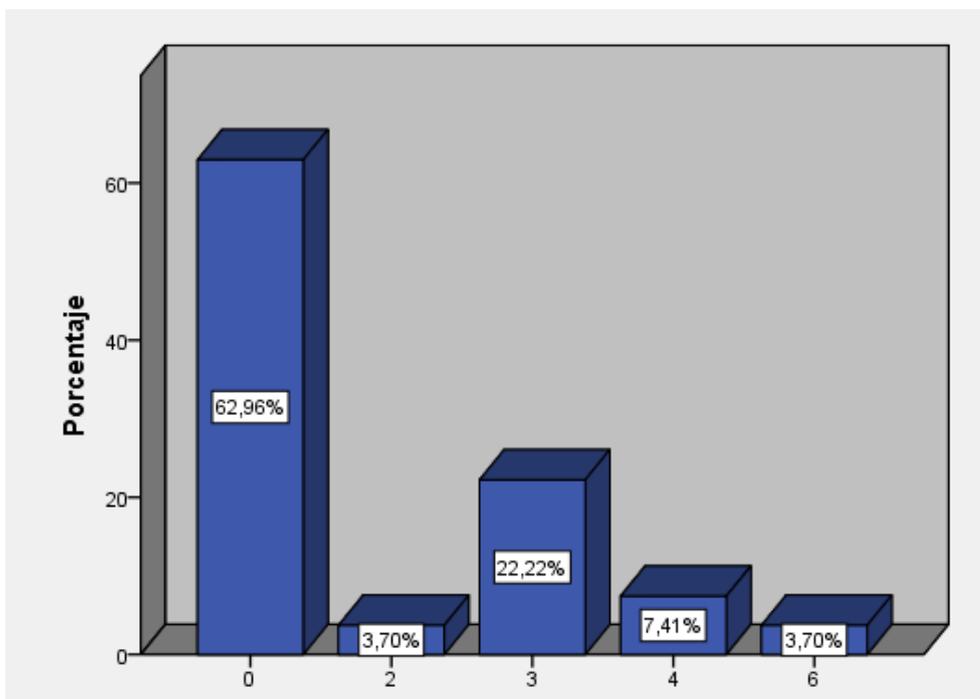


Figura 70. Porcentaje tinción estroma NK-1R según la escala Allred.

4.4.2.A EXPRESIÓN NK-1R EN LOS DIFERENTES TIPOS DE CARCINOMA TIROIDEOS.

EXPRESIÓN NK-1R EN CARCINOMA PAPILAR.

Podemos objetivar en los tumores papilares que se produce una expresión intensa de NK-1R en el citoplasma de las células principales, la tinción del material coloide es de intensidad y proporción moderada. No se tiñen ni el núcleo de las células principales ni las células endoteliales como podemos ver en las siguientes figuras (71, 72 y 73).

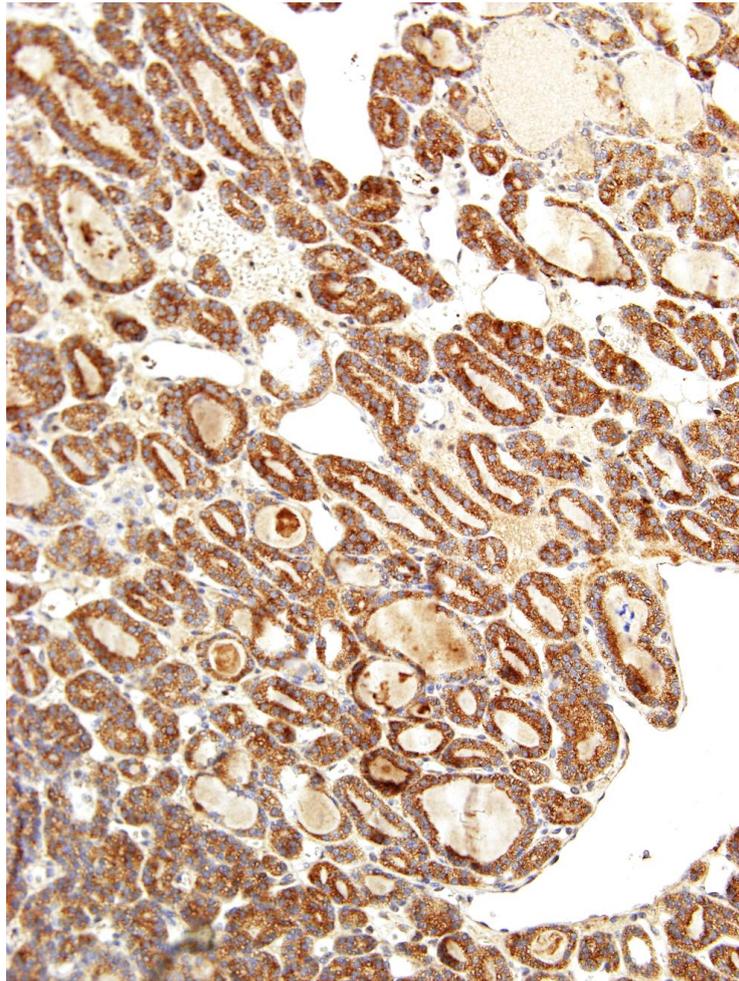


Figura 71. Expresión NK-1R en carcinoma papilar (x20). Observamos una tinción muy intensa citoplasmática (Allred:8) con núcleos que no captan NK-1R.El coloide presenta captación baja (Allred:4).

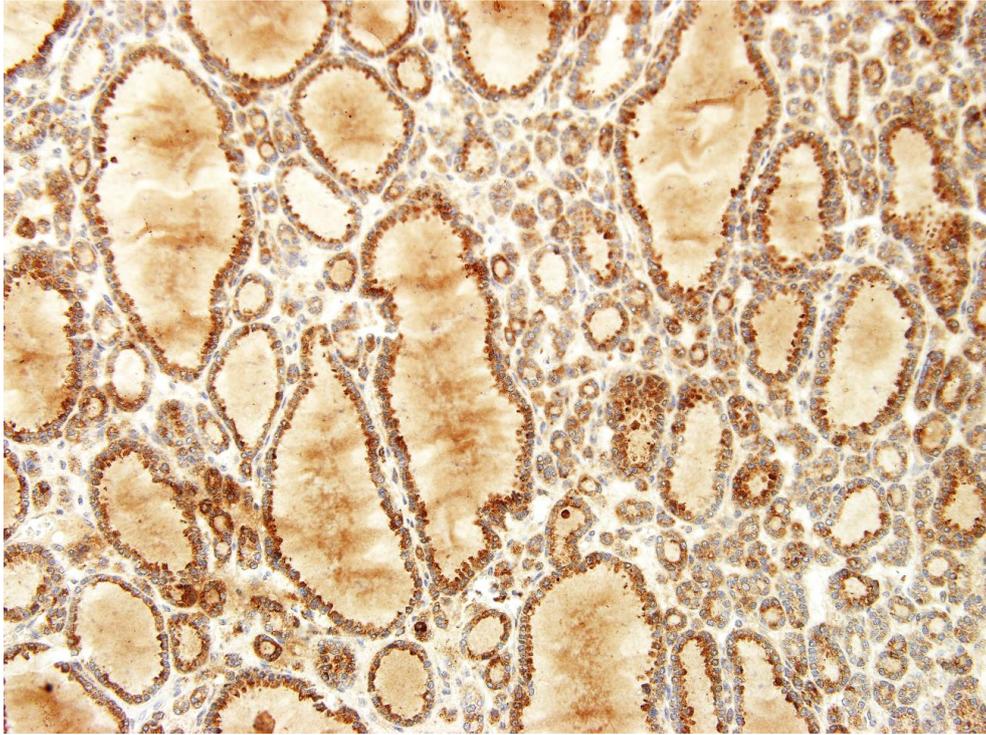


Figura 72. Expresión NK-1R en carcinoma papilar (x20). Observamos una tinción muy intensa citoplasmática (Allred:8) con núcleos que no captan NK-1R.El coloide presenta captación moderada (Allred:4).

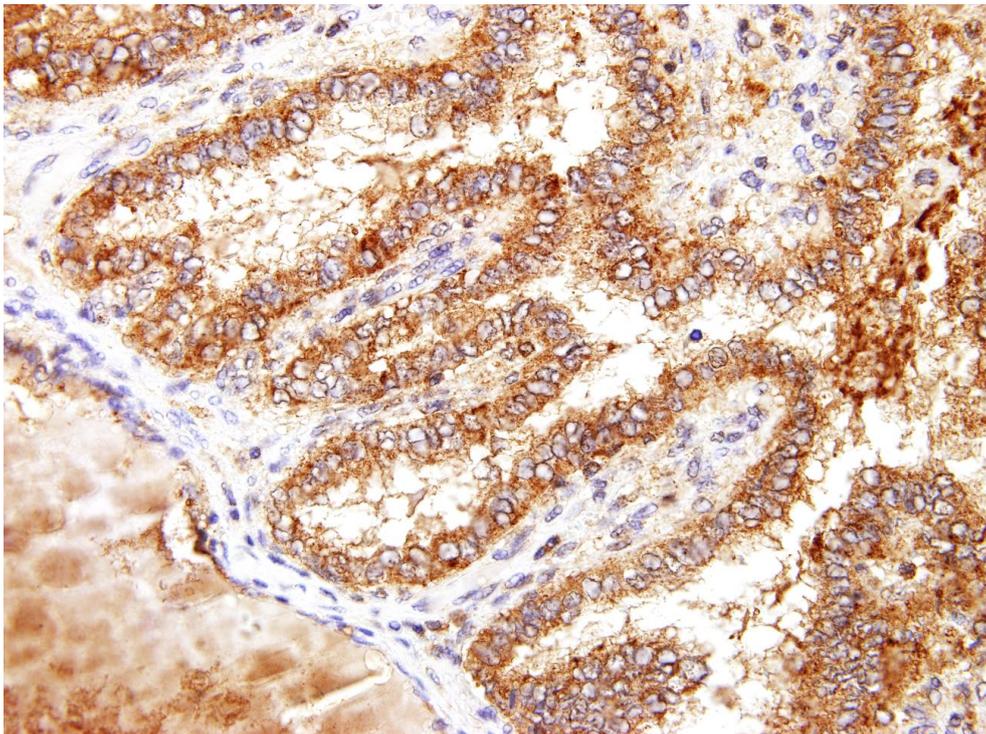


Figura 73. Expresión NK-1R en carcinoma papilar (x40).

Estudiamos también la expresión NK-1R en el carcinoma papilar variante oncocítica o de células de Hürthle. Las células oxifílicas o de Hürthle muestran un citoplasma granular abundante debido a la acumulación de mitocondrias y podemos observar los núcleos con nucleolo aparente. En la siguiente imagen podemos observar una tinción citoplasmática moderada en la que se objetiva un aumento de intensidad de expresión de NK-1R en la membrana de las células principales cuboidales del folículo que son las que tienen actividad glandular. Los núcleos no expresan NK-1R.

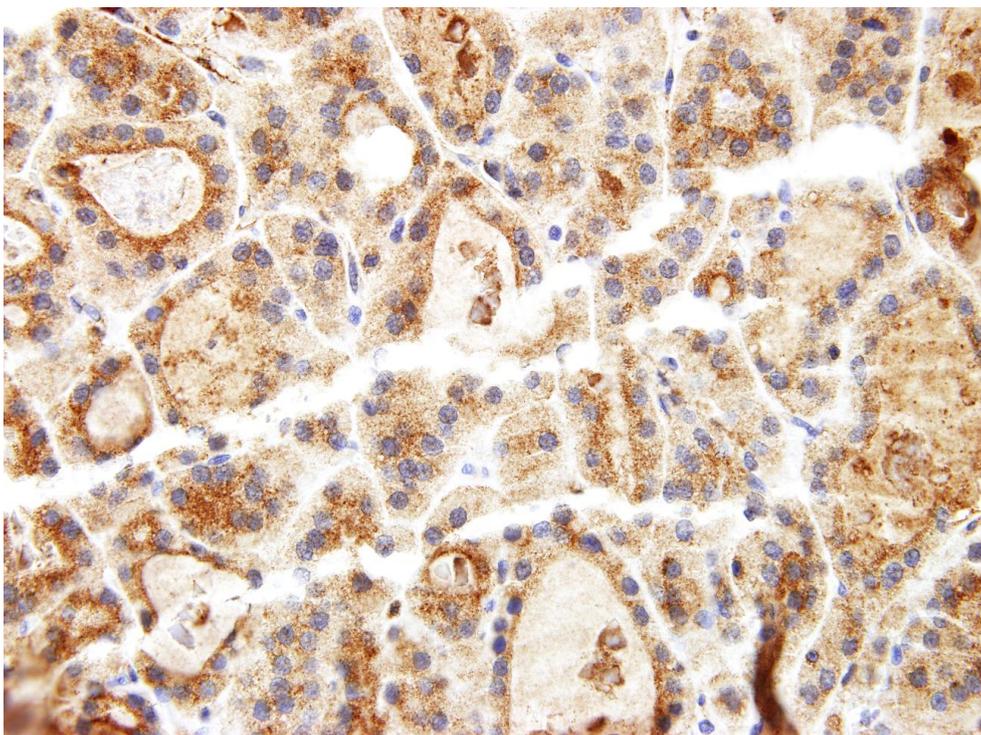


Figura 74. Expresión NK-1R en carcinoma papilar variante oncocítico (x40).

Se objetiva un aumento de intensidad de expresión de NK-1R en la membrana de las células principales cuboidales del folículo que son las que tienen actividad glandular. Los núcleos no expresan NK-1R.

EXPRESIÓN NK-1R EN CARCINOMA FOLICULAR.

En las muestras de cáncer folicular podemos observar una expresión muy intensa de NK-1R citoplasmática de las células principales y nula captación nuclear. El coloide tiene una tinción muy leve al igual que las fibras reticulares del tejido estromal (figura 75).

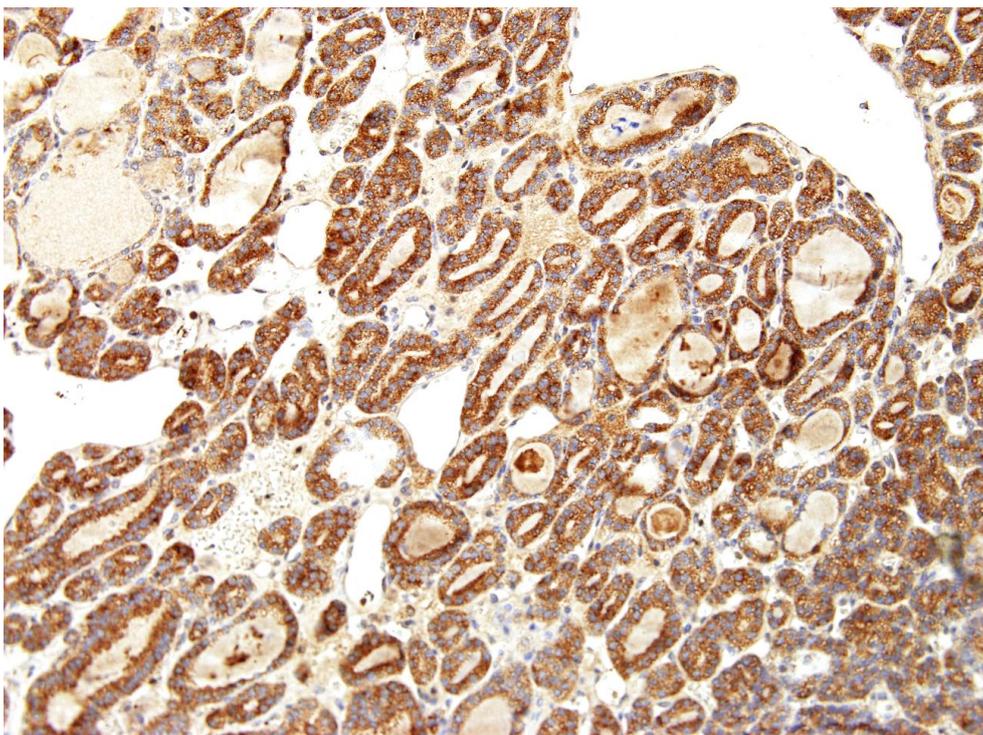


Figura 75. Expresión de NK-1R en carcinoma folicular (x20) Vemos una tinción intensa de NK-1R citoplasmática de las células principales (Allred: 8) y ninguna captación nuclear (Allred:0). El coloide tiene tinción débil (Allred: 3).

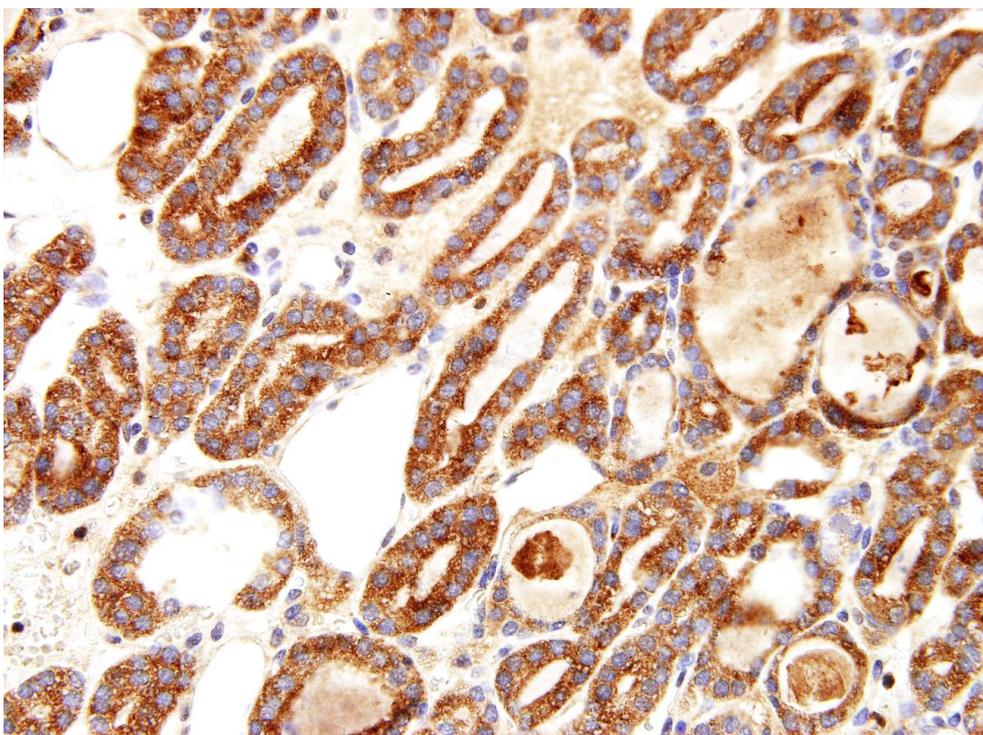


Figura 76. Expresión de NK-1R en carcinoma folicular, detalle (x40) Tinción intensa de NK-1R citoplasmática (Allred: 8) y ninguna captación nuclear (Allred:0). El coloide tiene una tinción leve (Allred: 3).

EXPRESIÓN NK-1R EN CARCINOMA MEDULAR.

El cáncer medular de tiroides se desarrolla a partir de las células parafoliculares o células C, secretoras de calcitonina, las cuales se encuentran en un bajo porcentaje dentro del folículo tiroideo.

En la siguiente imagen podemos observar como se tiñen los citoplasmas estos grupos celulares de forma muy intensa, en contraste con el resto del tejido que no capta NK-1R (figura 77).

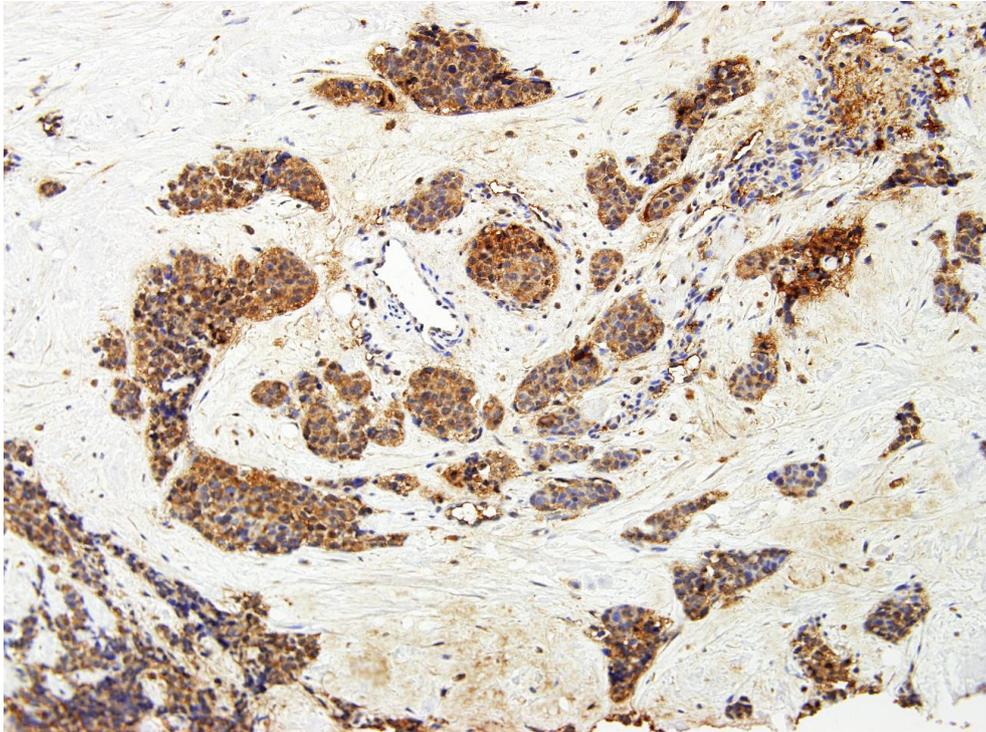


Figura 77. Expresión NK-1R en carcinoma medular (x20) Observamos tinción citoplasmática intensa en los grupos celulares de células parafoliculares (Allred: 8), y tinción leve de las fibras reticulares del tejido estromal (Allred:2).

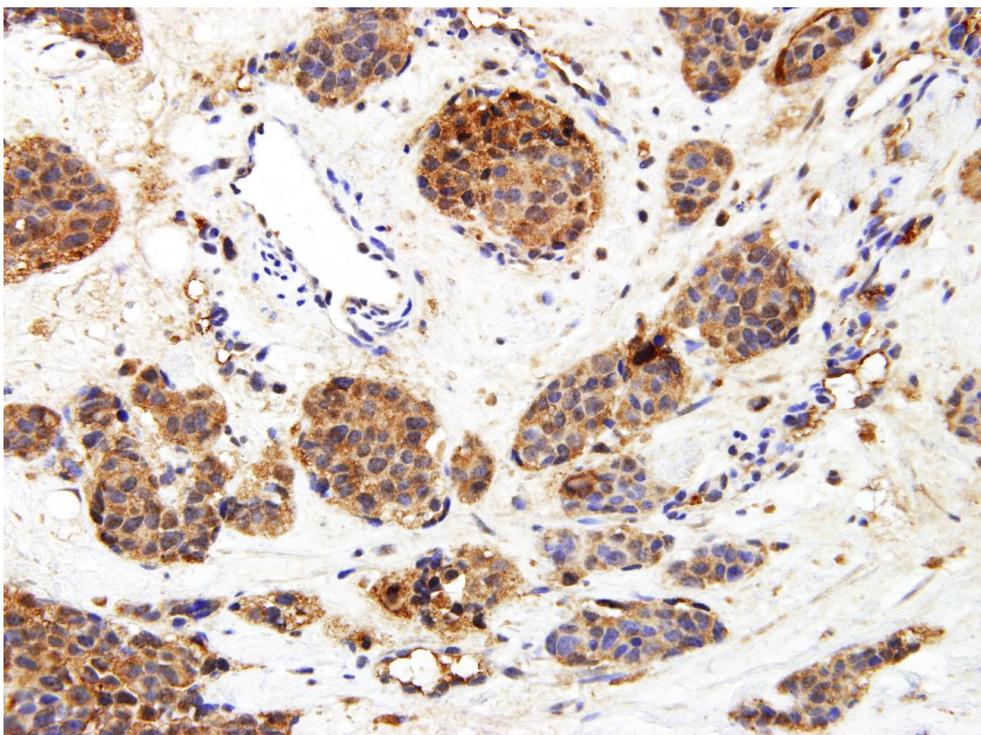


Figura 78. Expresión NK-1R en carcinoma medular, detalle (x40).

EXPRESIÓN NK-1R EN CARCINOMA ANAPLÁSICO.

El carcinoma anaplásico es uno de los cánceres más agresivos.

En el siguiente corte histológico podemos observar la transición entre tejido sano y carcinoma anaplásico. Vemos que en tejido sano existe una captación moderada de NK-1R y en la zona tumoral existe tinción escasa de algunos núcleos y del tejido reticular y desestructurado que compone el tumor. Esto se debe al rápido crecimiento de este tumor que es de muy rápida evolución. Vemos como se produce una desestructuración completa de la arquitectura folicular tiroidea y como al contrario de las tinciones para SP en las que la expresión es muy intensa, en el carcinoma anaplásico, el tumor expresa de forma escasa NK-1R (figura 79).



Figura 79. Expresión de NK-1R transición de tejido sano a carcinoma anaplásico (x4). Vemos que en tejido sano existe una captación moderada de NK-1R y en la zona tumoral existe tinción escasa de algunos núcleos y del tejido reticular y desestructurado que compone el tumor.

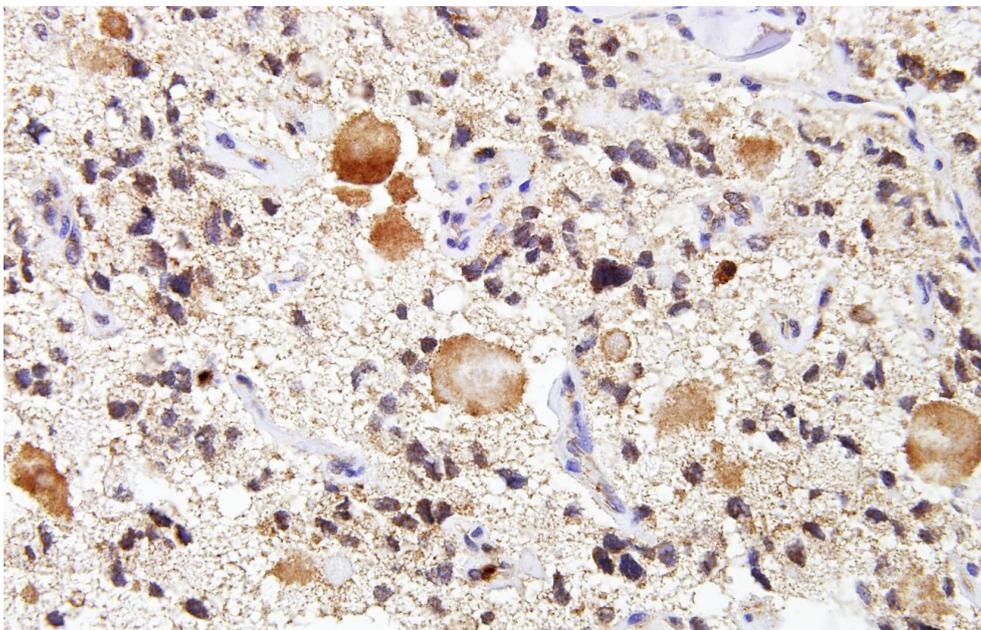


Figura 80. Expresión NK-1R en carcinoma anaplásico, detalle (x40). Observamos leve captación de algunos núcleos, en las membranas celulares, material colóide y en el tejido reticular desestructurado.

EXPRESIÓN NK-1R EN GANGLIOS METASTÁSICOS.

Podemos observar en las muestras histológicas de ganglios metastásicos una expresión de NK-1R intensa en el citoplasma de las células principales en claro contraste con el tejido linfoide sano (figuras 81, 82 y 83).

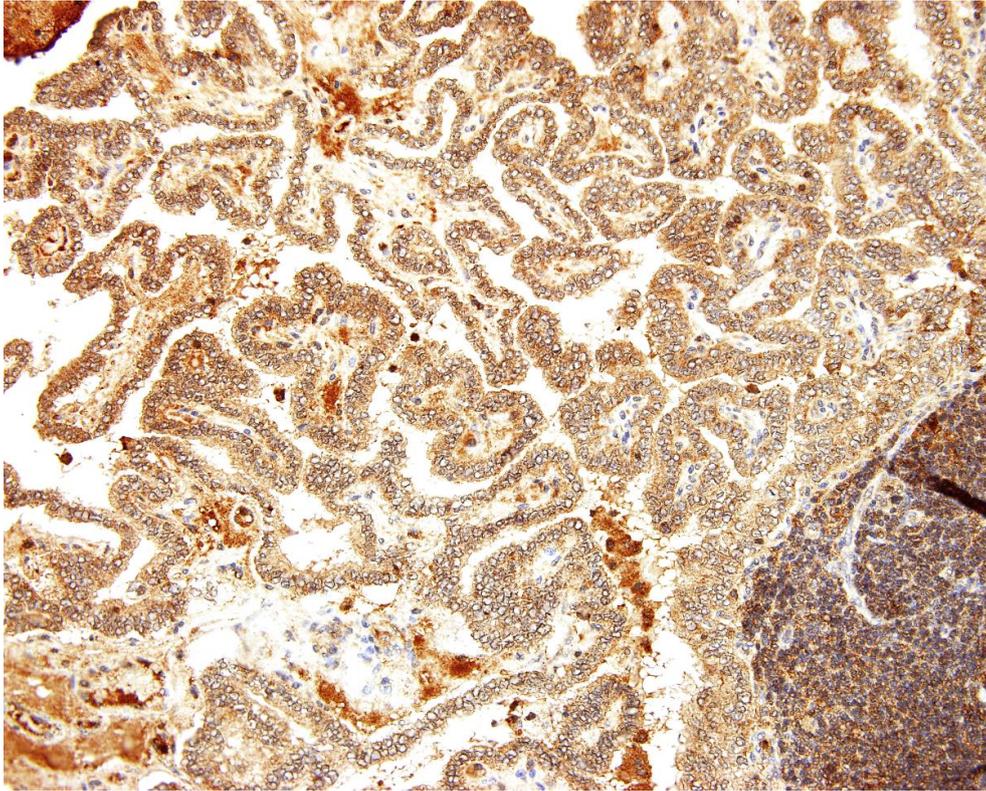


Figura 81. Expresión NK-1R en metástasis carcinoma papilar x20. Observamos tinción citoplasmática de las células principales (Allred: 6), no se tiñen los núcleos celulares (Allred:0) y de forma leve el estroma y el material coloide.

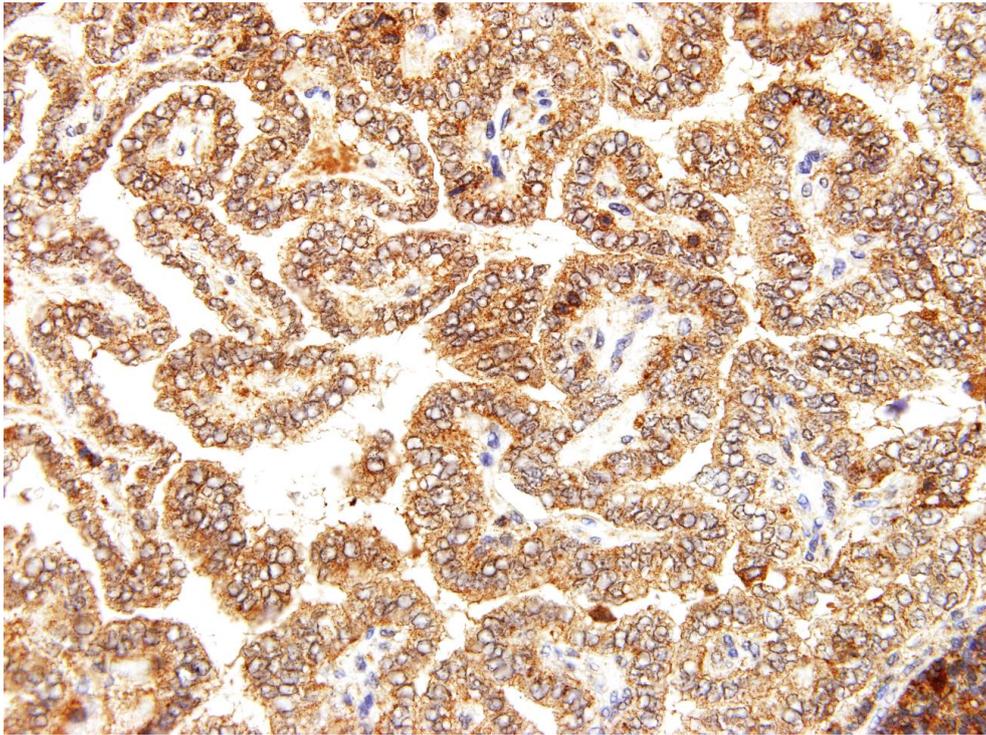


Figura 82. Expresión NK-1R en metástasis carcinoma papilar, detalle (x40).

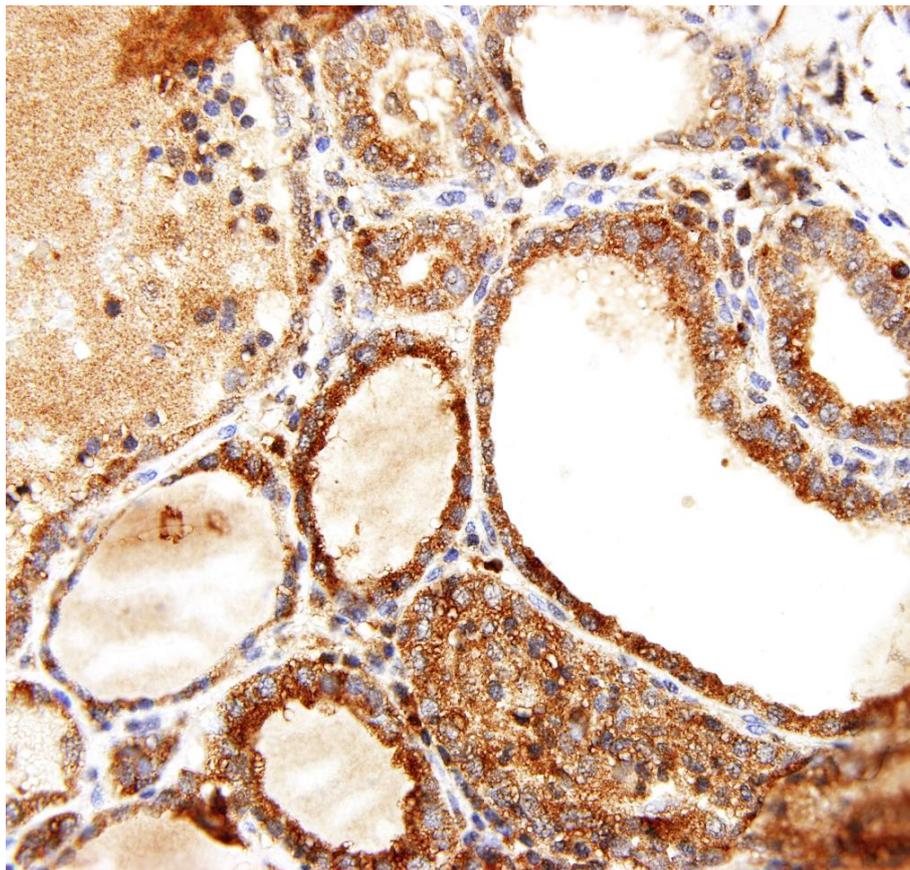


Figura 83. Expresión NK-1R en metástasis carcinoma papilar, detalle (x40).

V. DISCUSIÓN.

El sistema receptor NK-1R de la SP juega un papel importante en el cáncer.

La SP tiene un efecto antiapoptótico y estimulador de la angiogénesis, promueve la proliferación y la migración de las células tumorales. Las células tumorales sobreexpresan receptores NK-1R, que están implicados en su viabilidad. Esta sobreexpresión sugiere la posibilidad de un tratamiento específico contra las células tumorales utilizando antagonistas de los receptores NK-1R, promoviendo así una considerable disminución en los efectos secundarios del tratamiento.

Esta estrategia abre nuevos enfoques para el tratamiento del cáncer, ya que estos antagonistas, después de unirse a su diana molecular, inhiben la proliferación celular e inducen la muerte de células tumorales por apoptosis, y ejercen una acción antiangiogénica e inhibitoria de la migración de células tumorales.

El uso de antagonistas de receptores NK-1R como aprepitant como agentes antitumorales podría ser una innovación prometedora. El valor de aprepitant como un agente antitumoral puede ser determinado más rápido que otros compuestos, debido a que muchos estudios sobre su seguridad y su caracterización ya se han completado.

El receptor NK-1R puede ser un objetivo prometedor en el tratamiento del cáncer. Antagonistas de los receptores NK-1R podrían actuar específicamente como fármacos contra las células tumorales y estos antagonistas podrían ser nuevos candidatos contra el cáncer⁴³¹. En las últimas dos décadas, la búsqueda de tratamientos más eficaces y los esfuerzos de investigación en el cáncer han aumentado exponencialmente. Este esfuerzo, sin embargo, aún no se ha traducido en la mejora de las perspectivas en relación con el problema, a pesar de que varias áreas de investigación son prometedoras (el Proyecto Genoma Humano, la terapia génica y la investigación con células madre). Por lo tanto, sigue siendo necesario explorar otras iniciativas en la investigación del cáncer, para lograr el objetivo final de descubrir uno o más compuestos capaces de destruir el tumor como objetivo específico (parasitotrópicas), mientras que la producción no tiene efectos secundarios perjudiciales en el huésped (no organotrópicas). Paul Erlich denomina esta ambición la 'bala mágica'. Desafortunadamente, el anti-cáncer (agentes de quimioterapia citotóxica) utilizan actualmente en clínica la práctica están "lejos de ser una bala mágica". Presentan un perfil de seguridad muy bajo y a menudo provocan efectos secundarios graves en el huésped. Estos efectos clínicos se producen porque las drogas no son específicas contra las células tumorales; como consecuencia, el énfasis en la investigación ha sido durante mucho tiempo encontrar un medicamento con el mismo o mayor potencial antitumoral pero que produzca menos efectos secundarios. Una de estas soluciones podría ser el blanco de ataque molecular, terapia contra el cáncer basada en las drogas o estrategias terapéuticas focalizadas a alteraciones moleculares específicas de tumores.

En esta discusión, se describe una nueva diana terapéutica contra el cáncer, el complejo SP/ NK-1R. Y por esto una nueva generación de medicamentos contra el cáncer, los antagonistas de los receptores NK-1R, tienen un futuro prometedor ⁴³¹.

5.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Durante el procesamiento de las muestras de estudio se realizaron los pertinentes controles de calidad (preabsorción, control negativo y control positivo) para demostrar la veracidad de la técnica inmunohistoquímica empleada. Además, en todos los casos observamos que el patrón de inmunorreactividad tanto de la SP como del NK-1R se circunscribe y coincide con estructuras anatómicas e histológicas, a diferencia de lo que ocurriría con los artefactos.

Todo esto nos sirve como validación para poder afirmar que los resultados de la expresión inmunohistoquímica reflejan la existencia real en dichos tejidos tanto de la SP como del NK-1R.

El empleo de una escala semicuantitativa, sistema Allred Unit Scoring, para la valoración de la extensión e intensidad de la inmunorreactividad permitió homogeneizar y objetivar en mayor medida los resultados obtenidos entre los diferentes casos de estudio.

La demostración de la expresión tanto de la SP como del NK-1R en el tiroides humano sano establece las bases para profundizar en la comprensión de la fisiología tiroidea, pues hasta este momento se desconocía la existencia de estas proteínas en dicho órgano y, por tanto, cualquier función que pudieran desempeñar en él. Asimismo, las altas concentraciones de SP y el NK-1R en diferentes patologías tiroideas, como en la tiroiditis de Hashimoto y en los diferentes tipos de carcinoma, orienta a hacia su papel en la fisiopatología y abre la puerta a un nuevo abordaje terapéutico de este tipo de tumores basado en el bloqueo del NK-1R a través de sus antagonistas específicos.

El hecho de describir por primera vez la presencia de SP y NK-1R a nivel del tejido tiroideo humano impide poder comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores. Exceptuando a Hennig et al, que en 1995, estudiaron la presencia del NK-1R en el carcinoma medular tiroideo, únicamente, demostrando su existencia a altas concentraciones tanto en el tejido tumoral como en los vasos tumorales y peritumorales.

5.1.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP.

En el estudio inmunohistoquímico de SP realizado sobre tejido sano objetivamos que existe expresión de SP en pequeñas cantidades. Es importante destacar que se observa tinción de algunos núcleos y del material coloide de los folículos tiroideos. Tanto el citoplasma de las células principales, como las células endoteliales y el estroma no presentan tinción para SP en tiroides sano. La presencia de SP en el coloide, lugar donde se encuentra la tiroglobulina secretada por las células principales y las enzimas necesarias para la producción de las hormonas tiroideas, traduce que el complejo SP/NK-1R juega un papel importante en la regulación de la secreción endocrina tiroidea.

El análisis de las muestras de tejido tumoral presentaron, en mayor o menor grado tinción positiva para SP. Un 88,5% de los núcleos de las células principales. De este porcentaje,

la mayoría (76,9%) lo hacían de manera intensa (Allred 4, 5, 6, 7, 8). La distribución de la SP era predominantemente nuclear aunque también podía observarse en el en el material coloide tiroideo en un 53,8%, en el citoplasma en un 53,8%, así como en el estroma en un 46,2%.

Por último las metástasis tumorales muestran unos resultados similares con un porcentaje del 100% en la expresión de SP en las áreas invadidas por el cáncer. La distribución intracelular fue muy similar a la obtenida en el tejido tumoral primario de tal modo que el 100% de las células tumorales mostraban SP en sus núcleos presentándose además en menor porcentaje SP en el citoplasma y en material coloide. La presencia de SP traduce regiones con una marcada actividad mitogénica.

Todos estos resultados parecen indicar que la SP, además de otras muchas funciones biológicas, tiene la capacidad de inducir la replicación celular en los tejidos donde se halla.

5.1.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL NK-1R.

Respecto al NK-1R, los estudios realizados en tejido tiroideo sano muestran tinción inmunohistoquímica escasa citoplasmática y del estroma. Tanto el núcleo de las células principales, como las células endoteliales y el material coloide de los folículos tiroideos no presentan tinción para NK-1R en tejido sano.

El tejido tumoral primario expresó, en mayor o menor grado, NK-1R en un 93,3% en el citoplasma de las células principales. En el núcleo de las mismas se observó tinción en un porcentaje muy bajo. El NK-1R se postula así como el receptor mediante el cual la SP induce la mitosis en las células cancerígenas.

Por último, respecto a la distribución en las metástasis, el 100% expresó NK-1R en las regiones afectas por el tumor con un patrón citoplasmático marcado en proporción e intensidad.

Estos resultados coinciden con otros estudios inmunohistoquímicos realizados para otros tejidos tumorales^{421 422}.

5.2 DISCUSIÓN DE LA ACCIÓN DEL COMPLEJO SP/NK-1R EN EL CANCER DE TIROIDES Y DEL PAPEL DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R EN EL TRATAMIENTO DEL MISMO.

Ha quedado demostrado cómo los tejidos tumorales tiroideos estudiados expresan SP y NK-1R.

Las diferencias existentes entre la expresión de SP/NK-1R en tejidos sanos y tejidos tumorales parecen residir tanto a nivel distributivo como cuantitativo. Ha quedado demostrado que el binomio SP/NK-1R aparece en las zonas donde existe actividad mitogénica. La intensidad

de la inmunotinción fue muy superior al tejido sano y proporcional al grado de malignidad del tumor.

Todos estos hallazgos son extrapolables a todos los estudios realizados con diferentes líneas celulares de cáncer.

5.2.1 ACTIVIDAD MITOGÉNICA DE LA SP.

El mecanismo a nivel molecular por el que el NK-1R induciría la mitogénesis es confuso. La acción mitogénica mediada por SP no es del todo conocida. Una vez que el receptor es activado por su ligando, la SP, el NK-1R activa miembros la cascada MAPK (mitogen-activated protein kinase), incluyendo las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y la p38MAPK. Estas rutas son a menudo activadas bajo distintas condiciones y pueden llevar tanto a la apoptosis celular como al crecimiento ^{416 417}. El mecanismo específico por el que esta señal se transmite es desconocido, no obstante, la explicación podría estar en unos complejos de proteínas estructurales que determinan la localización subcelular y consecuentemente la especificidad de las proteínas señalizadoras ^{432 433}. El mecanismo principal por que los GPCRs activan la ruta MAPK es por la liberación de las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G. Estas subunidades reclutan componentes de la vía ras, como shc, grb2 y scr que conducen a la activación de raf-1 y MAP cinasa 1, un activador específico del ERK1/2 ⁴³⁴. Un componente de la ruta de señalización de MAPK ha sido recientemente identificado: la β -arrestina, la cual originariamente se pensó que solo mediaba el desacoplamiento y la internalización del receptor, parece ser necesaria para la activación del ERK1/2 en gran número de GPCRs ^{435 436 437}. En el caso de los receptores activados por proteínas 2 (PAR2), la β -arrestina forma un complejo con el receptor internalizado, raf-1 y ERK1/2, reteniendo las cinasas activadas en el citosol. Por otro lado, los complejos de proteínas estructurales, pueden determinar la locación subcelular y la especificidad del ERK1/2 y de este modo, dirigir el potencial mitogénico de una señal dada. Existe una variante del complejo β -arrestina que contiene el receptor adrenérgico β 2 y la tirosin-cinasa scr, la cual conduce también a la activación del ERK1/2. No obstante, esta ruta produce una respuesta celular distinta a la anterior, posiblemente esto se deba a una diferente localización subcelular de las cinasas activadas por el mecanismo antes mencionado. La SP induce la formación de complejos multiproteicos cerca de la membrana plasmática que contienen NK-1R, β -arrestina, src y ERK1/2. Una vez activado, ERK1/2 se transloca en el núcleo de tal modo que se induce la proliferación y protege a la célula de la apoptosis.

La SP estimula la proliferación celular que se puede observar en la colitis crónica, este mecanismo es llevado a cabo mediante la activación del receptor del factor de crecimiento

epidérmico (EGFR) y de MAPK ⁴³⁸ de modo que en los colonocitos humanos activan metaloproteinasas de la matriz que inducen la liberación de TGF. Del mismo modo, en el caso de la inflamación crónica de la tiroiditis linfocitaria crónica de Hashimoto o la enfermedad de Graves-Basedow, la SP estimularía la transformación celular y la proliferación en caso de malignización. Ya que está demostrado que el riesgo de desarrollar un carcinoma de tiroides es mayor en los pacientes con este tipo de tiroiditis. Y este tipo de cáncer es claramente más agresivo que otros carcinomas de tiroides ⁴³⁰.

Por lo tanto el uso de antagonistas de NK-1R inhibiría la síntesis de EGFR y de MAPK inhibiendo la proliferación celular tanto en este tipo de enfermedades inflamatorias tiroideas como en los carcinomas de tiroides.

Se ha podido demostrar la relación entre SP y ciertos oncogenes, así pues, Luo et al. ³⁷⁹ han demostrado recientemente que la SP induce la transcripción de RNA mensajero de c-myc en la línea celular U-373MG. En dicha línea celular, el uso de Tyrohostin A25, un bloqueador de la actividad tirosin-cinasa, inhibió significativamente la mitogénesis inducida por la SP, lo que sugiere la implicación de la fosforilación por protein-cinasa en la función mitogénica de la SP. La estimulación de del NK-1R activa la fosforilación de la tirosina y la actividad enzimática de ERK1/2 así como de las MAPK.

La habilidad para regular la activación Ras y la ruta MAPK por parte del receptor acoplado a proteínas G es un proceso crítico para la regulación del crecimiento celular y su transformación ⁴³⁹. Algunos estudios indican que la activación de MAPK inducida por SP requiere la presencia de un dominio funcional EGFR cinasa, así mismo se ha visto que la ruta de señalización de EGFR está relacionada con la activación Ras ⁴⁴⁰. Se ha demostrado que el mecanismo de transactivación del EGFR por parte del complejo SP/NK-1R en las células epiteliales del colon, produce la activación de metaloproteinasas de la matriz (TAPI-1-sensitive), el cual es capaz de separar el precursor proTGF α anclado a membrana, conduciendo a la aparición de su forma madura en el espacio extracelular. El TGF α , que está relacionado con el EGFR, causa tanto su activación como la activación de la vía MAPK induciendo la proliferación celular. Esta nueva ruta puede participar tanto en la proliferación celular mediada por SP de varias líneas celulares, así como en el daño producido por la inflamación. Finalmente, estas señales inducidas por NK-1R tienen mucha relevancia en la idea de que el complejo SP/NK-1R tiene capital importancia en el desarrollo y progresión del crecimiento de tumores de distinta etiología incluyendo cáncer de páncreas, gliomas humanos, cáncer de mama, carcinoma de colon, así como en las diferentes estirpes del cáncer de tiroides.

Se conoce que la SP estimula la mitogénesis activando NK-1R tanto en células normales ^{441 442 443} como neoplásicas. Además se ha demostrado la expresión aumentada del

NK-1R en diferentes líneas celulares tumorales como U373 MG, U138 MG, UC11 MG y GAMG de las líneas celulares de gliomas, retinoblastomas, astrocitomas, melanomas, neuroblastomas, cáncer de mama y de pulmón, muchos de estos estudios realizados por Muñoz et al ^{360 380 385 386 390 400}. Apoyando esto, se ha confirmado una función mitogénica en la regeneración de miembros en anfibios ⁴⁴⁴, además se ha comprobado esta misma función en células del tejido conectivo en mamíferos ³⁹⁴.

En el presente estudio demostramos por primera vez, gracias a la inmunohistoquímica que existe un alto grado de expresión de NK-1R en todos los tipos de carcinoma tiroideos. La presencia de NK-1R está estrictamente correlacionada con el efecto de la SP o la Neurokinina A en el aumento de la síntesis de DNA y proliferación celular. Diferentes estudios ya presentados muestran que la activación de NK-1R mediante concentraciones nanomolares de SP induce la síntesis de DNA y la mitogénesis en dicha línea celular. Se sabe que la SP, actúa específicamente a través del NK-1R ya que al aplicar un antagonista de este receptor se produce una inhibición de la multiplicación celular, este efecto es reversible al añadir nuevamente SP, incrementándose de nuevo la mitogénesis.

Se ha comprobado, como la expresión del NK-1R se encuentra aumentada en diferentes líneas celulares tumorales humanas en relación a las células normales del organismo ^{445 446 421}. En el presente estudio vemos unos resultados similares en las muestras de tejido tiroideo, evidenciándose que la expresión de NK-1R es bastante débil en el tejido tiroideo sano y sin embargo existe una expresión muy intensa en los diferentes tipos de carcinomas tiroideos y en la tiroiditis de Hashimoto.

Esteban et al. ⁴⁴⁷ proponen que, el aumento de los NK-1R en la membrana celular, sería el mecanismo por el que la SP produciría sólo en estas células un aumento de las señales mitogénicas contrarrestando las diferentes señales apoptóticas o señales pro-senescencia en la población de células neoplásicas. La regulación de la estabilidad del genoma y la protección frente a las transformaciones malignas son complejos procesos en los que están involucrados una variedad de complejos mecanismos, como por ejemplo el arresto permanente del ciclo celular cuando un oncogén se activa ^{448 449 450 451 452}. Parece ser que células en senectud existen en tejidos en estadio pre-maligno pero no en los malignos ⁴⁵³. Existen pruebas que indican que escapar de la senectud o la adquisición de la inmortalidad celular es importante para la transformación maligna. La proliferación autónoma celular es una meta que alcanzan las células cancerosas por medio de la activación de oncogenes promotores del crecimiento. Esta activación dispara la apoptosis celular en un intento de contrarrestar el desarrollo del cáncer ⁴⁵⁴. El mecanismo por el que el tumor contrarresta este intento de autólisis celular es desconocido. Se propone que la SP podría jugar un papel clave en este proceso todavía confuso. Así, la activación

del ERK2 por el NK-1R podría producir la translocación celular del Nur-77, como ha sido demostrado por Castro-Obregon et al ⁴⁵⁵. Esto podría representar un nuevo y rápido factor de crecimiento de supervivencia independiente de la regulación génica.

El hallazgo de que las células de carcinoma de tiroides expresan SP/NK-1R, significa que existe un mecanismo autocrino-paracrino para la SP. La liberación de SP por las células de carcinoma de tiroides se unirían al receptor NK-1R, activando la migración de las células de cáncer de tiroides para invadir y metastatizar. Por eso es fundamental bloquear el receptor NK-1R para evitar la invasión y la metástasis de las células carcinoma de tiroides puesto que todas ellas expresan el receptor NK-1R y la SP.

5.2.2. ESTIMULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS.

En varios estudios realizados sobre NK-1R en líneas tumorales, se ha podido documentar la existencia de estos receptores, tanto en la masa tumoral como en el tejido peritumoral, además de los vasos sanguíneos intratumorales como peritumorales⁴⁵⁶. Se sabe que los tumores sólidos consiguen realizar la angiogénesis peritumoral secretando factores proangiogénicos. Es posible que la estimulación de la SP a través del NK-1R sea un mecanismo alternativo y más sencillo para obtener nuevos vasos sanguíneos en lugar de activar un variado repertorio de fenotipos proangiogénicos³³⁶. Además, el crecimiento de la masa tumoral, la infiltración peritumoral y las metástasis a distancia podrían estar regulados por una sobreexpresión del NK-1R en el tejido tumoral y peritumoral.

La angiogénesis es un proceso secuencial que conlleva en su inicio de una proliferación endotelial, seguido de la neoformación de vasos sanguíneos y posteriormente un incremento de su flujo sanguíneo. El último paso consiste en la maduración de los sistemas de regulación endógenos de tipo neurovasculares. El proceso neoangiogénico asentado sobre vasos existentes es una característica común de los tejidos sometidos a inflamación crónica así como de aquellos en los que se ha producido una herida. Por otro lado, este proceso aparece también en el contexto de la progresión tumoral a medida que la masa va necesitando más recursos para su desarrollo. Existe un estudio³⁸³ que indica que en estos tejidos tumorales existe un incremento en la inervación nerviosa así como en la expresión de NK-1R.

Ciertos estudios demuestran la capacidad de la SP para inducir la proliferación endotelial tanto *in vitro* como *in vivo*⁴⁴³. Esta capacidad es mediada únicamente por el NK-1R, no así por el NK-2R ni NK-3R. Además, se ha demostrado que este efecto es dosis dependiente siendo máximo para concentraciones de SP entre 1 y 10 nM.

Así mismo, el uso antagonistas del NK-1R bloqueó esta capacidad proliferativa.

Nuestro hallazgo de que la SP se encuentra en las células de carcinoma de tiroides, significa que existe un mecanismo paracrino de SP por el cual las células de carcinoma de tiroides liberarían SP al espacio intercelular y esta se uniría al NK-1R que expresa las células del endotelio de los vasos sanguíneos peritumorales y tumorales. Con lo cual las células tumorales estarían estimulando la angiogénesis y la manera de aumentar el flujo sanguíneo tumoral.

Existe otra regulación indirecta mediante un mecanismo paracrino de la SP liberada por las células de carcinoma de tiroides. Que sería estimulando el VEGF, el cual activaría la angiogénesis. Actualmente existen anticuerpos específicos contra el VEGF.

Los antagonistas de NK-1R bloqueando el NK-1R de las células endoteliales inhibiría y bloquearía la función estimulada de la angiogénesis de la SP liberada por las células de carcinoma de tiroides, de una manera directa a través del NK-1R e indirecta inhibiendo la producción del VEGF.

Por otro lado, el hecho de que las células endoteliales estén inervadas por fibras nerviosas que contienen SP, sugiere que pueda existir otra vía de inducción de la angiogénesis. Cabe resaltar como esta inervación se encuentra incrementada en tejidos sometidos a inflamación crónica.

La escasa expresión de SP y NK-1R en las células endoteliales descrita en este estudio, en los diferentes tipos de cáncer de tiroides, podría ser interpretado como que realmente no existen o bien que este hallazgo fuera consecuencia de una limitación de la técnica inmunohistoquímica. Un argumento a favor de esta segunda hipótesis es el hecho de que se haya descrito su presencia en otros numerosos estudios ^{336 383 443 456}. Debido a la captación muy intensa que presenta el tejido tumoral tiroideo, podría ser que éste acaparase todo el reactivo y por eso la captación fuera débil o inexistente en las células endoteliales.

5.2.3 INDUCCIÓN DE METÁSTASIS.

Uno de los principales objetivos en el tratamiento del cáncer consiste en evitar la diseminación de las células tumorales, disminuyendo por tanto el riesgo de aparición de metástasis. Esto es de vital importancia ya que, según Massagué et al, casi el 90% de las muertes por cáncer son a causa de las metástasis ⁴⁵⁷. En este sentido existe un estudio ⁴⁵⁸ que trata de relacionar el desarrollo de metástasis con la estimulación de GPCRs, entre ellos el NK-1R. Uno de los objetivos de esta investigación consiste en determinar cuales serían los ligandos que pueden inducir la migración celular. Uno de los resultados obtenidos es que en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-478 y la de próstata PC-3 se da el fenómeno de migración celular inducido por la noradrenalina, dopamina y la SP. Dicho fenómeno fue inhibido tras la aplicación de sus correspondientes antagonistas.

En el último estudio de 2014 de Muñoz et al, en líneas celulares de melanoma, se demostró además que el NK-1R es muy importante para la viabilidad de las células tumorales. Ya que tras la eliminación de NK-1R en las células mediante el método de silenciamiento génico siRNA o “knockdown gene silencing method”, las células afectadas que no expresan NK-1R demostraron una gran disminución de proliferación y metástasis en comparación con los controles. Estos datos muestran que los NK-1R desempeñan un papel importante en la viabilidad de las líneas celulares tumorales³⁸⁰

En las muestras analizadas en el presente estudio, de metástasis de carcinoma tiroideo, se comprueba una captación de SP y de NK-1R muy intensa. Por tanto es posible que el complejo SP/NK-1R actúe no sólo favoreciendo el crecimiento tumoral sino que además permita la migración celular y con ello el desarrollo de metástasis en el cáncer.

5.2.4 RELACIÓN ENTRE SP, INFLAMACIÓN, DOLOR Y CÁNCER.

Como ya se ha comentado, diversos estudios muestran que la SP juega un papel importante en la regulación de la inflamación neurogénica y en la respuesta inmunitaria tanto en tejidos periféricos como en el SNC^{459 460}. También se ha visto que existe una importante conexión entre el dolor y la SP habiéndose demostrado como bajo situaciones de dolor crónico existe un marcado incremento en la expresión de NK-1R. Es por ello que el antagonista del NK-1R L-733,060 haya sido utilizado con éxito en como tratamientos antiinflamatorios⁴⁶¹ y analgésicos⁴⁶².

Se sabe además que la SP es un potente vasodilatador en varios tejidos periféricos, hay que recordar que las terminaciones nerviosas que contienen SP se hallan muy cerca de los vasos sanguíneos. El fenómeno producido por la liberación periférica de SP es la conocida reacción inflamatoria aguda, denominada inflamación neurogénica, consisten en vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar y extravasación plasmática, así como degranulación de los mastocitos, etc^{463 464}.

La SP y el NK-1R tienen, así mismo, la capacidad de regular la función inmunitaria a través de la inervación sensitiva y los mecanismos de inflamación neurogénica. Se sabe que la activación del NK-1R induce cambios en la respuesta inmunitaria humoral y celular tanto en tejidos sanos como tumorales. En este sentido se ha visto que las taquicininas tienen la capacidad de modular la respuesta inmune de una gran variedad de células como los mastocitos, granulocitos, linfocitos y monocitos/macrófagos. La actividad de estas células es estimulada mediante SP y bloqueada por medio de sus antagonistas. Hay que añadir que esta actividad desempeñada por la SP no sólo se lleva a cabo a través de los terminales nerviosos, sino que además participan elementos no neurales como los eosinófilos y macrófagos^{379 465}.

Gillespie et al, estudió la inflamación en las células de la colitis ulcerosa la presencia de la cantidad de NK-1R y de la forma truncada de NK-1R y su relación con la progresión de la misma hacia el desarrollo de carcinoma colorectal. Y observó que en los pacientes con colitis que sufría transformación maligna había catorce veces mas cantidad de la forma truncada de NK-1R que de la forma completa. Llegando a la conclusión de que puede haber un papel funcional para la forma truncada del NK-1R en la transformación maligna en el cáncer a partir de colitis crónica. Y que la forma truncada del NK-1R podría ser útil como marcador de diagnóstico para identificar pacientes en riesgo de neoplasia y puede servir como una diana terapéutica útil en el tratamiento del cáncer de la colitis asociada ⁴⁶⁶.

En tejidos sometidos a una inflamación crónica, se ha comprobado un incremento en el número de NK-1R en las pequeñas arteriolas y en los ganglios linfáticos en relación con otras muestras de pacientes sanos. Además se ha detectado un incremento de las concentraciones de SP en los tejidos afectados estando además relacionado con el grado de inflamación y el estado clínico de la enfermedad. Esto parece indicar que la liberación local SP (por ejemplo en los ganglios linfáticos) podría ser un factor contribuyente en el desorden inmunitario existente en los pacientes diagnosticados de enfermedades inflamatorias, este fenómeno estaría apoyado por la existencia de receptores para la SP en linfocitos T en sangre periférica ^{467 468}.

En el caso de las enfermedades inflamatorias tiroideas, la inflamación crónica de la tiroiditis linfocitaria crónica de Hashimoto o la enfermedad de Graves-Basedow, la SP podría estar implicada en la transformación celular y la proliferación en caso de malignización. Ya que está demostrado que el riesgo de desarrollar un carcinoma de tiroides o un linfoma es mayor en los pacientes con este tipo de tiroiditis ⁴³⁰.

Por lo tanto el uso de antagonistas de NK-1R como tratamiento, inhibiría la síntesis de EGFR y de MAPK impidiendo la proliferación celular tanto en este tipo de enfermedades inflamatorias tiroideas como en los carcinomas de tiroides.

Queda patente que los mecanismos neuroinmunológicos son importantes para la percepción, el mantenimiento y la perpetuación de los mecanismos relacionados con la inflamación y dolor crónico. Se ha demostrado que las fibras inmunorreactivas a SP incluyen los grupos de células linfocitarias (tanto foliculares como no) existentes en el tejido linfático. Una anormal comunicación a este nivel podría ser responsable, en parte, del inicio y perpetuación de los mecanismos implicados en el dolor y la inflamación crónicos ^{456 469}.

Todos estos hallazgos sugieren que la inflamación y el dolor crónico podrían inducir la aparición cáncer a través del binomio SP/NK-1R ya que, como se ha demostrado, la SP tiene una importante actividad mitogénica y los tejidos tumorales son ricos en NK-1R. Además el conjunto SP/NK-1R sería el responsable del crecimiento de la masa tumoral, la infiltración

peritumoral y el desarrollo de metástasis a través de la liberación de SP de las propias células tumorales y de los tejidos peritumorales que contendrían células inflamatorias, fibroblastos, vasos sanguíneos, nervios, etc ⁴⁷⁰.

5.2.5. RELACIÓN ENTRE, COMPORTAMIENTO EMOCIONAL, SP Y CÁNCER.

La posibilidad de que exista cierta relación entre los factores psicosociales y la incidencia de cáncer es un asunto que siempre suscita interés. Este fenómeno que se comprueba en la clínica diaria, tiene pobre sustento molecular.

Las taquicininas, entre ellas SP, NKA y NKB, actúan como neurotransmisores tanto a nivel del SNC como del periférico. No obstante, las taquicininas y sus receptores pueden expresarse en células no neurológicas contribuyendo a la correcta comunicación entre el sistema nervioso y los órganos periféricos como el respiratorio, cardiovascular, inmunitario, gastrointestinal, genitourinario, etc. El hecho de que las taquicininas estén relacionadas con tantas funciones fisiológicas no hace extrañar que puedan estar relacionadas con situaciones patológicas como el cáncer ⁴⁰⁷.

Existen datos que apoyan que los factores psicológicos podrían estar implicados en el desarrollo y progresión del cáncer. Así pues los tumores de mama se han relacionado con ciertos estilos de vida y con la exposición de varios tipos de estresantes. Parece ser que los factores cruciales que afectan al crecimiento tumoral son el estrés, la personalidad individual, la existencia de apoyo psicosocial y la habilidad individual de hacer frente al estrés ⁴⁷¹.

No cabe duda de que el cáncer y la depresión son dos patologías que suelen ir asociadas. Diversos expertos en el tema sugieren varias premisas; que la depresión severa y crónica se asocia a mayor riesgo de cáncer; que la prevalencia de depresión entre pacientes con cáncer aumenta con la progresión de la enfermedad y la aparición de síntomas como el dolor y la fatiga; y que la depresión parece ser un predictor de la progresión del cáncer y de mortalidad. En este sentido existen hechos que sugieren que un apoyo psicosocial en estos pacientes produce una disminución de la ansiedad, del dolor y de la depresión y que podría incrementar la supervivencia ³⁵⁴.

Se sabe que el tratamiento crónico con fármacos antidepresivos produce una disminución de las concentraciones de SP en el ganglio estriado, la sustancia negra y la amígdala ^{472 473}. Además se ha demostrado que su administración induce una marcada reducción en la expresión de los genes que codifican las taquicininas y el NK-1R en ciertas áreas cerebrales. Uno de los antagonistas del NK-1R sugerido como tratamiento contra el cáncer, el L-733,060, ha sido utilizado con fines antidepresivos, además otro antagonista, Aprepitant ha sido aceptado como un potente antidepresivo tan eficaz como la Paroxetina. Además el estudio indicó que Aprepitant fue

bien tolerado no existiendo diferencias entre las frecuencia de efectos adversos en comparación con placebo.

Como ya se ha señalado tanto la SP como en NK-1R están ampliamente distribuidos por el SNC de mamíferos, incluido el sistema límbico. La SP podría estar involucrada en la integración de la respuesta emocional frente al estrés, sugiriendo la posibilidad de que en la patogénesis de la depresión podría estar relacionado el complejo SP/NK-1R. Esto se apoya fundamentalmente en la existencia de aumento en la concentración de SP en estas áreas^{348 391 474}.

Observando estos datos en conjunto, cabe la posibilidad de que la depresión podría inducir la proliferación tumoral por medio de la activación del SP/NK-1R.

En personas afectas de síndrome depresivo aumentan los niveles de SP en sangre y por consiguiente podrían activar los receptores NK-1R que sobreexpresan las células de carcinoma de tiroides. Obviamente el tratamiento con antidepresivos en estos pacientes que actúan sobre el NK-1R disminuirían los niveles de SP. Por tanto podría quedar aclarado al menos uno de los mecanismos que vincularían la depresión, estrés y ansiedad en los fenómenos de progresión tumoral en el cáncer de tiroides, ya que ambos están mediados por la SP. Por tanto se propone que el uso de los antagonistas del NK-1R en los pacientes diagnosticados de cáncer tiroides, podría tener varias funciones como ansiolítica, antidepresiva y antitumoral. A la inversa de una forma paralela el carcinoma de tiroides en base a la sobreexpresión de SP, podría comportarse como una estructura endocrina por lo que podría aumentar la SP en sangre y provocar depresión. Existiría por tanto una intercomunicación y una estrecha interrelación entre el complejo SP/NK-1R, cáncer de tiroides y sistema límbico.

5.2.6 POSIBLES USOS CLÍNICOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R EN EL CÁNCER DE TIROIDES.

Hoy en día para la práctica clínica, los fármacos antitumorales de los que se dispone denominados citostáticos, son compuestos que presentan un perfil muy bajo de seguridad junto con un gran número de efectos secundarios, algunos de ellos muy graves como anemia, leucopenia,... Estos efectos indeseables aparecen debido a que la actividad que presentan no es selectiva para el tejido tumoral. Todos los esfuerzos en la investigación de este tipo de fármacos se centran en crear moléculas que manteniendo la misma capacidad antitumoral presenten menos efectos secundarios. Este objetivo sólo podrá alcanzarse cuando se desarrolle un fármaco selectivo para las células tumorales.

La acción de los antagonistas del NK-1R es completamente dosis dependientes. A bajas dosis producen un efecto antiemético, actuando sobre los NK-1R localizados en el tronco del encéfalo en el núcleo glosofaríngeo, se utilizan actualmente en situaciones de vómitos incoercibles

secundarios a fármacos citostáticos. Cuando la dosis aumenta, producen un efecto ansiolítico y antidepresivo, los antagonistas del NK-1R actúan a nivel central en el sistema límbico (amígdala, hipotálamo, núcleos basales y áreas relacionadas con el comportamiento emocional). A dosis mayores actúa sobre ciertas áreas cerebrales como analgésico central. A dosis aún mayores posee actividad antiinflamatoria. Por último a estas mismas dosis o algo superiores, dependiendo del tumor en cuestión y de su estadio, tiene una actividad antitumoral (inhibición de la proliferación tumoral, inhibición de la producción de metástasis, inhibición de la reacción inflamatoria peritumoral y de la angiogénesis). Esto, junto con el hecho de que algunos preparados pueden ser administrados por vía oral y a que cruzan la barrera hematoencefálica, indica que los antagonistas del NK-1R se pueden posicionar como un prometedor grupo de fármacos para el control y tratamiento de los tumores malignos.

El grupo de Muñoz et al. ha llevado a cabo varios estudios⁴⁷⁵ donde demuestra la actividad antitumoral *in vitro* de Aprepitant en varias líneas celulares de cáncer obteniendo unos resultados similares a los obtenidos con otros antagonistas del NK-1R. Queda por tanto probado la acción antitumoral *in vitro* de un fármaco ya comercializado.

Así mismo Berger y Muñoz et al, en 2014 han realizado estudios *in vivo* mediante xenoinjerto en ratones⁴²⁰, para demostrar la utilidad del complejo SP-NK-1R como un potencial objetivo para el tratamiento tumoral. Demostrando que la estimulación de las células tumorales con SP causa un aumento en la tasa del crecimiento del tumor y la administración de sustancias antagonistas del NK-1R producen una inhibición de este crecimiento. Por lo tanto se demuestra la actividad antitumoral *in vivo* de Aprepitant en animales de experimentación.

Futuras investigaciones podrían reconocer el uso de Aprepitant como fármaco antitumoral. De hecho el grupo de investigación de Muñoz et al, esta preparando un próximo ensayo clínico en humanos para demostrar esta teoría.

5.3. INVESTIGACIONES FUTURAS RELACIONADAS CON LOS ANTAGONISTAS DEL NK-1R.

A pesar los resultados obtenidos, todavía queda mucho por hacer para poder considerar a este grupo de fármacos como una alternativa real para el tratamiento del cáncer. Quedan pendientes ciertos puntos a investigar en relación con los antagonistas del NK-1R:

1. Seguir investigando la acción *in vitro* de los antagonistas del NK-1R en otras líneas celulares tumorales y con otros fármacos antagonistas de NK-1R.
2. Seguir realizando más estudios *in vivo* en animales de experimentación.
3. Llevar a cabo ensayos clínicos en humanos con Aprepitant, único fármaco antagonista del NK-1R aprobado hasta ahora por la Agencia Europea.

VI. CONCLUSIONES.

1. Se demuestra por primera vez, la presencia de la SP en el tiroides humano sano y en los diferentes tipos de cáncer de tiroides (en los carcinomas papilares, foliculares, medulares y anaplásicos) y en sus metástasis.
2. Se demuestra por primera vez, la presencia NK-1R en el tiroides humano sano y en los carcinomas papilares, foliculares, anaplásicos tiroideos y en sus metástasis.
3. La SP sigue un patrón de expresión y distribución inmunohistoquímica en tejido tiroideo humano predominantemente nuclear.
4. El NK-1R sigue un patrón de expresión y distribución inmunohistoquímica en tejido tiroideo humano predominantemente intracitoplasmático y de membrana citoplasmática.
5. La mayor presencia de la SP en el núcleo se traduce en que desempeña una mayor función nuclear que a nivel citoplasmático.
6. La SP desempeña en el núcleo de las células principales tiroideas una función neurorreguladora genética, regulando la expresión de ciertos genes relacionados con la proliferación.
7. La expresión de la SP y el NK-1R en tiroides humanos sanos establece unas bases anatomofuncionales que permiten mejorar el conocimiento de la fisiología tiroidea y la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades tiroideas en las que existe una sobreexpresión del complejo SP-NK-1R.
8. Además la SP a través de NK-1R estaría regulando de forma autocrina y paracrina la proliferación de las células tiroideas. En base a la expresión de SP/NK-1 en los diferentes tipos de carcinoma de tiroides, estos se comportarían como órganos endocrinos con respecto a SP.
9. La presencia de altas concentraciones del complejo SP-NK-1R en la tiroiditis linfocitaria crónica o tiroiditis de Hashimoto induciría a la proliferación celular y su transformación a tejido canceroso.
10. La presencia de SP y NK-1R en el material coloide de los folículos tiroideos traduce una influencia de los mismos en la regulación y formación de las hormonas tiroideas.
11. La presencia de la SP y del NK-1R en las células tiroideas sanas y patológicas, se traduce en una función autocrina y paracrina de las células a través del complejo SP-NK-1R.
12. Asimismo la SP a través del NK-1R estaría organizando la migración de las células tiroideas, lo que implicaría regulación de la infiltración y de las metástasis en el cáncer de tiroides.
13. La expresión de NK-1R en las células de los diferentes tipos de carcinoma tiroideo, puede ser útil para la intervención terapéutica con antagonistas del NK-1R, para inhibir la proliferación, la invasión y metástasis de las células tumorales tiroideas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010;22:395-404.
2. Becker HD, Hohenberger W, Junginger T, Schlag PM. *Chirurgická onkologie*. 1 ed. Prague Grada Publishing, a.s.
3. Vlček P. Tumours thyroid gland. *Postgraduální medicína* 2007;9:190-4
4. Lope V, Pollán M, Pérez-Gómez B, Aragonés R, Gómez-Barroso D, López-Abente G. Municipal mortality due to thyroid cancer in Spain. *BMC public health* 2006; 6: 302.
5. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. IARC Cancer Base No. 10. Lyon: IARC 2010. [cited 2010 Sep 22]. Available from: [http:// globocan.iarc](http://globocan.iarc).
6. Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer. Increased detection or higher radiation exposure? *Hormones* 2010;9(2):103-8.
7. Pellegriti G, De VF, Scollo C, Attard M, Giordano C, Arena S, Dardanoni G, Vigneri R. Papillary thyroid cancer incidence in the volcanic area of Sicily. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:1575-83.
8. Ward MH, Kilfoy BA, Weyer PJ, Anderson KE, Folsom AR, Cerhan JR. Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease. *Epidemiology* 2010;21:389-95.
9. Likhatov I, Kovgan L, Vavilov S, Chepurny M, Bouville A, Luckyanov N, Jacob P, Voillequ AP, Voigt G. Post-Chernobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: estimation of thyroid doses. *Radiat Res* 2005;163:125-36
10. Pedersen RK, Pedersen NT. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the thyroid gland: a population based study. *Histopathology* 1996;28:25-31
11. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X, Ward MH, Sjodin A. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973- 2002. *Cancer Causes Control* 2009;20:525-31.
12. Limanová Z. Thyroid carcinoma – diagnosis and treatment. *Interní medicína pro praxi* 2003;6:308-14.
13. Fagin JA, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract&Res Clin Endocrinol&Metab* 2008;22(6):955-69.
14. Cardis E, Hatch M. The Chernobyl accident – an epidemiological perspective. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2011;23:251-60.

15. Williams ED, Pacini F, Pinchera A. Thyroid cancer following Chernobyl. *J Endocrinol Invest* 1995;18:144-6.
16. Kolektiv autorů. Patnáct let od havárie Černobyli – důsledky a poučení. Praha: SUJB, 2001; <http://www.subj.cz>
17. Kazakov VS, Demidchik EP, Astakhova LN. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 1992;359:21-3.
18. Yang GC, LiVolsi VA, Baloch ZW. Thyroid microcarcinoma: fine-needle aspiration diagnosis and histologic follow-up. *Int J Surg Pathol* 2002;10:133-9.
19. Sigurdson AJ, Ronckers CM, Mertens AC, Stovall M, Smith SA, Liu Y. Primary thyroid cancer after a first tumour in childhood (the Childhood Cancer Survivor Study): a nested case-control study. *Lancet* 2005;365:2014-23.
20. Němec J, Chytrý P, Dvořák J, Vlček P, Neradilová M, Racek P, Blažek T, Zeman V. Effect of sex on the prevalence and survival in thyroid carcinoma. *Vnitř lék* 1996;42:602-4.
21. Mazzaferri EL. Management of low-risk differentiated thyroid cancer. *Endocr Pract* 2007;13:498-512.
22. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Ann Surg Oncol* 1996;3:534-8.
23. Ito Y, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. Risk factors for recurrence to the lymph node in papillary thyroid carcinoma patients without preoperatively detectable lateral node metastasis: validity of prophylactic modified radical neck dissection. *World J Surg* 2007;31:2085-91.
24. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS, Sturgeon A. Extent of Surgery affects survival for papillary thyroid cancer. *Ann Surg* 2007; 246:375-381.
25. Bhattacharyya N. A population-based analysis of survival factors in differentiated and medullary thyroid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:115-23.
26. Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, Parmentier J, Remick SC. Anaplastic thyroid cancer: A review of epidemiology, pathogenesis and treatment. *J of Oncology* 2011;2011:542358.
27. Thompson AM. Dissecting the molecular mechanisms of human cancer: translating laboratory. *Advances into clinical practice. Surg J R Coll Surg Edinb Irel* 2004;2:1-6

28. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. *Biología molecular de la célula*, 4ª ed. (2002) Ed. Omega, Barcelona.
29. Kim MN, Califano JA. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J Cancer* 2004;112:545-553.
30. Ramzi S. Cotran, Stanley L. Robbins, Vinay Kumar. *Robbins: Patología Estructural y Funcional (6ª ED.)*. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A. 1999.
31. Esteban Ortega, F. González Moles, M.A. Alteraciones genéticas frecuentes en el cáncer de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006 Jun;57 Suppl 1:251-2.
32. Shores CG, Yin X, Funkhouser W, Yarbrough WG. Clinical evaluation of a new molecular method for detection of micrometastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:937-942.
33. Cabanillas Farpón, R. Nuevas aproximaciones terapéuticas en el tratamiento de los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006 Jun;57 Suppl 1:251-2.
34. Jiang WW, Masayeva B, Zahurak M, et al. Increased mitochondrial DNA content in saliva associates with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2486-2491.
35. Rinaldo A, Devaney KO, Ferlito A. Immunohistochemical studies in the identification of lymph node micrometastasis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66:38-41.
36. Rodrigo Tapia, J.P. Aplicaciones diagnósticas de la biología molecular en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006 Jun;57 Suppl 1:251-2.
37. Von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol (Lond)* 1931;72: 74-87.
38. Pernow B. Studies on substance P purification, occurrence, and biological actions. *Acta Physiol Scand* 1953; 29: 1-90.
39. Ehrenpreis T, Pernow B. On the occurrence of substance P in the rectosigmoid in Hirschsprung's disease. *Acta Physiol Scand* 1952; 27: 380.
40. Lembeck F. Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1953; 219: 197-213.

41. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino acid sequence of substance P. *Nature (New Biol)* 1971; 232: 86-7.
42. Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nature (New Biol)* 1971; 232: 87-9.
43. Powell D, Leeman SE, Tregear GW, Niall HD, Potts JJT. Radioimmunoassay for substance P. *Nature (New Biol)* 1973; 241: 252-4.
44. Takahashi T, Konishi S, Powell D, Leeman SE, Otsuka M. Identification of the motoneuron-depolarizing peptide in bovine dorsal root as hypothalamic substance P. *Brain Res* 1974; 73: 59-69.
45. Henry JL. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res* 1976; 114: 439-51.
46. Takahashi T, Otsuka M. Regional distribution of substance P in the spinal cord and nerve roots of the cat and the effect of dorsal root section. *Brain Res* 1975; 87: 1-11.
47. Hoèkfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. Substance P localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 1975; 190: 889-90.
48. Nilsson G, Larsson LT, Haèkanson R, Brodin E, Pernow B, Sundler F. Localization of substance P-like immunoreactivity in mouse gut. *Histochemistry* 1975; 43: 97-9.
49. Cuello AC, Kanazawa I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1978; 178: 129-56.
50. Ljungdahl AÈ , Hoèkfelt T, Nilsson G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat I. Cell bodies and nerve terminals. *Neurosci* 1978; 3: 861-943.
51. Schultzberg M, Hoèkfelt T, Nilsson G et al. Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/ cholecystokinin, neurotensin and dopamine b-hydroxylase. *Neurosci* 1980; 5: 689-744.
52. Costa N, Cuello AC, Furness JB, Franco R. Distribution of enteric neurons showing immunoreactivity for substance P in the guinea-pig ileum. *Neurosci* 1980; 5: 323-31.
53. Otsuka M, Konishi S. Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature* 1976; 264: 83-4.

54. Olgart L, Gazelius B, Brodin E, Nilsson G. Release of substance P-like immunoreactivity from the dental pulp. *Acta Physiol Scand* 1977; 101: 510-2.
55. Otsuka M, Takahashi T. Putative peptide neurotransmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1977; 17: 425-39.
56. Nicoll RA, Schenker C, Leeman SE. Substance P as a neurotransmitter candidate. *Annu Rev Neurosci* 1980; 3: 227-68.
57. Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev* 1983; 35: 84-141.
58. Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 1993; 73: 229-308.
59. Kangawa K, Minamino N, Fukada A, and Matsuo H (1983) Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 114:533-540
60. Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata. Novel Neuropeptides, Neurokinin α and β , Isolated from Porcine Spinal Cord. *E. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Vol. 59, 101-104 (1983)*.
61. Nawa, H., Doteuchi, M., Igano, K., Inoue, K. and Nakanishi, S.: Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci* 34, 1153-1160 (1984).
62. Otsuka, M. and Konishi, S.: Substance P and excitatory transmitter of primary sensory neurones. In *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Vol. 40, p. 135-143, The Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1975)*.
63. Harmar, A.J. Three tachykinins in mammalian brain. *Trends Neurosci.*, 1984, 7, 57. Maggi, C.A.; Santicoli P.; Meli, A.. Evidence for the involvement of endogenous substance P in the motor effects of capsaicin on the rat urinary bladder. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1985, 37, 203.
64. Ljungdahl, A.; Hokfelt, T.; Nilsson G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*, 1978, 3, 861.
65. Traurig, H.H.; Saria, A.; Lembeck, F. Substance P in primary afferent neurons of the female rat reproductive system. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1984, 326, 343.
66. Buck, S.H. ; Helke, C.J. ; Burcher E. ; Shults C.W. ; O'Donohue T.L. Pharmacologic characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. *Peptides*, 1986, 7, 1109.

67. Holzer, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, 1988, 24, 739.
68. MAGGI, C. A., and A. MELI. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 19: 1-43, 1988.
69. Regoli D, Boudon A, Fauchere J. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 1994; 46(4): 551-599.
70. Lundberg, J.M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.*, 1996, 48, 113.
71. Zhang, Y.; Lu, L.; Furlonger, C.; Wu, G.E.; Paige, C. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *J. Nature Immunol.*, 2000, 1, 392.
72. Kurtz, M.M.; 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. *Gene*, 2002, 296, 205.
73. Aliakbari, J.; Sreedharan, S.P.; Turck, C.W.; Goetzl E. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 148, 1440.
74. Linnik, M.D.; Moskowitz, M.A. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides*, 1989, 10, 957.
75. Chiwakata, C.; Brackmann, B.; Hunt, N.; Davidoff, M.; Schulze, W.; Ivell, R. Tachykinin (Substance-P) Gene Expression in Leydig Cells of the Human and Mouse Testis. *Endocrinology*, 1991, 128, 2441.
76. Ho, W.Z.; Lai, J.P.; Zhu, X.H.; Uvaydova, M.; Douglas, S.D. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J. Immunol.*, 1997, 159, 5654.
77. Lai, J.P.; Douglas S.D.; Ho W.Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J. Neuroimmunol.*, 1998, 86, 80.
78. Pinto, F.M.; Cintado, C.G.; Devillier, P.; Candenias, M.L. Expression of preprotachykinin-B, the gene that encodes neurokinin B, in the rat uterus. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 425, R1.

79. Tatemoto, K.; Lundberg, J.M.; Jornvall, H.; Mutt, V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 128, 947.
80. Severini, C.; Improta, G.; Falconieri-Erspamer, G.; Salvadori, S.; Erspamer, V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54, 285.
81. Krause, J.E.; MacDonald, M.R.; Takeda, Y. The polyprotein nature of substance P precursors. *Bioessays*, 1989, 10, 62.
82. Maggio, J.E. Tachykinins. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1988, 11, 13.
83. Saffroy, M.; Torrens, Y.; Glowinski, J.; Beaujouan, J.C. Presence of NK2 binding sites in the rat brain. *J. Neurochem.*, 2001, 79, 985.
84. Takeda, Y.; Krause, J.E. Neuropeptide K potently stimulates salivary gland secretion and potentiates substance P-induced salivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 392.
85. Arai, H.; Emson, P.C. Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. *Brain Res.*, 1986, 399, 240.
86. Valentino, K.L.; Tatemoto, K.; Hunter, J.; Barchas, J.D. Distribution of neuropeptide K-immunoreactivity in the rat central nervous system. *Peptides*, 1986, 7, 1043.
87. Takeda, Y.; Takeda, J.; Smart, B.M., Krause, J.E. Regional distribution of neuropeptide gamma and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat. *Regul. Pept.*, 1990, 28, 323.
88. Maggi, C.A. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J. Auton. Pharmacol.*, 1991, 11, 173.
89. Lembeck, F.; Holzer, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1979, 310, 175.
90. Meini, S.; Maggi, C.A. Evidence for a capsaicin-sensitive, tachykinin-mediated, component in the NANC contraction of the rat urinary bladder to nerve stimulation. *Br. J. Pharmacol.*, 1994, 112, 1123.
91. Patacchini R, Barthó L, De Giorgio R, Lénárd L Jr, Stanghellini V, Barbara G, Lecci A, Maggi CA. Involvement of endogenous tachykinins and CGRP in the motor responses produced by

- capsaicin in the guinea-pig common bile duct. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999 Sep;360(3):344-53.
92. Jancso, G.; Kiraly, E.; Jancso-Gabor, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, 1977, 270, 741.
93. Lundberg, J.M.; Saria, A. Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol. Scand.*, 1982, 116, 473.
94. Moussaoui, S.M.; Le Prado, N.; Bonici, B.; Faucher, D.C.; Cuiné, F.; Laduron, P.M.; Garret, C. Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience*, 1992, 48, 969.
95. Goubillon, M.L.; Forsdike, R.A.; Robinson, J.E.; Ciofi, P.; Caraty, A.; Herbison, A. Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *E. Endocrinology*, 2000, 141, 4218.
96. Massi, M.; Panocka, I.; de Caro, G. The psychopharmacology of tachykinin NK3 receptors in laboratory animals. *Peptides*, 2000, 21, 1597.
97. Patacchini, R.; Maggi, C.A.; Holzer, P. Tachykinin autoreceptors in the gut. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, 21, 166.
98. Pascual, D.W.; Bost, K.L. Substance P production by P388D1 macrophages: a possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology*, 1990, 71, 52.
99. Metwali, A.; Blum, A.M.; Ferraris, L.; Klein, J.S.; Fiocchi, C.; Weinstock, J.V. Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. *J. Neuroimmunol.*, 1994, 52, 69.
100. Killingsworth, C.R.; Shore, S.A.; Alessandrini, F.; Dey, R.D.; Paulauskis, J.D. Rat alveolar macrophages express preprotachykinin gene-I mRNA-encoding tachykinins. *Am. J. Physiol.*, 1997, 273, L1073.
101. Joos, G.F.; Pauwels, R.A. Pro-inflammatory effects of substance P: new perspectives for the treatment of airway diseases? *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, 21, 131.
102. Page, N.M.; Woods, R.J.; Lowry, P.J. A regulatory role for neurokinin B in placental physiology and pre-eclampsia. *Regul. Pept.*, 2001, 98, 97.

103. Cintado, C.G.; Pinto, F.M.; Devillier, P.; Merida, A.; Candenas, M.L. Increase in neurokinin B expression and in tachykinin NK(3) receptor-mediated response and expression in the rat uterus with age. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001, 299, 934.
104. Patak, E.; Candenas, M.L.; Pennefather, J.N.; Ziccone, S.; Lilley, A.; Martín, J.D.; Flores, C.; Mantecón, A.G.; Story, M.E.; Pinto, F.M. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 139, 523.
105. Pintado, C.O.; Pinto, F.M.; Pennefather, J.N.; Hidalgo, A.; Baamonde A.; Sanchez, T.; Candenas, M.L. A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol. Reprod.*, 2003, 69, 940.
106. Nawa H, Kotani H, Nakanishi S. Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature*. 1984 Dec 20-1985 Jan 2;312(5996):729-34.
107. Nakanishi, S. Structure and regulation of the preprotachykinin gene. *Trends Neurosci.*, 1986, 9, 41.
108. Nakanishi, S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol. Rev.*, 1987, 67, 1117.
109. Carter, M.S.; Krause, J.E. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J. Neurosci.*, 1990, 10, 2203.
110. Kage, R.; McGregor, G.P.; Thim, L.; Conlon, J.M. Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J. Neurochem.*, 1988, 50, 1412.
111. Krause, J.E.; Chirgwin, J.M.; Carter, M.S.; Xu, Z.S.; Hershey A.D. Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 881.
112. Wang, Y.; Bockman, C.S.; Lovas, S.; Abel, P.W.; Murphy, R.F.; Conlon, J.M. Neuropeptide gamma-(1-9)-peptide: a major product of the posttranslational processing of gamma-preprotachykinin in rat tissues. *J. Neurochem.*, 1993, 61, 1231.
113. Kawaguchi, Y.; Hoshimaru, M.; Nawa, H.; Nakanishi, S. Sequence analysis of cloned cDNA for rat substance P precursor: existence of a third substance P precursor. *Biochem. Biophys. Res. Comun.*, 1986, 139, 1040.

114. Kako, K.; Munekata, E.; Hosaka, M.; Murakami, K.; Nakayama, K. Cloning and sequence analysis of mouse cDNAs encoding preprotachykinin A and B. *Biomed. Res.*, 1993, 14, 253.
115. Harmar, A.J.; Armstrong, A.; Pascall, J.C.; Chapman, K.; Rosie, R.; Curtis, A.; Going, J.; Edwards, C.R.; CRW and Fink G. (1986) cDNA sequence of human B-preprotachykinin, the common precursor to substance P and neurokinin A. *Fedn. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 208, 67-72.
116. MacDonald, M.R.; McCourt, D.W.; Krause, J.E. Posttranslational processing of alpha-, beta-, and gamma-preprotachykinins. Cell-free translation and early posttranslational processing events. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 15176.
117. Harmar, A.J.; Hyde, V.; Chapman, K. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett.*, 1990, 275, 22.
118. Khan, I.; Collins, S.M. Fourth isoform of preprotachykinin messenger RNA encoding for substance P in the rat intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 202, 796.
119. Lai, J.P.; Zhan, G.X.; Campbell, D.E.; Douglas, S.D.; Ho, W.Z. Detection of substance P and its receptor in human fetal microglia. *Neuroscience*, 2000, 101, 1137.
120. Brown, E.R.; Harlan, R.E.; Krause, J.E. Gonadal steroid regulation of substance P (SP) and SP-encoding messenger ribonucleic acids in the rat anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology*, 1990, 126, 330.
121. Kotani, H.; Hoshimaru, M.; Nawa, H.; Nakanishi, S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 7074.
122. Folkers, K.; Lu, Y.A.; Rosell, S. Synthesis and biological activities of neurokinin A and B. *Biophys. Res. Commun.*, 1984, 118, 405.
123. Gurrath, M. Peptide-binding G protein-coupled receptors: new opportunities for drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8, 1605.
124. Hoyle, C.H. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul. Pept.*, 1998, 73, 1.
125. Holmgren, S.; Jensen, Evolution of vertebrate neuropeptides. *J. Brain Res. Bull.*, 2001, 55, 723.
126. Conlon, J.M.; Katsoulis, S.; Schmidt, W.E.; Thim, L. [Arg³]substance P and neurokinin A from chicken small intestine. *Regul. Pept.*, 1988, 20, 171.

127. Wang, Y.; O'Harte, F.; Conlon, J.M. Structural characterization of tachykinins (neuropeptide gamma, neurokinin A, and substance P) from a reptile, *Alligator mississippiensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1992, 88, 277.
128. Conlon, J.M.; Adrian, T.E.; Secor, S.M. Tachykinins (substance P, neurokinin A and neuropeptide gamma) and neurotensin from the intestine of the Burmese python, *Python molurus*. *Peptides*, 1997, 18, 1505.
129. Conlon, J.M.; Warner, F.J.; Burcher, E. Bufokinin: a substance P-related peptide from the gut of the toad, *Bufo marinus* with high binding affinity but low selectivity for mammalian tachykinin receptors. *J. Pept. Res.*, 1998, 51, 210.
130. O'Harte, F.; Burcher, E.; Lovas, S. Smith, D.D.; Vaudry, H.; Conlon, J.M. Ranakinin: a novel NK-1R tachykinin receptor agonist isolated with neurokinin B from the brain of the frog *Rana ridibunda*. *J. Neurochem.*, 1991, 57, 2086.
131. Kozawa, H.; Hino, J.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H. Isolation of four novel tachykinins from frog (*Rana catesbeiana*) brain and intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 177, 588.
132. Anastasi, A.; Erspamer, V.; Cei, J.M. Isolation and amino acid sequence of physalaemin, the main active polypeptide of the skin of *Physalaemus fuscumaculatus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, 108, 341.
133. Erspamer, V.; Anastasi, A.; Bertaccini, G.; Cei, J.M. Structure and pharmacological actions of physalaemin, the main active polypeptide of the skin of *Physalaemus fuscumaculatus*. *Experientia*, 1964, 20, 489.
134. Anastasi, A.; Montecucchi, P.; Erspamer, V.; Visser, J. Amino acid composition and sequence of kassinin, a tachykinin dodecapeptide from the skin of the African frog *Kassina senegalensis*. *Experientia*, 1977, 33, 857.
135. Yasuhara, T.; Nakajima, T.; Falconieri-Erspamer G.; Erspamer V. New tachykinins. Glu², Pro¹- kassinin (*Hylambates kassinin*) and hylambatin. in the skin of the African racophorid frog *Hylambates mucululus*. *Biomed. Res.*, 1981, 2, 613.
136. Waugh, D.; Bondareva, V.; Rusakov, Y.; Bjenning, C.; Nielsen, P.F.; Conlon, J.M. Tachykinins with unusual structural features from a urodele, the amphiuma, an elasmobranch, the hammerhead shark, and an agnathan, the river lamprey. *Peptides*, 1995, 16, 615.

137. Jensen, J.; Conlon, J.M. Substance-P-related and neurokinin-A-related peptides from the brain of the cod and trout. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 206, 659.
138. Lin, X.W.; Peter, R.E. Goldfish gamma-preprotachykinin mRNA encodes the neuropeptides substance P, carassin, and neurokinin A. *Peptides*, 1997, 18, 817.
139. Waugh, D.; Groff, K.E.; Platzack, B.; Youson, J.H.; Olson, K.R.; Conlon, J.M. Isolation, localization, and cardiovascular activity of tachykinins from the stomach of the bowfin *Amia calva*. *Am. J. Physiol.*, 1995, 269, R565.
140. Waugh, D.; Wang, Y.; Hazon, N.; Balment, R.J.; Conlon, J.M. Primary structures and biological activities of substance-P-related peptides from the brain of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Eur. J. Biochem.*, 1993, 214, 469.
141. Conlon, J.M.; Deacon, C.F.; O'Toole, L.; Thim, L. Scyliorhinin I and II: two novel tachykinins from dogfish gut. *FEBS Lett.*, 1986, 200, 111.
142. Waugh, D.; Sower, S.; Bjenning, C.; Conlon, J.M. Novel tachykinins from the brain of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the skate, *Raja rhina*. *Peptides*, 1994, 15, 155.
143. Siviter, R.J.; Coast, G.M.; Winther, A.M.; Nachman, R.J.; Taylor, C.A.; Shirras, A.D.; Coates, D.; Isaac, R.E.; Nassel, D.R. Expression and functional characterization of a *Drosophila* neuropeptide precursor with homology to mammalian preprotachykinin A. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 23273.
144. Jensen, J.; Olson, K.R.; Conlon, J.M. Primary structures and effects on gastrointestinal motility of tachykinins from the rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, 1993, 265, R804.
145. Christie, A.E.; Lundquist, C.T.; Nassel, D.R.; Nusbaum, M.P. Two novel tachykinin-related peptides from the nervous system of the crab *Cancer borealis*. *J. Exp. Biol.*, 1997, 200, 2279.
146. Wang, Y.; Badgery-Parker, T.; Lovas, S.; Chartrel, N.; Vaudry, H.; Burcher, E.; Conlon, J.M. Primary structure and receptor-binding properties of a neurokinin A-related peptide from frog gut. *Biochem. J.*, 1992, 287, 827.
147. Conlon, J.M.; O'Harte, F.; Peter, R.E.; Kah, O. Carassin: a tachykinin that is structurally related to neuropeptide-gamma from the brain of the goldfish. *J. Neurochem.*, 1991, 56, 1432.
148. Erspamer, V. *Experientia*, 1949, 5, 79. Christie, A.E.; Lundquist, C.T.; Nassel, D.R.; Nusbaum, M.P. Two novel tachykinin-related peptides from the nervous system of the crab *Cancer borealis*. *J. Exp. Biol.*, 1997, 200, 2279.

149. Anastasi, A. Structure and pharmacological actions of eledoisin, the active endecapeptide of the posterior salivary glands of *Eledone*. *Experientia* 1962, 18, 58.
150. Erspamer, V.; Falconieri-Erspamer, G. Pharmacological actions of eledoisin on extravascular smooth muscle *Br. J. Pharmacol.*, 1962,19, 337.
151. Schoofs, L.; Holman, G.M.; Hayes, T.K.; Nachman, R.J.; De Loof, A. Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS Lett.*, 1990, 261, 397.
152. Schoofs, L.; Holman, G.M.; Hayes, T.K.; Kochansky, J.P.; Nachman, R.J.; De Loof, A. Locustatachykinin III and IV: two additional insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *Regul. Pept.*, 1990, 31, 199-212.
153. Muren, J.E.; Nassel, D.R. Isolation of five tachykinin-related peptides from the midgut of the cockroach *Leucophaea maderae*: existence of N-terminally extended isoforms. *Regul. Pept.*, 1996, 65, 185.
154. Zhang Y, Paige CJ. T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. *Blood* 2003;102:2165–72.
155. Harrison S, Geppetti P, Substance P, *Int J. Biochem Cell Biol* 2001;33:555–76.
156. Champagne, D.E.; Ribeiro, J.M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994 ,91, 138.
157. Nachman, R.J.; Moyna, G.; Williams, H.J.; Zabrocki, J.; Zadina, J.E.; Coast, G.M.; Varden Broeck, J. Comparison of active conformations of the insectatachykinin/tachykinin and insect kinin/Tyr-W-MIF-1 neuropeptide family pairs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1999,897, 388.
158. Gerard, N.P.; Bao, L.; Xiao-Ping, H.; Gerard, C. Molecular aspects of the tachykinin receptors. *Regul. Pept.*,1993, 43, 21.
159. Krause, J.E.; Blount, P.; Sachais, B.S. In: *The tachykinin receptors*; Buck, S.H., Ed.; Humana Press: Totowa, 1994; pp 165-218.
160. Maggi, C.A. The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmacol.*, 1995, 26, 911.
161. Attwood, T.K. A compendium of specific motifs for diagnosing GPCR subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2001, 22, 162.
162. Zhang Y, Devries ME, Skolnick J. Structure Modeling of All Identified G Protein-Coupled Receptors in the Human Genome. *PLoS Comput Biol.* 2006 Feb 17;2(2):e13.

163. Baldwin, J.M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.*, 1993, 4, 1693.
164. 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; 329:836-8.
165. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martín JD, Candenas ML. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem.* 2004 Aug;11(15):2045-81.
166. Gerard, N.P.; Garraway, L.A.; Eddy, R.L.Jr.; Shows, T.B.; Iijima, H.; Paquet, J.L.; Gerard, C. Human substance P receptor (NK-1R): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry*, 1991, 30, 10640.
167. Takahashi, K.; Tanaka, A.; Hara, M.; Nakanishi, S. The primary structure and gene organization of human substance P and neuromedin K receptors. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 204, 1025.
168. Page, N.M.; Bell, N.J. The human tachykinin NK-1R (short form) and tachykinin NK4 receptor: a reappraisal *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 437, 27.
169. Shigemoto, R.; Yokota, Y.; Tsuchida, K.; Nakanishi, S. Characterization of benzodiazepine receptors with a fluorescence-quenching ligand. *J. Biol. Chem.*, 1990, 15, 623.
170. Buell, G.; Schulz, M.F.; Arkininstall, S.J.; Maury, K.; Missotten, M.; Adami, N.; Talabot, F.; Kawashima, E. Molecular characterisation, expression and localisation of human neurokinin-3 receptor. *FEBS Lett.*, 1992, 299, 90.
171. Aharony, D.; Little, J.; Thomas, C.; Powell, S.; Downey-Jones, M.; Graham, A. Isolation and characterization of neurokinin A receptor cDNAs from guinea-pig lung and rabbit pulmonary artery. *J. Recept. Res.*, 1994, 14, 399.
172. Sasai, Y.; Nakanishi, S. Molecular characterization of rat substance K receptor and its mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 165, 695.
173. Gorbulev, V.; Akhundova, A.; Luzius, H.; Fahrenholz, F. Molecular cloning of substance P receptor cDNA from guinea-pig uterus. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, 1131, 99.
174. Takeda, Y.; Chou, K.B.; Takeda, J.; Sachais, B.S.; Krause, J.E. Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 179, 1232.

175. Hershey, A.D.; Dykema, P.E.; Krause, J.E. Organization, structure, and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 4366.
176. Sarau, H.M.; Field, J.A.; Ames, R.S.; Foley, J.J.; Nuthulaganti, P.; Schmidt, D.B.; Buckley, P.T.; Elshourbagy, N.A.; Brawner, M.E.; Luttmann, M.A.; Giardina, G.A.; Hay, D.W. Molecular and pharmacological characterization of the murine tachykinin NK(3) receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 413, 143.
177. Sundelin, J.B.; Provvedini, D.M.; Wahlestedt, C.R.; Laurell, H.; Pohl, J.S.; Peterson, P.A. Molecular cloning of the murine substance K and substance P receptor genes. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 203, 625.
178. Hershey, A.D.; Krause, J.E. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science*, 1990, 247, 958.
179. Yokota, Y.; Sasai, Y.; Tanaka, K.; Fujiwara, T.; Tsuchida, K.; Shigemoto, R.; Kakizuka, A.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S. Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 17649.
180. Gerard, N.P.; Eddy, R.L.Jr.; Shows, T.B.; Gerard, C. The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 20455.
181. Debeljuk, L.; Rettori, V.; Bartke, A.; McCann, SM. In vivo and in vitro effects of neuropeptide K and neuropeptide gamma on the release of growth hormone. *Neuroreport*, 1995, 6, 2457.
182. Debeljuk, L.; Lasaga, M. Modulation of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and the pineal gland by neurokinin A, neuropeptide K and neuropeptide gamma. *Peptides*, 1999, 20, 285.
183. Saffroy, M.; Torrens, Y.; Glowinski, J.; Beaujouan, J.C. Autoradiographic distribution of tachykinin NK2 binding sites in the rat brain: comparison with NK-1R and NK3 binding sites. *Neuroscience*, 2003, 116, 761.
184. Van Giersbergen, P.L.; Shatzer, S.A.; Burcher, E.; Buck, S.H. Comparison of the effects of neuropeptide K and neuropeptide gamma with neurokinin A at NK2 receptors in the hamster urinary bladder. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1992, 345, 51.
185. Prat, A.; Picard, P.; Couture, R. Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered neuropeptide K in the rat: receptor characterization. *Br. J. Pharmacol.*, 1994, 112, 250.

186. Carini, F.; Catalani, C.; Cucchi, P.; Lecci, A.; Meini, S.; Patacchini, R.; Quartara, L.; Ricci, R.; Tramontana, M.; Giuliani, S.; Maggi, C.A. Pharmacological profile of the novel mammalian tachykinin, hemokinin 1. *Br. J. Pharmacol.*, 2002, 135, 266.
187. Bellucci, F.; Camarda, V.; Rizzi, A.; Calo, G.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Regoli, D. Pharmacological profile of hemokinin 1: a novel member of the tachykinin family. *Life Sci.*, 2002, 71, 363.
188. Steinberg, R.; Marco, N.; Voutsinos, B.; Bensaid, M.; Rodier, D.; Souilhac, J.; Alonso, R.; Oury-Donat, F.; Le Fur, G.; Soubrie, P. Expression and presence of septal neurokinin-2 receptors controlling hippocampal acetylcholine release during sensory stimulation in rat. *Eur. J. Neurosci.*, 1998, 10, 2337.
189. Mastrangelo, D.; Mathison, R.; Huggel, H.J.; Dion, S.; D'Orleans-Juste, P.; Rhaleb, N.E.; Drapeau, G.; Rovero, P.; Regoli, D. *Eur. J. Pharmacol.*, 1986, 134, 321.
190. Barnes, P.J.; Belvisi, M.G.; Rogers, D.F. Modulation of neurogenic inflammation: novel approaches to inflammatory disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1990, 11, 185.
191. Croci, T.; Aureggi, G.; Manara, L.; Emonds-Alt, X.; Le Fur, G.; Maffrand, J.P.; Mukenge, S.; Ferla, G. In vitro characterization of tachykinin NK2-receptors modulating motor responses of human colonic muscle strips. *Br. J. Pharmacol.*, 1998, 124, 1321.
192. Patacchini, R.; Maggi, C.A. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 429, 13.
193. Tsuchida, K.; Shigemoto, R.; Yokota, Y.; Nakanishi, S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. *Eur. J. Biochem.*, 1990, 193, 751.
194. Grady, E.F.; Baluk, P.; Bohm, S.; Gamp, P.D.; Wong, H.; Payan, D.G.; Ansel, J.; Portbury, A.L.; Furness, J.B.; McDonald, D.M.; Bunnett, N.W. Characterization of antisera specific to NK-1R, NK2, and NK3 neurokinin receptors and their utilization to localize receptors in the rat gastrointestinal tract. *J. Neurosci.*, 1996, 16, 6975.
195. Stewart-Lee, A., and G. Burnstock. Actions of tachykinins on the rabbit mesenteric artery: substance P and [Glp6,L- Pro9]SP6-11 are potent agonists for endothelial neurokinin-1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 97: 1218-1224, 1989.
196. Patak, E.N.; Pennefather, J.N.; Story, M.E. Effects of tachykinins on uterine smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2000, 27, 922.
197. Kage R, Leeman SE, Boyd ND. Biochemical characterization of two different forms of the substance P receptor in rat submaxillary gland. *J Neurochem.* 1993 Jan;60(1):347-51.

198. Jian-Ping Lai*, Saien Lai*, Florin Tuluc*, Morris F. Tansky†, Laurie E. Kilpatrick*, Susan E. Leeman†, and Steven D. Douglas*‡. Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. PNAS _ August 26, 2008 _ vol. 105 _ no. 34 _ 12605–12610.
199. Fong TM, Anderson SA, Yu H, Huang RR, Strader CD. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. Mol Pharmacol. 1992 Jan;41(1):24-30.
200. Mochizuki-Oda N, Nakajima Y, Nakanishi S, Ito S. Characterization of the SP receptor-mediated Ca influx in cDNA transfected CHO cells. J Biol Chem 1994; 269:9651-9658.
201. Garcia M, Sakamoto K, Shigekawa M, Nakanishi S, Ito S. Multiple mechanisms of arachidonic acid release in chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of SP receptor. Biochem Pharmacol 1994; 48: 1735-1741.
202. Seabrook G R, Fong T M. Thapsigargin blocks the mobilization of intracellular Ca caused by activation of human NK 1 (long) receptors expressed in CHO cells. Neurosci Lett 1993; 152: 9- 12.
203. Takeda Y, Blount P, Sachais B S, Hershey A D, Raddatz R, Krause J E. Ligand binding kinetics of substance P and neurokinin A receptors stably expressed in CHO cells and evidence for differential stimulation of inositol 1, 4, 5- triphosphate and cAMP second messenger responses. J Neurochem 1992; 59: 740-745.
204. Mitsuhashi M, Ohashi Y, Shichijo S et al. Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide SP receptor. J Neurosci Res 1992; 32: 437-443.
205. Nakajima Y, Tsuchida K, Negishi M, Ito S, Nakanishi S. Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of both phosphatidylinositol hydrolysis and cAMP cascades in transfected chinese hamster ovary cells. J Biol Chem 1992; 267: 2437-2442.
206. S. A. Khedkar, A. K. Malde, and E. C. Coutinho Internet Electronic Journal of Molecular Design 2005, 4, 329–341.
207. E F Grady, A M Garland, P D Gamp, M Lovett, D G Payan, and N W Bunnett. Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK-1R receptor. Mol Biol Cell. 1995 May;6(5):509-24.
208. Cuello, A. C., and I. Kanazawa. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. J. Comp. Neurol. 178: 129-156, 1978.

209. Cuello, A. C., J. V. Priestley, and M. R. Matthews. Localization of substance P in neuronal pathways. In: Substance P in the Nervous System, edited by R. Porter and M. O'Connor. London: Pitman, 1982, p. 55-83. (Ciba Found. Symp. 91).
210. Inagaki, S., M. Sakanaka, S. Shiosaka, E. Senba, K. Takatsuki, H. Takagi, Y. Kawai, H. Minagawa, and M. Tohyama. Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. I. Forebrain and upper brain stem. *Neuroscience* 7: 251-277, 1982. 27-31, 1983.
211. Ljungdahl, A, T. Hokfelt, and G. Nilsson. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 3: 861-943, 1978.
212. Pedersen-Bjergaard, U., L. B. Nielsen, K. Jensen, L. Edvinsson, I. Jansen, and J. Olesen. Algesia and local responses induced by neurokinin A and substance P in human skin and temporal muscle. *Peptides* 10: 1147-1152, 1989.
213. Brownstein, M. J., E. A. Mroz, J. S. Kizer, M. Palkovits, and S. E. Leeman. Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res.* 116: 299-305, 1976.
214. Hendry, S. H. C., E. G. Jones, and N. Burstein. Activity dependent regulation of tachykinin-like immunoreactivity in neurons of monkey visual cortex. *J. Neurosci.* 8: 1225- 1238, 1988.
215. Mantyh, P. W., T. Gates, C. R. Mantyh, and J. E. Maggio. Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J. Neurosci.* 9: 258-279, 1989.
216. Beach, T. G., and E. G. McGeer. The distribution of substance P in the primate basal ganglia: an immunohistochemical study of baboon and human brain. *Neuroscience* 13: 29- 52, 1984.
217. Dam, T.-V., E. Escher, and R. Quirion. Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [3H]senktide. *Brain Res.* 506: 175-179, 1990.
218. Saffroy, M., J.-C. Beaujouan, Y. Torrens, J. Besseyre, L. Bergstrom, and J. Glowinski. Localization of tachykinin binding sites (NK₁, NK₂, NK₃ ligands) in the rat brain. *Peptides* 9: 227-241, 1988.
219. Haber, S. N., and W. J. H. Nauta. Ramifications of the globus pallidus in the rat as indicated by patterns of immunohistochemistry. *Neuroscience* 9: 245-260, 1983.
220. Haber, S. N., and S. J. Watson. The comparative distribution of enkephalin, dynorphin and substance P in the human globus pallidus and basal forebrain. *Neuroscience* 14: 1011-1024, 1985.

221. Douglas, F. L., M. Palkovits, and M. J. Brownstein. Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in lower brain stem of the rat. *Brain Res.* 245: 376-378, 1982.
222. Chen LW, Yung KK, Chan YS. Neurokinin peptides and neurokinin receptors as potential therapeutic intervention targets of basal ganglia in the prevention and treatment of Parkinson's disease. *Curr Drug Targets.* 2004 Feb;5(2):197-206.
223. Lévesque M, Wallman MJ, Parent R, Sík A, Parent A. Neurokinin-1 and neurokinin-3 receptors in primate substantia nigra. *Neurosci Res.* 2007 Mar;57(3):362-71.
224. Beal, M. F., and M. F. Mazurek. Substance P-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Neurology* 37: 1205-1209, 1987.
225. Cooper, P. E., M. H. Fernstrom, O. P. Rorstad, S. E. Leeman, and J. B. Martin. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res.* 218: 219-232, 1981.
226. Flood, J. F., M. L. Baker, E. N. Hernandez, and J. E. Morley. Modulation of memory retention by neuropeptide K. *Brain Res.* 520: 284-290, 1990.
227. Kanazawa, I., and T. Jessell. Post mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. *Brain Res.* 117: 362-367, 1976.
228. Massi, M., L. Gentili, M. Perfumi, G. De Caro, and J. Schulkin. Inhibition of salt appetite in the rat following injection of tachykinins into the medial amygdala. *Brain Res.* 513: 1-7, 1990.
229. Langevin, H., and P. C. Emson. Distribution of substance P, somatostatin and neurotensin in the human hypothalamus. *Brain Res.* 246: 65-69, 1982.
230. Sakanaka, M., S. Shiosaka, K. Takatsuki, S. Inagaki, H. Takagi, E. Senba, Y. Kawai, T. Matsuzaki, and M. Tohyama. Experimental immunohistochemical studies on the amygdalofugal peptidergic (substance P and somatostatin) fibers in the stria terminalis of the rat. *Brain Res.* 221: 231-242, 1981.
231. Tsuruo, Y., H. Kawano, T. Nishiyama, S. Hisano, and S. Daikoku. Substance P-like immunoreactive neurons in the tuberoinfundibular area of rat hypothalamus. Light and electron microscopy. *Brain Res.* 289: 1-9, 1983.
232. Hönkfelt, T., B. Pernow, G. Nilsson, L. Wetterberg, M. Goldstein, and S. L. Jeffcoate. Dense plexus of substance P immunoreactive nerve terminals in eminentia medialis of the primate hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1013-1015, 1978.

233. Rubin, B. S., and R. J. Barfield. Priming of estrous responsiveness by implants of 17 β -estradiol in the ventromedial hypothalamic nucleus of female rats. *Endocrinology* 106: 504-509, 1980.
234. Rubin, B. S., and R. J. Barfield. Progesterone in the ventromedial hypothalamus facilitates estrous behavior in ovariectomized, estrogen-primed rats. *Endocrinology* 113: 797- 804, 1983.
235. Hirai, T., and E. G. Jones. Distribution of tachykinin- and enkephalin-immunoreactive fibers in the human thalamus. *Brain Res. Rev.* 14: 35-52, 1989.
236. Burcher, E., and S. H. Buck. Multiple tachykinin binding sites in hamster, rat and guinea-pig urinary bladder. *Eur. J. Pharmacol.* 128: 165-177, 1986.
237. Cuello, A. C., M. del Fiacco, and G. Paxinos. The central and peripheral ends of the substance P-containing sensory neurones in the rat trigeminal system. *Brain Res.* 152: 499-509, 1978.
238. Rovero, P., V. Pestellini, C. A. Maggi, R. Patacchini, D. Regoli, and A.
239. Giachetti. A highly selective NK2 tachykinin receptor antagonist containing D-triptófano. *Eur. J. Pharmacol.* 175: 113-115, 1990.
240. Manaker, S., and G. Rizio. Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone and substance P receptors in the rat dorsal vagal complex. *J. Comp. Neural.* 290: 516- 526, 1989.
241. Katz, D. M., and H. J. Karten. Substance P in the vagal sensory ganglia: localization in cell bodies and pericellular arborizations. *J. Comp. Neural.* 193: 549-564, 1980.
242. De Groat, W. C., M. Kawatani, T. Hisamitsu, I. Lowe, C. Morgan, J. Roppolo, A. M. Booth, I. Nadelhaft, D. Kuo, and K. Thor. The role of neuropeptides in the sacral autonomic reflex pathways of the cat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 7: 339-350, 1983.
243. De Lanerolle, N. C., and C. C. Lamotte. The human spinal cord: substance P and methionine-enkephalin immunoreactivity. *J. Neurosci.* 2: 1369-1386, 1982.
244. Jessell, T., A. Tsijnoo, I. Kanazawa, and M. Otsuka. Substance P: depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. *Braia Rw.* 168: 247-259, 1979.
245. Krnjevi, K. Effects of substance P on central neurons in cats. In: *Substance P*, edited by U. S. Von Euler and B. Pernow. New York: Raven, 1977, p. 217-230.

246. Nilsson, J., A. M. VON Euler, and C.-J. Dalsgaard. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature Lond.* 315: 61-63,1985.
247. Perrone, M. H., R. D. Lepore, and W. Shain. Identification and characterization of substance P receptors on LRM55 glial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 389-395, 1986.
248. Bjorklund, A., T. Hgkfelt, and C. Owman (Editors). *Handbook of Chemical Neuroanatomy. The Peripheral Nervous System.* New York: Elsevier, 1988, vol. 6.
249. Miller, A., M. Costa, J. B. Furness, and I. W. Chubb. Substance P immunoreactive sensory nerves supply the rat iris and cornea. *Neurosci. Lett.* 23: 243-249, 1981.
250. Keen, P., A. B. Tullo, W. A. Blyth, and T. J. Hill. Substance P in the mouse cornea: effects of chemical and surgical denervation. *Neurosci. Lett.* 29: 231-235, 1982.
251. Zalutsky, R. A., and R. F. Miller. The physiology of substance P in the rabbit retina. *J. Neurosci.* 10: 394-402, 1990.
252. Brodin, E., B. Gazelius, L. Olgart, and G. Nilsson. Tissue concentration and release of substance P-like immunoreactivity in the dental pulp. *Acta Physiol. Stand.* 111: 141- 149.
253. Gibbins, I. L., and J. L. Morris. Co-existence of neuropeptides in sympathetic, cranial autonomic and sensory neurons innervating the iris of the guinea-pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* 21: 67-82,1987.
254. Lundberg, J. M., T. Hokfelt, A. Anggard, B. Pernow, and P. Emson. Immunohistochemical evidence for substance P immunoreactive nerve fibres in the taste buds of the cat. *Acta Physiol. Stand.* 107: 389-391, 1979.
255. Duner-Engström, M., B. B. Fredholm, O. Larsson, J. M. Lundberg, and A. Saria. Autonomic mechanisms underlying capsaicin induced oral sensations and salivation in man. *J. Physiol. Lond.* 373: 87-96, 1986.
256. López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Andujar-Mateos P, Sánchez-Siles M, Gómez-García F. Burning mouth syndrome: An update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Dec 29.
257. Vučićević-Boras V, Savage NW, Brailo V, Lukac J, Lukac M, Alajbeg IZ. Salivary and serum levels of substance p, neurokinin A and calcitonin gene related peptide in burning mouth syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Dec 29.
258. Iwabuchi, Y., C. Aoki, and T. Masuhara. Effects of tachykinins on the secretion of fluid and glycoproteins from the submandibular glands of rat, mouse, hamster and guinea pig. *Jpn. J. Pharmacol.* 51: 428-431, 1989.

259. Lundberg, J. M., C.-R. Martling, and T. Hokfelt. Airways, oral cavity and salivary glands: classical transmitters and peptides in sensory and autonomic motor neurons. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy. The Peripheral Nervous System, edited by A. Bjorklund, T. Hokfelt, and C. Owman. New York: Elsevier, 1988, vol. 6, p. 391-444.
260. Lundblad, L., E. Brodin, J. M. Lundberg, and A. Anggard. Effects of nasal capsaicin pretreatment and cryosurgery on sneezing reflexes, neurogenic plasma extravasation, sensory and sympathetic neurons. *Acta Oto-laryngol.* 100: 117- 127,1985.
261. Manzini, S., S. Conti, C. A. Maggi, L. Abelli, V. Somma, E. del Bianco, and P. Geppetti. Regional differences in the motor and inflammatory responses to capsaicin in guinea pig airways. Correlation with content and release of substance P-like immunoreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140: 936-941, 1989.
262. Lima-Rodrigues M, Nunes R, Almeida A. Intraepithelial nerve fibers project into the lumen of the larynx. *Laryngoscope.* 2004 Jun;114(6):1074-7.
263. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 219-63.
264. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 173-217.
265. Furness JB, Costa M. The Enteric Nervous System. New York: Churchill Livingstone, 1987.
266. Sharkey, K. A., R. G. Williams, and G. J. Dockray. Sensory substance P innervation of the stomach and pancreas. Demonstration of capsaicin-sensitive sensory neurons in the rat by combined immunohistochemistry and retrograde tracing. *Gastroenterology* 87: 914-921, 1984.
267. SU, H. C., A. E. Bishop, R. F. Power, Y. Hamada, and J. M. Polak. Dual intrinsic and extrinsic origins of CGRP- and NPY-immunoreactive nerves of rat gut and pancreas. *J. Neurosci.* 7: 2674-2687, 1987.
268. Bucsics, A., P. Holzer, and F. Lembeck. The substance P content of peripheral tissues in several mammals. *Peptides* 4: 451-455, 1983.
269. Cai, W., J. GU, W. Huang, G. P. McGregor, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, and J. M. Polak. Peptide immunoreactive nerves and cells of the guinea pig gall bladder and biliary pathways. *Gut* 24: 1186-1193,1983.

270. Nilsson, G., K. Dahlberg, E. Brodin, F. Sundler, and K. Strandberg. Distribution and constrictor effect of substance P in guinea pig tracheobronchial tissue. In: Substance P, edited by U. S. Von Euler and B. Pernow. New York: Raven, 1977, p. 75-81.
271. Lundberg, J. M., E. Brodin, and A. Saria. Effects and distribution of vagal capsaicin-sensitive substance P neurons with special reference to the trachea and lungs. *Acta Physiol. Scand.* 119: 243-252, 1983.
272. Martling, C.-R., E. Theodorsson-Norheim, and J. M. Lundberg. Occurrence and effects of multiple tachykinins: substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Life Sci.* 40: 1633-1643, 1987.
273. Hunter, J. C., G. J. Kilpatrick, and J. R. Brown. Pharmacological analysis of 125I Bolton and Hunter labelled eleoisin binding sites in rat spinal cord by quantitative autoradiography. *Neurosci. Lett.* 78: 12-16, 1987.
274. Saria, A., C.-R. Martling, C.-J. Dalsgaard, and J. M. Lundberg. Evidence for substance P-immunoreactive spinal afferents that mediate bronchoconstriction. *Acta Physiol. Scand.* 125: 407-414, 1985.
275. Hoover DB, Hancock JC. Distribution of substance P binding sites in guinea-pig heart and pharmacological effects of substance P. *J Auton Nerv Syst.* 1988 Sep;23(3):189-97.
276. Papka, R. E., J. B. Furness, N. G. Della, and M. Costa. Depletion by capsaicin of substance P-immunoreactivity and Acetylcholinesterase activity from nerve fibres in the guinea pig heart. *Neurosci. Lett.* 27: 47-53, 1981.
277. Liu-Chen, L.-Y., T. M. Liszczak, J. C. King, and M. A. Moskowitz. Immunoelectron microscopic study of substance P-containing fibers in feline cerebral arteries. *Brain Res.* 369: 12-20, 1986.
278. Lundberg, J. M., A. Franco-Cereceda, X. Hua, T. Hokfelt, and J. A. Fischer. Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.* 108: 315-319, 1985.
279. Furness JB, Costa M, Papka RE, Della NG, Murphy R. Neuropeptides contained in peripheral cardiovascular nerves. *Clin Exp Hypertens A.* 1984;6(1-2):91-106.
280. Prabhakar, N. R., S. C. Landis, G. K. Kumar, D. Mullikin- Kilpatrick, N. S. Cherniack, and S. Leeman. Substance P and neurokinin A in the cat carotid body: localization, exogenous effects and changes in content in response to arterial PO₂. *Brain Res.* 481: 205-214, 1989.

281. Scheibner, T., D. J. C. Read, and C. E. Sullivan. Distribution of substance P-immunoreactive structures in the developing cat carotid body. *Brain Res.* 453: 72-78, 1988.
282. Huang, W. M., J. GU, M. A. Blank, J. M. Allen, S. R. ters: frequency dependence of the efflux of substance P, thyro- tropin releasing hormone and [3H]serotonin from tissue slices of the mammalian female tract. *Histochem. J.* 16: 129'7-1310, 1984
283. Stjernquist, M., R. Hakanson, S. Leander, C. Owman, F. Sundler, and R.Uddman. Immunohistochemical localization of substance P, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin-releasing peptide in vas deferens and seminal vesicle, and the effect of these and eight other neuropeptides on resting tension and neurally evoked contractile activity. *Regul. Pept.* 7: 67-86,1983.
284. Alm, P., J. Alumets, E. Brodin, R. Hakanson, G. Nilsson, N.-O. Sjaberg, and F. Sundler. Peptidergic (substance P) nerves in the genito-urinary tract. *Neuroscience* 3: 419- 425, 1978.
285. Wallengren, J., and R. Hakanson. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 143: 267-273, 1987.
286. Franco-Cereceda, A., H. Henke, J. M. Lundberg, J. B. Petermann, T. Hokfelt, and J. A. Fischer. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: distribution and release by capsaicin. *Peptides* 8: 399-410, 1987.
287. Traurig, H., A. Saria, and F. Lembeck. The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 327: 254-259, 1984.
288. Traurig, H., R. E. Papka, A. Saria, and F. Lembeck. Substance P immunoreactivity in the rat mammary nipple and the effects of capsaicin treatment on lactation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 328: 1-8, 1984.
289. Traurig, H., A. Saria, and F. Lembeck. Substance P in primary afferent neurons of the female rat reproductive system. *Naunyn-Schmiedeberg 's Arch. Pharmacol.* 326: 343-346, 1984.
290. Ferguson, M., and C. Bell. Ultrastructural localization and characterization of sensory nerves in the rat kidney. *J. Comp. Neurol.* 274: 9-16, 1988.

291. Gibbins, I. L., J. B. Furness, M. Costa, I. Macintyre, C. J. Hillyard, and S. Girgis. Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs. *Neurosci. Lett.* 57: 125- 130, 1985.
292. Brownbill P, Bell NJ, Woods RJ, Lowry PJ, Page NM, Sibley CP. Neurokinin B is a paracrine vasodilator in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2164e70.
293. Gallicchio M, Rosa AC, Benetti E, Collino M, Dianzani C, Fantozzi R. Substance P-induced cyclooxygenase-2 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2006;147:681e9.
294. Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J, Burnstock G. Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci* 1990;241:245e8.
295. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and Neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 1997;159:5654e60.
296. Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol* 1998;86:80e6.
297. Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. Tachykinin (Substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology* 1991;128:2441e8.
298. Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R. Antitumoral action of the Neurokinin-1 receptor antagonist L-733 60 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 2004a;14:183e8.
299. Nilsson J, Von Euler AM, Dalsgaard CJ. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 1985;315:61e3.
300. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Gepetti P, Alessandri G, Maggi CA. Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res* 1990;40:264e78.
301. Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, ET AL. Excessive placental secretion of Neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 2000;405:797e800.

302. Arck PC, Merali FS, Stanisz AM, Stead RH, Chaouat G, Manuel J, et al. Stress-induced murine abortion associated with substance P-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua. *Biol Reprod* 1995;53:814-9.
303. Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, Klapp BF, Arck PC. Murine stress triggered abortion is mediated by increase of CD8 β TNF- α β decidual cells via substance P. *Am J Reprod Immunol* 2001;45:303-9.
304. M. Muñoz , A. Pavón, M. Rosso , M.V. Salinas , A. Pérez , A. Carranza , A. González-Ortega. Immunolocalization of NK-1R Receptor and Substance P in Human Normal Placenta. *Placenta* 2010;(13):647-651.
305. Miguel Muñoz, Andres Carranza, Antonio Pavon, George Anderson, Rafael Coveñas. Immunolocalization of Substance P and NK-1R Receptor in Hofbauer Cells in Human Normal Placenta. *Microscopy Research and Technique* 2013;Dec;76(12):13010-3.
306. Seval Y, Korgun ET, Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2007; 28:841-845.
307. Khan S, Katabuchi H, Araki M, Nishimura R, Okamura H. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. *Biol Reprod* 2000; 62:1075-1083.
308. Cayli S, Demirturk F, Ocakli S, Aytan H, Caliskan AC, Cimsir H. Altered expression of COP9 signalosome proteins in preeclampsia. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28:488-491.
309. Holwerda KM, Boss EM, Rajakumar A, Ris-Stalpers C, Van Pampus MG, Timmer A, Erwich JJ, Faas MM, Van Goor H, Lely AT. Hydrogen sulfide producing enzymes in pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 2012;33:518-521.
310. Tang Z, Abrahams VM, Mor G, Guller S. Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. *Ann NY Acad Sci* 2011;122:103-108.
311. Linnoila, R. I., R. P. DiAugustine, A. Hervonen, and R. J. Miller. Distribution of [Met⁵]- and [Leu⁵]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience* 5: 2247- 2259, 1980.
312. Bucsics, A., A. Saria, and F. Lembeck. Substance P in the adrenal gland: origin and species distribution. *Neuropeptides* 1: 329-341, 1981.
313. Bjurholm, A., A. Kricbergs, E. Brodin, and M. Schultzberg. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 9: 165-171, 1988.

314. Gundersen, K., O. Oktedalen, and F. Fonnum. Substance P in subdivisions of the sciatic nerve, and in red and white skeletal muscles. *Brain Res.* 329: 97-103, 1985.
315. Hill, E. L., and R. Elde. Distribution of CGRP-, VIP-, DPH-, SP-, and NPY-immunoreactive nerves in the periosteum of the rat. *CeZZ Tissue Rex* 264: 469-480, 1991.
316. Ohlen, A., L. Lindbom, w. Staines, T. Hokfelt, A. c. Cuello, J. A. Fischer, and P. Hedqvist. Substance P and calcitonin gene-related peptide: immunohistochemical localisation and microvascular effects in rabbit skeletal muscle. *Naunyn-Schmiedeberg 's Arch. Pharmacol.* 336: 87-93,1987.
317. Dalsgaard, C.-J., C.-E. Jonsson, T. Hijfelt, and A. C. Cuello. Localization of substance P-immunoreactive nerve fibers in the human digital skin. *Experientia Base1* 39: 1018- 1020, 1983.
318. Björklund, H., C.-J. Dalsgaard, C.-E. Jonsson, and A. Hermansson. Sensory and autonomic innervation of nonhairy and hairy human skin. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 243: 51-57, 1986.
319. Foreman, J. C. Neuropeptides and the pathogenesis of allergy. *Allergy* 42: 1-11, 1987.
320. Fernandes ES, Schmidhuber SM, Brain SD. Sensory-nerve-derived neuropeptides: possible therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(194):393-416.
321. Lundy FT, Linden GJ. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral and periodontal inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jan 1;15(2):82-98.
322. Brain SD, Cox HM. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S202-11.
323. Lewis, T. *The Blood Vessels of the Human Skin and their Responses.* London: Shaw, 1927, p. 47.
324. Holzer, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin generelated peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24: 739- 768, 1988.
325. Payan, D. G. Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. *Annu. Rev. Med.* 40: 341-352,1989.
326. Foreman, J. C. Peptides and neurogenic inflammation. *Br. Med. Bull.* 43: 386-400, 1987.

327. Nagahisa A, Kanai Y, Suga O, Taniguchi K, Tsuchiya M, Lowe JA 3rd, Hess HJ. Antiinflammatory and analgesic activity of a non-peptide substance P receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1992 Jul 7;217(2-3):191-5.
328. Lembeck, F. Sir Thomas Lewis's nocifensor system, histamine and substance-P-containing primary afferent nerves. *Trends Neurosci.* 6: 106-108, 1983.
329. Roch-Arveiller M, Regoli D, Chanaud B, Lenoir M, Muntaner O, Stralzko S, Giroud JP. Tachykinins: effects on motility and metabolism of rat polymorphonuclear leucocytes. *Pharmacology.* 1986;33(5):266-73.
330. Assem ES, Ghanem NS, Abdullah NA, Repke H, Foreman JC, Hayes NA. Substance P and Arg-Pro-Lys-Pro-NH-C12-H25-induced mediator release from different mast cell subtypes of rat and guinea-pig. *Immunopharmacology.* 1989 Mar-Apr;17(2):119-28.
331. Hartung, H.-P., and K. V. Toyka. Substance P, the immune system and inflammation. *Int. Rev. Immunol.* 4: 229-249, 1989.
332. Zhang Y, Berger A, Milne CD, Paige CJ. Tachykinins in the immune system. *Curr Drug Targets.* 2006 Aug;7(8):1011-20.
333. Santoni G, Perfumi MC, Spreghini E, Romagnoli S, Piccoli M. Neurokinin type-1 receptor antagonist inhibits enhancement of T cell functions by substance P in normal and neuromanipulated capsaicin-treated rats. *J Neuroimmunol.* 1999 Jan 1;93(1-2):15-25.
334. Shen, X. Z., & Bernstein, K. E. (2011). The peptide network regulated by angiotensin converting enzyme (ACE) in hematopoiesis. *Cell Cycle*, 10(9), 1363-1369.
335. Schäffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? *Arch Surg.* 1998 Oct;133(10):1107-16.
336. Seegers HC, Hood VC, Kidd BL, Cruwys SC, Walsh DA. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jul;306(1):8-12. Epub 2003 Mar 26.
337. Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol.* 2001 Dec;60(6):404-15.
338. Pearson, J., L. Brandeis, and A. C. Cuello. Depletion of substance P-containing axons in substantia gelatinosa of patients with diminished pain sensitivity. *Nature Lond.* 295: 61-63, 1982.

339. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK-1R receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides*. 1997 Dec;31(6):537-63. Review.
340. Folkers K, Hakanson R, Horig J, Jie-Cheng X, Leander S. Biological evaluation of substance P antagonists. *Br J Pharmacol* 1984; 83: 449-456.
341. Folkers K, Feng D, Asano N, Hakanson R, Weisenfeld-Hallin Z, Leander S. Spantide II, an effective tachykinin antagonist having high potency and negligible neurotoxicity. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1990; 87: 4833-4835.
342. Maggi C A, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A. Tachykinin receptors and receptor antagonists. *J Auton Pharmacol* 1993; 13: 958-962.
343. Seabrook GR, Shepherd SL, Williamson DJ, Tyrer P, Rigby M, Cascieri MA, Harrison T, Hargreaves RJ, Hill RG. L-733,060, a novel tachykinin NK-1R receptor antagonist; effects in [Ca²⁺]_i mobilisation, cardiovascular and dural extravasation assays. *Eur J Pharmacol*. 1996 Dec 12;317(1):129-35.
344. Harrison T, Williams B J, Swain C J and Ball R G, Piperidineether based hNK, antagonists 1: determination of the relative and absolute stereochemical requirements. *Biomed Chem Lett* 1994; 4(21): 2545-2550.
345. MacLeod A M, Merchant K J, Cascieri M A et al. N-acyl-Ltriptófano benzil esters: potent substance P receptor antagonists. *J Med Chem* 1993; 36(14): 2044-2045.
346. Ficha farmacológica APREPITANT . Disponible en: <http://www.merck.com> Consultado el Abril, 2, 2010.
347. Curran MP, Robinson DM. Aprepitant: a review of its use in the prevention of nausea and vomiting. *Drugs*. 2009;69(13):1853-78.
348. DeVane CL. Substance P: a new era, a new role. *Pharmacotherapy*. 2001 Sep;21(9):1061-9.
349. Madaan V, Wilson DR. Neuropeptides: relevance in treatment of depression and anxiety disorders. *Drug News Perspect*. 2009 Jul-Aug;22(6):319-24.
350. Ebner K, Sartori SB, Singewald N. Tachykinin receptors as therapeutic targets in stress-related disorders. *Curr Pharm Des*. 2009;15(14):1647-74
351. Chahl LA. Tachykinins and neuropsychiatric disorders. *Curr Drug Targets*. 2006 Aug;7(8):993-1003.

352. Blier P, Gobbi G, Haddjeri N, Santarelli L, Mathew G, Hen R. Impact of substance P receptor antagonism on the serotonin and norepinephrine systems: relevance to the antidepressant/anxiolytic response. *J Psychiatry Neurosci*. 2004 May;29(3):208-18.
353. Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snavely D, Wyatt-Knowles E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swain CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti F, Scolnick EM, Cascieri MA, Chicchi GG, Sadowski S, Williams AR, Hewson L, Smith D, Carlson EJ, Hargreaves RJ, Rupniak NM: Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281:1640–1645, 1998.
354. Jessell TM. The role of substance P in sensory transmission and pain perception. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1981;28:189-98.
355. Levy MJ, Classey JD, Maneesri S, Meeran K, Powell M, Goadsby PJ. The association between calcitonin gene-related peptide (CGRP), substance P and headache in pituitary tumours. *Pituitary*. 2004;7(2):67-71.
356. Shimoyama M, Tatsuoka H, Ohtori S, Tanaka K, Shimoyama N. Change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic cancer pain. *Pain*. 2005 Mar;114(1-2):221-30. Epub 2005 Jan 26.
357. Scardina GA, Augello L, Messina P. The role of neuromodulators (substance P and calcitonin gene-related peptide) in the development of neurogenic inflammation in the oral mucosa. *Minerva Stomatol*. 2004 Jan-Feb;53(1-2):21-32.
358. Deal CL, Schnitzer TJ, Lipstein E, Seibold JR, Stevens RM, Levy MD, Albert D, Renold F. Treatment of arthritis with topical capsaicin: a double-blind trial. *Clin Ther*. 1991 May-Jun;13(3):383-95.
359. Partsch G, Matucci-Cerinic M, Marabini S et al Collagenase síntesis of rheumatoid arthritis synoviocytes: dose-dependent stimulation by substance p and capsaicin. *Scand J Rheumatol*. 1991; 20(2):98-103.
360. Munoz M, Perez A, Covenas R, Rosso M, Castro E. Antitumoral action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Ital Biol*. 2004 Mar;142(2):105-12.
361. Sendo T, Itoh Y, Goromaru T, Hirakawa T, Ishida M, Nakano H, Oishi R. Role of substance P in hypersensitivity reactions induced by paclitaxel, an anticancer agent. *Breast Cancer Res Treat*. 2003 Jul;80(1):63-70.
362. Viale PH. Integrating Aprepitant and palonosetron into clinical practice: a role for the new antiemetics. *Clin J Oncol Nurs*. 2005 Feb;9(1):77-84.

363. Navari RM. Role of neurokinin-1 receptor antagonists in chemotherapy-induced emesis: summary of clinical trials. *Cancer Invest.* 2004;22(4):569-76.
364. Navari RM, Reinhardt RR, Gralla RJ, Hesketh P, Khojasteh A, Kindler H et al. Reduction of cisplatin-induced emesis by a selective neurokinin-1-receptor antagonist. *N Engl J Med* 1999; 340: 190-195.
365. Dando TM, Perry CM. Aprepitant: A review of its use in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Drugs* 2004; 64: 777-794.
366. Bergstrom M, Hargreaves RJ, Burns HD, Goldberg MR, Sciberras D, Reines SA, Petty KJ, Ogren M, Antoni G, Langstrom B, Eskola O, Scheinin M, Solin O, Majumdar AK, Constanzer ML, Battisti WP, Bradstreet TE, Gargano C, Hietala J. Human positron emission tomography studies of brain neurokinin 1 receptor occupancy by aprepitant. *Biol Psychiatry.* 2004 May 15;55(10):1007-12.
367. Ruhlmann CH, Herrstedt J. Safety evaluation of aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Expert Opin Drug Saf* 011;10:449-62
368. Madsen JL, Fuglsang S. A randomized, placebo-controlled, crossover, double-blind trial of the NK-1R receptor antagonist aprepitant on gastrointestinal motor function in healthy humans.
369. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:609-15 de Jonge ME, Huitema AD, Holtkamp MJ, et al. Aprepitant inhibits cyclophosphamide bioactivation and thiotepa metabolism. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56:370-8
370. Blum RA, Majumdar A, McCrea J, et al. Effects of aprepitant on the pharmacokinetics of ondansetron and granisetron in healthy subjects. *Clin Ther* 2003;25:1407-19
371. Loos WJ, de Wit WR, Freedman SJ, et al. Aprepitant when added to a standard antiemetic regimen consisting of ondansetron and dexamethasone does not affect vinorelbine pharmacokinetics in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59:407-12
372. Zhang D, Mita M, Shapiro GI, et al. Effect of aprepitant on the pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib in patients with advanced malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;70:891-8
373. Bubalo JS, Cherala G, McCune JS, et al. Aprepitant pharmacokinetics and assessing the impact of aprepitant on cyclophosphamide metabolism in cancer patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Pharmacol* 2012;52:586-94

374. Gore L, Chawla S, Petrilli A, et al. Aprepitant in adolescent patients for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and tolerability. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52:242-7
375. Bergman AJ, Marbury T, Fosbinder T, et al. Effect of impaired renal function and haemodialysis on the pharmacokinetics of aprepitant. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:637-47
376. Grunberg S, Chua D, Maru A, et al. Single-dose fosaprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting associated with cisplatin therapy: randomized, double-blind study protocol-EASE. *J Clin Oncol* 2011;29:1495-501
377. Rolland 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* 13: 175–185, 1989.
378. Muñoz M, Coveñas R : Safety of neurokinin-1 receptor antagonist. *Expert Opin. Drug Saf. Informa Healthcare*. 12(5).10.1517/14740338, 2013.
379. 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* 56:4983–4991, 1996.
380. González-Ortega A, Sánchez-Vaderrábanosa E, Ramiro-Fuentes S, Salinas-Martín V, Carranzac A, Coveñas R, Muñoz M: Uveal melanoma expresses NK-1 receptors and cyclosporin A induces apoptosis in human melanoma cell lines overexpressing the NK-1 receptor. *Peptides* 55,1-12, 2014.
381. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, Lieb K, Korc M, Palma C, Zimmermann A, Reubi JC, Buchler MW: Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 83:731–742, 2003.
382. Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA: Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cells line bearing tachykinin NK-1R receptors. *Br J Cancer* 79:236–243, 1999.
383. Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascon P, Maloof PB, Mosenthal A, Rameshwar P: Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 388–393, 2000.

384. Sitohy B, El Saly M: Changes in the colonic enteric nervous system in rats with chemically induced colon dysplasia and carcinoma. *Acta Oncol* 41:543–549, 2002.
385. Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarriego C, Piruat JI: The NK-1R receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on neuroblastoma and glioma cell lines. *Neuropeptides* 39(4): 427–32, 2005a.
386. Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarriego C, Sault JA, Montero I. Antitumoural 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* 46:2567–2570, 2005b.
387. Fowler CJ, Brannstrom G: Substance P enhances forskolin-stimulated cyclic AMP production in human UC11MG astrocytoma cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 16:21–28, 1994.
388. Lee CM, Kum W, Cockram CS, Teoh R, Young JD: Functional substance P receptors on a human astrocytoma cell line (U-373 MG). *Brain Res* 488:328–331, 1989.
389. Eistetter HR, Mills A, Brewster R, Alouani S, Rambosson C, Kawashima E: Functional characterization of neurokinin-1 receptors on human U373MG astrocytoma cells. *Glia* 6:89–95, 1992.
390. Muñoz M, Rosso M, Sault JA, Coveñas R (2006) Antitumoural action of neurokinin-1 receptor antagonists on human brain cancer cell lines. In: Yang AV (ed) *Brain cancer: therapy and surgical intervention*. New York: Nova Science, pp 45–75.
391. 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* 112:231–238, 2004.
392. 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* 52:4554–4557, 1992.
393. Reeve JG, Bleehen NM: Substance P induces apoptosis in lung cancer cell lines in vitro. *Biochem Bioph Res Com* 199:1313–1319, 1994.
394. Seckl MJ, Higgins T, Wildmer F, Rozengurt E: Substance P: a novel potent inhibitor of signal transduction and growth in vitro and in vivo in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 57:51–54, 1997.

395. Palma C, Bigioni M, Irrissuto C, Nardelli F, Maggi CA, Manzini S: Anti-tumour activity of tachykinin NK-1R receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer* 82:480–487, 2000.
396. Woll PJ, Rozengurt E. Substance P, 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* 35:1859–1863, 1998.
397. Bigioni M, Benzo A, Irrissuto C, Maggi CA, Goso C. Role of NK-1R and NK2 tachykinin receptor antagonism on the growth of human breast carcinoma cell line MDA-MB-231. *Anticancer Drugs*. 2005 Nov;16(10):1083-9.
398. Flageole H, Senterman M, Trudel JL. Substance P increases in vitro lymphokine-activated-killer (LAK) cell cytotoxicity against fresh colorectal cancer cells. *J Surg Res*. 1992 Nov;53(5):445-9.
399. Alcaide J, Funez R, Rueda A, Perez-Ruiz E, Pereda T. The role and prognostic value of apoptosis in colorectal carcinoma. *BMC clinical pathology* 2013, 13:24
400. Muñoz M, Berger M, Rosso M, Gonzalez-Ortega A, Carranza A. Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonist in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *International Journal of oncology*. 2014, 44:137-146.
401. Kast RE1, Boockvar JA, Brüning A, Cappello F, Chang WW, Cvek B, Dou QP, Duenas-Gonzalez A, Efferth T, Focosi D, Ghaffari SH, Karpel-Massler G, Ketola K, Khoshnevisan A, Keizman D, Magné N, Marosi C, McDonald K, Muñoz M, Paranjpe A, Pourgholami MH, Sardi I, Sella A, Srivenugopal KS, Tuccori M, Wang W, Wirtz CR, Halatsch ME. A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care. *Oncotarget*. 2013 Apr;4(4):502-30.
402. Drell TL 4th, Joseph J, Lang K, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Br J Cancer*. 2003 Jun 2;88(11):1808-16.
403. Guha S, Eibl G, Kisfalvi K, Fan RS, Burdick M, Reber H, Hines OJ, Strieter R, Rozengurt E. Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2005 Apr 1;65(7):2738-45.

404. Muñoz M, Gonzalez-Ortega A, Coveñas R. The NK-1R receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant an other NK-1R receptor antagonist on acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Invest New Drugs*. 2012;30:529-540.
405. Nowicki M, Miskowiak B. Substance P--a potent risk factor in childhood lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2003 Jun;17(6):1096-9.
406. Muñoz M, Gonzalez-Ortega A, Coveñas R. A therapeutic Target in leukemia: the NK-1R receptor. *Acute Lymphoblastic Leukemia*. 2011. ISBN 978-161470-872-8.
407. Palma C, Maggi CA. The role of tachykinins via NK-1R receptors in progression of human gliomas. *Life Sci*. 2000;67(9):985-1001. Review.
408. Al-Sarraj A, Thiel G. Substance P induced biosynthesis of the zinc finger transcription factor Egr-1 in human glioma cells requires activation of the epidermal growth factor receptor and of extracellular signal-regulated protein kinase. *Neurosci Lett*. 2002 Oct 31;332(2):111-4.
409. Berger A, Paige CJ. Hemokinin-1 has Substance P-like function in U-251 MG astrocytoma cells: a pharmacological and functional study. *J Neuroimmunol*. 2005 Jul;164(1-2):48-56.
410. Kast R, Boockvar J, Bruning A. A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: Coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care. *Oncotarget*. 2013.
411. Muñoz M, González-Ortega A, Rosso M. The substance P/NK-1R receptor system in lung cancer: Focus on the tumor action of neurokinin-1 receptor antagonist. *Peptides*. 2012 Sep. 38, 318-325.
412. MacKinnon AC, Armstrong RA, Waters CM, Cummings J, Smyth JF, Haslett C, Sethi T. [D-Arg6,D-Trp7,9,NmePhe8]-substance P (6-11) activates JNK and induces apoptosis in small cell lung cancer cells via an oxidant-dependent mechanism. *British Journal of Cancer* (1999) 80, 1026-1034.
413. MacKinnon AC, Waters C, Rahman I, Harani N, Rintoul R, Haslett C, Sethi T. [Arg(6), D-Trp(7,9), N(me)Phe(8)]-substance P (6-11) (antagonist G) induces AP-1 transcription and sensitizes cells to chemotherapy. *Br J Cancer*. 2000 Oct;83(7):941-8.
414. Waters CM, MacKinnon AC, Cummings J, Tufail-Hanif U, Jodrell D, Haslett C, Sethi T. Increased gastrin-releasing peptide (GRP) receptor expression in tumour cells confers

- sensitivity to [Arg6,D-Trp7,9,NmePhe8]-substance P (6-11)-induced growth inhibition. *Br J Cancer*. 2003 Jun 2;88(11):1808-16.
415. MacKinnon AC, Tufail-Hanif U, Lucas CD, Jodrell D, Haslett C, Sethi T. Expression of V1A and GRP receptors leads to cellular transformation and increased sensitivity to substance-P analogue-induced growth inhibition. *Br J Cancer*. 2005 Feb 14;92(3):522-31.
416. Hepler JR, Gilman AC: G proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 383–387, 1992.
417. Clapham D, Neer EJ: New roles: G protein $\beta \gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365: 406, 1993.
418. Muñoz, M., Rosso, M., Coveñas, R. *Neuropeptides Research Trends*. Levine, B.A. (ed.), Nova Science Publishers, New York, pp. 97-119, 2007.
419. Glanz H. Carcinoma of the larynx. Growth, p-classification and grading of squamous cell carcinoma of the vocal cords. *Adv Oto-Rhino-Laryngol* 1984;32:1-123.
420. Berger M, Neth O, Ilmer M, Garnier A. Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *Journal of hepatology*. 2014. Vol60. 985-994.
421. Esteban F, Gonzalez-Moles MA, Castro D, Martin-Jaen Mdel M, Redondo M, Ruiz-Avila I, Muñoz M. Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*. 2009 Jan;54(2):258- 60.
422. Rosso M, Robles-Frías MJ, Coveñas R, Salinas-Martín MV, Muñoz M. The NK-1R receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol*. 2008;29(4):245-54.
423. Friess H., Zhu Z., Liard V., Shi X., Shrikhande S.V., Wang L., Lieb K., Korc M., Palma C., Zimmermann A., Reubi J.C. and Buchler M.W. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. (2003). *Lab. Invest.* 83, 731-742
424. Muñoz M., Rosso M. and Coveñas R. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1R receptor antagonists. (2010). *Curr. Med. Chem.*17, 504-516
425. Muñoz M., Rosso M. and Coveñas R. The NK-1R receptor: a new target in cancer therapy. (2011). *Curr. Drug Targets* 12, 909-921

426. Muñoz M., González-Ortega A. and Coveñas R. The NK-1R receptor is expressed in human leukemia and is involved in the antitumor action of aprepitant and other NK-1R receptor antagonists on acute lymphoblastic leukemia cell lines. (2012a). *Invest. New Drugs* 30, 529-540
427. Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, Melotto S, Corsi M, Carletti R (2003) Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci* 17:1736–1746.
428. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1R receptor in human pathology. 2014. *Amino Acids*. DOI. 10.1007/s00726-014-1736-9.
429. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SA, Brown RW, Chamness GC, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 93;85:200-6.
430. Kim KW, Park YJ, Kim EH, et al. Elevated risk of papillary thyroid cancer in Korean patients with Hashimoto's thyroiditis. *Head Neck*. May 2011;33(5):691-5.
431. Muñoz M, Coveñas R, Esteban F and Redondo M (2015) The substance P/NK-1R receptor system: NK-1R receptor antagonists as anti-cancer drugs. *J. Biosci.* 40 441–463]
432. DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Dery O, Bunnett NW: The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(20):11086–11091, 2000.
433. Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ: Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390: 88–91, 1997.
434. Van Biesen T, Hawes BE, Raymond JR, Luttrell LM, Koch WJ, Lefkowitz RJ: G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* 271(3):1266–1269, 1996.
435. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ : Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283: 655–661, 1999.
436. Ignatova EG, Belcheva MM, Bohn LM, Neuman MC, Coscia CJ: Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence. *J Neurosci* 19: 56–63, 1999.

437. Vögler O, Nolte B, Voss M, Schmidt M, Jakobs KH, van Koppen CJ: Regulation of muscarinic Acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin. *J Biol Chem* 274: 12333–12338, 1999.
438. Koon HW, Zhao D, Na X, Moyer MP, Pothoulakis C: Metalloproteinases and Transforming Growth Factor- α Mediate Substance P-induced Mitogen-activated Protein Kinase Activation and Proliferation in Human Colonocytes. *J Biol Chem* 279: 45519–45527, 2004.
439. Parma J, Duprey L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mochel J, Dumont J, Vassart G: Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 365: 649–651, 1993.
440. Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A: Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16 7032–7044, 1997.
441. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ: Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol* 131:1613–1615, 1983.
442. Lotz M, Carson DA, Vaughan JH: Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 235:893–895, 1987.
443. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA: NK-1R-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol* 100:11–14, 1990.
444. Globus M, Smith MJ, Vethamany-Globus S: Evidence supporting a mitogenic role for substance P in amphibian limb regeneration. *Ann NY Acad Sci* 632:396–399, 1991.
445. Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ: Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315:61–63, 1985.
446. Brener S, González-Moles MA, Tostes D, Esteban F, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, Bravo M, Muñoz M. A role for the substance P/NK-1R receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009 Jun;29(6):2323-9.
447. Esteban F, Munoz M, Gonzalez-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Mar;25(1):137-45.
448. Bringold F, Serrano M: Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35: 317–329, 2000.

449. Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW, Kallioniemi A, Fornace AJ Jr, Appella E: Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet* 31: 210–215, 2002.
450. Ferbeyre GE, de Stanchina AW, Lin E, Querido ME, McCurrach GJ, Hannon S, Lowe SW: Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22: 3497–3508, 2002.
451. Lin AW, Lowe SW: Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5025–5030, 2001.
452. Serrano MA, Lin W, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593–602, 1997.
453. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M: Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436(7051): 642, 2005.
454. Ding HF, Fisher DE: Induction of apoptosis in cancer: new therapeutic opportunities. *Ann Med* 34(6): 451–469, 2002.
455. Castro-Obregon S, Rao SV, del Rio G, Chen SF, Poksay KS, Rabizadeh S, Vesce S, Zhang XK, Swanson RA, Bredesen DE: Alternative, Nonapoptotic Programmed Cell Death. Mediation By Arrestin 2, Erk2, And Nur77. *J Biol Chem* 279:17543–17553, 2004.
456. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC: Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer* 61:786–792, 1995.
457. Entschladen F, Lang K, Drell TL, Joseph J, Zaenker KS. Neurotransmitters are regulators for the migration of tumor cells and leukocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2002 Nov;51(9):467-82. Epub 2002 Jul 27. Review.
458. Mantyh, PW. Substance P and the inflammatory and immune response. *Ann NY Acad Sci* 1991; 632, 263-271.
459. Harrison, S; Geppetti, P. Substance P. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33, 555-576.
460. 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.

461. Rupniak, NM; Carlson, E; Boyce, S; Webb, JK; Hill, RG. Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK-1R receptor antagonist L-733,060 in gerbils. *Pain* 1996; 67, 189-195.
462. Lembeck, F; Holzer, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1979;; 310, 175-183.
463. Lundberg, JM; Brodin, E; Hua, X; Saria, A. Vascular permeability changes and smooth muscle contraction in relation to capsaicin-sensitive substance P afferents in the guinea-pig. *Acta Physiol Scand* 1984; 120, 217-227.
464. Lieb, K; Fiebich, BL; Berger, M; Bauer, J; Schulze-Osthoff, K. The neuropeptide substance P activates transcription factors NF.kB and kB-dependent gene expression in human astrocytoma cells. *J Immunol* 1997; 159, 4952-4958.
465. Keranen, U; Jarvinen, H; Karkkaine, P; Kiviluoto, T; Kivilaakso, E; Soynila, S. Substance P – an underlying factor for pouchitis?. Prospective study of substance P and VIP-immunoreactive innervation and mast cells. *Dig Dis Sci* 1996b; 41, 1665-1671.
466. Gillespie E, Leeman SE, Watts LA, Coukos JA, O'Brien MJ, Cerda SR, Farraye FA, Stucchi AF, Becker JM. Truncated neurokinin-1 receptor is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 18;108(42):17420-5.
467. Payan, DG; Brewster, DR; Missirian-Bastian, A; Goetzl, EJ. Substance P recognition of a subset of human T lymphocytes. *J Clin Investigation* 1984; 74, 1532-1539.
468. Weihe, E; Nohr, D; Müller, S; Büchler, M; Friess, H; Zentel, H-J. The tachykinin neuroimmune connection in inflammatory pain. *Ann NY Acad Sci* 1991; 632, 283-295.
469. Friess, H ; Zhu, Z ; Liard, V ; Shi, X; Shrikhande, SV; Wang, L; Lieb, K; Korc, M; Palma, C; Zimmermann, A; Reubi, JC; Buchler, MW. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 2003; 83, 731-742.
470. Hilakivi-Clarke, L; Rowland, J; Clarke, R; Lippman, ME. Psychosocial factors in the development and progression of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29, 141-160.
471. Okamura, M; Yamawaki, S; Akechi, T; Taniguchi, K; Uchitomi, Y. Psychiatric disorders following first breast cancer recurrence: prevalence, associated factors and relationship to quality of life. *Jpn J Clin Oncol*, 2005; 35, 302-309.

472. Shirayama, Y; Mitsushio, H; Takashima, M; Ichikawa, H; Takayashi, K. Reduction of substance P after chronic antidepressant treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. *Brain Res* 1996; 739, 70-78.
473. Spiegel, D; Giese-Davis, J. Depression and cancer: mechanisms and disease progression. *Biol Psychiatry* 2003; 54, 269-282.
474. Fehder, WP. Alterations in immune response associated with anxiety in surgical patients. *CNRA* 1999; 10, 124-129.
475. Muñoz M, Rosso M. The NK-1R receptor antagonist Aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Invest New Drugs*. 2009 Jan 17. *Neuropeptides*. *Ann N Y Acad Sci* 594:85-94.