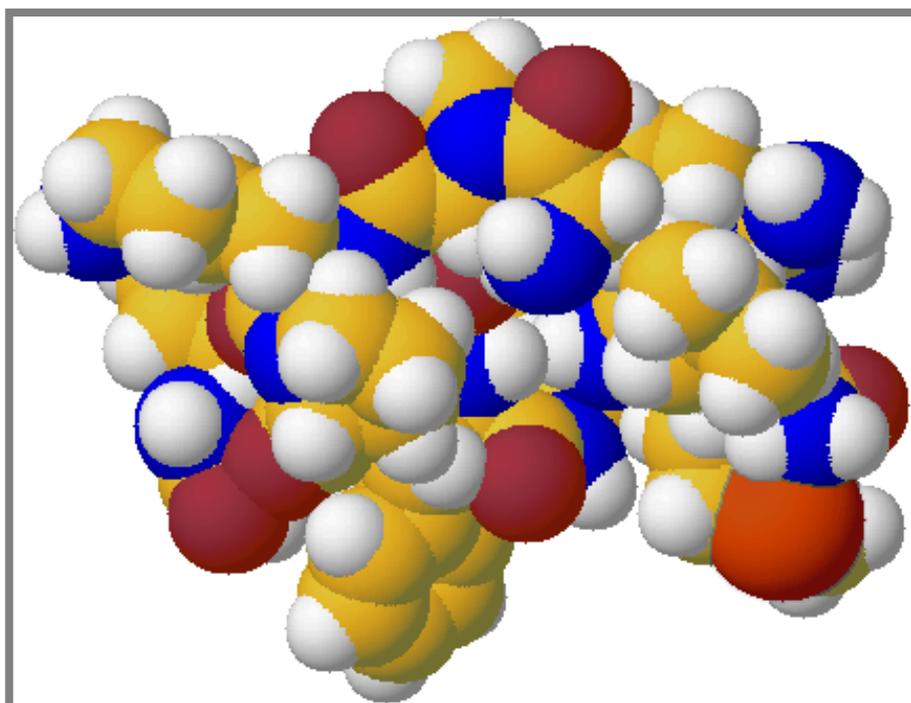


Tesis Doctoral – Universidad de Sevilla

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe



David Castro Gutiérrez de Agüera

Directores:

Prof. Dr. Francisco Esteban Ortega

Prof. Dr. Antonio Abrante Jiménez

Prof. Dr. Miguel Muñoz Sáez

Prof. Dr. Miguel Ángel González Moles



Universidad de Sevilla · 2010

Tesis Doctoral – Universidad de Sevilla

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

David Castro Gutiérrez de Agüera

Directores:

Prof. Dr. Francisco Esteban Ortega

Prof. Dr. Antonio Abrante Jiménez

Prof. Dr. Miguel Muñoz Sáez

Prof. Dr. Miguel Ángel González Moles

Universidad de Sevilla · 2010

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

ÍNDICE

ÍNDICE	3
AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS	7
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1. ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER	11
1.2. EL DESCUBRIMIENTO DE LA SUSTANCIA P	23
1.3. LA GRAN FAMILIA DE LAS TAQUICININAS	26
1.4. LOS RECEPTORES DE LAS TAQUICININAS. EL NK1R	32
1.5. FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE LA SP Y EL NK1R	40
1.6. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES DE LAS TAQUICININAS	46
1.7. ANTAGONISTAS DEL NK1R	75
1.8. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R	81
1.9. ACTIVIDAD ONCOGÉNICA DE LA SP Y DEL NK1R	89
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	103
III. MATERIAL Y MÉTODO	107
3.1. MATERIAL	109
3.2. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP Y EL NK1R	113
3.3. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO IN VITRO DE LOS ANTAGONISTAS DE LA SP	122
IV. RESULTADOS	127
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA	129
4.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP Y EL NK1R	131
4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO IN VITRO DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R	149
V. DISCUSIÓN	157
5.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP Y EL NK1R	159
5.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO IN VITRO DE LOS ANTAGONISTAS DE LA SP	161
5.3. DISCUSIÓN DEL PAPEL DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE LARINGE	163
VI. CONCLUSIONES	175
VII. ARTÍCULOS DE REFERENCIA	179
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Esteban, por su esfuerzo y dedicación en la realización de la tesis y sin el cual hubiera sido imposible llevarla a cabo.

Al Dr. Abrante, por su implicación y la aportación de sus conocimientos en el desarrollo del proyecto.

Al Dr. González-Moles, por sus inestimables aportaciones en el proceso de la histoquímica.

Al Dr. Muñoz, por compartir sus conocimientos sobre la sustancia P y las taquicininas.

Al Dr. Palacios, por permitirme disponer de la tecnología necesaria para realizar el proyecto.

Al Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Virgen del Rocío, por haberme enseñado todo lo que sé acerca de la especialidad.

A mis padres y hermanos, por haberme apoyado siempre.

Y a mi futura esposa, ya que sin su apoyo y comprensión nunca podría haber llevado a cabo este proyecto.

ABREVIATURAS

- 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 sulfoxido
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DTT: Ditioneitol
- EDTA: Acido 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 γ 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
- NK1R: Receptor de la Neurokinina 1
- NK2R: Receptor de la Neurokinina 2

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

- NK3R: Receptor de la Neurokinina 3
- NKA: Neurokinina A
- NKB: Neurokinina B
- NP γ : Neuropeptido γ
- NPK: Neuropeptido K
- PBS: Solución tamponada de fosfato salino
- PIP2: Fosfatidil inositol bifosfato
- PLC: Fosfolipasa C
- PPT: Preprotaquinina
- PVDF: Membranas de Polifluoruro de Vinilideno
- RNA: Ácido ribonucleico
- 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

I. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS TUMORES DE CABEZA Y CUELLO

Los tumores de cabeza y cuello, con alrededor de 75.000 casos nuevos diagnosticados en el año 2000 en la Comunidad Europea, representan el sexto tipo de cáncer más frecuente y el 10% de los cánceres masculinos ¹.

En esta localización se producen un amplio número de tumores que se encuentran en diferentes regiones anatómicas del área cérvico-facial, con diferentes patrones histológicos y con distintos comportamientos. Se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: los tumores de glándulas salivares, el cáncer de rinofaringe, los tumores escamosos de cabeza y cuello, y una miscelánea que incluye los tumores de tiroides, los tumores metastáticos de primario desconocido, los sarcomas o el esteseoneuroblastoma.

El segmento etario con mayor porcentaje de diagnóstico es aquel comprendido entre los 65 y los 80 años, siendo significativamente mayores los porcentajes en los pacientes varones. La supervivencia media depende del estadio en que se encuentre el cáncer al diagnóstico, siendo aproximadamente del 80% a los 5 años en el caso de enfermedad localizada y menor del 20% en el caso de enfermedad metastática. Dentro del grupo de los tumores de cabeza y cuello aquellos considerados de mejor pronóstico son los tumores de labio y de glándulas salivares, por el contrario los tumores de cavidad oral, faringe e hipofaringe son los que peor pronóstico poseen (Figura 1).

La cirugía y la radioterapia constituyen el tratamiento convencional para esta enfermedad en los estadios tempranos; por el contrario, en estadios avanzados, la quimio-radioterapia concomitante posibilita una alta tasa de conservación de órgano ² con buenos índices de supervivencia. A lo largo de estos últimos años, el avance en las técnicas quirúrgicas y reconstructivas ha beneficiado en gran medida a los pacientes afectados con este tipo de cáncer.

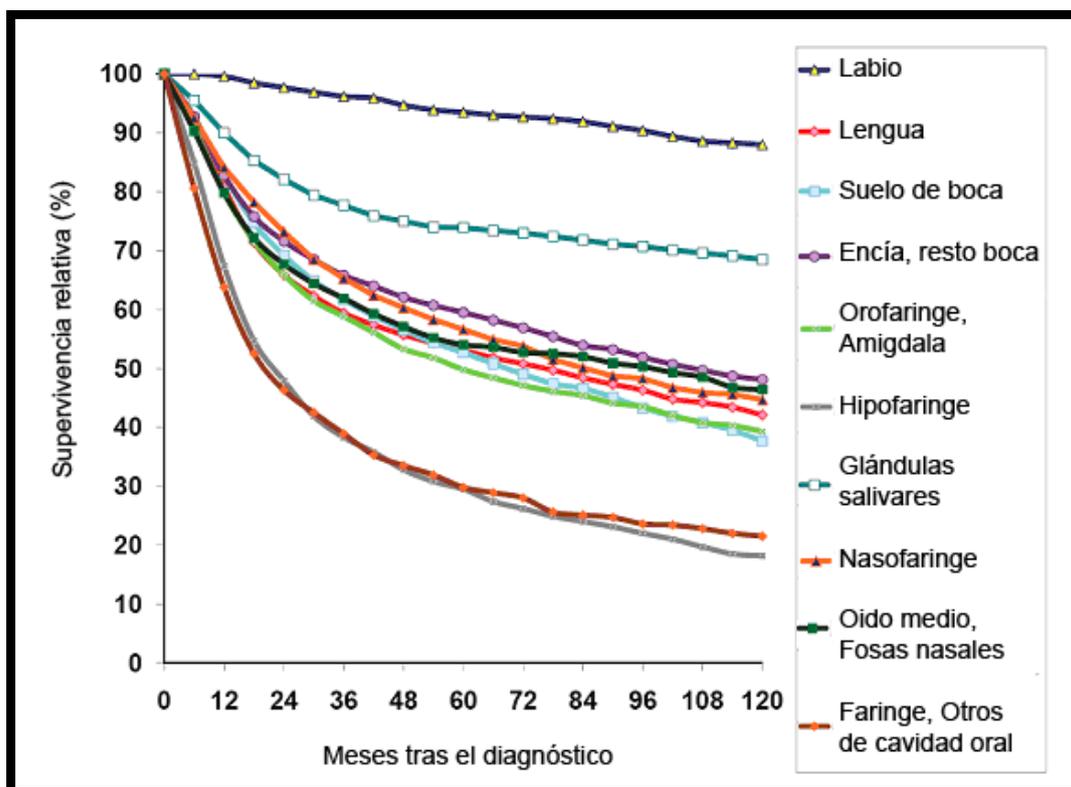


Figura 1. Cáncer de cabeza y cuello: Supervivencia Relativa (%) por localización del sitio primario. Mayores de 20 años. Estudio entre 1988-2001. NCI SEER Public-Use Data. SEER Survival Monograph ³.

Desgraciadamente, la gran mayoría de los casos se presentan como enfermedad localmente avanzada o irreseccable, de tal modo que, a pesar de que se aprecia una mejoría en el control local y en la calidad de vida de los pacientes con las técnicas previamente mencionadas, las tasas de supervivencia de los pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello no han mejorado significativamente en las dos últimas décadas.

En la actualidad, el tratamiento estándar para los pacientes diagnosticados de cáncer de cabeza y cuello con enfermedad localmente avanzada o irreseccable es la quimioterapia basada en cisplatino, concurrente con radioterapia ^{4 5 6 7}. En los últimos años se ha evaluado el papel de nuevos fármacos citotóxicos y sus combinaciones con y sin cisplatino: taxanos, gemcitabina, vinorelbina, capecitabina y pemetrexed, con respuestas que

generalmente van desde el 30%-35% en monoterapia hasta casi el 70% con la combinación de docetaxel y 5-fluorouracilo ^{8 9 10 11 12 13 14}.

Los avances en biología molecular han permitido desarrollar nuevas estrategias tanto diagnósticas como terapéuticas; éstas últimas tienen como objetivo no sólo la célula tumoral sino su entorno, de manera que los nuevos agentes desarrollados tienen mecanismos de acción y toxicidades diferentes a los de los fármacos citotóxicos convencionales ¹⁵.

1.1.2. EL CÁNCER DE LARINGE

La laringe es la segunda localización más frecuente de cáncer del tracto aerodigestivo superior después de la cavidad oral. El cáncer de laringe más común es el carcinoma escamocelular ¹⁶ (95 % de todos los casos) siendo éste más frecuente en hombres entre los 60 y 70 años de edad. El tabaco supone el agente carcinógeno esencial; además de los compuestos cancerígenos que contiene como hidrocarburos aromáticos entre otros, el tabaco produce una irritación e inflamación local crónica, a lo que se le añade la capacidad para inducir alteraciones en la vascularización reproduciendo las condiciones ideales para desarrollar un tumor maligno. El alcohol, aunque por sí sólo tiene una limitada capacidad cancerígena a este nivel, se acepta que actúa mediante un efecto sinérgico con el tabaco por medio de una irritación local crónica y favoreciendo la disolución de los agentes carcinógenos del tabaco.

Otros factores que se han visto implicados en el desarrollo de este tipo de cáncer son el reflujo faringo-laríngeo, la exposición a sustancias como pinturas, metales, plásticos, combustibles... y algunas cepas del virus del papiloma humano.

Existen ciertas áreas geográficas de condensación de casos de este tipo de cáncer sin que se haya podido determinar con exactitud la causa de esta agregación (Figura 2).

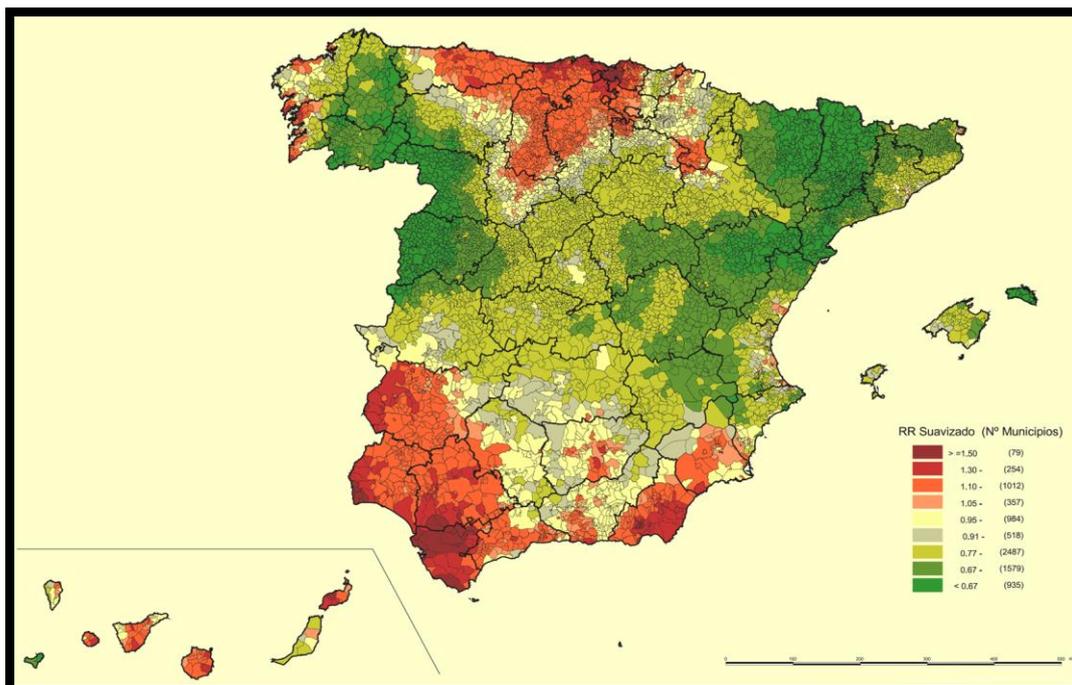


Figura 2. Atlas Municipal de Mortalidad por Cáncer en España 1989-1998. Cáncer de laringe. Riesgo relativo ajustado en ambos sexos. Centro Nacional de Epidemiología ¹⁷.

Las alteraciones morfológicas que se detectan previas al cáncer son lesiones que representan cambios anormales en el epitelio y se pueden manifestar como masas irregulares o ulceraciones de la mucosa. Estas lesiones pre-malignas deben biopsiarse mediante microcirugía laríngea, resecaando por completo la lesión y preservando en lo posible el tejido normal circundante. Los términos clínicos de las lesiones pre-malignas más frecuentemente descritas son la leucoplasia, la cual describe una placa de color blanquecino, y la eritroplasia, que describe una lesión roja, ésta última más sugestiva de una lesión maligna subyacente.

Los principales síntomas de esta enfermedad son: disfonía, disfagia, odinofagia, disnea, hemoptisis y otodinia. Estos síntomas van a depender de la localización tumoral dentro de la laringe, así como de su estado. La disfonía es el síntoma más frecuente asociado al cáncer de laringe originado en la glotis. Por originarse en las cuerdas vocales su primer síntoma suele ser la alteración de la voz, la cual por fortuna es un síntoma temprano que permite establecer un diagnóstico precoz y un tratamiento oportuno que eleva considerablemente la posibilidad de control y cura de la enfermedad. No obstante numerosos

pacientes sufren una faringitis crónica previa que enmascara los síntomas haciendo que el diagnóstico pueda verse retrasado.

La evaluación de pacientes con cualquier tipo de cáncer de laringe requiere una buena anamnesis, exploración completa otorrinolaringológica y exámenes radiológicos.

La supervivencia a los 5 años de pacientes con cáncer de laringe en general es de un 66 %. El principal factor pronóstico es la afectación o no de las cadenas ganglionares. Así mismo, las localizaciones fuera de la glotis suponen una disminución de la supervivencia (Figura 3 y 4).

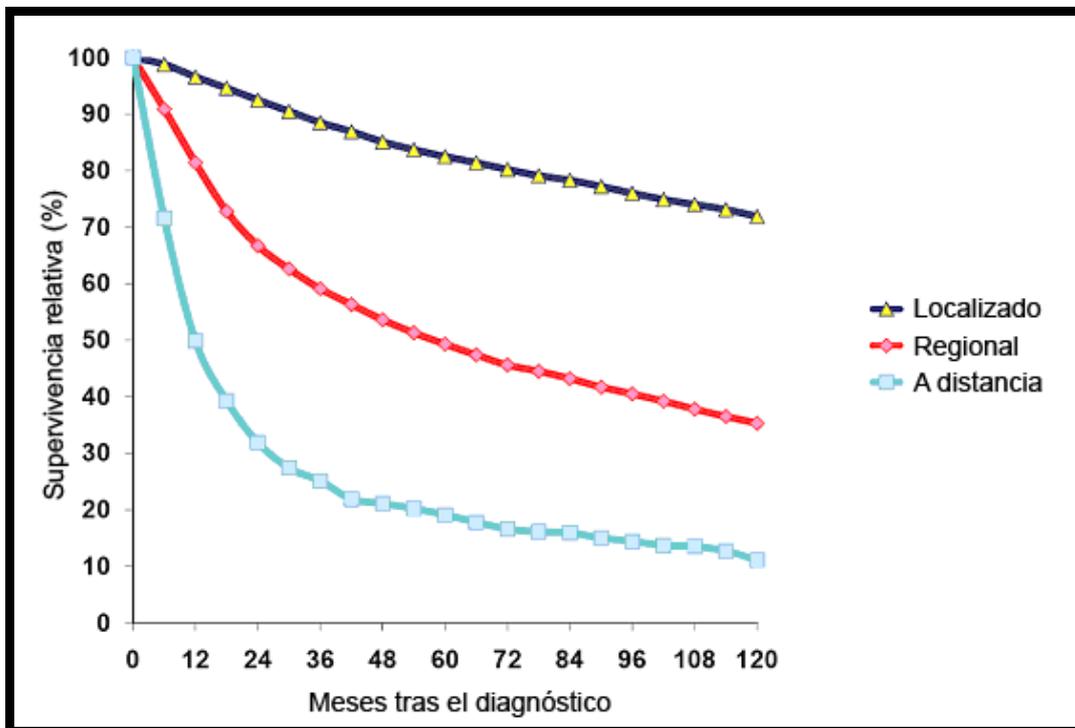


Figura 3. Cáncer de laringe: Supervivencia relativa (%) por estadio tumoral. Mayores de 20 años. Estudio entre 1988-2001. NCI SEER Public-Use Data. SEER Survival Monograph³.

El tratamiento del cáncer de laringe contempla varias opciones, entre las que se encuentran la cirugía, la radioterapia y últimamente la quimioterapia en los protocolos de preservación de laringe en estados avanzados¹⁸.

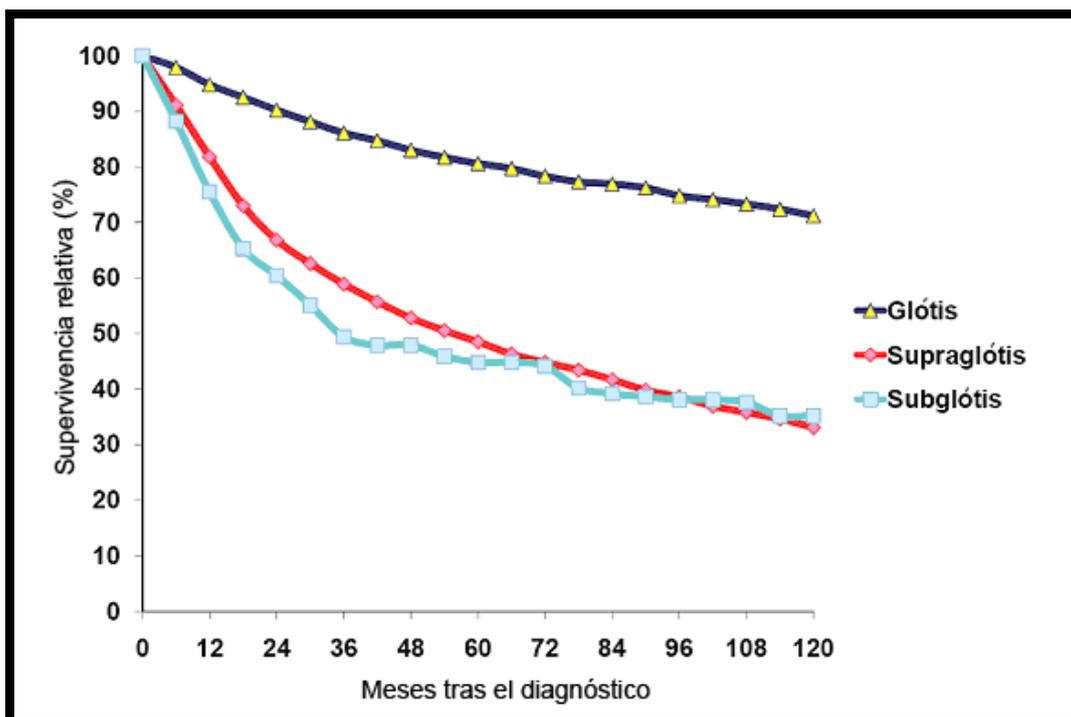


Figura 4. Cáncer de laringe: Supervivencia relativa (%) por localización tumoral. Mayores de 20 años. Estudio entre 1988-2001. NCI SEER Public-Use Data. SEER Survival Monograph ³.

Hasta finales del siglo pasado la mayoría de los pacientes se trataban mediante técnicas quirúrgicas, bien parciales, bien totales. Hoy en día se dispone de, por un lado, técnicas de cirugía endoscópicas mediante láser junto con las técnicas de cirugía abierta, y por otro, de protocolos de preservación de órgano mediante quimio-radioterapia. En términos generales, la cirugía láser se utiliza en los tumores bien delimitados, principalmente aquellos con estadios T1 y T2. Los protocolos de conservación de órgano se reservan para estadios avanzados (T3 y T4); en estos pacientes, la laringectomía total permite el control de la enfermedad en un 80% de los casos, a costa de perder la fonación y la necesidad de llevar una cánula de traqueotomía. Durante los últimos 15 años se han realizados trabajos dirigidos a intentar obtener una eficacia terapéutica idéntica con un tratamiento que evite la mutilación laríngea.

Así, a finales del siglo pasado se llevaron a cabo los estudios de EORTC (EUROPA)¹⁹ Y VETERANS (EE.UU.)²⁰ en los cuales se administraba quimioterapia de inducción a los pacientes en estadios avanzados, aquellos que respondían se sometían posteriormente a radioterapia y a los que no, se le

ofertaba la laringectomía total. Los resultados mostraron una supervivencia similar en ambos tratamientos.

La segunda generación de ensayos clínicos ²¹ va dirigida a la comparación del tratamiento con radioterapia exclusiva versus quimio-radioterapia concomitante. Como conclusión, a pesar de presentar una toxicidad mayor, los resultados mostraron una mayor supervivencia y mayor porcentaje de conservación laríngea.

Los últimos ensayos van encaminados a demostrar el aumento en la supervivencia mediante la aplicación de quimioterapia de inducción, de tal manera que si existe respuesta, se continúa con quimio-radioterapia concomitante, en caso contrario se oferta cirugía.

La detección y tratamiento oportunos pueden derivar en altas tasas de curación y evitar tratamientos futuros más agresivos que aumenten la morbilidad de estos pacientes.

1.1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

1.1.3.1. EL CÁNCER COMO PROCESO MICROEVOLUTIVO

Por definición, las células cancerosas proliferan desafiando los controles normales y son capaces de invadir y colonizar los tejidos de su entorno. Los tejidos que presentan estas células pueden originar tumores secundarios o metástasis que ya resultan muy difíciles de erradicar quirúrgicamente. Se cree que la mayoría de los cánceres se originan a partir de una sola célula que ha experimentado una mutación inicial; no obstante, posteriormente la progenie de esta célula ha de sufrir otros cambios; para que algunas de estas células se conviertan en cancerosas será necesario un gran número de mutaciones adicionales. Este fenómeno de progresión tumoral, que dura muchos años, refleja numerosos cambios evolutivos por mutación y selección natural entre las células somáticas.

El tratamiento racional del cáncer requiere un conocimiento de las propiedades especiales de que disponen las células cancerosas al progresar, multiplicarse y extenderse. Entre estas propiedades se encuentran 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 –incluyendo la senescencia replicativa y las rutas normales de diferenciación que de lo contrario impedirían su capacidad de crecer y de proliferar.

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 DNA. Esta inestabilidad genética les facilita la adquisición del complejo conjunto de alteraciones necesarias para la progresión tumoral^{22 23 24 25}.

1.1.3.2. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER

Las tasas de evolución y de progresión 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, 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 cánceres.

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 que causan cáncer como el papiloma virus o el virus de la hepatitis B. 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 y puede relacionar factores que no son simplemente mutagénicos como los virus o la edad a la que tiene el primer hijo.

1.1.3.3. 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 cuales 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 la 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: 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 examinar el genoma de las células cancerosas buscando señales de pérdida de genes que, a menudo, se manifiestan de heterozigosis 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 proclives a padecer cánceres heredan habitualmente una copia defectuosa y una copia funcional de un gen supresor de tumores; presentan una gran predisposición al desarrollo del 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 DNA, pronto permitirán disponer de un catálogo más completo de genes críticos del cáncer ²⁶ (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.

1.1.3.4. FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA CANCEROSA

Los estudios en embriones en desarrollo y en animales transgénicos 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 social y proliferativo de las células del organismo –en particular, 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 producir metástasis, saliendo del tumor original y creciendo en tejidos ajenos aun son muy pocos conocidos.

Los virus DNA 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 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. Así pues 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 DNA, 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 metastáticos.

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 estas mutaciones se producen al azar. Sin embargo, 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.

1.1.3.5. PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

El mayor conocimiento de la biología molecular del cáncer 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 DNA, en los controles de ciclo celular y en las vías de apoptosis. 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^{27 28 29 30 31}.

1.2. EL DESCUBRIMIENTO DE 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 5). Por aquella época se habían publicado una serie de artículos en los que se discutía la hipótesis de una neurotransmisión química. Dale acababa de publicar que la acetilcolina podría tener una función neurotransmisora, por ello no es de extrañar que le sugiriera al joven Euler que investigara sobre la distribución de la acetilcolina en el tracto digestivo. Esta tarea la llevó a cabo utilizando un fragmento de intestino de conejo en un baño orgánico. Como resultado obtuvo 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. Así pues en 1931 se publica el primer artículo referente a la SP; en él se describía la existencia en el cerebro e en el intestino de un factor resistente a la atropina que estimulaba el músculo liso y disminuía la presión sanguínea ³². 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.

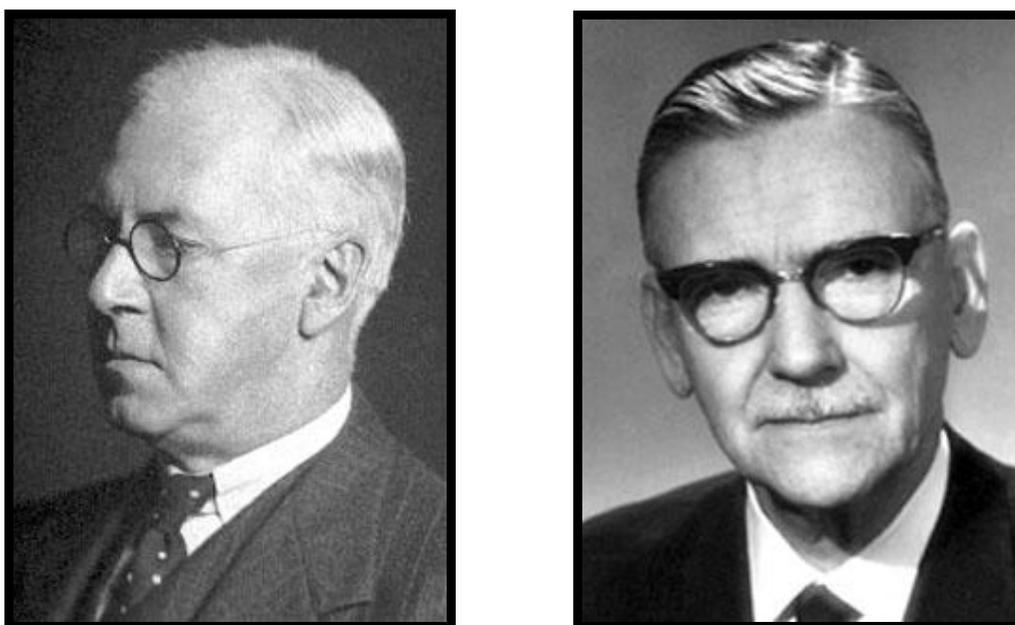


Figura 5. Dr. Henry Dale (1875-1968) y Dr. Ulf Von Euler (1905-1983).
(Imágenes procedentes de “The Nobel Foundation”).

Von Euler llegó a ser profesor de fisiología del instituto Karolinska y durante su carrera llevó a cabo descubrimientos tan importantes como la noradrenalina y las prostaglandinas. No obstante, 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 biológicas³³. 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 diencéfalo y particularmente en el hipotálamo. En la médula espinal demostró que la región dorsal presentaba 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 proximal³⁴. Por entonces, en Australia, Fred Lembeck publicó sus descubrimientos acerca de la función neurotransmisora sensitiva de la SP³⁵.

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)³⁶, siendo los primeros en sintetizar el compuesto³⁷ y llevar a cabo un ensayo radioinmunológico³⁸. Gracias a estas investigaciones, los efectos de la SP pudieron ser monitorizados en modelos fisiológicos^{39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53}.



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

La SP ha sido una de las moléculas que más extensamente han sido estudiadas durante la última mitad del siglo pasado, pensándose además que era la única taquicinina hallada en mamíferos que actuaba como neuropéptido. Esto continuó así hasta 1983 cuando Kangawa y Kimura ⁵⁴ 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.

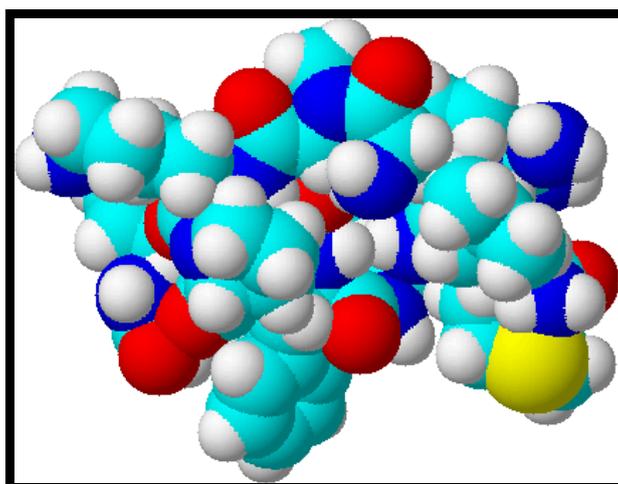


Figura 7. Modelo tridimensional SP.
(Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

1.3. LA GRAN FAMILIA DE LAS TAQUICININAS

1.3.1. INTRODUCCIÓN

La familia de las taquicininas conforma la mayor familia peptídica descrita en el reino animal. Así pues, han sido aisladas más de 40 taquicininas entre animales invertebrados (insectos, gusanos y moluscos), procordados y vertebrados (piel, tracto gastrointestinal, sistema nervioso, etc.). 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^{54 55 56}. 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^{57 58 59 60 61 62 63 64 65 66}. No obstante, recientes estudios han cambiado el concepto que se tenía sobre la distribución de las taquicininas, comprobando cómo tanto la SP, la NKA, la NKB y otro miembro de las taquicininas denominada Hemocininina-1 (HK1) se producen también en células no neurales, sugiriendo una amplia distribución de las taquicininas por todo el organismo^{67 68 69 70 71 72 73 74}.

1.3.2. PÉPTIDOS DE LA FAMILIA DE LAS TAQUICININAS

Hasta la fecha, se han descrito en mamíferos seis taquicininas: SP, NKA, NKB, Neuropéptido K (NPK), Neuropéptido γ (NP γ) y HK1^{32 36 75} (Figura 8). NPK y NP γ 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^{76 77 78 79 80}. 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 taquicininas se expresan principalmente en los tejidos neurales^{81 82 83}. Así, 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 ^{35 53 84 85 86 87 88 89} siendo liberadas en las terminaciones nerviosas tanto en la médula espinal como en los tejidos periféricos realizando una actividad neurotransmisora excitatoria ^{90 91 92 93}. Como ya se ha comentado, el sistema nervioso no es la única localización de la SP, 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 ^{94 95 96 97}. Además se han encontrado precursores del NKB en placentas humanas y de ratas, en úteros así como en otras células reproductoras en ratón ^{98 99 100 101}. 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.

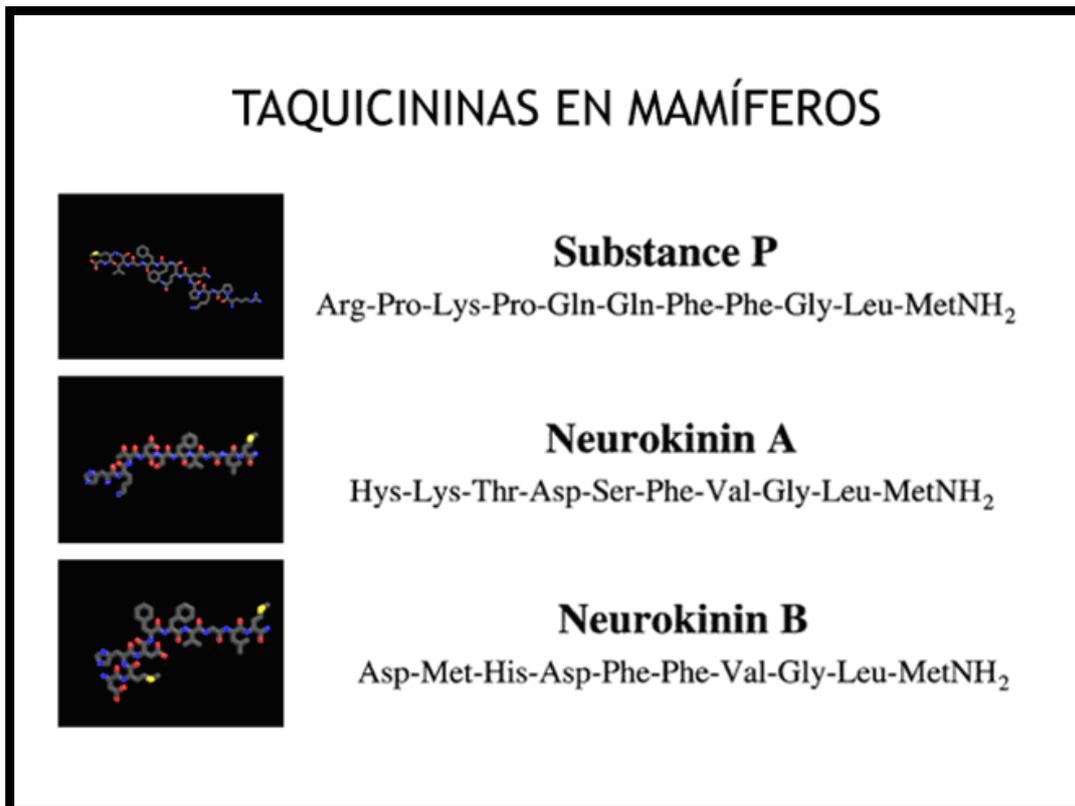


Figura 8. Estructuras de las principales taquicininas en mamíferos.
(Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

1.3.3. ESTRUCTURA GENÉTICA

SP, NKA, NPK y NPY se encuentran codificados en el gen preprotaquicinina-A (PPT-A) o gen TAC-1 (Figura 9). Solamente se conoce la organización de este gen en unas cuantas especies de mamíferos^{102 103 104 105}. En humanos y ratas, 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 RNA mensajero (α, β, γ y δ) que difieren en sus combinaciones de los exones. El RNA mensajero β -PPT-A contiene los siete exones del gen mientras que el RNA mensajero α -PPT-A pierde el exón 6, el γ pierde el exón 4, por último, el RNA 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 RNA mensajero β y γ -PPT-A, la secuencia de NPY en el RNA mensajero γ -PPT-A y por último, la secuencia de NPK es únicamente codificada por RNA mensajero β -PPT-A^{106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116}. La translación de esos RNA mensajeros y su procesamiento posttranslacional es lo que determina las distintas taquicininas. 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 RNA 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 NKA¹⁰¹.

La NKB es la única secuencia conocida hasta el momento que se obtiene del gen PPT-B o gen TAC-3^{117 118}. En humanos y ratas, el gen está

compuesto por siete exones y la secuencia que codifica la NKB se encuentra en el exón 5.

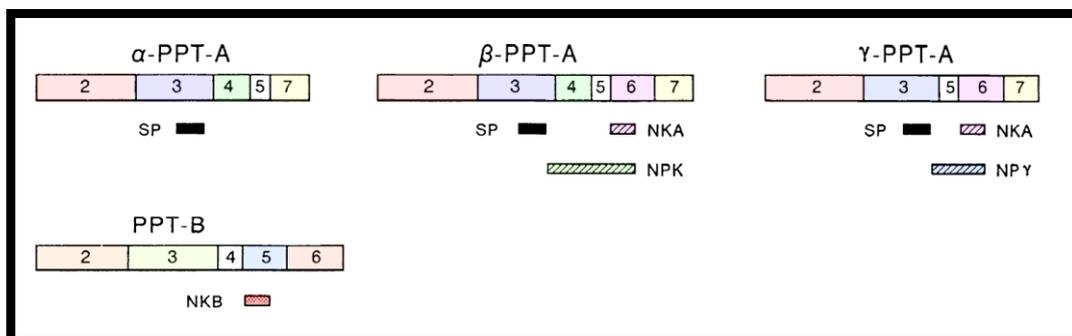


Figura 9. Estructura de los genes de las principales taquicininas. (Imagen modificada la original de Otsuka y Yoshioka ⁵³).

Por último, la HK-1 está producida por el tercer gen PPT-C o TAC-4 ^{67 68}. El gen PPT-C está compuesto por cuatro exones y la secuencia que codifica la HK-1 se encuentra en el exón 2. Se ha demostrado que la estructura primaria de la HK-1 es diferente en humanos de la hallada en ratones y ratas.

1.3.4. ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LAS TAQUICININAS

Se han aislado taquicininas tanto en los vertebrados superiores como en distintos grupos de invertebrados ^{76 119 120 121}. La estructura primaria de las taquicininas 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 péptidos ⁸⁰. Todas las especies a lo largo de la escala de la evolución expresan taquicininas 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 ^{122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138}.

La NKA de mamíferos, reptiles y aves tienen la misma estructura primaria diferenciándose únicamente en dos aminoácidos ^{139 140 141}.

El NPY y péptidos relacionados se han encontrado también en otras especies de vertebrados como el aligátor y la serpiente pitón entre otros^{142 143}. 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 denomina péptidos “pseudo” taquicinina^{139 141 144 145 146 147 148 149}. A pesar de ello, existen excepciones como la sustancia aislada en las glándulas salivares del mosquito *Aedes aegypti*, denominada sialokinina¹⁵⁰ 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 conllevan 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, como ya se ha señalado, 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^{120 151}.

1.4. LOS RECEPTORES DE LAS TAQUICININAS. EL NK1R

1.4.1. TIPOS DE RECEPTORES DE LAS TAQUICININAS

Los efectos biológicos de las taquicininas están mediados a través de 3 tipos de receptores denominados NK1R (Receptor de la neurokinina-1), NK2R (Receptor de la neurokinina-2) Y NK3RR (Receptor de la neurokinina-3). Además, existe una variante del NK3R denominado NK3BR o NK4R. 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 ⁶⁵

152 153 154 155

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 10). 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 or adrenergic-receptor-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.

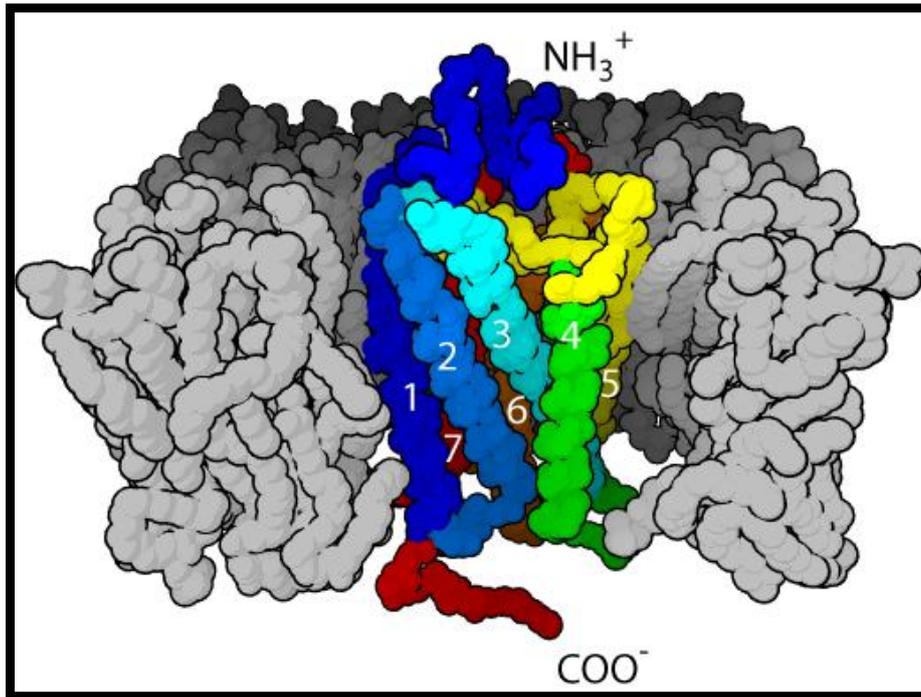


Figura 10. Receptor asociado a proteína G genérico: 7 hélices transmembrana y 6 bucles.
(Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

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 11).

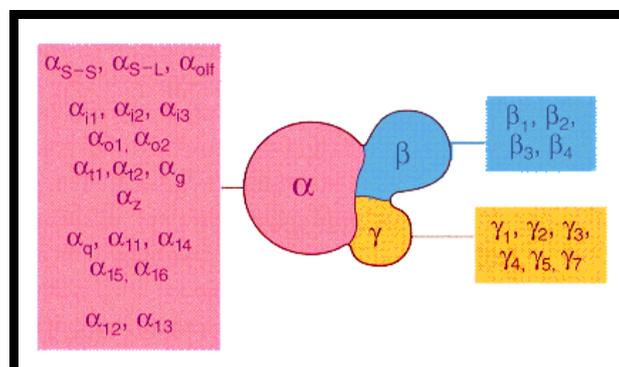


Figura 11. Diferentes combinaciones de proteína G. (Imagen modificada de la original de Zhang Y. et al.¹⁵⁶).

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

En estado de reposo el trómero 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 trómero 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 12).

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

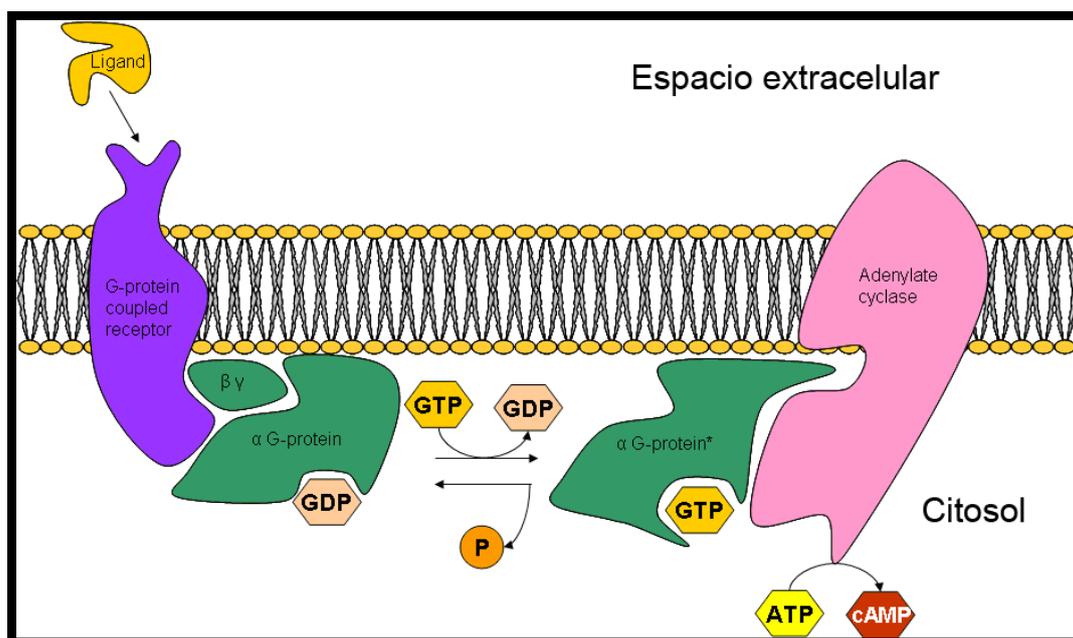


Figura 12. Activación del receptor acoplado a proteína G.
(Imagen procedente de Zhang Y. et al.¹⁵⁶).

Como ocurre con 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 citoplasmática ¹⁵⁷.

Hasta que Nakanishi y col.¹⁵⁸ clonaron el primer receptor relacionado con la SP, el conocimiento de la presencia de los receptores de neuropéptidos 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 (Figura 13 y 14).

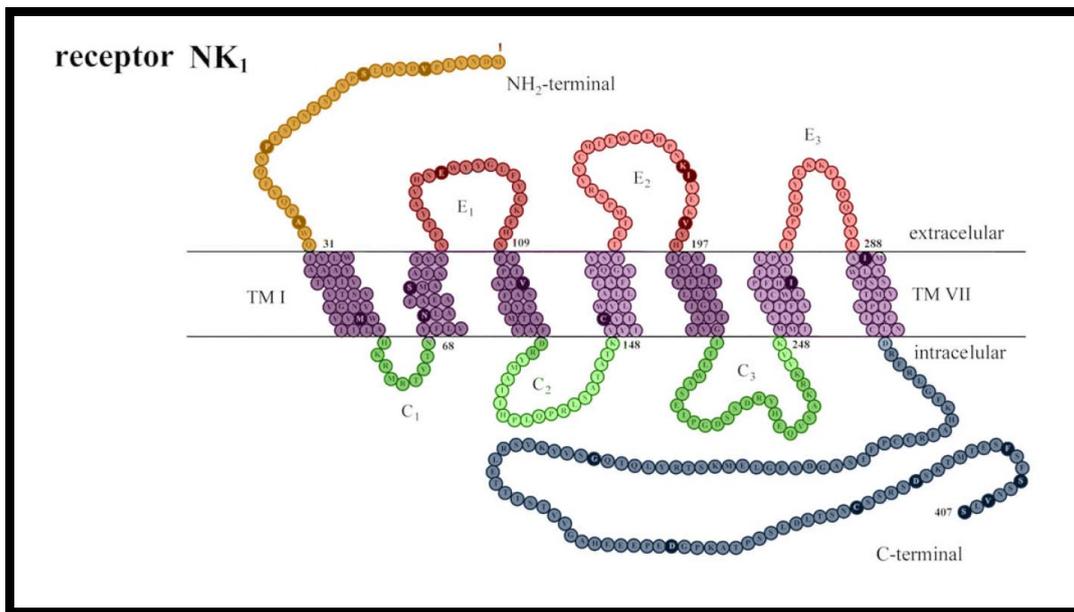


Figura 13. Esquema del Receptor de la Neurokinina-1.
(Imagen procedente de Almeida et al. ¹⁵⁹).

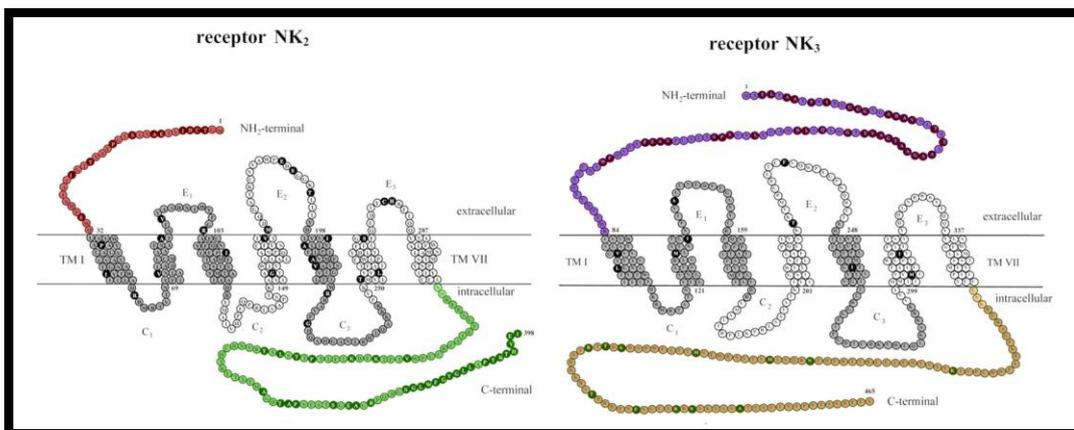


Figura 14. Esquemas del Receptor de la Neurokinina-2 y 3.
(Imagen procedente de Almeida et al. ¹⁵⁹).

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

Se han clonado receptores de taquicinina de diferentes especies de mamíferos. En todos ellos se ha podido demostrar que el NK1R es una proteína compuesta por 407 aminoácidos^{158 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174}.

El NK2R humano tiene en cambio 398 aminoácidos y es mayor que el de la rata con 390 aminoácidos; por otro lado, el NK2R del cobaya tiene 402 aminoácidos.

Por último, el NK3R es el mayor de todos en todas las especies, conteniendo 465, 452 y 440 aminoácidos en humanos, ratas y cobaya respectivamente; siendo este tamaño a expensas de la región aminoterminal.

Los receptores de las taquicininas poseen una moderada selectividad a las taquicininas 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 NK1R es la SP, para el NK2R la NKA y para el NK3R la NKB (Tabla 2).

Receptores y sus ligandos	
NK1R	SP>NKA>NKB
NK2R	NKA>NKB>SP
NK3R	NKB>NKA>SP

Tabla 2. Receptores de las neurokininas y sus ligandos preferidos.

Cada vez hay más pruebas que indican 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 NK2R pero también presentan una alta afinidad con el NK1R. Recientes estudios farmacológicos indican que la HK-1 tanto de ratón, rata, como humanos actúa como agonista del NK1R produciendo, al menos en los tejidos periféricos, idénticos efectos que la SP^{68 78 81 82 83 175 176 177 178 179 180 181}.

Los receptores de las taquicininas en mamíferos se encuentran distribuidos de forma heterogénea dentro de cada especie. El NK1R se expresa ampliamente tanto en el SNC como en el SNP y está presente en las neuronas, endotelio vascular, músculo y diferentes tipos de células inmunitarias entre otras. El NK2R se encuentra principalmente en el SNP aunque también se expresa de manera selectiva en ciertos núcleos cerebrales, por el contrario, el NK3R se encuentra principalmente en el SNC, mientras que en los tejidos periféricos se identifica en el útero y placenta de ratas y humanos, el sistema músculo esquelético humano, pulmón, hígado, el sistema portal y vena mesentérica de ratas y ciertas neuronas entéricas del intestino de diversas especies^{72 73 98 99 100 162 182 183 184 185 186 187 188 189 190}.

1.4.2. ESTRUCTURA GENÉTICA

Los genes que codifican los 3 receptores de las taquicininas se encuentran en el cromosoma 2 teniendo todos la misma organización estructural. Como ocurre con otros receptores de esta superfamilia, los receptores de las taquicininas 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^{160 161 164 166 168 169 171 174}. El Exón 1 contiene la región 5' no traducida y la región que codifica hasta la parte final de TM III. 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 15).

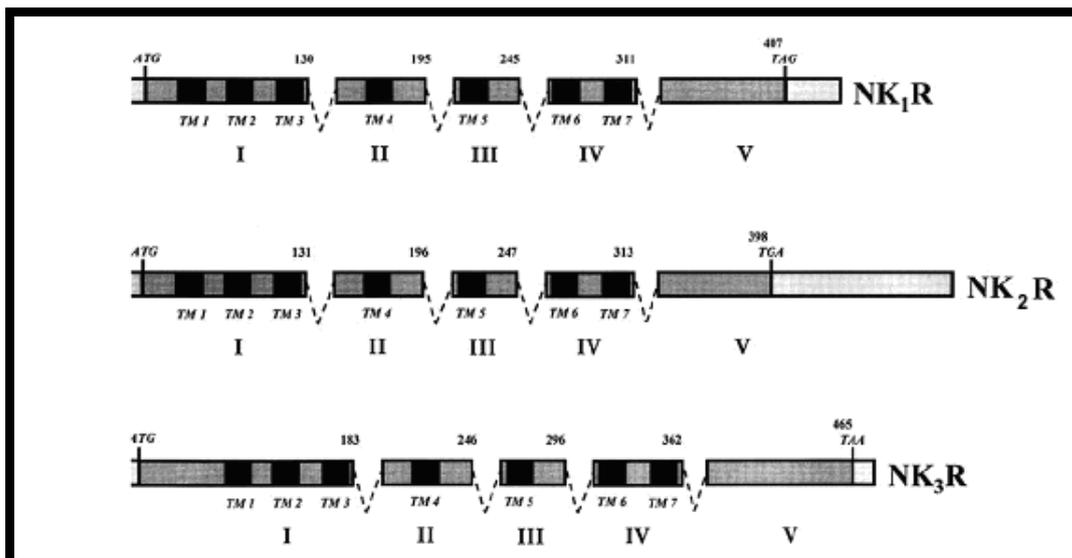


Figura 15. Esquema de los genes que codifican los receptores de las neurokininas. Las regiones codificantes de los genes están divididas en cinco exones (I-V) interrumpidos por cuatro intrones (marcados con líneas discontinuas). TM (1-7) indica los segmentos transmembrana codificados por cada exón mostrados en los segmentos del gen pintados de negro. (Imagen modificada de la original Almeida et al. ¹⁵⁹).

1.4.3. LAS ISOFORMAS DEL NK1R

Kage et al ¹⁹¹ demostraron la existencia de dos isoformas del NK1R presentes en las glándulas submaxilares de la rata, que se diferenciaban en la longitud del extremo carboxi terminal ¹⁹². En la especie humana también han sido clonadas y estudiadas. Estas dos isoformas poseen los mismos dominios de unión pero se diferencian en la longitud del polipéptido generado, 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.

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.

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-RNA mensajero. Los estudios de Fong et al.¹⁹³ en 1992, indican por tanto que existen múltiples formas del NKR1 humano y que la diferente activación de la respuesta intracelular podría estar en relación con la complejidad de los efectos biológicos de la SP.

1.5. FISIOLÓGÍA MOLECULAR DE LA SP Y EL NK1R

Las taquicininas son liberadas de sus precursores por la acción de unas proteasas específicas. 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.

Al igual que todos los neurotransmisores conocidos, las taquicininas son liberadas de la terminación nerviosa por un mecanismo calcio-dependiente como respuesta tras la aplicación de un estímulo ya sea fisiológico o no (estimulación eléctrica, potasio, despolarización por capsaicina). Una vez que son liberadas, las taquicininas pueden ser atacadas e inactivadas 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. En la degradación proteolítica de la SP, tres enzimas parecen mostrar una función predominante: dipeptidyl-amino peptidasa, postprolina endopeptidasa y catepsina-D.

La estimulación del NK1R 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. Tanto la subunidad α -GTP como las subunidades β y γ están relacionadas con la regulación de las funciones efectoras de la SP. Aparentemente existen tres segundos mensajeros que podrían llevar a cabo estas funciones (Figura 16)^{194 195 196 197 198 199}.

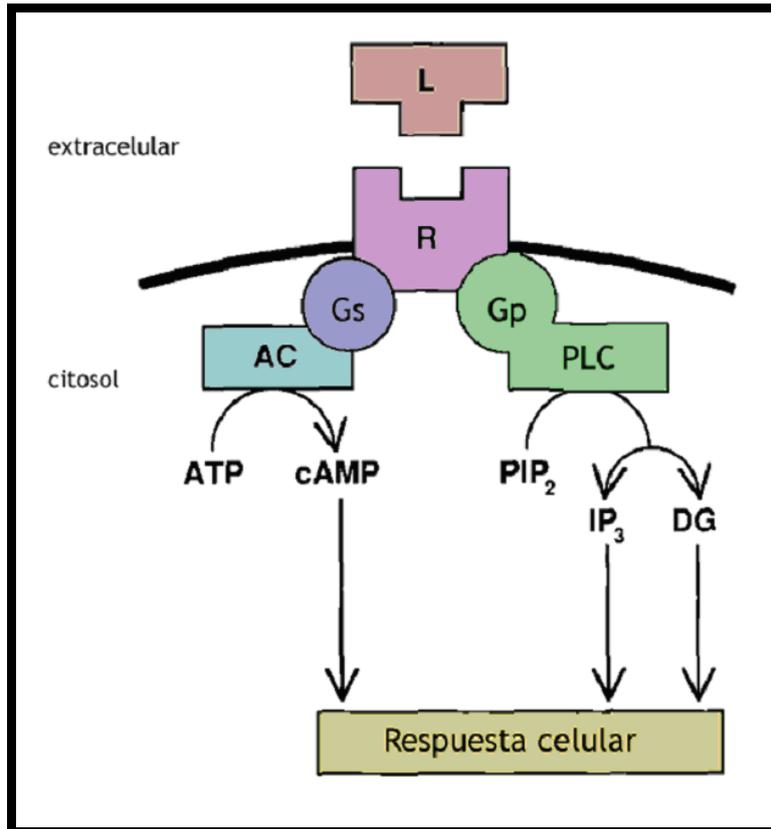


Figura 16. Mecanismos efectores de los receptores de las neuroquininas. Estimulación de la hidrólisis del fosfatidil inositol (PI) y la cascada del AMP cíclico (cAMP) por parte de los receptores de las taquicininas (L) sobre el receptor de proteína G (R). Gs y Gp son proteínas G. AC corresponde a la adenilato ciclasa. PLC es la fosfolipasa C. PIP₂ es el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. DG corresponde al diacilglicerol.

(Imagen modificada de la original de Zhang Y. et al.¹⁵⁶).

A) 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. El DAG actúa vía protein-kinasa 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.

B) Activación de la fosfolipasa A₂, la cual desencadena la movilización del ácido araquidónico.

C) Activación de la adenilato ciclasa, la cual produce un incremento de los niveles de adenosin monofosfato cíclico (cAMP)

Debido a la naturaleza anfifílica de la SP, se supone que ésta 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 pero con menor afinidad que la SP²⁰⁰.

La ruta endocelular tras la internalización del complejo SP/NKR1 ha sido estudiada en profundidad por Grady et al.²⁰¹ Gracias a los estudios con microscopio confocal utilizando SP marcada y anticuerpos frente a NK1R, se puede conocer al detalle la ruta intracelular así como los procesos de degradación de la SP y reciclaje de los NK1R (Figura 17-19). Se ha podido demostrar que el NK1R y la SP son rápidamente internalizados mediante un mecanismo dependiente de clathrina en los denominados endosomas tempranos. En estado basal, en ausencia de SP, el NK1R 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 NK1R 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. De tal modo, 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/NKR1 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 NKR1 aparecen en la membrana plasmática de nuevo. Esto puede ser explicado mediante tres teorías: 1) La síntesis de nuevos receptores, 2) La inserción de receptores preformados, 3) El reciclaje de los receptores internalizados. En contra de la primera 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. La segunda posibilidad no puede ser descartada del todo, aunque los estudios realizados en el estadio basal no mostraron NKR1 en el interior de la célula en tanta cantidad que nos hagan pensar en esta posibilidad. 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 NH₄Cl) 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 se consigue la regulación en la respuesta celular frente a la SP.

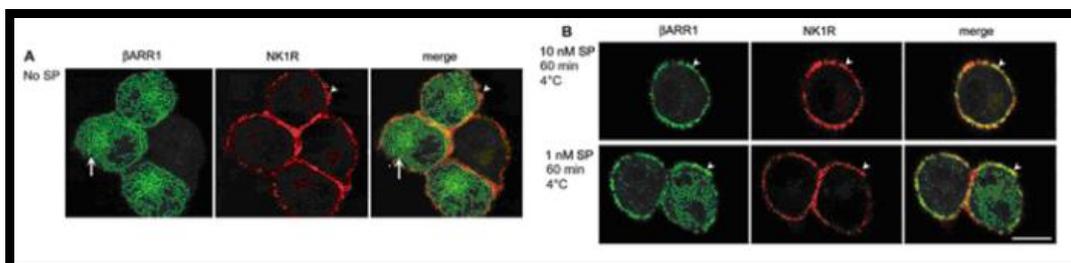


Figura 17. Translocación transmembrana de la β -arrestina 1-GFP. En la secuencia A, el medio no contiene SP. En la secuencia B, las células fueron incubadas con 10nM o 1 nM de SP durante 60 minutos a una temperatura de 4°C. Tras la fijación de las células se procede a identificar los NK1R mediante inmunofluorescencia. Así mismo, mediante el anticuerpo β -ARR1 se procede a localizar la β -arrestina. En la secuencia A se observa que los NK1R 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 B-Arrestina 1-GFP desde el citosol hacia la membrana timpánica. (Imagen procedente de Graddy et al.²⁰¹).

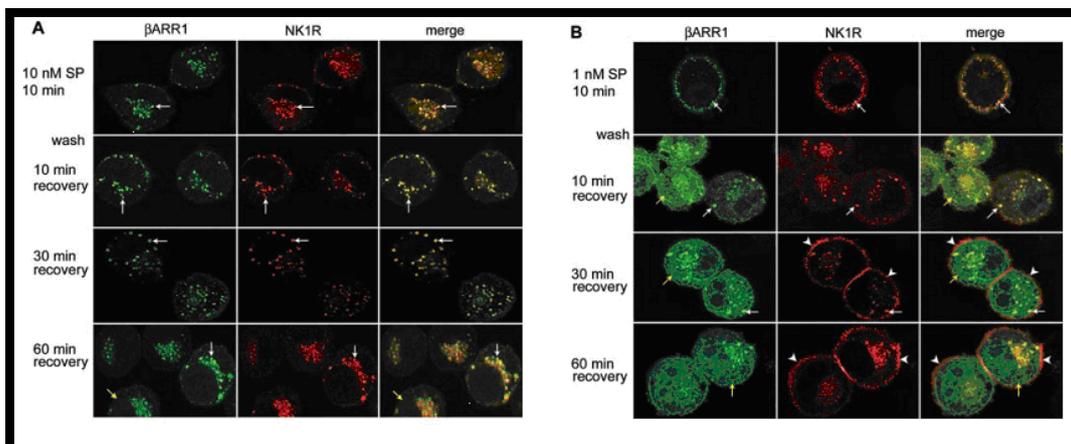


Figura 18. La SP estimula el tráfico de β -arrestina 1-GFP. Las células son incubadas con 10 nM (secuencia A) o con 1 nM (secuencia B) de SP durante 10 minutos a 37°C. A continuación se lavan y se incuban de nuevo por un periodo entre 0 y 60 minutos a 37°C. Posteriormente se fijan y se realiza la localización mediante inmunofluorescencia del NK1R y de la B-arrestina. La estimulación con 10 nM de SP induce una endocitosis mediada por β -arrestina 1 y NK1R 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 NK1R en las últimas fases del experimento. Se constató además una mínima depleción de β -arrestina 1 en el citosol. Tras 30 minutos el NK1R se detectó en la membrana celular de nuevo. (Imagen procedente de Graddy et al.²⁰¹).

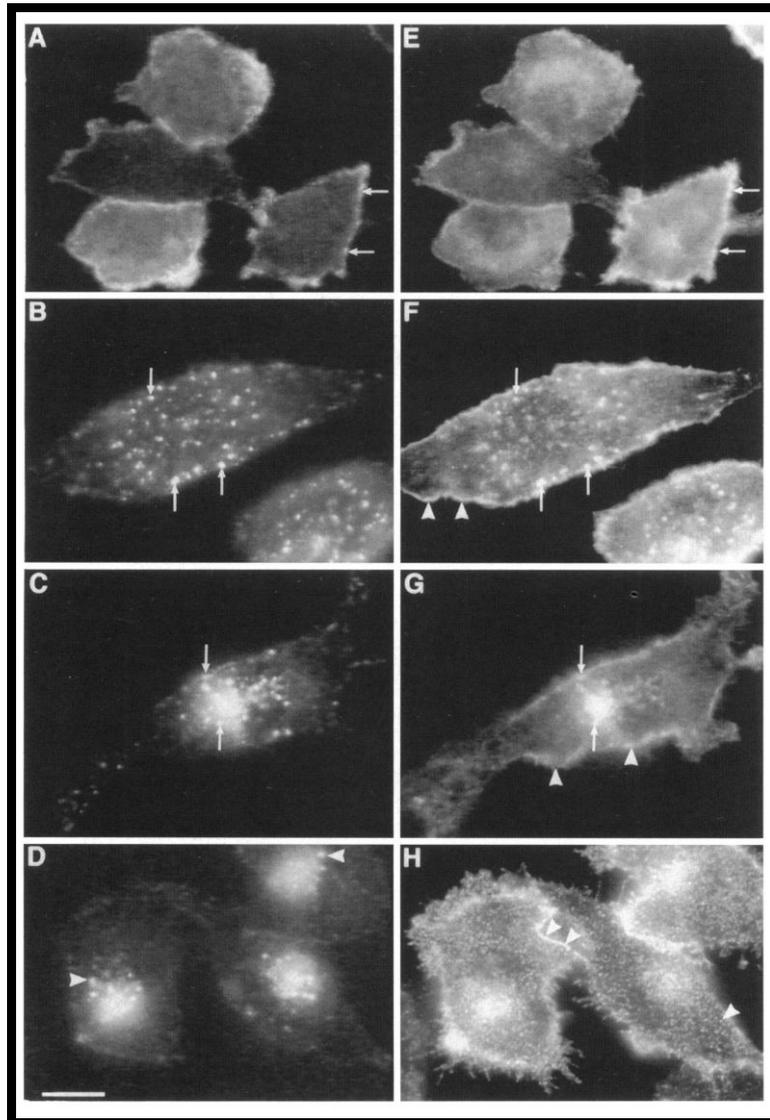


Figura 19. Detección de la inmunorreactividad de cy3-SP (paneles de la izquierda) y NK1R (paneles de la derecha). Las células se incubaron con 100 nM de cy3-SP durante 60 minutos a 4°C, posteriormente fueron lavadas y vuelta a incubar con un medio sin SP durante 0 minutos (A y E), 10 minutos (B y F), 30 minutos (C y G) y 120 minutos (D y H). A continuación fueron fijadas y mediante inmunorreactividad se localizó a cy3-SP y NK1R. 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 NK1R va volviendo a la membrana celular. (Imagen procedente de Graddy et al. ²⁰¹).

1.6. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES DE LAS TAQUICININAS

1.6.1. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES DE LAS TAQUICININAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El SNC, tanto en los cuerpos celulares, como en las fibras nerviosas presenta una gran inmunorreactividad para la SP. La distribución de la NKA es 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. Además de su papel como transmisor sensorial, las taquicininas están implicadas en una variedad de funciones como el control de las actividades motoras, funciones autónomas y endocrinas, así como procesamiento de la memoria ^{202 203 204 205 206}.

1.6.1.1. NEOCORTEX

La SP se encuentra a bajas concentraciones en el neocortex; no obstante, existen determinados estudios ²⁰⁷ que otorgan a la SP papel más relevante del que se había asumido. Así pues, 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. Por otro lado, 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 estudios²⁰⁸, muestran que la privación visual produce una gran 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 cerebral²⁰⁹.

1.6.1.2. NÚCLEO ESTRIADO

Los núcleos caudal y putamen muestran altos niveles de inmunorreactividad a SP. Microscópicamente, la tinción se lleva a cabo en los cuerpos neuronales y en los axones terminales. En los núcleos estriados de ratas se comprueba la existencia de dos tipos de neuronas que tiñen para SP: por un lado, neuronas de mediano tamaño, espiculadas, que parecen ser el origen de la proyección de SP que existe hacia la sustancia negra. El otro grupo de neuronas, de menor número y no espiculadas, conforman los circuitos neuronales locales del núcleo.

Aproximadamente, el 70% del total de las neuronas de los núcleos estriados de ratas son catalogadas del primer tipo, espiculadas y proyectadas hacia la sustancia negra, el área tegmental ventral y el globo pálido.

El núcleo estriado de los mamíferos está compuesto por dos compartimentos distintos, el estriosoma y la matriz. Estos compartimentos están dispuestos como un mosaico y presentan diferentes propiedades neuroquímicas. El estriosoma presenta altos niveles de SP, dinorfina y encefalina así como endopeptidasas que degradan estos péptidos anteriores. Además contiene altos niveles de dopamina y receptores muscarínicos. Por otro lado presenta menor nivel de acetilcolinesterasa que la matriz.

Diversos estudios autorradiográficos indican la existencia en este núcleo de grandes concentraciones del NK1R presentando por el contrario muy bajos niveles para NK2R Y NK3RR^{210 211 212}.

1.6.1.3. GLOBO PÁLIDO

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. El principal origen de la SP en el globo pálido proviene de la proyección existente a través de las neuronas del núcleo estriado. 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 por completo a las dendritas receptoras^{213 214}.

1.6.1.4. SUSTANCIA NEGRA

De entre todas las regiones cerebrales, la sustancia negra es de las que mayor concentración de SP posee. 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. Junto al área tegmental ventral, 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. La aplicación de SP mediante electroforesis sobre las neuronas de la sustancia negra produce una excitación mantenida de las mismas. El hecho de que la SP active las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales se ha visto reforzado por varios estudios²¹⁵: 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 de la misma.

Se ha demostrado también la existencia de 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 además cómo en la enfermedad de Párkinson ²¹⁶, 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 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 SP que para la NKA ²¹⁷.

1.6.1.5. HIPOCAMPO

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. Dentro del hipocampo, las fibras nerviosas que contienen SP se hayan principalmente en las capas piramidal y granular, en cambio, los cuerpos neuronales que expresan alrededor de su núcleo SP se hayan principalmente en la capa polimórfica. Se piensa que el origen de las

terminaciones nerviosas que contienen SP puede ser el núcleo supramamilar y el hipotálamo posterior.

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^{218 219 220}.

1.6.1.6. AMÍGDALA Y NÚCLEOS DEL LECHO DE LA ESTRÍA TERMINAL

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 amigdalario 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.

La amígdala y los núcleos del lecho de la estría terminal están relacionados con la regulación del comportamiento sexual, habiéndose detectado así una distribución y concentración 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 inmunoreactividad de la SP en la amígdala^{221 222}.

1.6.1.7. 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 amígdala²²³.

Algunos estudios mediante microscopía electrónica ²²⁴ 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. Además, mediante inmunofluorescencia se ha demostrado ²²⁵ la existencia de receptores de la SP en estas células. En ratas, la aplicación intraventricular de SP 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. Por el contrario la SP produce una elevación en plasma de prolactina ²²⁶.

La inyección intracerebroventricular de SP en la rata produce una típica respuesta de defensa cardiovascular basada en aumento de la presión sanguínea, frecuencia cardíaca, actividad simpática eferente y vasoconstricción visceral. Esta respuesta viene acompañada por un 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 evocan respuestas similares a las que producen la inyección intracerebroventricular.

Se piensa que 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. Por otro lado, en las ratas macho se ha visto que la inyección de SP en la región preóptica anterior del hipotálamo estimula la respuesta sexual mientras que la aplicación de antagonistas la inhibe ^{227 228}.

A excepción de los núcleos centromediales y posterolaterales, todas las regiones del tálamo presentan fibras nerviosas que contienen SP pudiendo proceder estas fibras del hipotálamo, regiones pretalámicas y terrenos del cerebro medio. Respecto a los cuerpos neuronales, prácticamente el 100% de ellos expresan SP en su interior²²⁹.

1.6.1.8. NÚCLEO ESPINAL DEL TRIGÉMINO

La distribución de las fibras inmunorreactivas a SP en la sustancia gelatinosa del núcleo espinal del trigémino en ratas es similar 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. Esta acción se ha comprobado tanto a nivel del ganglio como a nivel tisular periférico^{230 231 232}.

1.6.1.9. NÚCLEO DORSAL DEL VAGO, GANGLIO VAGAL Y GANGLIO GLOsofaríngeo

Se ha detectado la presencia de varicosidades y cuerpos celulares positivos a SP en el núcleo dorsal del vago tanto en gatos como en ratas²³³.

Respecto a los ganglios vagal y glossofaríngeo, poseen gran cantidad de cuerpos neuronales positivos a SP en conejos ²³⁴.

1.6.1.10. GANGLIOS AUTÓNOMOS PREGANGLIONARES

La principal localización de las neuronas simpáticas preganglionares es el núcleo intermediolateral en la médula torácica y lumbar. Este núcleo se tiñe intensamente para SP en numerosas especies de mamíferos. Se han hallado además NK1R 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.

En los núcleos parasimpáticos sacros, se han observado también tanto fibras que contienen SP como receptores. Estos núcleos regulan las funciones del tracto urinario bajo, el intestino grueso y los órganos sexuales ^{235 236}.

1.6.1.11. NÚCLEOS DE ASTA ANTERIOR DE LA MÉDULA Y NÚCLEOS MOTORES CRANEALES

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. 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 ^{237 238}.

1.6.1.12. GLÍA

Recientes estudios indican la existencia de receptores de taquicininas en líneas celulares de glía, astrocitos y líneas celulares de astrocitomas. Se piensa que la SP y la NKA podrían tener un papel en la regulación de la respuesta glial frente al daño del SNC^{239 240}.

1.6.2. DISTRIBUCIÓN Y FUNCIONES DE LAS TAQUICININAS EN TEJIDOS PERIFÉRICOS

A lo largo de los tejidos periféricos, la SP puede aparecer o bien en el interior de fibras nerviosas o bien sin relación con células neuronales. 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. Existen casos especiales como aquellas neuronas que se encuentra en la retina²⁴¹.

1.6.2.1. OJO

1.6.2.1.1. POLO ANTERIOR

Se ha podido documentar en numerosas especies la existencia de neuronas inmunorreactivas para SP en diferentes regiones del polo anterior del ojo como la cornea, iris y cuerpo ciliar. 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. También se ha visto como en el conejo la SP induce una contracción del músculo esfínter del iris, siendo revertida esta acción con la aplicación de un antagonista de la SP ^{242 243}.

1.6.2.1.2. RETINA

Las células de la retina de mamífero contienen SP, NKA, NKB y NPK. La mayor parte de estas células se encuentran en la capa ganglionar. Zalustsky y Miller ²⁴⁴ 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 de otros neurotransmisores, principalmente del GABA ^{245 246}.

1.6.2.2. VÍA AERO-DIGESTIVA SUPERIOR

1.6.2.2.1. CAVIDAD ORAL

Al igual que en el polo anterior del ojo, la pulpa dental de los gatos presenta una rica inervación de fibras positivas para SP que proceden del trigémino. 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 acompañada a esta sensación. A estas conclusiones se han llegado mediante la estimulación antidrómica del trigémino y la aplicación de antagonistas de la SP ^{52 247}.

1.6.2.2.2. 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^{49 248}.

En este sentido, 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^{249 250}.

1.6.2.2.3. GLÁNDULAS SALIVARES

Observando las concentraciones de SP en las glándulas salivares murinas, 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 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, pero en menor intensidad se comprueba también al administrar NKA. La función de las fibras sensoriales que contienen SP no está del todo clara. 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 péptidos) contribuyen particularmente a través de aquellas neuronas que son sometidas a estímulos de alta frecuencia²⁵¹.

1.6.2.2.4. FOSAS NASALES

Se ha demostrado la existencia tanto de SP como de NKA en el tracto respiratorio de numerosos mamíferos. En la mucosa nasal, las fibras que contienen SP se encuentran 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, pudiendo proceder en menor medida del ganglio pterigopalatino ^{252 253 254}.

1.6.2.2.5. LARINGE

La inervación sensitiva de la laringe se encuentra en la capa mucosa. 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 Nunes en 2004 ²⁵⁵ 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 era 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 lamina 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 20).

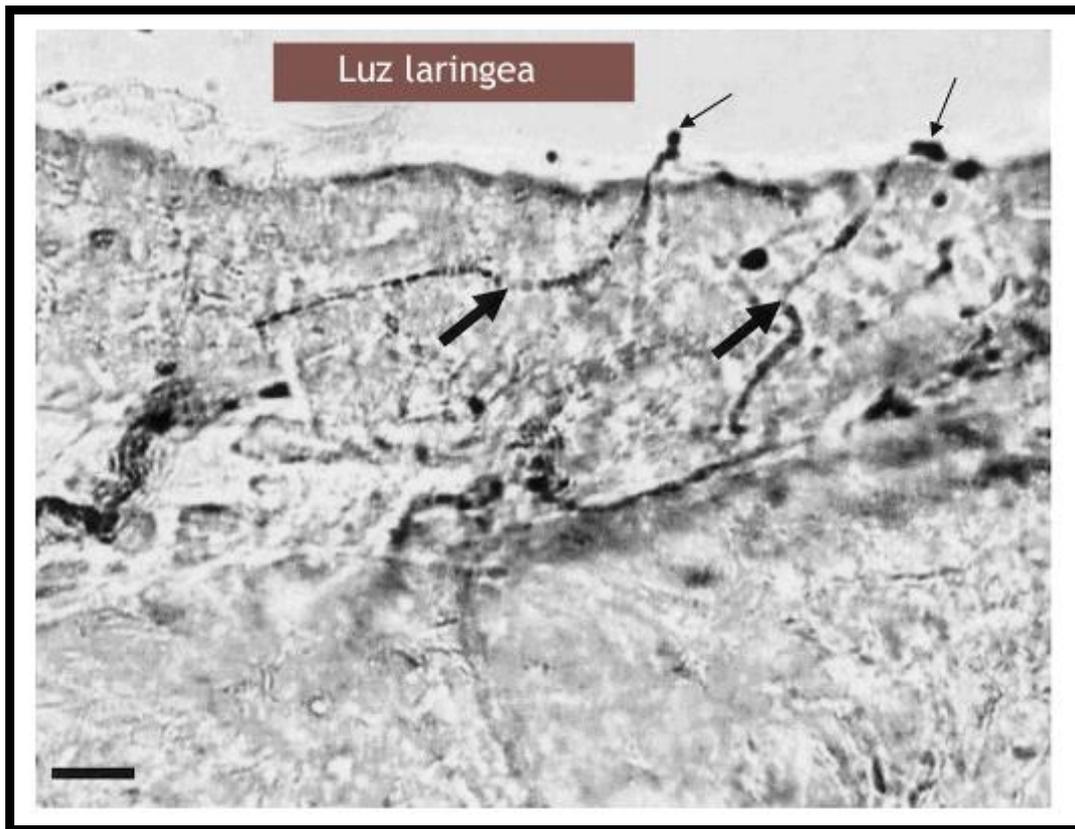


Figura 20. Inmunorreactividad de la SP en fibras nerviosas de mucosa laríngea. Las flechas indican las terminaciones nerviosas.
(Imagen procedente de Lima-Rodrigues et al. ²⁵⁵).

1.6.2.3. TRACTO GASTROINTESTINAL

La distribución y función de la SP en el tracto gastrointestinal es un tema que ha sido ampliamente estudiado durante los últimos 25 años. 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 ^{256 257} por un lado y Furness y Corta por otro ²⁵⁸. 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, NK1R, NK2R y NK3R 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 motilidad intestinal, la secreción de electrolitos y fluidos y mediar la respuesta inmune y vascular.

El papel principal de las taquicininas en el intestino es regular la motilidad. Las taquicininas 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 taquicinina. Respecto a la estimulación de la contracción, los NK1R abundan principalmente en las células intersticiales de Cajal mientras que los NK2R están presentes en las células musculares. Los NK3R 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 NK1R Y NK2R.

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 NK3R.

Las taquicininas también participan en el control neural de la actividad secretora del intestino por medio de los NK1R Y NK2R actuando sobre los enterocitos estimulando la secreción tanto de ácido clorhídrico como de bicarbonato. Además la SP y el NKA, por mediación de los NK1R y NK3R 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.

1.6.2.4. OTROS ÓRGANOS DEL SISTEMA DIGESTIVO

1.6.2.4.1. SISTEMA HEPATOBILIAR

Se ha documentado la existencia de SP en células de la vesícula y tracto biliar de numerosas especies. En la vesícula, las fibras que contienen SP predominan en los plexos ganglionares y musculares. En el hígado, estas fibras aparecen tanto en el parénquima como en el tejido conectivo presente en el hígado, así como en el sistema vascular hepático. 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. 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 NK2R. Se piensa además que las taquicinas pueden estar relacionadas con la inflamación existente por una colecistitis o colelitiasis, pues ciertos 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^{259 260}.

1.6.2.4.2. PÁNCREAS

En el páncreas también se ha comprobado la existencia de fibras inmunoreactivas a SP tanto en ratas como en cobaya. Existe una distribución dual de estas fibras; 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. Esta distribución doble sugiere que las fibras median funciones diferentes.

Respecto al páncreas exocrino 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^{261 262}.

1.6.2.5. APARATO RESPIRATORIO

Las taquicininas son unos de los agentes con mayor potencia broncoconstrictora de los que se conocen. La NKA es más potente incluso que la SP y la NKB induciendo esta acción en cobayas. Diversos estudios realizados en estos animales han demostrado que tanto el NK1R como el NK2R están relacionados con esta actividad²⁶³.

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. 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.

Se ha visto como la exposición a la mucosa de la vía aérea de irritantes mecánicos o químicos, como la capsaicina, el humo del tabaco y la formalina produce una respuesta protectora que consiste en broncoconstricción, estornudo, aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, secreción mucosa y estimulación de la actividad mucociliar²⁶⁴. Esta respuesta puede reproducirse mediante la estimulación antidrómica de los nervios responsables. Debido a esto se piensa que las taquicininas pueden tener un papel relevante en algunas enfermedades crónicas de la vía aérea como el asma. 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.

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. 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 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.

Respecto al aclaramiento mucociliar también se ha detectado un incremento de su actividad 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 capsaicina, humo de tabaco y bradiquininas^{265 266 267}.

1.6.2.6. SISTEMA CARDIOVASCULAR

1.6.2.6.1. CORAZÓN

En el corazón existen numerosas localizaciones en las que se pueden encontrar fibras que contengan tanto SP como CGRP. Algunos estudios^{268 269} realizados en cobayas indican que las paredes de las aurículas y ventrículos, las válvulas, las inmediaciones de vénulas, los vasos coronarios y las células cardíacas ganglionares expresan SP. Otras especies estudiadas son los perros, los gatos, las ovejas, incluso en los humanos²⁷⁰. En estas especies existen sobre todo diferencias en la concentración de taquicininas, manteniéndose constante la distribución.

El origen de estas fibras, en el cobaya, son aferencias primarias cardíacas provenientes de los ganglios de la raíz dorsal.

Respecto a sus funciones, 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 cardiaca ²⁷¹.

1.6.2.6.2. VASOS SANGUÍNEOS

Diversos estudios ²⁷² muestran 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. 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 NK1R. Esta acción parece estar relacionada con la liberación por parte de las células endoteliales de algún factor relajante ¹⁸⁹.

1.6.2.6.3. CUERPO CAROTÍDEO

Algunos estudios inmunohistoquímicos muestran como 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. Esto hace pensar que la SP puede estar relacionada con el mecanismo desencadenado frente a la hipoxia tanto en el cuerpo carotídeo como el núcleo solitario ^{273 274}.

1.6.2.7. SISTEMA UROGENITAL

1.6.2.7.1. RIÑÓN Y URÉTERES

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 menudo 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.

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.

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. Estos y otros 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^{275 276}.

1.6.2.7.2. 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 cobayas²⁷⁷.

Existen pruebas que indican que las taquicininas podrían estar relacionadas con el mecanismo reflejo de la micción. La aplicación local de taquicininas y capsaicina a este nivel produce contracción de la musculatura lisa de la vejiga, Esta contracción, mediada por los NK1R Y NK2R, 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 parasimpáticos. Como en otras regiones, la SP estaría relacionada con la transmisión del dolor a este nivel en distintas patologías vesicales²⁷⁸.

1.6.2.7.3. ÓRGANOS GENITALES

El útero, ovarios y vagina son también órganos donde 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 taquicinas producen un aumento de la vascularización así como induce la contracción uterina. Algunos estudios²⁷⁹ 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^{280 281 282}.

Por otro lado, 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. Además, en humanos la SP tiene una respuesta bifásica respecto a la motilidad de los espermatozoides, a bajas concentraciones ($4 \times 10^{-7} \text{M}$) produce un leve incremento, a altas concentraciones ($>10^{-6} \text{M}$) una marcada reducción de la motilidad^{283 284}.

1.6.2.8. SISTEMA ADRENAL

Se ha detectado que numerosas especies de mamíferos expresan SP en sus glándulas adrenales, entre ellas, 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 bajas concentraciones produce una protección contra la desensitización de la respuesta nicotínica, a altas concentraciones, la SP induce una inhibición en la liberación de catecolaminas^{285 286}.

1.6.2.9. SISTEMA MÚSCULO ESQUELÉTICO

1.6.2.9.1. MÚSCULO ESQUELÉTICO

Las fibras musculares y los vasos sanguíneos presentan fibras nerviosas que expresan SP a este nivel. 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. Existen pruebas que indican que la SP podría tener un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo hacia los músculos esqueléticos. 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^{287 288}.

1.6.2.9.2. HUESO Y ARTICULACIONES

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. 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^{289 290}.

1.6.2.10. PIEL

Diversos estudios sobre este órgano 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. El hecho de que la SP esté presente en las fibras C de la piel indican que cumplen un papel fundamental en la nocicepción^{291 292}.

1.6.3. PAPEL DE LAS 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 alérgicas²⁹³ e inflamatorias²⁹⁴, así mismo, pueden tener un papel relevante en la cicatrización de las heridas y el mantenimiento de la integridad tisular (Figura 21 y 22).

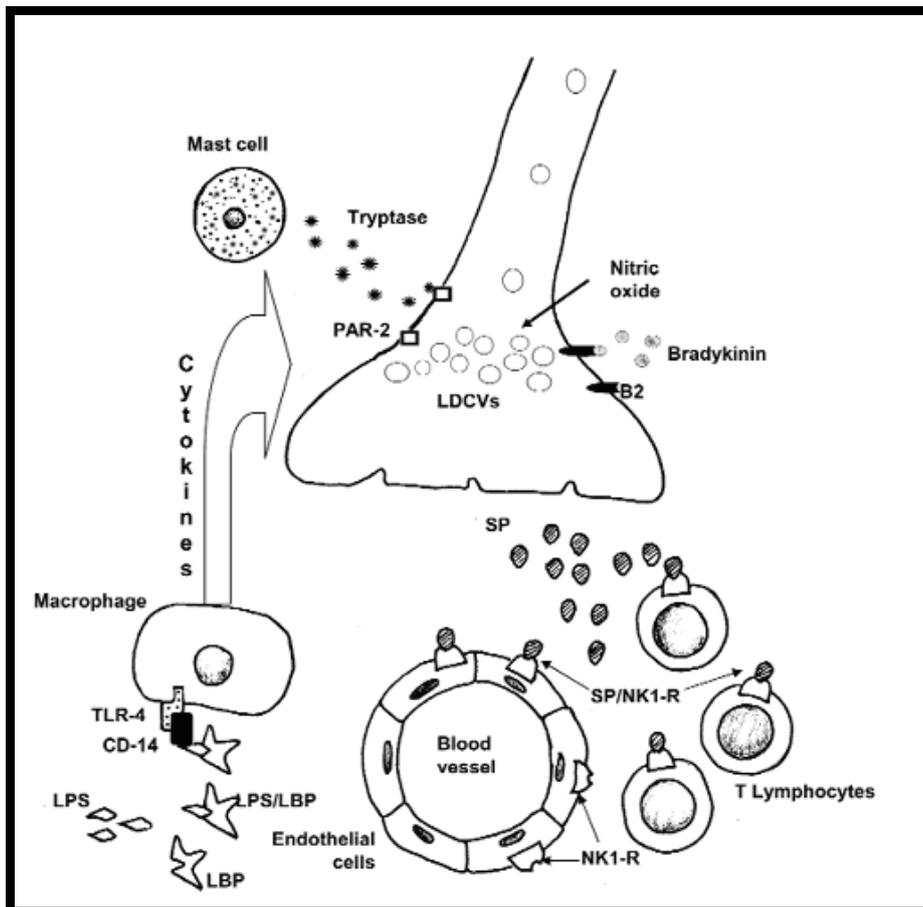


Figura 21. Factores que determinan la liberación de SP desde las terminaciones nerviosas sensitivas. La SP se libera a partir de la terminación nerviosa mediante la fragmentación del PAR-2 (receptor activado por proteasas-2) por medio de la triptasa. Además, la liberación es estimulada por otros factores 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 NK1R 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 al.²⁹⁵).

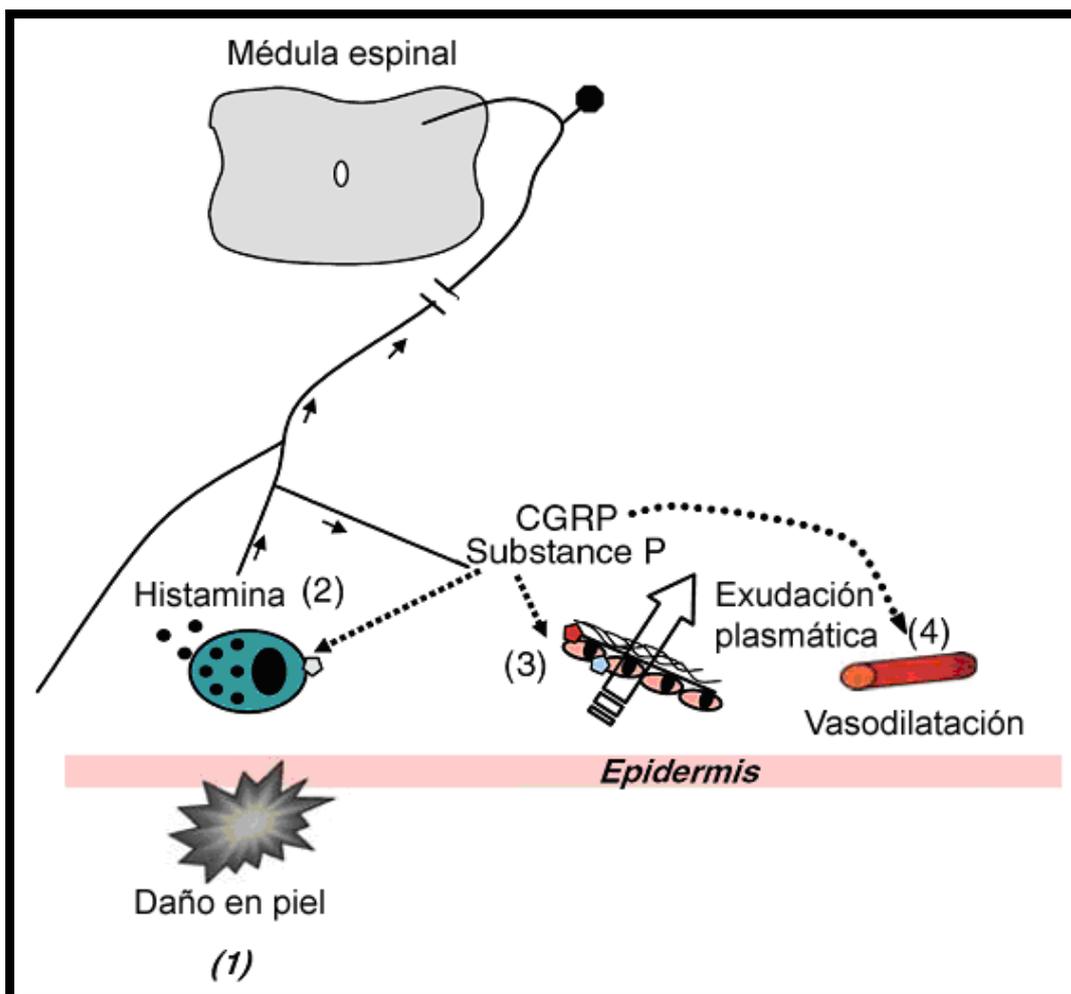


Figura 22. Esquema sobre los eventos que ocurren tras producirse un daño en la piel. Tras el daño (1) suele ocurrir una activación de los mastocitos y una liberación de histamina. Ésta activa los terminales de las neuronas sensitivas mediante el receptor de histamina 1 (2) de tal modo que produce una 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 NK1R 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 Cox. ²⁹⁶).

1.6.3.1. INFLAMACIÓN

1.6.3.1.1. CONTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS AFERENTES SENSIBLES A CAPSAICINA

La triple respuesta cutánea descrita por Lewis ²⁹⁷, desencadenada ante un daño mecánico, térmico o químico, 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 respuesta ²⁹⁸.

1.6.3.1.2. EL PAPEL DE LAS TAQUICININAS EN LA INFLAMACIÓN

Se ha hablado ya del 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 tejidos ²⁹⁹.

Al inyectar en la piel humana 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 plasmática ³⁰⁰.

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 mencionados ³⁰¹.

Todos datos indican que las taquicininas tienen un papel relevante en la inflamación.

1.6.3.1.3. ERITEMA Y VASODILATACIÓN

La extensión de 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 respuesta ³⁰². 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 estudios ⁶⁴ *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 reflejo 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. Esta cascada de mutuas activaciones de las fibras aferentes y los mastocitos tienen la función de prolongar y expandir la respuesta inflamatoria.

1.6.3.1.4. 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 NK1R existentes alrededor de los capilares venosos en la piel.

1.6.3.1.5. 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. Además, 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, el incremento de la permeabilidad vascular favorece la extravasación de leucocitos, por otro, parece inducir cierta quimiotaxis leucocitaria ³⁰³.

Otros autores sugieren que la degranulación de mastocitos inducida por la SP también puede aumentar la migración leucocitaria ³⁰⁴.

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 araquidónico ³⁰⁵.

1.6.3.2. SISTEMA INMUNITARIO

Ya se ha señalado previamente que la SP puede influir sobre los leucocitos a través de las citoquinas. No obstante, existen otros mecanismos como la estimulación directa sobre los linfocitos ³⁰⁶.

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 NK1R tanto en linfocitos B, T como en las células natural killers (NK).

Se pueden observar 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%³⁰⁷. 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.

Existe un estudio que muestra como la dexametasona reduce en gran cantidad el número de RNA mensajeros del receptor de taquicininas explicando así, al menos en parte, el poder antiinflamatorio y supresor de la inmunidad³⁰⁸.

En la siguiente tabla se presenta el efecto de la SP sobre las distintas células del sistema inmunitario (Tabla 3).

1.6.3.3. CICATRIZACIÓN DE HERIDAS Y FUNCIONES TRÓFICAS

Ciertos estudios³⁰⁹ han demostrado como las neuronas sensoriales sensibles a capsaicina llevan a acabo una función trófica de los tejidos. 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 DNA en diversos tejidos estudiados y así en el tejido vascular³¹⁰ se ha constado 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 NK1R.

Linfocitos
Potente quimiotáxis
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 quimiotáxis
Estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias
Induce la "explosión oxidativa"
Estimula la síntesis y liberación de metabolitos del ácido araquidónico
Los macrófagos expresan NK1R y segregan SP
Neutrófilos
Potente quimiotáxis
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 quimiotáxis
Estimula la activación, degranulación, liberación de O ₂ - y tromboxano
Los eosinófilos pueden segregar SP

Tabla 3. Efectos de la SP sobre las células del sistema inmunitario.

1.6.4. PAPEL DE LAS NEUROKININAS EN LA NOCICEPCIÓN

La mayoría de las fibras C-aférentes que expresan SP pertenecen a distintos tipos de nociceptores que se activan mediante estímulos térmicos, químicos y mecánicos ya sea en la piel o bien por distensión visceral³¹¹.

Estas neuronas, al ser estimuladas, liberan SP, NKA y CGRP a partir de sus terminales tanto centrales como periféricas. 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

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

la percepción del dolor, modulación del reflejo protector de flexión así como varios reflejos autónomos y respuestas endocrinas.

Por otro lado, 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 disminución de la sensibilidad al dolor, presenta una reducción de la concentración de SP en los axones de la sustancia gelatinosa ³¹².

1.7. ANTAGONISTAS DEL NK1R

Como se ha visto anteriormente, el NK1R 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 NK1R y por otro establecer las posibles aplicaciones terapéuticas de los antagonistas de los NK1R.

A finales del siglo pasado se desarrollaron una serie de ligandos para el NK1R de tipo peptídico y no peptídico. Dentro de los tipos 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 del triptófano y derivados piperidínicos entre otros ³¹³.

1.7.1. ANTAGONISTAS DEL NK1R PEPTÍDICOS

Los principales agonistas peptídicos del NK1R son, además de la SP, Septide (Figura 23), GR 73632 y Cycloseptide. Por otro lado, los principales antagonistas de tipo peptídico son el Spantide y Spantide II.

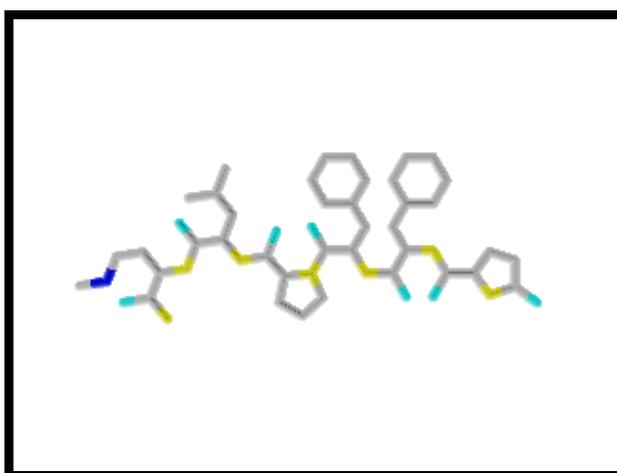


Figura 23. El agonista del NK1R SEPTIDE.
(Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

A lo largo de los años 80^{314 315} 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 24). Estos dos antagonistas son de tipo peptídico lineal. Con posterioridad se desarrollaron otros antagonistas peptídicos de tipo cíclico como el FK 224 que tiene la particularidad de actuar sobre el NK1R y NK2R lo cual podría tener ciertas aplicaciones terapéuticas o el L-668,169 con una gran afinidad sobre el NK1R. Las investigaciones posteriores se encaminaron a desarrollar un antagonista mediante la delección 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.

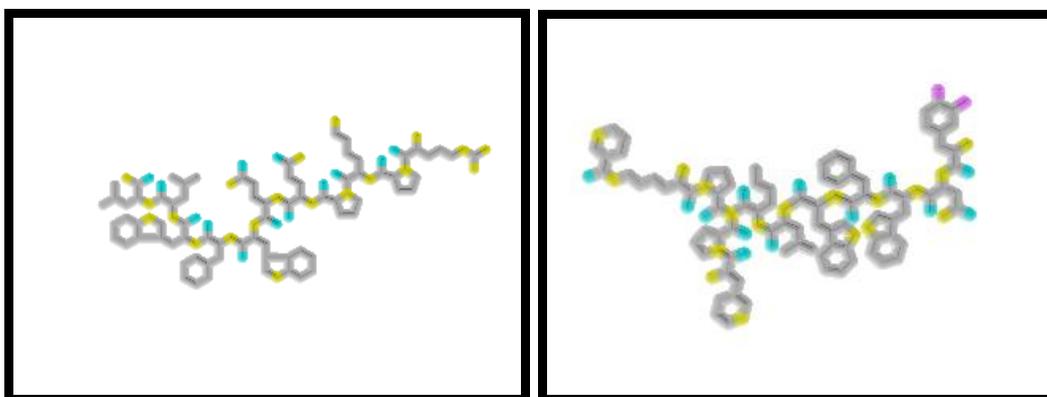


Figura 24. Los antagonistas peptídicos del NK1R SPANTIDE Y SPANTIDE II. (Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

1.7.2. ANTAGONISTAS DEL NK1R NO PEPTÍDICOS

Los antagonistas no peptídicos se desarrollaron a partir de inicios de los años 90^{65 316} cuando tres diferentes grupos de investigación divulgaron sus resultados. Desde entonces hasta ahora se han desarrollado un gran número

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 quinucledinos destacan el CP 96345 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.

1.7.2.1. ANTAGONISTA L-733,060

El L-733,060 (2S,3S)-3-[[3,5-bis(trifluorometil)benzil]oxy]-2-fenilpiperidina), es un fármaco desarrollado por los laboratorios Merck, Sharpe & Dohme. Se trata de un antagonista no peptídico del NK1R que pertenece a la familia de la benzileter piperidinas. Presenta un IC₅₀ de 1.0 nM en el NK1R humano. Su peso molecular es 403.361. Es activo por vía oral ^{317 318} (Figura 25).

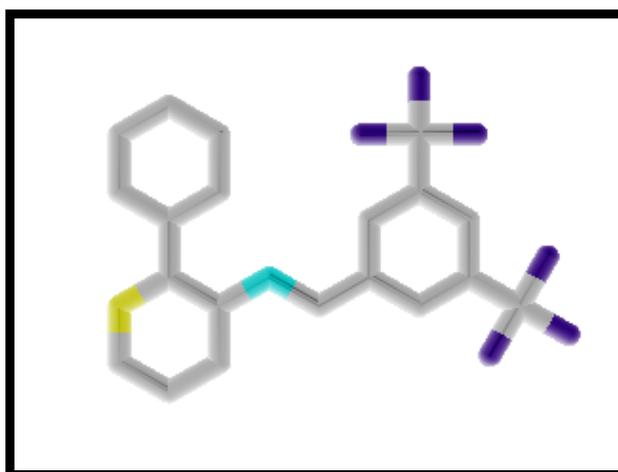


Figura 25. El antagonista no peptídico del NK1R L-733,060.
(Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

1.7.2.2. 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 NK1R. 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 472.4³¹⁹ (Figura 26).

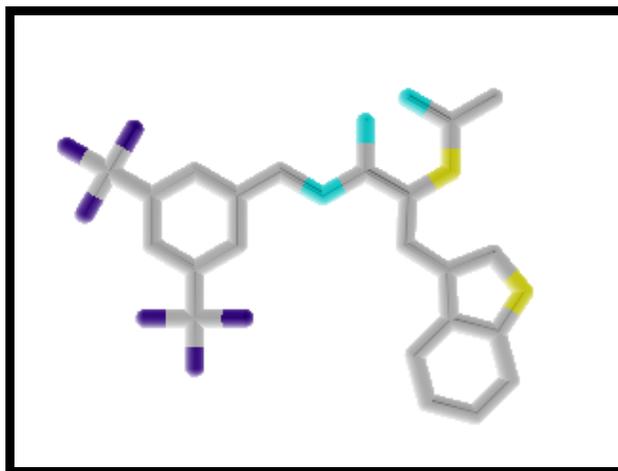


Figura 26. El antagonista no peptídico del NK1R L-732,138.

(Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

1.7.2.3. APREPITANT

El Aprepitant³²⁰ es un antagonista de los receptores de la SP/NK1R, 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 27).

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.

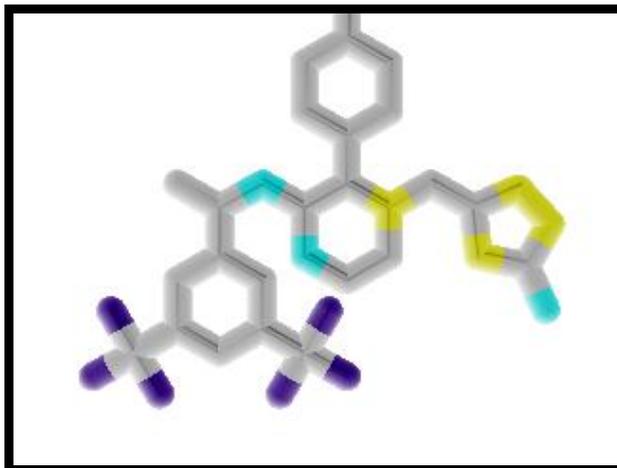


Figura 27. El antagonista no peptídico del NK1R APREPITANT.
(Imagen tridimensional generada con el software SweetMollyGrace 1.3).

En modelos en animales, se ha demostrado que inhibe la emesis inducida por agentes quimioterapéuticos citotóxicos, entre ellos, cisplatino, mediante acciones centrales. 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 NK1R. 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 demoradas de emesis inducida por cisplatino.

La biodisponibilidad oral absoluta media del Aprepitant es de aproximadamente el 60% al 65% y la concentración plasmática máxima media se alcanza aproximadamente a las 4 horas. 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.

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

Los estudios *in vitro* con microsomas hepáticos humanos indican que se metaboliza principalmente por CYP3A4 con metabolismo menor por CYP1A2 y CYP2C19. El metabolismo ocurre principalmente mediante oxidación en el anillo de morfolina y sus cadenas laterales. 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.

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

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.

1.8. APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R

La única aplicación terapéutica en el momento actual para los antagonistas del NK1R 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 Medicamento ³²¹.

Se ha relacionado la SP con varios actos fisiológicos como son la emesis inducida por quimioterapia, el desarrollo del sistema inmune, cambios en el tono cardiovascular, la regulación de la motilidad gastrointestinal, 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 estrés ³²².

A continuación se hace un breve repaso de los distintos campos médicos donde se están investigando y desarrollando novedades terapéuticas relacionadas con la acción de la SP y los antagonistas de los NK1R.

1.8.1. TRASTORNOS PSIQUIÁTRICOS Y SP

Se ha objetivado la relación existente entre la SP y el desarrollo de enfermedades psiquiátricas como son la ansiedad y la depresión. Hay numerosos estudios ^{323 324 325} que apoyan esta afirmación y que investigan nuevos tratamientos para dichas enfermedades basándose en la fisiopatología de la SP.

Ciertos ensayos clínicos a doble ciego realizados en ratones indican que tras la administración de antagonistas del NK1R, se produce un incremento a largo plazo de la transmisión de serotonina en el hipocampo ³²⁶. 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 NK1R 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 Science ³²⁷ comparó el antagonista del NK1R 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.

1.8.2. SP Y EL DOLOR

Se ha comprobado electrofisiológicamente 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 dolor ³²⁸.

La SP está relacionada con los mecanismos dolorosos ya que está presente en las fibras-C, que son las aferentes primarios relacionados con la neurotransmisión del dolor. Se ha comprobado 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 morfomiméticos 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.

Los morfínomiméticos (denominadas encefalinas y endorfinas) son compuestos naturales, de estructura química semejante a la morfina. 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 tumor³²⁹.

En otro estudio 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 CGRP³³⁰.

Otros estudios³³¹ 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).

Deal et col.³³², en la Case Western Reserve University, en Cleveland , 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 aumentó la producción del enzima colagenasa y de prostaglandinas, reduciendo tanto el dolor como la inflamación³³³. 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.

1.8.3. INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA Y SP

La inflamación neurogénica también ha sido relacionada con la SP, de tal forma que dicha inflamación conlleva la liberación de SP desde los nervios sensitivos en respuesta al dolor o a la infección.

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 atropina³³⁴.

Además de en la inflamación neurogénica 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 NK1R, 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, mejor que la histamina, se podía implicar en la hipersensibilidad producida por el Paclitaxel ³³⁵.

1.8.4. SP EN LAS EMESIS POSTQUIMIOTERAPIA

Las náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia desempeñan un papel importante en la calidad de vida de los pacientes e influyen decisivamente en el mantenimiento de la quimioterapia, por lo que, potencialmente, un control adecuado de las mismas salvaría vidas, mejorando al menos los resultados del tratamiento quimioterápico ³³⁶.

Ninguno de los fármacos antieméticos disponibles en la actualidad es completamente eficaz 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. Hasta ahora se usaban fármacos eficaces sólo durante las primeras 24 horas.

Los antagonistas del NK1R 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-HT₃ ³³⁷, que actúan entre el segundo y el quinto día posteriores a la quimioterapia y que son efectivos en el 70% de los casos.

Dado que se sabe que la SP está en las regiones del troncoencéfalo asociadas con los vómitos, Navari et col.³³⁸ investigaron la posibilidad de que un antagonista del NK1R pudiera prevenir las náuseas y los vómitos agudos y retardados en los pacientes sometidos a tratamientos de quimioterapia. El estudio se realizó con pacientes en tratamiento con Cisplatino. Todos recibieron Granisetron y Dexametasona previo al tratamiento con Cisplatino y posteriormente se randomizaron en tres brazos, dos de los cuales contenían el antagonista de NK1R 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 NK1R.

Así pues, este estudio demostró que el antagonista del NK1R proporcionaba un beneficio adicional, más allá del tratamiento antiemético estándar en la prevención de náuseas y vómitos agudos y retardados.

Se realizaron dos estudios ³³⁹ controlados, aleatorios, doble ciegos, paralelos y multicéntricos (con al menos 520 pacientes en cada estudio), 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 ha esta amplia distribución es importante tener un método adecuado para manejar y controlar las dosis terapéuticas de los fármacos antagonistas de los NK1R, 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 NK1R, el [(18)F]SPA-RQC, para determinar los niveles de ocupación de los NK1R alcanzados a nivel central, tras la administración de dosis relevantes de Aprepitant (fármaco antagonista de los NK1R) en individuos sanos.

Para ello se desarrollaron dos estudios placebo-control, simple-ciego y randomizados, cuyos resultados mostraron que la ocupación de los NK1R 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 SNC ³⁴⁰.

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

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

Central y del Sur, Inglaterra y Europa, convirtiéndose de esta forma en el primer fármaco antagonista del NK1R comercializado.

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.

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.

1.9. ACTIVIDAD ONCOGÉNICA DE LA SP Y DEL NK1R

1.9.1. RELACIÓN ENTRE SP-NK1R Y ONCOGÉNESIS

Numerosas publicaciones avalan la posibilidad de la implicación de la SP en la oncogénesis en distintos órganos^{334 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361}, entre ellas se pueden destacar:

- 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 colorectal humanos: HT-29

De manera detallada se presentan los estudios que existen hasta la actualidad sobre la actividad oncogénica de la SP y el NK1R:

1.9.1.1 CÁNCER DE MAMA

En un estudio realizado por Singh y colaboradores en el año 2000³⁴⁶, se investigó el papel de PPT-I y de sus receptores (NK1R y NK2R) en el cáncer de mama y sus metástasis, para ello se utilizó el análisis cuantitativo con RT-PCR, ELISA e hibridación in situ.

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); se demostró una expresión creciente de

PPT-I y de NK1R. Los niveles de NK2R eran altos en células normales y malignas. Los antagonistas específicos del NK1R y NK2R inhibieron la proliferación celular, sugiriendo un estímulo autocrino o intercrino por los péptidos de PPT-I en el cáncer de mama.

El antagonista del NK2R 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 mayoría de los pacientes que sufren cáncer de mama no mueren debido al tumor primario sino al desarrollo de metástasis. 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.

En una investigación realizada por Lang y colaboradores³⁵⁴ 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 β 2-adrenales, el receptor D2 o el NK1R, 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 α 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 inmunoblotting, 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 cuál se puede prevenir por los antagonistas de los neurotransmisores. En un estudio previo ³⁶² 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 una fuerte implicación reguladora de estos neurotransmisores en la migración de células del cáncer de mama.

1.9.1.2. CÁNCER PANCREÁTICO

El NK1R y su ligando la SP están implicados en la patogénesis de ciertos tumores neuronales. La expresión del NK1R 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. Además, se ha analizado mediante sulforhodamine B la influencia de los análogos de la SP y de los antagonista del NK1R (MEN 11467) en el crecimiento celular del cáncer pancreático.

Por RT-PCR, se ha comprobado que el mRNA del NK1R 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 NK1R 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 NK1R fueron escasas y débilmente presentes en células acinares y ductales de páncreas sano. En contraste, se detectaron intensas señales del mRNA del NK1R y de inmunorreactividad en la mayoría de las células de cáncer.

Mediante análisis de Western-Blot, se comprobó que el NK1R estaba incrementado un 26 % ($p < 0.01$) en muestras pancreáticas del cáncer en comparación a los controles sanos.

El mRNA del NK1R 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 NK1R, constatándose que este efecto se podría bloquear por un antagonista selectivo del NK1R.

Estos resultados ilustran que el NK1R está activo en la patogenia del cáncer pancreático humano y tiene el potencial de contribuir al crecimiento de células cancerígenas ³⁴⁴.

Otro estudio ³⁶³ examina el [D-Arg(1),D-Trp(5,7,9),Leu(11)]SP (SP-A) en los cánceres pancreáticos ductales. 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 DNA y el crecimiento *in vitro*.

El SP-A también disminuyó perceptiblemente el crecimiento del tumor de HPAF-II en ratones desnudos 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.

1.9.1.3. LEUCEMIA

Nowicki y colaboradores realizaron un estudio ³⁶⁴ que se centró en 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 RNA mensajero y de niveles de producción de proteínas. También se intentó demostrar una correlación de la SP tanto con factores de riesgo de la leucemia, como con los fracasos terapéuticos.

El grupo de estudio consistió en 120 niños tratados por linfoblástica aguda infantil. La expresión del SP fue examinada por hibridación *in situ* con una sonda de 5'-biotinylated y por inmunohistoquímica con un anticuerpo específico anti-humano de SP.

Entre los 80 pacientes con linfoblástica aguda común, la expresión del SP fue demostrada en 33 casos (41.2%). En el grupo de 24 niños con linfoblástica aguda infantil pre-B, la presencia del SP fue observada en seis casos (25.0%). Y de los 16 pacientes con leucemia de células T, la expresión del SP fue demostrada en 13 casos (81.2%). El porcentaje de células inmunopositivas en los casos SP-positivos se extendió del 79.8 al 97.3.

El fracaso terapéutico en los niños con linfoblástica aguda infantil fue correlacionado con la expresión de SP observada al principio del tratamiento.

Los resultados demostraron una conexión entre la presencia de expresión de SP positivas y la recaída de la leucemia. Esto podría indicar que

la expresión de SP estaría implicada en la proliferación de células tumorales y podría representar un nuevo factor de riesgo en leucemia linfoblástica aguda.

1.9.1.4. CÁNCER DEL SNC

Existen varios estudios que han investigado la relación entre la SP y los antagonistas de los NK1R y distintos tipos de tumores que se desarrollan en el SNC.

En este sentido se realizó un estudio *in vitro*³³⁴ para valorar la capacidad inhibitoria de un potente antagonista de acción prolongada del NK1R, 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 NK1R) 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 NK1R, podría constituir 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 NK1R. 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 NK1R, 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*,³⁶⁵ 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 NK1R como acercamiento terapéutico a los gliomas malignos.

En uno de estos estudios³⁶⁶ 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 NK1R (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 NK1R³⁵⁸.

En un estudio realizado por Berger³⁶⁷ en 2005 se investigaba la implicación de otras taquicininas, 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 NK1R. Se observó que la HK-1 y la SP estimulaban la movilización de Ca²⁺ 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 NK1R 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.

1.9.1.5. CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón de células pequeñas es un cáncer particularmente agresivo que metastatiza de forma temprana. A pesar de su sensibilidad inicial a la radio y a la quimioterapia, su recaída es invariable, de modo que la supervivencia a los dos años sigue siendo menor al 5%.

El [Arg(6),D-Trp(7,9),N(me)Phe(8)]-sustancia P (6-11) (SP-G) 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. En un estudio realizado por Mackinnon y colaboradores³⁶⁸ se demostraba que el SP-G estimulaba 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.

Además, el SP-G 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 SP-G 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 SP-G en cánceres no neuropéptido-dependientes.

Estos resultados se ampliaron y se demostró que el estímulo que ejercía el SP-G 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 SP-G 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 SP-G 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 SP-G aumentaba la inhibición del crecimiento inducida por el Etoposido.

Los resultados obtenidos sugerían que el SP-G 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 agresivo ³⁶⁹.

Como se vio en el anterior estudio el SP-G 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 a SP-G.

En varias líneas celulares tumorales (cáncer de pulmón de células pequeñas y resto de cáncer de pulmón, ovárico, colorectal 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 a SP-G *in vitro* e *in vivo*.

Las líneas celulares tumorales exhibieron una variedad de sensibilidades a los valores de SP-G (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 SP-G. Además, la introducción del receptor de GRP en fibroblastos de rata aumentó su sensibilidad a SP-G.

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 a SP-G 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 convencional ³⁷⁰.

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 estudio ³⁷¹ 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) (SP-G) 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 Etoposido. 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 SP-G 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.

1.9.1.6. MELANOMA

Un estudio realizado por Muñoz et al.³⁴³ intenta demostrar la implicación existente entre la SP y el desarrollo tumoral en líneas celulares de melanoma. Para ello utiliza una molécula antagonista de los NK1R, como terapia para inhibir el crecimiento tumoral.

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 NK1R 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 μM a las 30 h y 31.5 μM a las 72 h para COLO 679.

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.

1.9.1.7. RETINOBLASTOMA

Otro estudio de Muñoz et al.³⁴⁹, publicado en Julio del 2005, se plantea si la activación del NK1R induce la proliferación de células tumorales del retinoblastoma. Éste 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 NK1R) actúa en ambas líneas celulares humanas del retinoblastoma como un agente antitumoral.

1.9.2. ACTIVIDAD ONCOGÉNICA DEL COMPLEJO SP/NK1R

El mecanismo por el que la SP y el NK1R favorecerían la aparición y desarrollo de tumores no es del todo conocido.

En términos generales, cuando el complejo SP/NK1R se activa, se produce una serie de respuestas intracelulares que conllevan la activación de la cascada de las MAPK. 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^{372 373}.

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 NK1R 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 sometidos a 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 supervivencia³⁷⁴.

En resumen, la SP es un ubicuo mediador de la inflamación que, presente a concentraciones picomolar en tejidos humanos, actúa como vínculo entre 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 NK1R 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 NK1R, podrían ser debidos a la pérdida de esas señales mitogénicas inducidas por el NK1R 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. Así la relación entre depresión, estrés crónico, estado inflamatorio y cáncer podría estar mediada por la SP.

Todos estos datos, apoyado por los numerosos artículos que vinculan la SP con el crecimiento de ciertas líneas celulares de cáncer hacen que los antagonistas del NK1R deban ser considerados como una posible alternativa para el tratamiento del cáncer.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los objetivos globales del presente trabajo son los siguientes:

1. Investigar la existencia de Sustancia P (SP) y su receptor (NK1R) en el epitelio laríngeo, cáncer de laringe y sus metástasis mediante inmunohistoquímica.

2. Estudiar la acción antitumoral *in vitro* de los antagonistas del NK1R en la línea celular de cáncer de laringe Hep-2. Como sub-objetivos específicos se plantean:

2.1. Determinar la existencia de los NK1R en la línea celular de cáncer de laringe Hep-2 mediante Western blot.

2.2. Constatar si la SP, tras unirse al NK1R, induce un aumento en la mitogénesis en la línea celular de cáncer de laringe Hep-2.

2.3. Analizar si la presencia de los antagonistas del NK1R, L-733,060 y L-732,138, inhibe la proliferación celular de la línea Hep-2 de cáncer de laringe.

2.4. Evaluar si los antagonistas del NK1R, L-733,060 y L-732,138, inducen la apoptosis celular de la línea Hep-2 de cáncer de laringe mediante la técnica DAPI.

III. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL FUNGIBLE

- Frascos de cultivo no pirógenos estériles de 25 o de 75 cm². (Falcon. Heidelberg. Alemania)
- Criotubos de 1,8 ml (Nunc Internacional. Dinamarca)
- Pipetas serológicas estériles de 10, 5 y 1 ml. (Becton Dickinson. Francia)
- Pipetas de Pasteur estériles desechables de 3 ml.
- Cámara de contaje celular con 10 gradillas. (Kova Hycor Biomedical Inc. California. EEUU.)
- Tubos de propileno con fondo cónico Falcon de 15 ml para centrifugar. (Becton Dickinson. Francia)
- Placas de siembra con 96 pocillos Nunclon TM Surface. (Nunc Internacional. Dinamarca)
- Tubos Eppendorf de 1,8 ml. (Daslab Nirco)
- Puntas de pipetas estériles de 1-10 µL y 20-200 µL.
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio, sal (MTS) CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corp., Madison, USA).
- Medios de cultivo RPMI 1640 y D-MEM (GIBCO, Barcelona, España).
- L glutamina 2 mM (GIBCO, Barcelona, España).
- Estreptomina (GIBCO, Barcelona, España).
- Penicilina (GIBCO, Barcelona, España).
- Heppes buffer 10 mM (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, USA).
- Azul tripan (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Dimetil sulfoxido (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Tripsina Ácido Etilen-Diamino-Tetracético (tripsina 0,05% y 0,02% EDTA sin Ca²⁺ y Mg²⁺ (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Suero fisiológico.
- Suero bovino fetal (GIBCO, Barcelona, España).
- Albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

- Igepal al 20% (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Revelador ECL (Amersham Life Science USA).
- Membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Bio assay. Protein reagent (Bio-Rad).
- Ditiotritol (GIBCO, Barcelona, España).
- Dodecil sulfato de sodio (Serva Heidelberg Germany).

3.1.2. MATERIAL INVENTARIABLE

- Congelador de - 80 °C REVCO LEGACI™ Refrigeration system Asheville North Carolina USA.
- Frigorífico Superser Ecologic.
- Incubadora para Ta de 37°C y CO2 a 5% Thermo-Forma Hepa filter.
- Centrifuga Megafuge 1.0 R (SORVALL_Heraeus).
- Microscopio invertido (Olimpus CKX41 Optical España, S.A.) (Figura 28).
- Microscopio óptico NIKON AFX-DX (Figura 28).
- Lector de placa TECAN (Spectra classic, Barcelona, España).
- Ordenador.
- Software de análisis estadístico.
- Micropipetas Pipetman de 10, 100 y 200 µL (Gilson Medical Electronics, France).
- Cabina de flujo laminar vertical Heraguard Mod.HPH9 (SORVALL-Heraeus).
- Contenedor de Nitrógeno Líquido Dewars 196, CD-90, 33 Lts carga automática (Carbuos metálicos, Barcelona España).
- Baño de agua 2-6 L: (SORVALL-Heraeus).
- Espectrofotómetro DU 640 Beckman.
- Typhoon 9400 Amersham Biosciences.

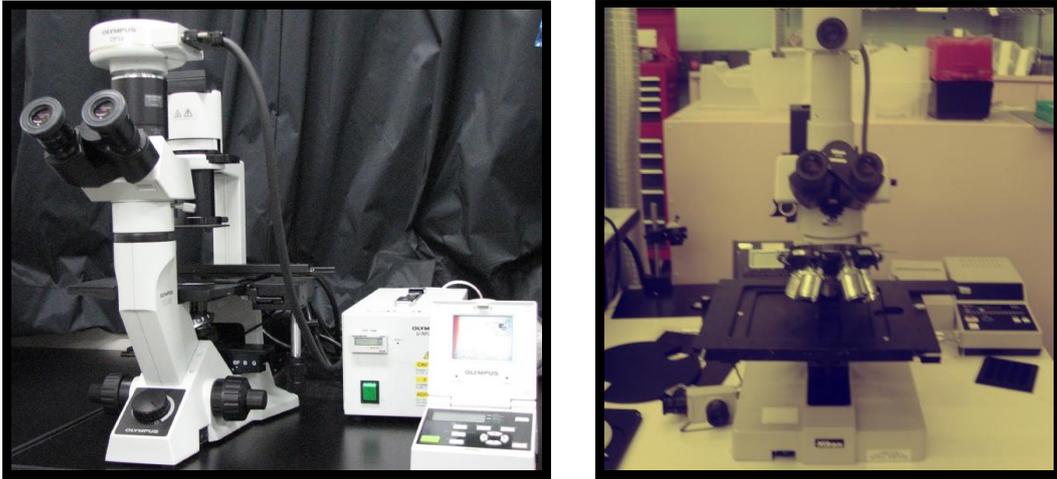


Figura 28. Microscopios Olympus CKX41 y Nikon AFX-DX.

3.1.3. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.3.1. ANTICUERPOS

- Anticuerpo anti-SP originado en conejo conjugado con KLH como inmunógeno (Sigma, St Louis, MO, USA)
- Anticuerpo primario específico contra el NK1R de la SP. Péptido sintético correspondiente al C-terminal de un NK1R originado en rata con 393-407 aminoácidos, conjugado con KLH como inmunógeno. (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Anticuerpo anti-inmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa (Amersham Biosciences).

3.1.3.2. LÍNEA CELULAR Hep-2 DE CARCINOMA DE LARINGE HUMANO

- Laboratorio: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 130,(DSMZ), Braunschweig, Germany.
- Procede de un carcinoma laríngeo de células escamosas en un paciente varón de 56 años de raza caucasiana.
- Morfología: epitelial. Crecimiento en monocapas.
- Medio de cultivo: MEM + 5% FBS + Antibiotics + 2mM L-Glutamine; 37c, 5% CO₂, split 1-4.
- Medio de congelación: MEM + 10% FBS + 10% DMSO.

3.1.4. MATERIAL FARMACOLÓGICO

- L-733,060: (2S,3S) -3- {[3,5-bis(trifluorometil)benzil]oxi} -2- fenilpiperidina. Vial de 5 mg. Antagonista del NK1R con peso molecular de 438,9 Da. Polvo blanco soluble en DMSO e insoluble en agua. Pureza del 99%. (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- L-732,138: N-Acetil -L- triptófano -3,5- bis(trifluorometil) benzilester. Vial de 10 mg. Antagonista del NK1R con peso molecular de 472,4 Da. Polvo blanco no soluble en agua. Pureza del 98%. (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- SP: Vial 25 mg. Agonista del NK1R. Peso molecular de 1347 Da. Polvo blanco soluble en agua con una pureza del 98%.

3.2. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP Y EL NK1R

3.2.1. MODELO DEL ESTUDIO

Se ha recogido una serie de 130 pacientes afectos de carcinoma epidermoide de laringe que han sido intervenidos quirúrgicamente con finalidad curativa. De estos pacientes, se han obtenido una serie de datos clínicos y estadísticos de su enfermedad; así mismo, se han analizado los resultados anatomopatológico de las intervenciones. Por último, se ha realizado un estudio inmunohistoquímico que pretende demostrar la existencia de SP y su receptor (NK1R) en el epitelio laríngeo sano, cáncer de laringe y metástasis de las muestras obtenidas.

3.2.2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO

Los pacientes que conforman el material del estudio, fueron diagnosticados y tratados quirúrgicamente en el Hospital Universitario Virgen del Valme (Sevilla) en el periodo comprendido entre el 3/2/1988 y el 26/5/1997. La muestra la conforman 130 pacientes afectos de cáncer de laringe e hipofaringe. Estos sujetos eran portadores de carcinoma epidermoide de laringe e hipofaringe tratados con cirugía, con finalidad curativa. Los pacientes forman parte de una serie histórica en un servicio en el cuál aún no se había protocolizado la asistencia de los pacientes afectados de cáncer de laringe.

Al seleccionar los pacientes, fueron excluidos todos los enfermos que recibieron tratamiento quimioterápico previo a la cirugía, así como los casos con coexistencia de un segundo primario o metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. Para llevar a término dicho estudio se confeccionó un protocolo para cada paciente y se le asignó un número de código a efectos del procesado de los datos y del eventual análisis estadístico.

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

Los parámetros recogidos han sido:

- **EDAD.** Se registró la edad del paciente en el momento de la intervención así como su fecha de nacimiento.
- **ENFERMEDAD SISTÉMICA.** En cada caso se consideraron los distintos antecedentes personales de interés categorizados como:
 - 1: No enfermedad sistémica previa
 - 2: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
 - 3: Hipertensión arterial
 - 4: Enfermedad cardiovascular
 - 5: Enfermedad hepática
 - 6: Diabetes
 - 7: Otras
 - 8: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica asociada a otras
- **RADIOTERAPIA PREVIA.** Tras el fallo de la radioterapia administrada con finalidad curativa se incluyeron algunos enfermos intervenidos como rescate.
- **DURACIÓN DE SÍNTOMAS.** Fueron referidos por el paciente y se codificaron en meses.
- **ALCOHOL.** Se valoró el consumo de alcohol por parte de cada enfermo como nulo (0), leve (1) (si refería un consumo menor de 40 g/día), moderado (2)(entre 40 y 80 g/día) e intenso (3) con más de 80 g/día.
- **TABACO.** El antecedente de hábito tabáquico se registró en base al número de cigarrillos fumados diariamente por parte del paciente: no fumador (0), menos de 10 cigarrillos (1), entre 10 y 30 (2) y más de 30 (3).

- AFECTACIÓN DEL SENO PIRIFORME. Se valoró dicha afectación en la pieza operatoria, tras el informe anatomopatológico.
- AFECTACIÓN DE LA BASE DE LENGUA. Igual que en el punto anterior, se registró tal circunstancia en los casos correspondientes.
- TRAQUEOTOMÍA PREVIA. Se consideró una circunstancia relevante la realización de una traqueotomía desde al menos la semana anterior a la intervención.
- TRATAMIENTO SOBRE EL CUELLO. Se valoraron las siguientes intervenciones: el vaciamiento funcional (uni o bilateral), radical (asociado eventualmente a otro vaciamiento, generalmente funcional, contralateral) y la denominada "toilette" o revisión ganglionar, uni o bilateral.
 - 1: No vaciamiento
 - 2: Vaciamiento funcional unilateral
 - 3: Vaciamiento funcional bilateral
 - 4: Vaciamiento radical unilateral
 - 5: Vaciamiento radical unilateral asociado a funcional contralateral
 - 6: Revisión ganglionar unilateral
 - 7: Revisión ganglionar bilateral
- CIRUGÍA PREVIA. Se valora si el enfermo antes de practicarle la cirugía había sido operado con anterioridad.
- TIPO DE CIRUGÍA PREVIA. Fundamentalmente, se trató de microcirugías laríngeas (1), cordectomías (2), laringuectomías parciales horizontales supraglóticas (3).
- AÑO DE LA INTERVENCIÓN. Fecha en la que se llevó a cabo la intervención quirúrgica definitiva.

- ESTADO DE LOS MÁRGENES QUIRÚRGICOS. Distinción entre márgenes negativos (0) o positivos (1) tras el informe anatomopatológico.

- LOCALIZACIÓN DEL TUMOR PRIMARIO. En la historia clínica del paciente se recogió la localización topográfica del tumor, obtenida mediante laringoscopia indirecta, fibrovideoscopia, lupa endoscópica o fibroscopia rígida con ópticas de Wolf y Storz de 0°, 30° y de 70°. En los casos en los que existían dificultades técnicas o mala colaboración del paciente se realizaba una microlaringoscopia directa. Estos hallazgos se confirmaron en el informe anatomopatológico de la pieza definitiva.
 - 1: Supraglótico
 - 2: Glótico
 - 3: Subglótico
 - 4: Transglótico
 - 5: Piriforme

- ESTADIOS T Y N PATOLÓGICOS. Se llevaron a cabo según la clasificación T.N.M. basándose en los hallazgos operatorios y en el informe anatomopatológico.

- NÚMERO DE METÁSTASIS. Se registraron las que constaban en el informe anatomopatológico.

- ESTADO DEL PACIENTE TRAS EL SEGUIMIENTO. Las posibilidades registradas fueron las de perdido para el seguimiento (0), curado sin evidencia de enfermedad (1), muerto por el cáncer (2), muerto por otra causa (3) y vivo con enfermedad (4).

- CAUSA DE LA MUERTE. Las opciones recogidas en esta apartado fueron:
 - 1: vivo
 - 2: recidiva local

- 3: recidiva ganglionar
 - 4: recidiva loco-regional no especificada
 - 5: metástasis a distancia
 - 6: recidiva estomal
 - 7: metástasis a distancia asociada con otra forma de recidiva
 - 8: muerte por complicación postoperatoria
 - 9: muerte por otras causas
- **RADIOTERAPIA COMPLEMENTARIA.** Se indicó ante los casos considerados T4, N (+) patológico, pacientes T3 patológicos a los que no se realizó vaciamiento ganglionar cervical o en aquellos con informe de positividad tumoral en los márgenes.
 - **ÚLTIMO CONTROL REALIZADO.** Se indica cuando se objetivó por última vez el estado del paciente.

3.2.3. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

3.2.3.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la detección de la SP y el NK1R se utilizaron anticuerpos monoclonales ya descritos en la sección material biológico.

Para la conformación de los cortes histológicos, se crearon secciones entre 3 y 5 μm de grosor a partir del bloque de tejido. Las secciones obtenidas fueron posteriormente desparafinadas con xileno y rehidratadas posteriormente con etanol. La actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada incubando los cortes en una solución compuesta por metanol con 1,5% de H_2O_2 durante 2 minutos.

Para la recuperación antigénica, los cortes se hierven en una solución buffer citrato (2.94 g/L de citrato de sodio, pH 6.0) durante 15 minutos y posteriormente se enfrían a 30°C. Tras ser lavadas con PBS, los cortes se incuban en una solución de suero de caballo al 10% no inmunogénico durante

15 minutos. A continuación, se incuban durante 60 minutos en una solución 1:500 de anticuerpo anti-SP (Sigma, St. Louis, MO). Se realiza el mismo procedimiento para el anticuerpo anti-NK1R (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Posteriormente, se lavan con PBS y se incuban con una solución 1:500 de anticuerpo biotinilada de caballo anti-ratón (Vector Laboratories Inc., Burlington, VT) durante 30 minutos junto con una dilución 1:4000 de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Immunotech; Beckman Coulter, Fullerton, CA). A continuación, los cortes son lavados en una solución buffer fosfato-citrato (pH 5.6), en este momento, los anticuerpos frente SP y NK1R se visualizan bajo el microscopio utilizando reactivo DAB (0.06%) y H₂O₂ (0.03%) en una solución buffer fosfato-citrato. Los cortes son contrateñidos con hematoxilina durante 3 minutos. Finalmente, para determinar la especificidad de la inmunotinción se incluyen varios controles histológicos. En todos los casos, los controles corroboraron la especificidad de los anticuerpos utilizados en este estudio.

3.2.3.2. EXAMEN DE MUESTRAS HISTOLÓGICAS

Las muestras obtenidas en la intervención quirúrgica fueron analizadas histológicamente. Los casos que presentaban epitelio laríngeo sano adyacente al tumoral fueron recogidos para el estudio en tejido no tumoral.

Las muestras fueron clasificadas en 3 grupos: tejido sano, tejido tumoral y metástasis tumoral.

El estudio histológico e inmunohistoquímico se llevó a cabo sin el conocimiento por parte de los investigadores del estadio clínico, tratamiento, así como curso de la enfermedad de cada caso.

El examen se llevó a cabo mediante microscopía óptica con un sistema de recogida digital de imágenes para su análisis posterior.

Para determinar el grado de inmunorreactividad, se formaron, tanto para SP como para NK1R cinco grupos distintos en relación al porcentaje de células que eran positivas al inmunoanálisis:

- 1: No expresión: 0%
- 2: Expresión débil: del 1 al 24%
- 3: Expresión moderada: del 25 al 49%
- 4: Expresión alta: del 50 al 74%
- 5: Expresión intensa : 75 al 100%

Estas determinaciones se llevaron a cabo para tejido sano (adyacente no tumoral), tejido tumoral y metástasis linfáticas.

Además de la intensidad, se recogió también la localización de las células que expresaban SP y NK1R. Pudiendo ser:

- 1: Expresión epitelial basal
- 2: Expresión transepitelial

Los parámetros estudiados fueron:

- GRADO DE DIFERENCIACIÓN Y POLIMORFISMO TUMORAL. Según el sistema de puntuación establecido por Glanz y cols.³⁷⁵:
 - 1: Queratinización marcada con o sin polimorfismo
 - 2: Queratinización moderada con o sin polimorfismo
 - 3: Queratinización escasa con o sin polimorfismo
- ESTRUCTURA Y BORDE DEL TUMOR. Según el sistema de puntuación establecido por Glanz y cols.:
 - 1: Formación celular sólida o compacta con bordes expansivos evidentes

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

- 2: Pequeños cordones celulares e hileras, con borde de avance poco neto
 - 3: Disociación celular e infiltración difusa
- INVASIÓN VASCULAR. Según el sistema de puntuación establecido por Glanz y cols.:
 - 0: No demostrada
 - 1: Posible
 - 2: Probada
- RESPUESTA CELULAR DEL HUÉSPED. Según el sistema de puntuación establecido por Glanz y cols.:
 - 0: Marcada
 - 1: Moderada
 - 2: Pobre o nula
- TIPO DE MUESTRA. Si la muestra era tumor primario o ganglio tumoral.
- EXPRESIÓN DE SP EN TUMOR. Recogido en 5 grupos según intensidad de la expresión. (0=no expresión, 4=expresión máxima)
- PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA SP EN TUMOR. Se recoge si la expresión de la SP en el interior de las células tiene una localización citoplasmático, membrana y /o nuclear.
- EXPRESIÓN SP EN TEJIDO SANO. Se recoge si está presente o no.
- EXPRESIÓN DE NK1R EN TUMOR. Recogido en 5 grupos según intensidad de la expresión (0=no expresión, 4=expresión máxima).

- PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA NK1R EN TUMOR. Se recoge si la expresión de la SP en el interior de las células tiene una localización citoplasmático, membrana y /o nuclear.
- EXPRESIÓN NK1R EN TEJIDO SANO. Se recoge si está presente o no.

3.2.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La descripción de la muestra y su análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Microsoft Excel 2003 y el paquete estadístico SPSS v.14.

Se realizó un análisis univariable, el cual permite seleccionar aquellas variables que mantienen asociaciones significativas con las consideradas como principales en la investigación. Así, se estableció el test de significación apropiado a la relación de asociación entre las variables del estudio según el nivel de su medición.

Se emplearon dos variables consideradas como efecto: la tinción de las muestras para el NK1R y la tinción para la SP. Para la valoración de la relación de éstos con las variables continuas se utilizó el análisis de la varianza para el NK1R y la t de Student para dos muestras para la SP. Por otro lado, para la relación con las variables categóricas se utilizó el Chi-cuadrado de Pearson.

Como nivel de significancia se estableció $p < 0.05$ para todas las comparaciones.

3.3. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO IN VITRO DE LOS ANTAGONISTAS DE LA SP

3.3.1. MODELO DEL ESTUDIO

La segunda parte de la investigación tuvo como objetivo estudiar la acción antitumoral *in vitro* de los antagonistas del NK1R en la línea celular de cáncer de laringe Hep-2.

3.3.2. CULTIVO CELULAR

La línea celular objeto del estudio fue la Hep-2 de DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). El medio de cultivo utilizado fue RPMI 161640 (GIBCO, Barcelona, España) suplementado con un 10% de SBF de acuerdo con las recomendaciones de la American Type Culture Collection, Interlab Cell Line Collection y DSMZ.

Las líneas celulares se sembraron en frascos de cultivo tipo Falcon de 75cm² en el medio recomendado por el fabricante; éste es renovado cada 2 días hasta el sexto día cuando el cultivo se haga confluyente, en este momento se procede a tripsinar con 5 ml de tripsina EDTA al 0,05% y 0,02% EDTA sin Ca²⁺ y Mg²⁺. Las condiciones de incubación fueron a 37° en una atmósfera húmeda con un 95% de aire y un 5% de CO₂.

3.3.3. PROCEDIMIENTO WESTERN BLOT

La muestra para el análisis se obtuvo de la línea celular de cáncer de laringe Hep-2 la cual fue sembrada en un frasco de cultivo de 125 cm². Se incluyó como control un extracto proteína de una línea celular de feocromocitoma de rata (PC12). Las células fueron sometidas a un tratamiento con tripsina, posteriormente lavadas con una solución tampón de fosfato salino pH 7.4 (PBS) y resuspendidas en una solución tampón HEN (5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7.3) junto con un cóctel compuesto por 5 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, 0.2%, IGEPAL CA-630 (Sigma) y 1% inhibidor de

la proteasa. Una vez resuspendidas, las células fueron centrifugadas, incubadas en hielo durante 5 minutos y posteriormente centrifugadas de nuevo durante 15 minutos a alta velocidad. A continuación se recogió el sobrenadante rico en proteínas.

La concentración de proteínas fue determinada mediante un kit de análisis de BIO-RAD siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. De cada muestra obtenida, 50 µg de proteínas fueron separados mediante electroforesis con gel de poliacrilamida SDS al 10% y luego transferidas a membranas de PVDF. Las membranas con las proteínas transferidas fueron incubadas con solución bloqueante (leche desnatada al 5% en PBS, 0,1% Tween-20[PBS-T]), seguidamente se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo específico anti-NK1R correspondiente al C-terminal del receptor (1/1.000). A continuación, se lavaron de nuevo con PBS-T y luego se incubaron con el 2º anticuerpo, anti-peroxidasa, que reconoce a la inmunoglobulina G del conejo (1/10.000). Este procedimiento se realiza a temperatura ambiente durante 2 horas. La detección del anticuerpo marcado con peroxidasa se realiza mediante un kit de revelado ECL (Amershan Biosciences), obteniéndose una reacción que es analizada mediante el lector de quimioluminiscencia Typhoon 9400 (Amershan Biosciences).

3.3.4. PREPARACIÓN DEL MATERIAL FARMACOLÓGICO

Los antagonistas del NK1R (2S,3S)3-([3,5-Bis(trifluorometil)fenil]metoxi)-2-fenilpiperidina, (L-733,060) y N-Acetil-L-triptófano 3, 5-bis (trifluorometil)benzil ester (L-32,138) fueron disueltos de agua bidestilada a la que se le añadió 0.2% y 2.5%, respectivamente, de DMSO. Con el objeto de determinar el IC₅₀ (concentración de antagonista que inhibe el 50% del crecimiento celular), se desarrollaron las siguientes diluciones de L-733,060 (5, 10, 20, 30 y 40 µM) y L-732,138 (5, 10, 20, 40, 60 y 80 µM). Así mismo, para determinar la estimulación del crecimiento celular, se diluyó la SP, en forma de sal acetato de SP, en agua bidestilada (5, 10, 50 y 100 nM).

3.3.5. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Para determinar el número de células viables en proliferación, se utilizó un método colorimétrico. El procedimiento fue llevado a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corp., Madison, USA). El compuesto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio es biorreducido por las células dando lugar un producto coloreado, Formazán, que es soluble en medio de cultivo. Esta reacción química es llevada a cabo por las enzimas deshidrogenasas presentes en aquellas células metabólicamente activas.

La lectura de la absorbancia emitida por el Formazán, se realiza con un lector de microplaca a una longitud de onda de 492 nm. El valor de la lectura, indicador de la cantidad de Formazán producido, es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

Las células procedentes de la línea Hep-2, tras ser sembradas durante 4-5 días, fueron separadas mediante tripsinización el mismo día del estudio. La suspensión celular obtenida se debe centrifugar a 1500 rpm durante 5-10 minutos. A continuación se debe resuspender el botón celular en medio de cultivo introduciéndose en un tubo Falcon. Para determinar la viabilidad celular y el contaje celular se empleó el azul triptán. Según esta técnica, en un tubo Eppendorf se introducen 250 μ l de suero fisiológico, 35 μ l de azul triptán y 15 μ l de la suspensión celular. Tras agitar la mezcla, se extraen 9 μ l. El número de células fue cuantificado mediante un contador Coulter.

Las células se sembraron en placas de cultivo de fondo plano con 96 pocillos, conteniendo cada pocillo 10^4 células en un volumen total de 100 μ l de cultivo. Cada ensayo incluía una placa con:

- pocillos blancos (0 células en 100 μ l de cultivo),
- pocillos controles (10^4 células en 100 μ l de cultivo)

- pocillos controles con DMSO (10^4 células en 100 μ l de cultivo con 0.2% de DMSO)
- pocillos controles tratados con L-733,060 (10^4 células en 100 μ l de cultivo con L-733,060 a 5, 10, 20, 30 y 40 μ M)
- pocillos controles tratados con L-732,138 (10^4 células en 100 μ l de cultivo con L-732,138 a 5, 10, 20, 40, 60 y 80 μ M)
- pocillos controles tratados con SP exógena a diferentes concentraciones (10^4 células en 100 μ l de cultivo con SP a 5, 10, 100 y 500 nM)
- pocillos controles tratados con la concentración de SP más mitogénica y L-733,060 (10^4 células en 100 μ l de cultivo con 100 nM de SP más 20 y 40 μ M de L-733,060)
- pocillos controles tratados con la concentración de SP más mitogénica y L-732,138 (10^4 células en 100 μ l de cultivo con 100 nM de SP más 20 y 40 μ M de L-732,138)

Estos dos últimos pocillos tienen como utilidad determinar si la acción inhibitoria de los antagonistas del NK1R ocurre a través de interaccionar vía específica con el NK1R. Entre la aplicación de la SP y los antagonistas transcurrieron 60 minutos.

Los pocillos no utilizados de las distintas placas fueron ocupados con una solución buffer fosfato para controlar la humedad de la placa.

Las placas fueron incubadas a T^a de 37°C, a una atmósfera de 5% de CO₂, durante un periodo de 48 horas que es el tiempo de duplicación celular.

La proliferación celular se evaluó usando MTS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadieron 20 μ l de MTS a cada pocillo 90 minutos antes de leer las muestras en un lector de placas multiscanner (TECAN Spectra classic) a 492 nm. La cantidad de producto, medida como densidad óptica es directamente proporcional al número de células vivas.

Cada placa fue inoculada por duplicado y todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces.

Para determinar el IC50 de L-733,060 y L-732,138 se hizo un ajuste lineal de la curva obtenida generando una ecuación del tipo $Y=BX+A$.

3.3.6. ESTUDIO DE APTOSIS MEDIANTE LA TÉCNICA DAPI

La apoptosis o muerte celular programada, induce en la célula una serie de cambios, uno de ellos es la condensación nuclear. La técnica DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) marca mediante fluorescencia las cadenas de DNA a las cuales se unen esta molécula. Bajo visión con un microscopio de fluorescencia y tras excitación con luz ultravioleta, las moléculas señalan los núcleos tiñéndolos de color celeste o azul.

Las células fueron en primer lugar sembradas en placas de 4 pocillos. Tras ser tratadas con los antagonistas del NK1R (L-733,060 y L-732,138) durante 48 horas, las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas utilizando paraformaldehído al 4% durante 30 minutos. Tras ser lavadas de nuevo con PBS, las células fueron incubadas con una solución de DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos en ausencia de luz. Finalmente, fueron analizadas mediante un microscopio de fluorescencia (Zeiss, Oberkochen, Germany).

3.3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron expresados como la media \pm el error standard. El análisis estadístico fue realizado con el software SPSS estadístico para Microsoft Windows, versión 14.0 (Professional Statistic, Chicago, IL). La homogeneidad de varianzas se comprobó mediante el test de Levene. Aquellos datos cuyas varianzas fueron homogéneas, fueron analizados utilizando el test ANOVA con la corrección de Bonferroni's para múltiples comparaciones. Para el conjunto de datos con varianzas no homogéneas, se utilizó el test ANOVA con el análisis T3 Dunnett post hoc. Como nivel de significancia se estableció $p<0.05$ para todas las comparaciones.

IV. RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA

Se dispone de 149 muestras histológicas pertenecientes a 130 pacientes diagnosticados de cáncer de laringe. De estos 130 pacientes, el 100% son varones cuya edad media es de 59,92 años con un rango entre 37 y 80 años.

De los 130 pacientes, 43 (33,07 %) no presentaban patología previa, 50 (38,46 %) estaban diagnosticados de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, 14 de ellos además presentaban otras patologías añadidas. Seis (4,61 %) presentaban hipertensión arterial, 7 (5,38 %) estaban diagnosticados de enfermedades cardiovasculares, 8 (6,15 %) presentaban patología hepática, 9 (6,92 %) eran diabéticos y por último 6 (4,61 %) presentaban otras patologías.

La duración de los síntomas fue de 6,29 meses de media, con un rango entre 0 y 48 meses.

81 (62,30 %) de los pacientes eran bebedores habituales y 121 (93,07 %) tenían hábito tabáquico, la mayoría de ellos, 77 (63,63 %), con más de 30 cigarrillos/día.

47 de los 130 pacientes (36,15 %) presentaba un tumor supraglótico, 36 (27,69 %) afectación glótica, 4 (3,07 %) afectación subglótica, 23 (17,69 %) extensión transglótica y por último 19 (14,61%) mostraban patología en el seno piriforme.

De todos los tumores estudiados, 27 (20,76 %) en total presentaban extensión hacia seno piriforme y 9 (6,92 %) hacia la base de la lengua.

23 (17,68 %) pacientes habían sido intervenidos previamente, 10 (7,69 %) mediante microcirugía laríngea, 2 (1,53 %) mediante cordectomía y 11 (8,46 %) mediante laringuectomía parcial.

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

De todos los pacientes intervenidos, 28 (21,53 %) presentaban traqueotomía previa a la cirugía.

A 54 (41,53 %) de los 130 pacientes se les realizó una actuación quirúrgica sobre los ganglios cervicales, 23 (17,69 %) fueron vaciamientos funcionales unilaterales, 19 (14,61 %) fueron funcionales bilaterales, 4 (3,07 %) fueron radicales, uno de ellos asociado a funcional contralateral, por último a 8 (6,14 %) pacientes se le hizo una revisión ganglionar, 4 (3,07 %) unilateral y 4 (3,07 %) bilateral.

8 (6,15 %) pacientes recibieron radioterapia previa a la cirugía y 98 (75,38 %) la recibieron después.

La estadificación según el T.N.M. se expresan en la Tabla 4.

T	N	M
T1: 3 (2,31%)	N0:104 (80,00 %)	M0: 106 (81,54 %)
T2: 17 (13,08%)	N1: 17 (13,08 %)	M1: 24 (18,46 %)
T3: 79 (60,77 %)	N2: 6 (4,62 %)	
T4: 31 (23,85 %)	N3: 3 (2,31 %)	

Tabla 4. Estadificación de los pacientes de la muestra.

De las muestras analizadas, 11 (8,46 %) presentaban los márgenes afectados.

Por último, en el momento de la revisión, 91 (70,00 %) se hallaban sin evidencia de enfermedad, 27 (20,77 %) habían fallecido por el cáncer, 12 (9,73 %) habían muerto debido a otras causas. De las muertes acontecidas, 39 en total, 5 (12,82 %) fueron por recidiva local, 4 (10,25 %) por recidiva ganglionar, 6 (15,38 %) recidiva loco-regional, 5 (12,82 %) por metástasis a distancia, 3 (7,69 %) por recidiva estomal, 3 (7,69 %) por metástasis a distancia asociada con otra recidiva, 1 (2,56 %) por complicación postoperatoria y 12 (30,76) por otras causas.

4.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP Y EL NK1R

De las 149 muestras histológicas patológicas obtenidas, 133 (89,26%) pertenecían a tumores laríngeos primarios y 16 (10,73%) pertenecían a ganglios metastáticos. De los 133 tumores primarios, pudo obtenerse tejido libre de tumor en 107 y 61 casos para estudio de SP y NK1R respectivamente.

4.2.1. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DE LAS MUESTRAS

El grado de malignidad anatomopatológico se determinó mediante el sistema de puntuación establecido por Glanz et al. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

DIFERENCIACIÓN Y POLIMORFISMO TUMORAL	ESTRUCTURA Y BORDE DEL TUMOR	INVASIÓN VASCULAR	RESPUESTA CELULAR DEL HUÉSPED
•Queratinización marcada con o sin polimorfismo: 96	•Formación celular sólida o compacta con bordes expansivos evidentes: 21	• No demostrada: 54	• Marcada: 24
•Queratinización moderada con o sin polimorfismo: 14	•Pequeños cordones celulares e hileras, con borde de avance poco neto: 84	• Posible: 47	• Moderada: 65
•Queratinización escasa con o sin polimorfismo: 20	•Disociación celular e infiltración difusa: 25	• Probada: 29	• Pobre o nula: 41

Tabla 5. Estadiaje mediante el sistema de puntuación de Glanz.

De lo que se muestra en esta tabla, se deduce que la media de la puntuación de Glanz fue de 5,38.

4.2.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP

4.2.2.1. TEJIDO EPITELIAL ADYACENTE LIBRE DE TUMOR

De las 107 muestras válidas de tejido sano obtenidas, 105 (98,13%), expresaban SP. Esta expresión característicamente se produjo en las capas basales del epitelio. 2 casos (1,87%) no expresaron SP (Figura 29-31).

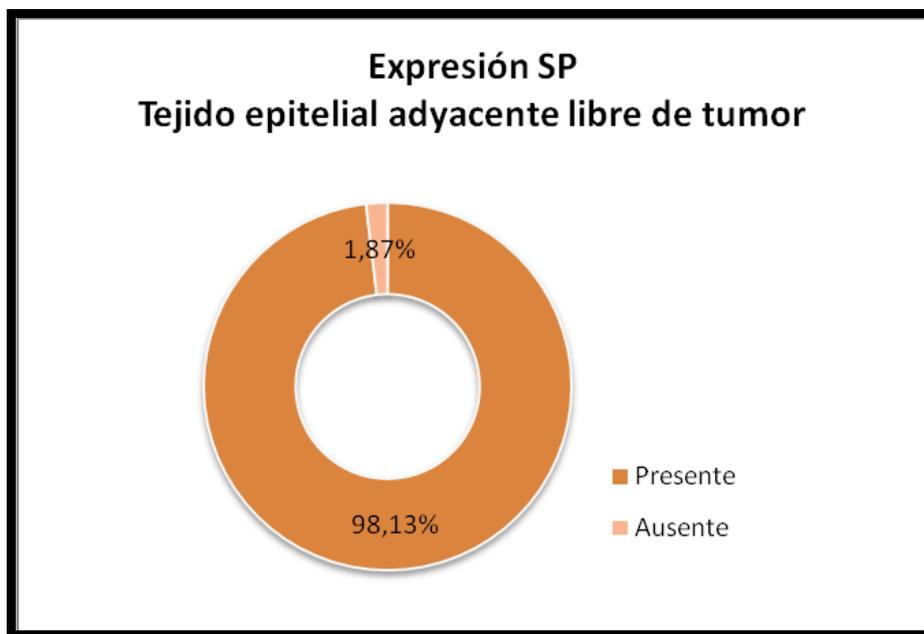


Figura 29. Expresión SP. Tejido epitelial adyacente libre de tumor.

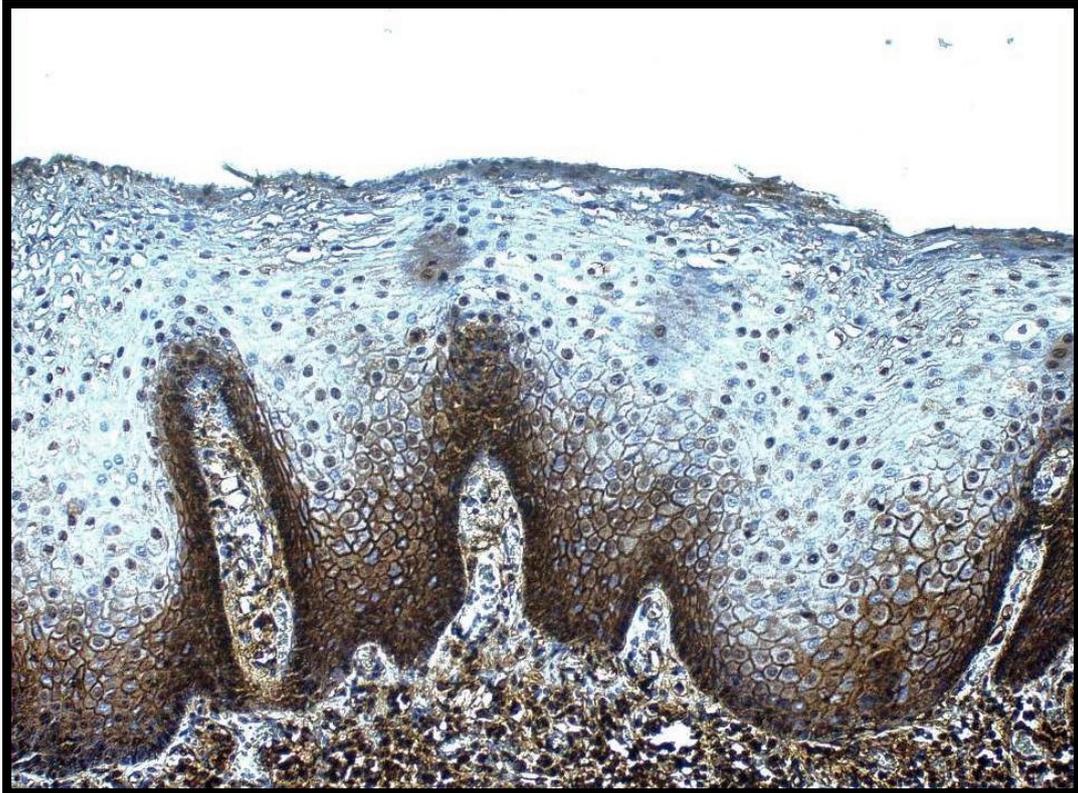


Figura 30. Expresión SP en tejido epitelial sano. Las capas basales del epitelio tiñen intensamente como reflejo de la actividad mitótica de dicha capa.

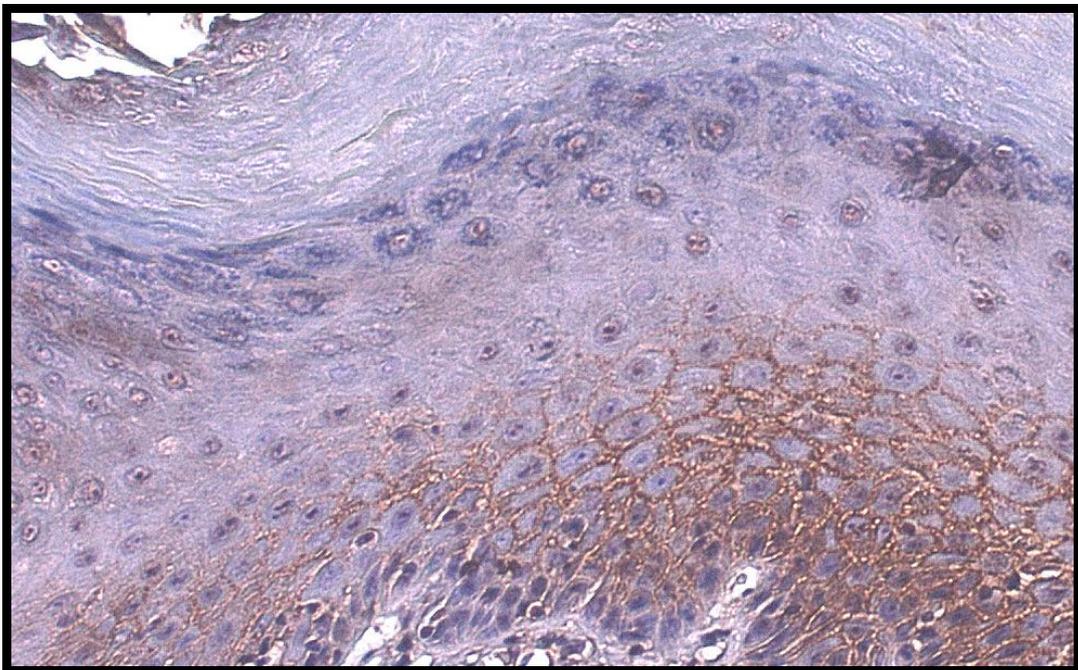


Figura 31. Expresión SP en tejido epitelial sano (detalle). Las células expresan SP principalmente en la membrana plasmática.

4.2.2.2. TUMORES LARÍNGEOS

De las 125 muestras válidas de tejido tumoral obtenidas, 119 (95,20%), expresaban en mayor o menor grado SP. De estas 119, 5 (4,20%) lo hacían con mínima intensidad (+), 10 (8,40%) lo hacían con intensidad leve, 9 (7,56%) lo hacían con intensidad media y por último 95 (79,83%) lo hacían con máxima intensidad. 6 casos (4,80%) no expresaban SP (Figura 32-37).

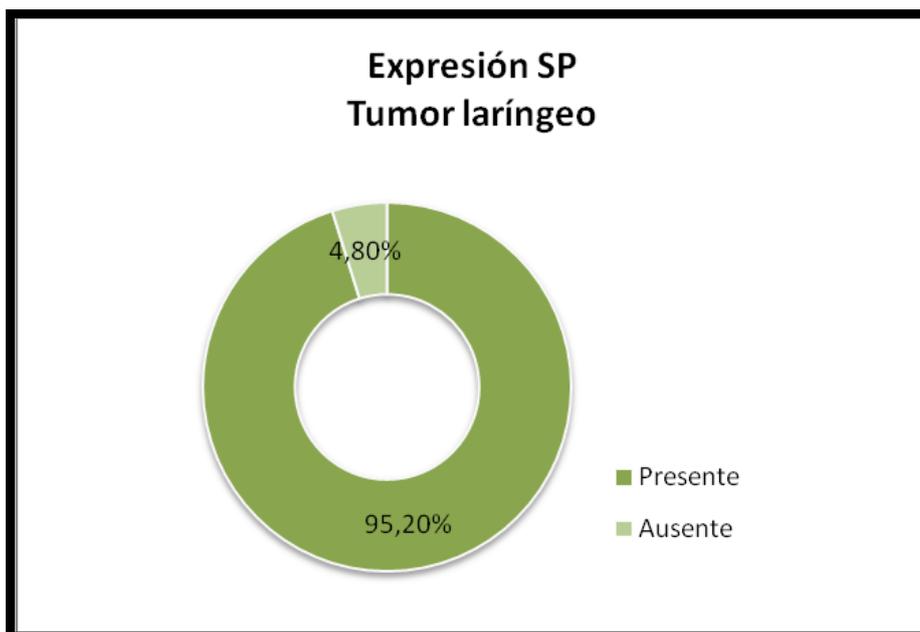


Figura 32. Expresión SP. Tumores laríngeos.

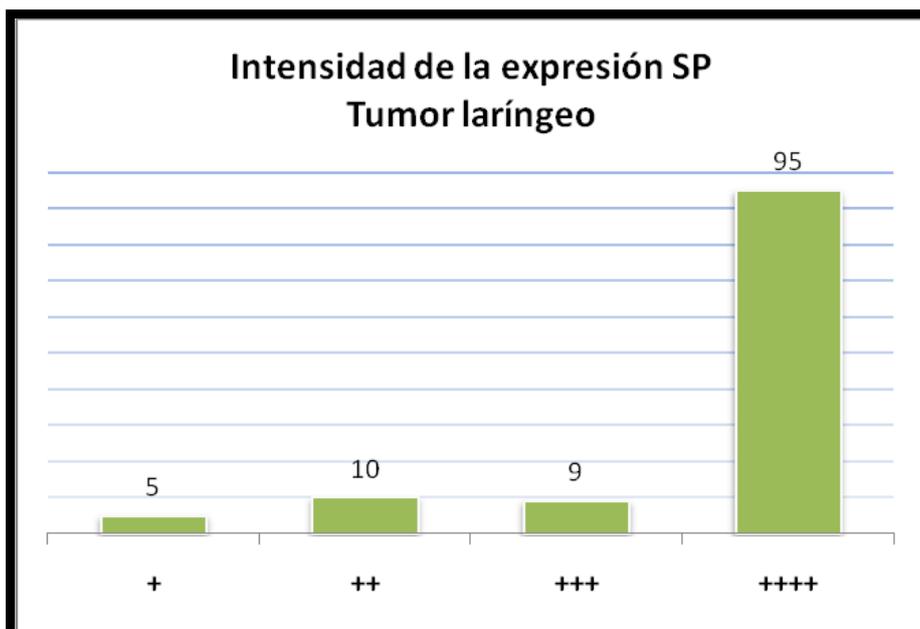


Figura 33. Intensidad de la expresión de SP. Tumores laríngeos.

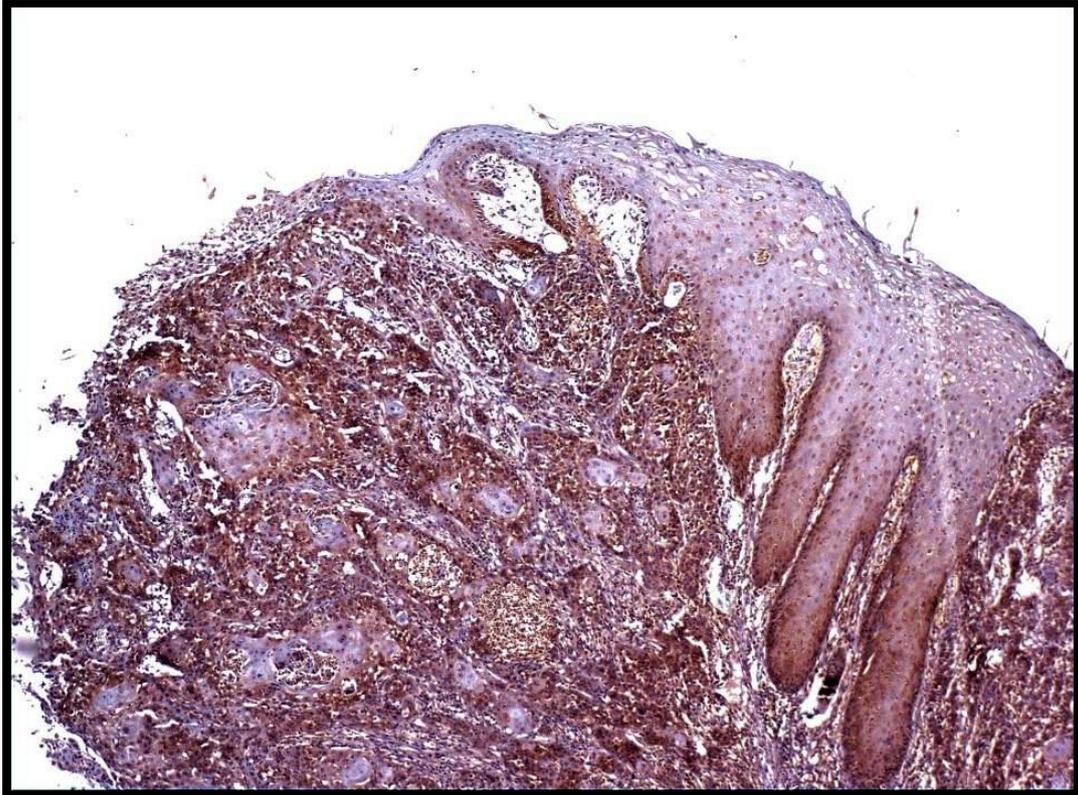


Figura 34. Expresión de SP en tumores laríngeos. Se constata como en el tejido sano adyacente al tumor la expresión se produce en las capas basales mientras que todo el tejido tumoral expresa intensamente SP.

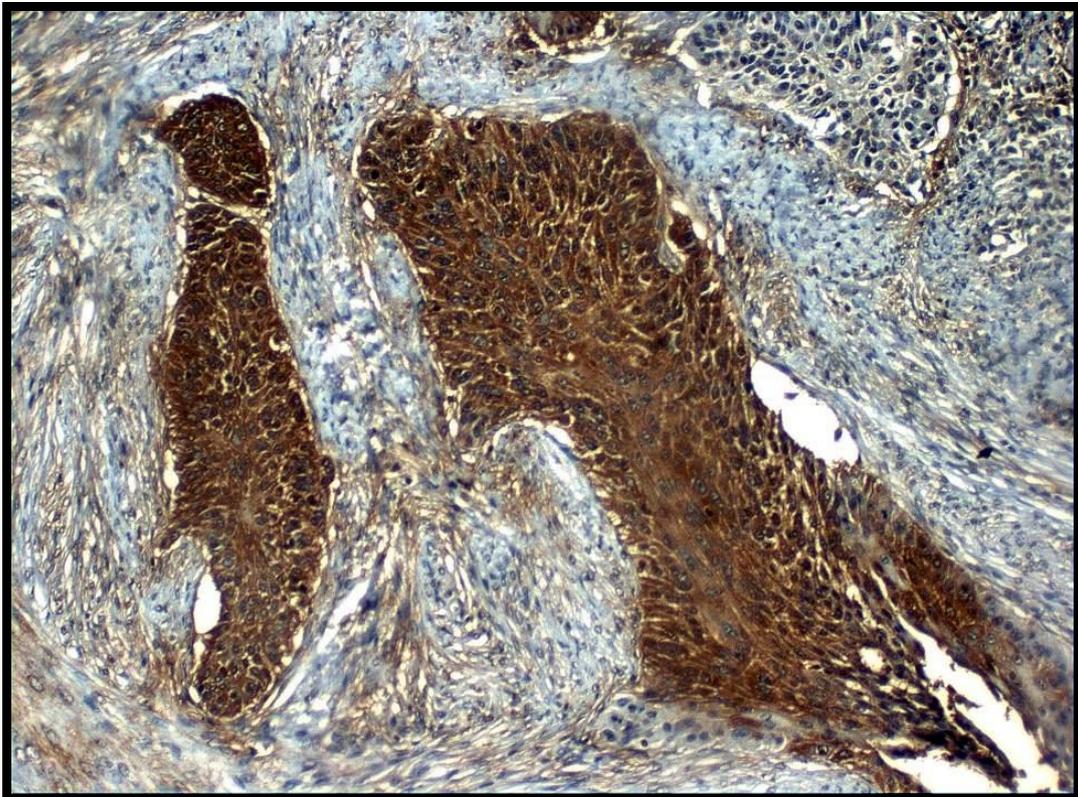


Figura 35. Expresión de SP en tumores laríngeos (detalle). Membrana plasmática, núcleos y citoplasma expresan intensamente SP en las células cancerosas.

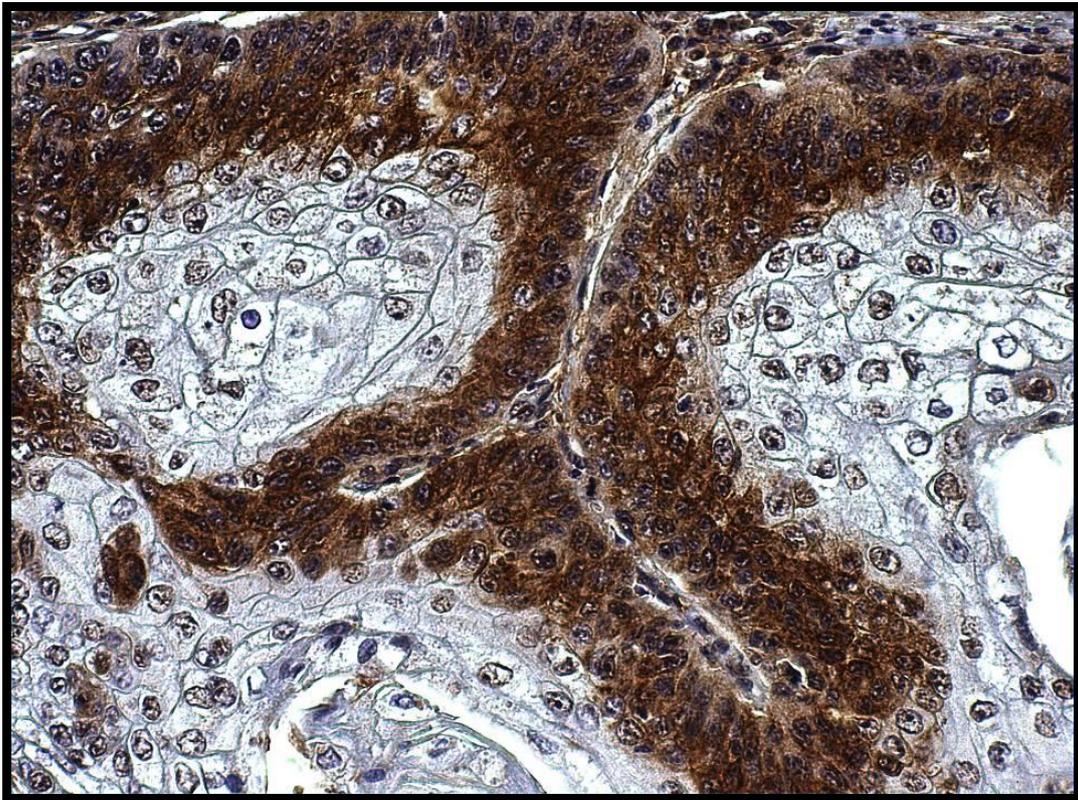


Figura 36. Expresión de SP en tumores laríngeos (detalle).

En las muestras en las que se estudió la distribución intracelular de la SP, 87 casos, se constató que el 97,70% de las muestras (85) expresaban SP en el citoplasma, el 33,33% (29) expresaban SP en la membrana celular y el 28,74% (25) en el núcleo. Dentro de un mismo corte histológico, así como dentro de cada célula, podían coexistir diferentes localizaciones de la SP (Figura 37).

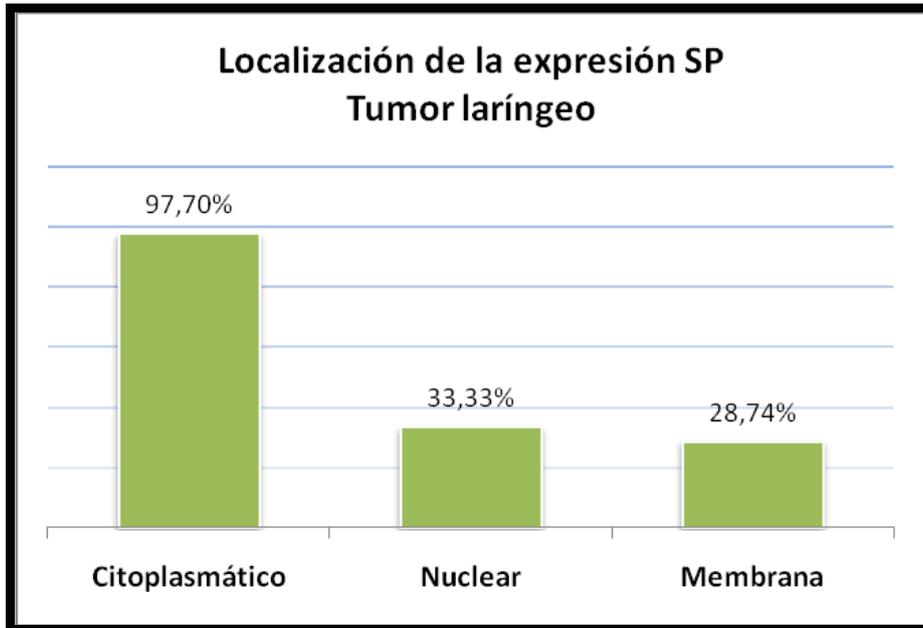


Figura 37. Localización de la expresión de SP en tumores laríngeos.

4.2.2.3. GANGLIOS LINFÁTICOS METASTÁTICOS

De los 16 casos de ganglios metastáticos, el 100% (16) expresó SP. De estos 16 casos, 1 (6,25%) lo hizo con mínima intensidad (+), 2 (12,50%) lo hacían con intensidad leve, 1 (6,25%) lo hizo con intensidad media y por último 12 (75,00%) lo hacían con máxima intensidad (Figura 38-42).

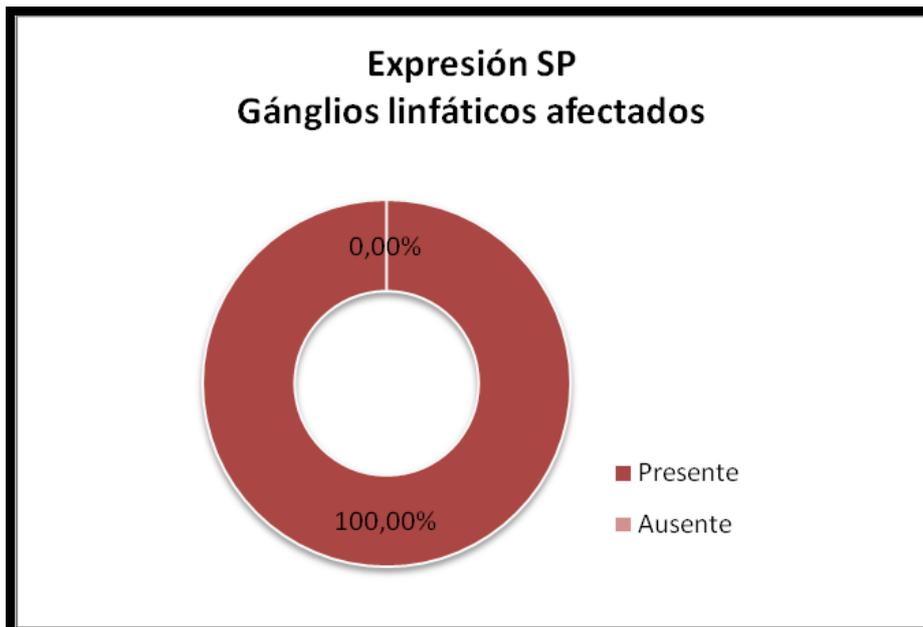


Figura 38. Expresión SP en ganglios linfáticos afectados.

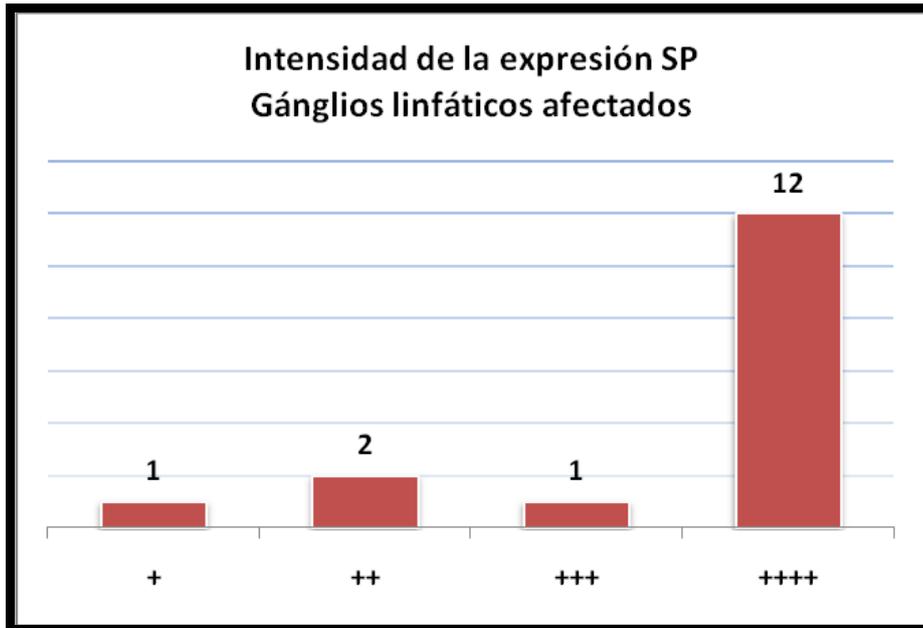


Figura 39. Intensidad de la expresión de SP en gánglios linfáticos metastáticos.

En los casos en que se estudió la distribución intracelular de la SP en los gánglios afectados, 12, se apreció que el 100 % de las muestras expresaban SP en el citoplasma, el 33,33% (4) expresaban SP en la membrana celular y el 41,66% (5) en el núcleo (Figura 40).

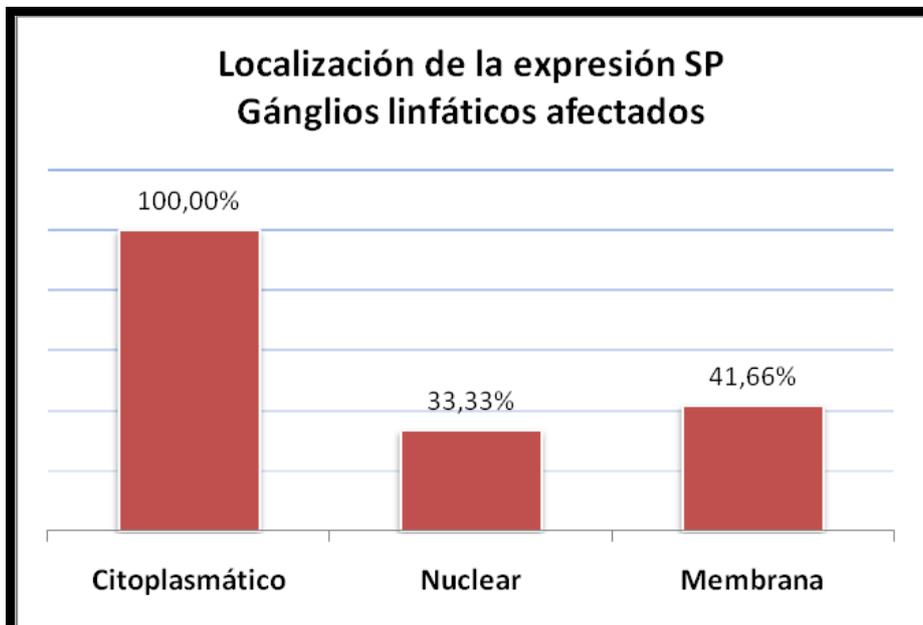


Figura 40. Localización de la expresión de SP en gánglios linfáticos afectados.

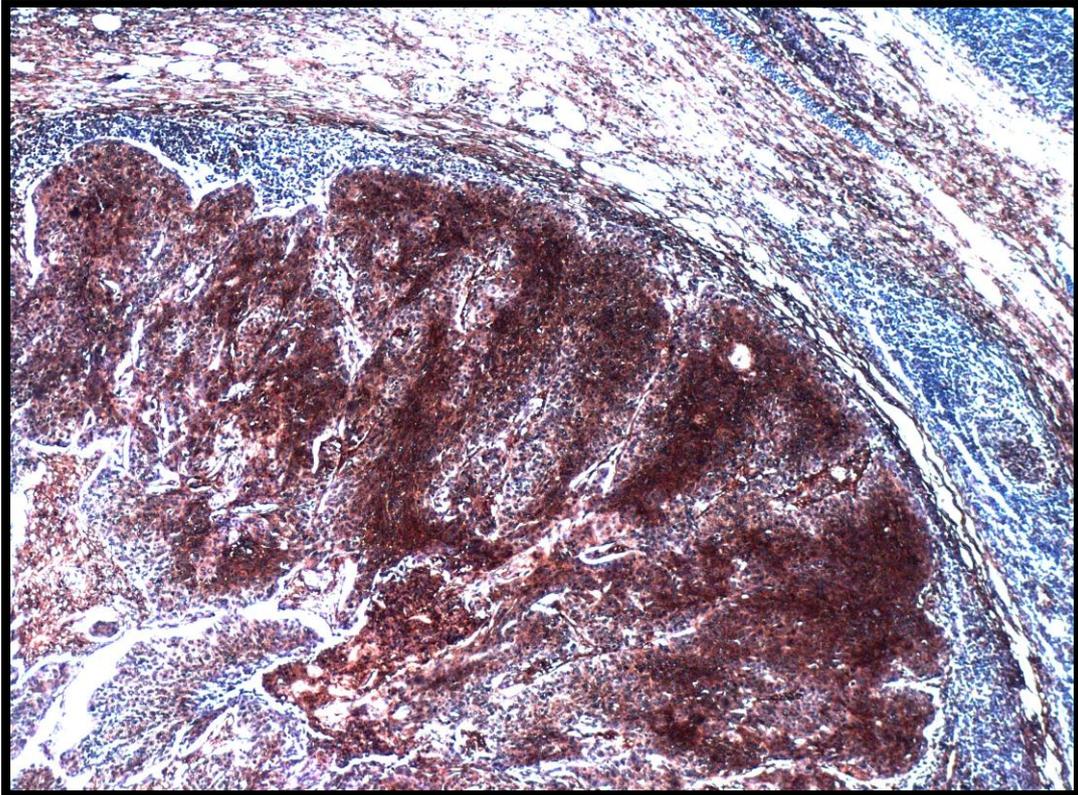


Figura 41. Expresión de SP en metástasis ganglionar. La SP se tiñe en todo el espesor del gánlio afectado.

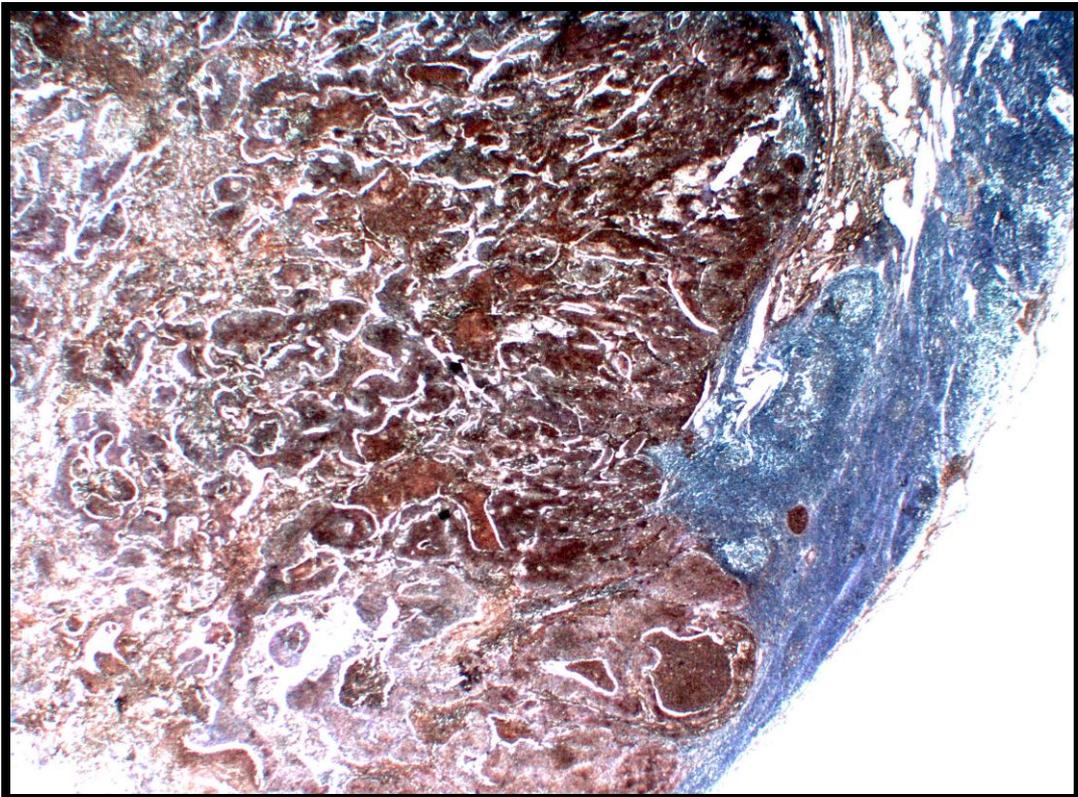


Figura 42. Expresión de SP en metástasis ganglionar (detalle).

4.2.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL NK1R

4.2.3.1. TEJIDO EPITELIAL ADYACENTE LIBRE DE TUMOR

De las 61 muestras válidas de tejido sano obtenidas, 52 (85,25%), expresaban NK1R. Esta expresión característicamente se produjo en las capas basales del epitelio, no obstante, se objetivó una clara relación entre las áreas de captación del NK1R y la transformación gradual maligna desde tejido a sano a carcinoma in situ. De este modo, se constató un incremento gradual de la captación en áreas displásicas leves, moderadas y severas. 9 casos (14,75%) no expresaron NK1R (Figura 43-45).

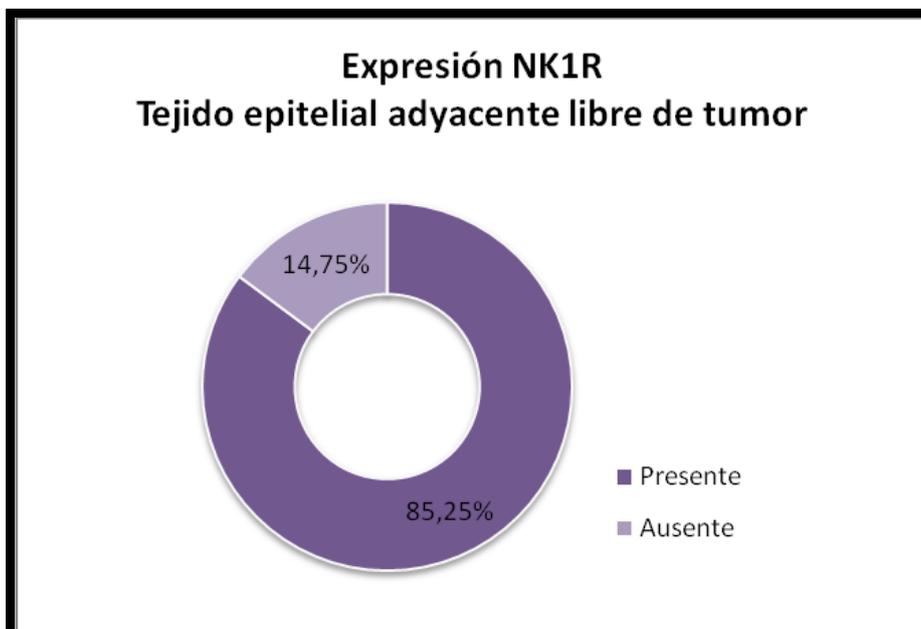


Figura 43. Expresión de NK1R en tejido epitelial adyacente libre de tumor.

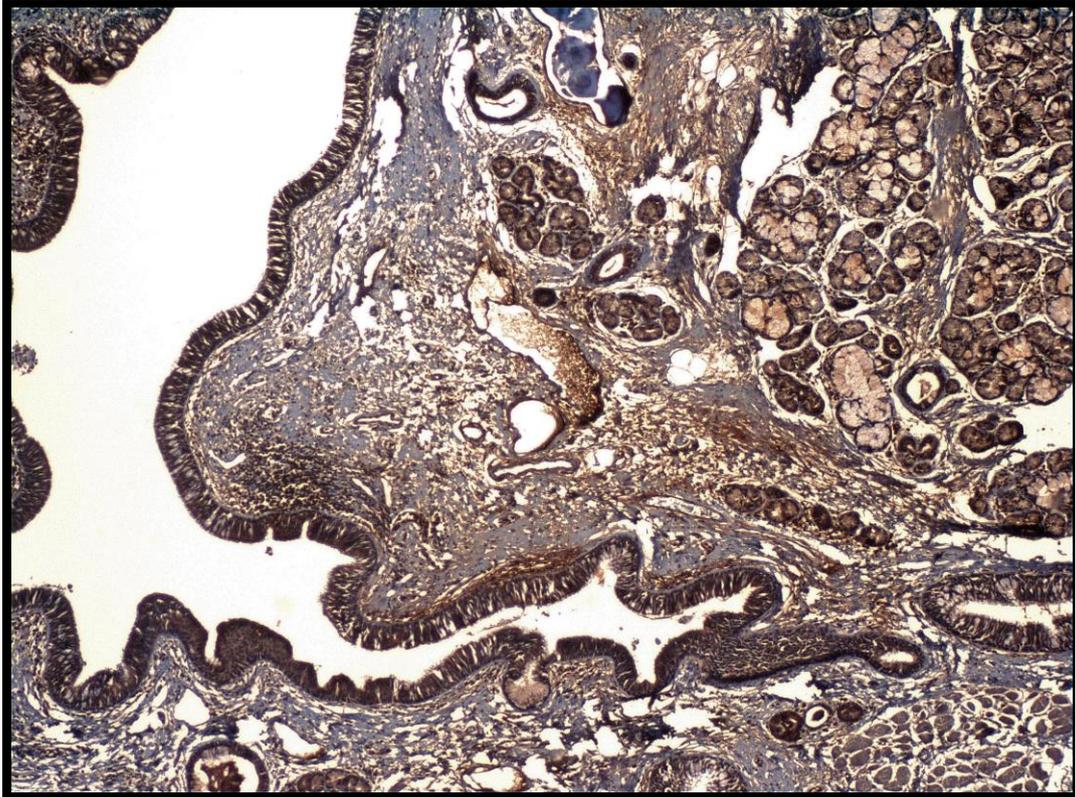


Figura 44. Expresión de NK1R en tejido epitelial sano.

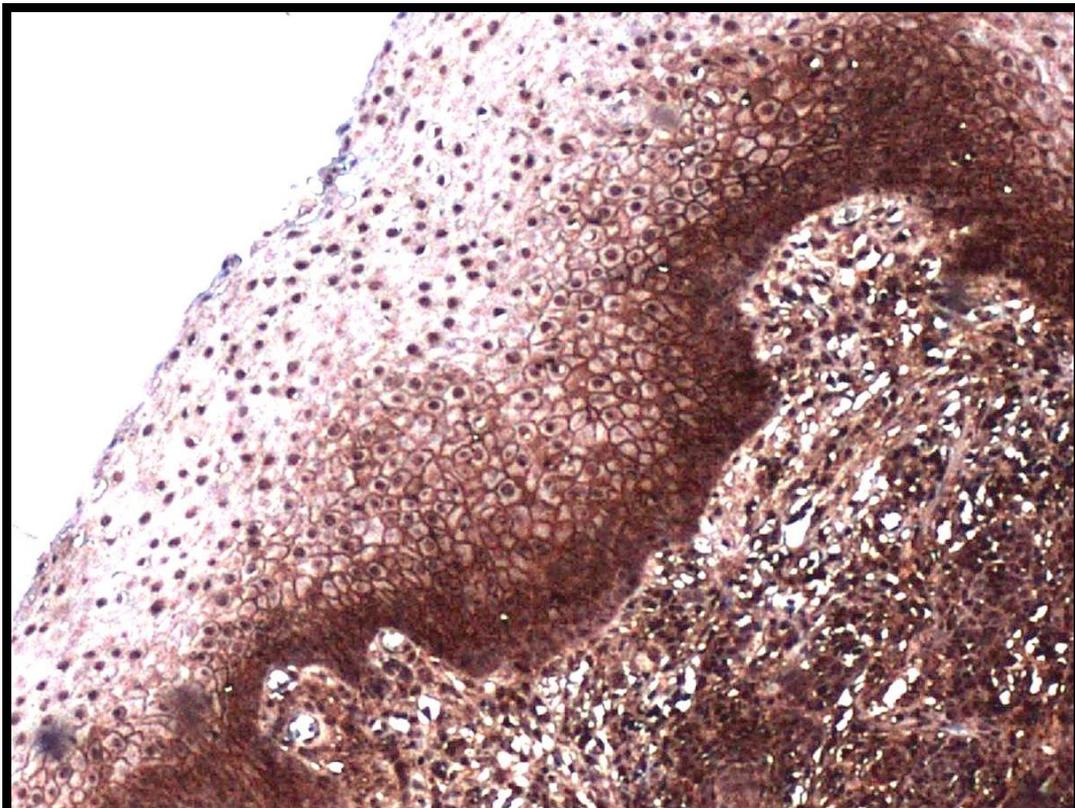


Figura 45. Expresión de NK1R en tejido epitelial sano (detalle). Tejido sano expresando NK1R en las capas basales del epitelio y con los receptores distribuidos por la membrana plasmática.

4.2.3.2. TUMORES LARÍNGEOS

De las 94 muestras válidas de tejido tumoral obtenidas, 73 (77,66%), expresaban en mayor o menor grado NK1R. De estas 73, 6 (8,22%) lo hacían con mínima intensidad (+), 17 (23,29%) lo hacían con intensidad leve, 2 (2,74%) lo hacían con intensidad media y por último 48 (65,75%) lo hacían con máxima intensidad. 21 casos (22,34%) no expresaban NK1R (Figura 46-50).

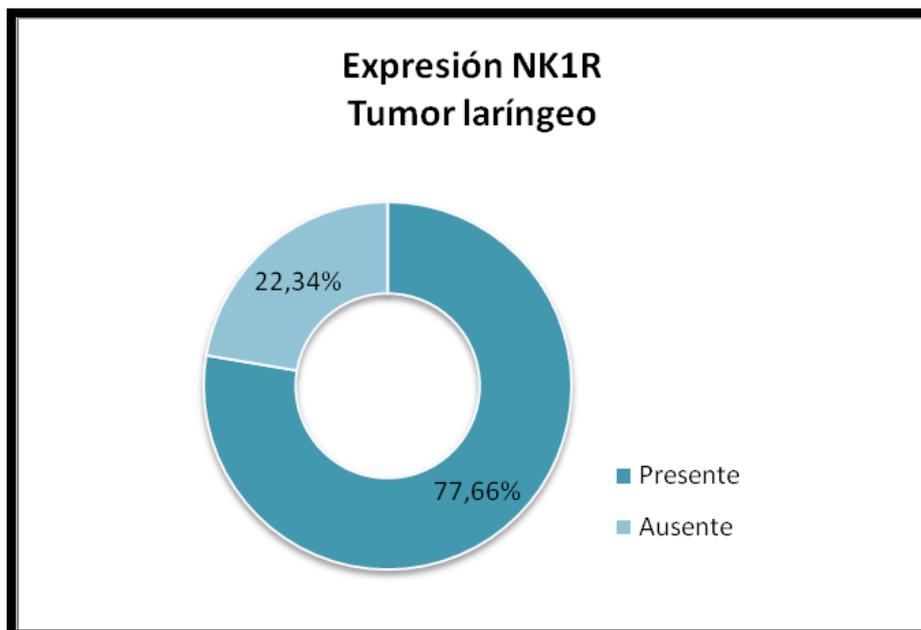


Figura 46. Expresión del NK1R en tumores laríngeos.

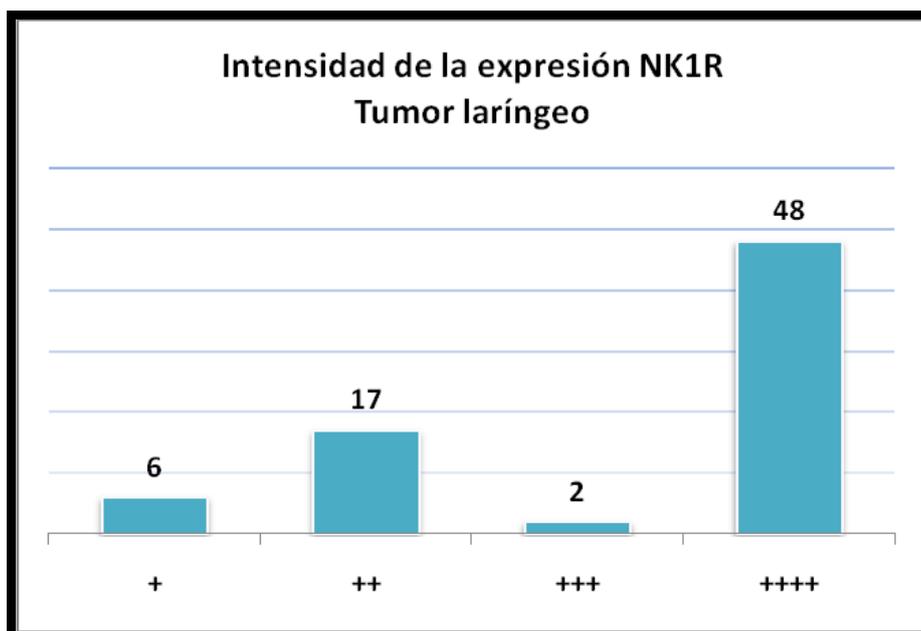


Figura 47. Intensidad de la expresión del NK1R en tumores laríngeos.



Figura 48. Expresión de NK1R en tumores laríngeos. Se aprecia la expresión incrementada del NK1R en el tumor mientras que en el tejido adyacente se constata la distribución basal típica.

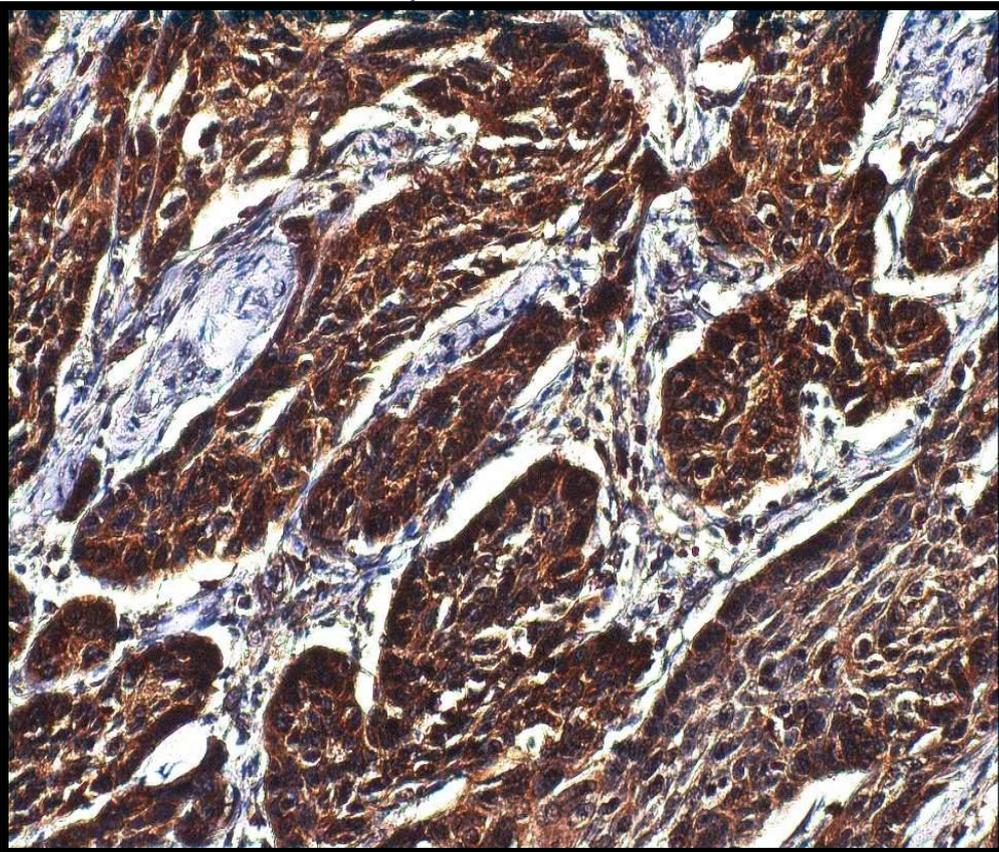


Figura 49. Expresión de NK1R de tumores laríngeos (detalle). El NK1R se expresa tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma y núcleo.

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

Se estudió la distribución intracelular de la NK1R intratumoral constatándose en el 100% de los casos (65) expresión del NK1R tanto en membrana celular como en el citoplasma.

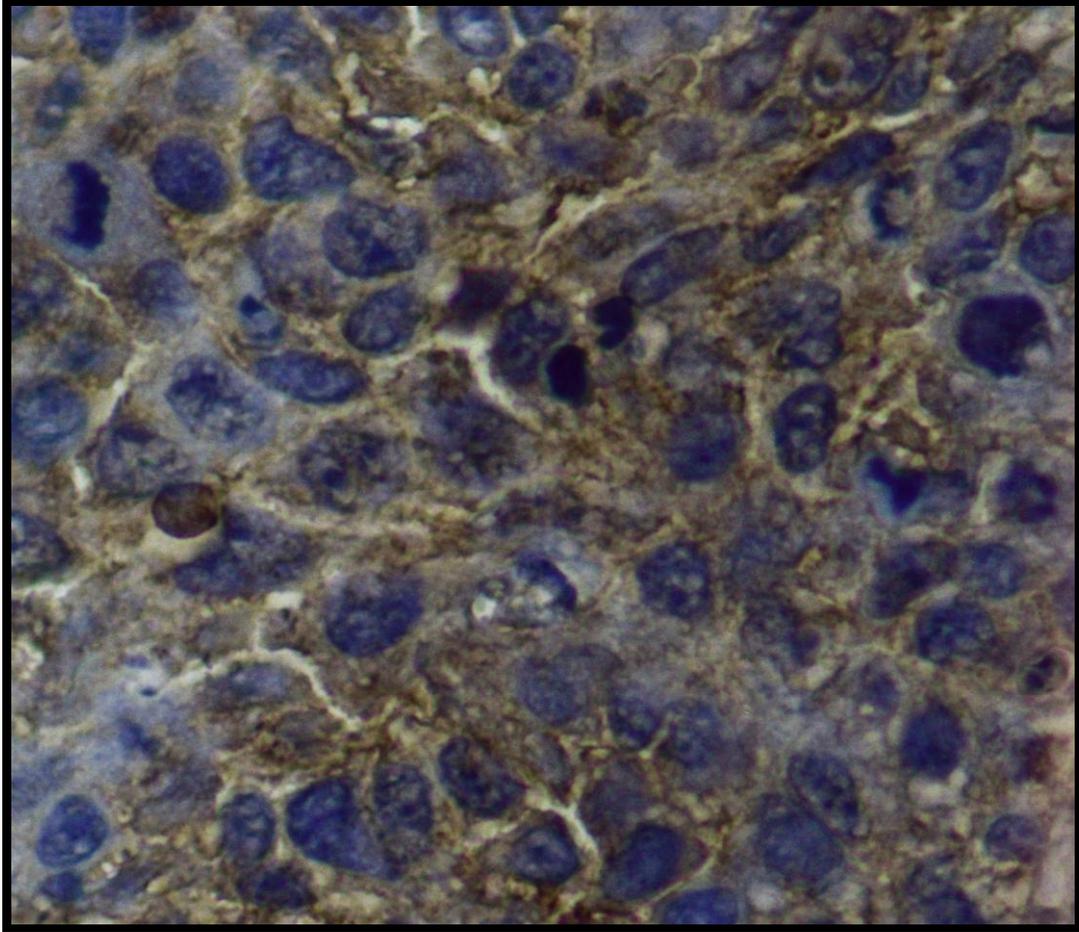


Figura 50. Expresión de NK1R en tumores laríngeos (detalle).

4.2.3.3. GANGLIOS LINFÁTICOS METASTÁTICOS

De las 12 muestras válidas de ganglios metastáticos, el 91,67% (11) expresó NK1R. De estos 11 casos, 1 (9,09%) lo hizo con mínima intensidad (+), 1 (9,09%) lo hizo con intensidad leve, ninguno (0%) lo hizo con intensidad media y por último 9 (81,82%) lo hacían con máxima intensidad. Solamente 1 muestra (8,33%) no expresó NK1R (Figura 51-54).

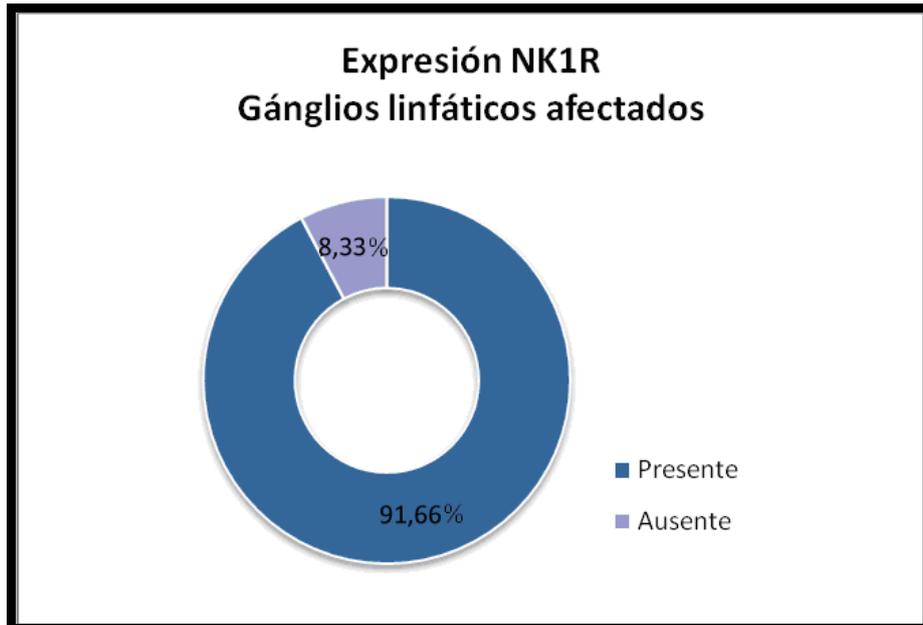


Figura 51. Expresión de NK1R en gánglios linfáticos afectados.

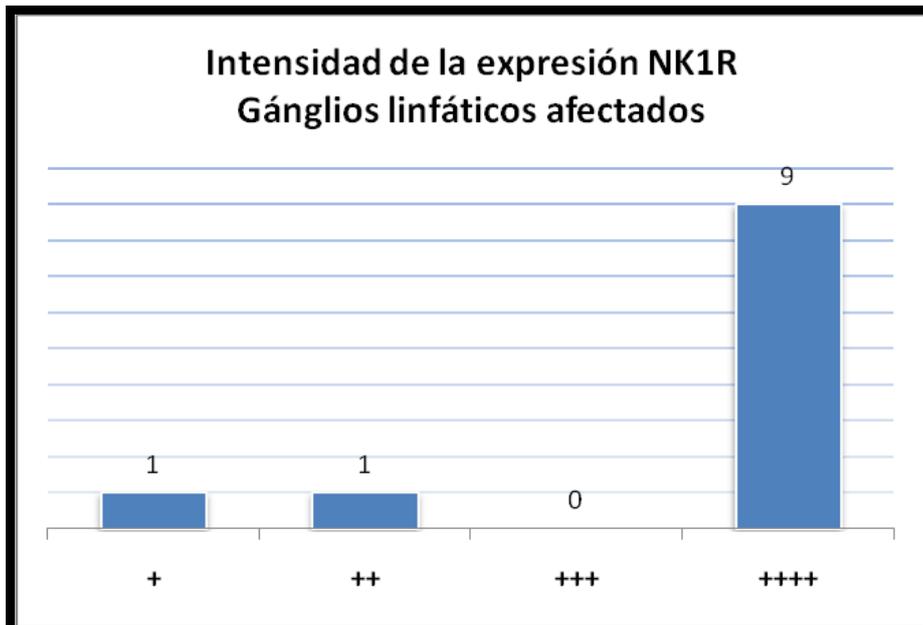


Figura 52. Intensidad de la expresión de NK1R en gánglios linfáticos afectados.

En los casos en los que se estudió la distribución intracelular de la NK1R, se apreció que el 100% de las muestras (9) expresaban NK1R tanto en el citoplasma como en la membrana.

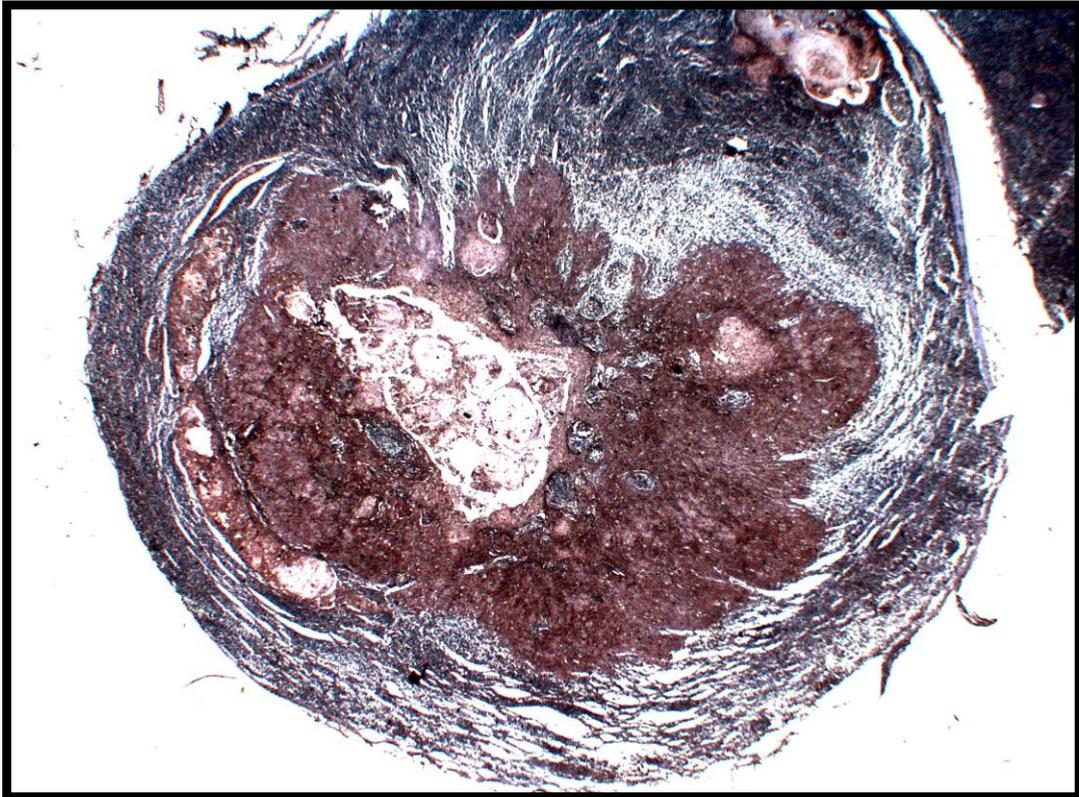


Figura 53. Expresión de NK1R en metástasis ganglionar.

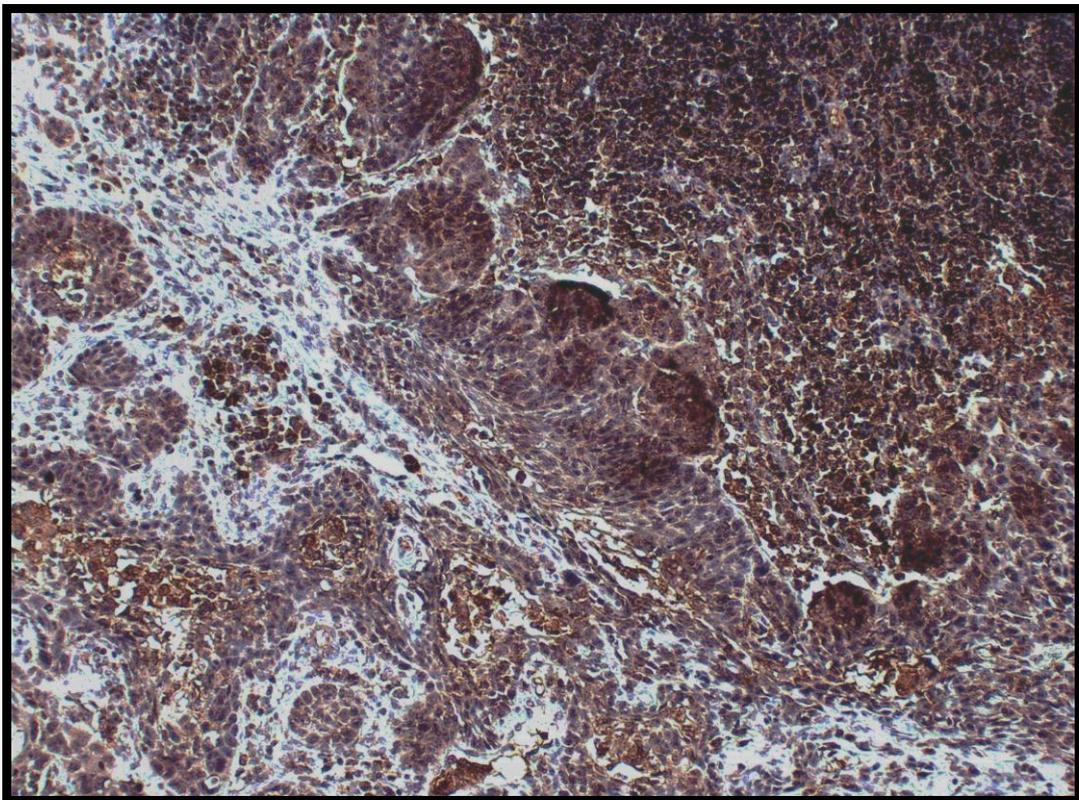


Figura 54. Expresión de NK1R en metástasis ganglionar (detalle).

4.2.4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

4.2.4.1. VARIABLE A ESTUDIAR: TINCIÓN PARA NK1R

4.2.4.1.1. ESTUDIO SOBRE LAS VARIABLES CONTINUAS

VARIABLE	Media del grupo NK1R +	Desviación standard	Media del grupo NK1R -	Desviación standard	Valor p
Duración de síntomas	4,327	5,288	8,326	12,322	p=0,0811
Número de metástasis	1,069	2,526	0,653	1,549	p=0,4518

Tabla 6. Resultados estadísticos sobre de la tinción del NK1R y las variables continuas del estudio.

Como se puede apreciar en la Tabla 6, aunque ninguna de las dos variables son significativas, parece existir una tendencia a que los pacientes con poca expresión de NK1R tengan mayor duración de síntomas.

4.2.4.1.2. ESTUDIO SOBRE LAS VARIABLES CATEGÓRICAS

VARIABLE	SIGNIFICACIÓN
Consumo de alcohol	p=0,764
Consumo de tabaco	p=0,462
Afectación del seno piriforme	p=0,184
Afectación de la base de la lengua	p=0,329
Presencia de traqueotomía previa	p=0,789
Presencia de cirugía previa	p=0,525
Márgenes afectados	p=0,069
Localización tumoral	p=0,416
Estadio T	p=0,796
Estadio N	p=0,934
Administración de radioterapia posterior	p=0,933
Estructura y borde del tumor	p=0,354
Invasión vascular	p=0,631

Tabla 7. Resultados estadísticos sobre de la tinción del NK1R y las variables categóricas del estudio.

Como se aprecia en la Tabla 7, ninguna de las comparaciones alcanzó relevancia estadísticamente significativa.

4.2.4.2. VARIABLE A ESTUDIAR: TINCIÓN PARA SP

4.2.4.2.1. ESTUDIO SOBRE LAS VARIABLES CONTINUAS

VARIABLE	Media del grupo SP +	Desviación standard	Media del grupo SP -	Desviación standard	Valor p
Duración de síntomas	5,438	8,448	8,913	10,941	p=0,953
Número de metástasis	1,069	2,526	0,653	1,549	p=0,999

Tabla 8. Resultados estadísticos sobre de la tinción de la SP y las variables continuas del estudio.

Como se aprecia en la Tabla 8, ninguna de las comparaciones es estadísticamente significativa.

4.2.4.2.2. ESTUDIO SOBRE LAS VARIABLES CATEGÓRICAS

VARIABLE	SIGNIFICACIÓN
Consumo de alcohol	p=0.036 (artefacto)
Consumo de tabaco	p=0,433
Afectación del seno piriforme	p=0,199
Afectación de la base de la lengua	p=0,507
Presencia de traqueotomía previa	p=0,414
Presencia de cirugía previa	p=0,895
Márgenes afectados	p=0,882
Localización tumoral	p=0,101
Estadio T	p=0,125
Estadio N	p=0,073
Administración de radioterapia posterior	p=0,646
Estructura y borde del tumor	p=0,620
Invasión vascular	p=0,860

Tabla 9. Resultados estadísticos sobre de la tinción de la SP y las variables categóricas del estudio.

Como se aprecia en la Tabla 9, ninguna de las comparaciones alcanzó relevancia estadísticamente significativa.

4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO IN VITRO DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R

4.3.1. IDENTIFICACIÓN DEL NK1R

Mediante la técnica Western Blot se objetivó la presencia del NK1R en la línea celular de cáncer de laringe Hep-2. Tras el revelado de fluorescencia de las membranas de PVDF que contiene las proteínas extraídas de la línea celular, como se ha indicado en material y método, se observa la presencia de varias isoformas del NK1R. Se describe la existencia de cuatro isoformas, de mayor a menor peso molecular, 75, 58, 46 y 34 kDa. Cuando se realiza el proceso de incubación utilizando únicamente el segundo anticuerpo, no se observa la aparición de ninguna banda (Figura 55).

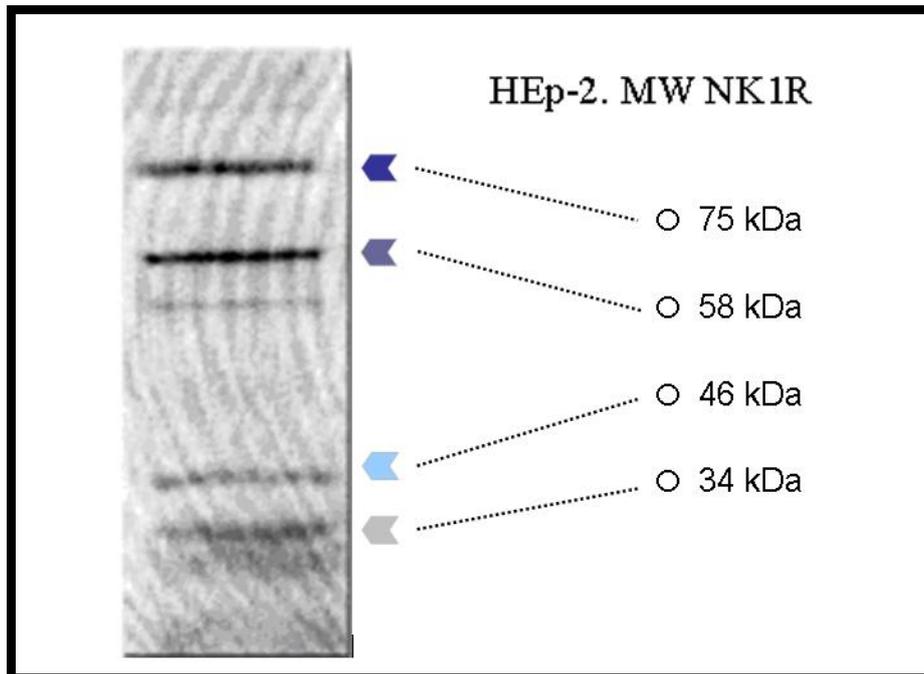


Figura 55. Identificación del NK1R mediante Western Blot.

4.3.2. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR DE LA LÍNEA Hep-2 MEDIADO POR LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R

La adicción de los antagonistas del NK1R L-733,060 y L-732,138 a concentraciones crecientes originó una inhibición del crecimiento celular de la línea celular Hep-2 de tal modo que el efecto citotóxico mediado por estos antagonistas es concentración-dependiente. Concretamente, la concentración requerida para la reducción de la densidad óptica en un 50% (IC50) se determinó en 21.34 μM y 37.97 μM durante 48 horas para L-733,060 y L-732,138 respectivamente. Por otro lado, el mayor grado de inhibición se obtuvo con concentraciones de 40 μM para L-733,060 y 80 μM para L-732,138. En el primer tiempo de duplicación se comprobó una gran disminución del número de células cuando se utilizaron concentraciones de antagonistas intermedias, de tal modo que cuando se utilizaron concentraciones máximas ninguna célula sobrevivió tras este periodo. Por último cuando se utilizaron concentraciones bajas (sobre los 5 μM) se obtuvo una escasa inhibición del crecimiento celular.

En las siguientes gráficas (Figura 56 y 57) se puede apreciar el porcentaje de inhibición del crecimiento celular de la línea Hep-2 tras las 48 horas de su cultivo *in vitro* tras la aplicación de distintas concentraciones de antagonistas del NK1R (5,10, 20 y 40 μM para L-733,060 y 5, 10, 20, 40, 60 y 80 μM para L-732,138). El porcentaje de inhibición tras el primer tiempo de duplicación (48 horas) se ha representado en un gráfico de líneas. El nivel de significancia fue establecido en $p < 0,05$ p. Los datos fueron expresados como la media \pm el error standard. Se ha especificado la línea de regresión así como la ecuación para obtener el IC50.

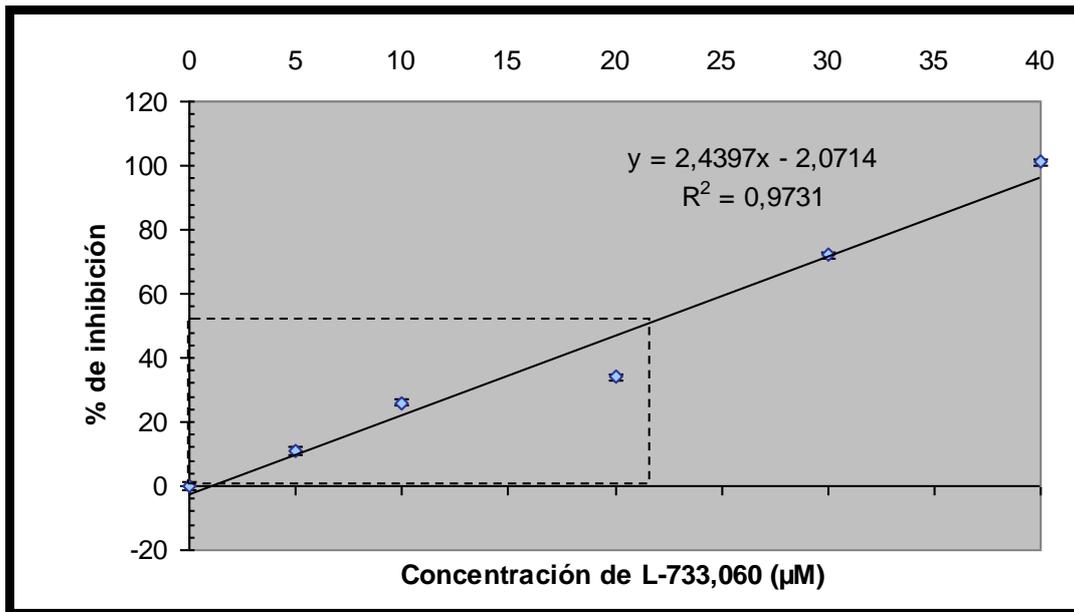


Figura 56. Inhibición del crecimiento celular de la línea Hep-2 mediado por L-733,060.

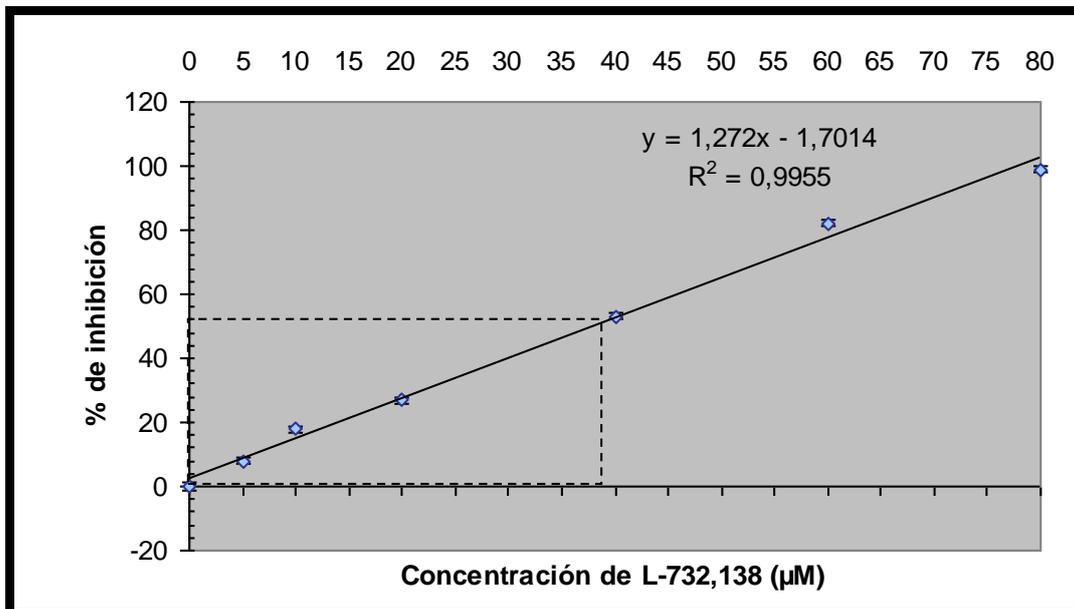


Figura 57. Inhibición del crecimiento celular de la línea Hep-2 mediado por L-732,138.

4.3.3. ACCIÓN MITOGÉNICA DE LA SP EN LA LÍNEA CELULAR Hep-2

Para demostrar la acción mitogénica de la SP, se añadió esta sustancia al cultivo celular como se indicó en la sección de material y método. De este modo se objetivó un incremento en el crecimiento celular, en relación a los controles, tras la adición de diferentes concentraciones nanomolar de SP (5, 10, 50, 100 nM). Este incremento del crecimiento se hizo patente a concentraciones de 5 nM alcanzándose el máximo nivel a concentraciones 50 nM. Todo esto indica que la activación del NK1R por parte de la SP origina mitogénesis en las células de la línea celular de cáncer de laringe Hep-2. El porcentaje de proliferación celular varió entre el 9,8 y el 16,2% dependiendo de la dosis administrada.

La siguiente gráfica muestra la inducción de la proliferación celular tras la administración de SP a diferentes concentraciones nanomolar (Figura 58).

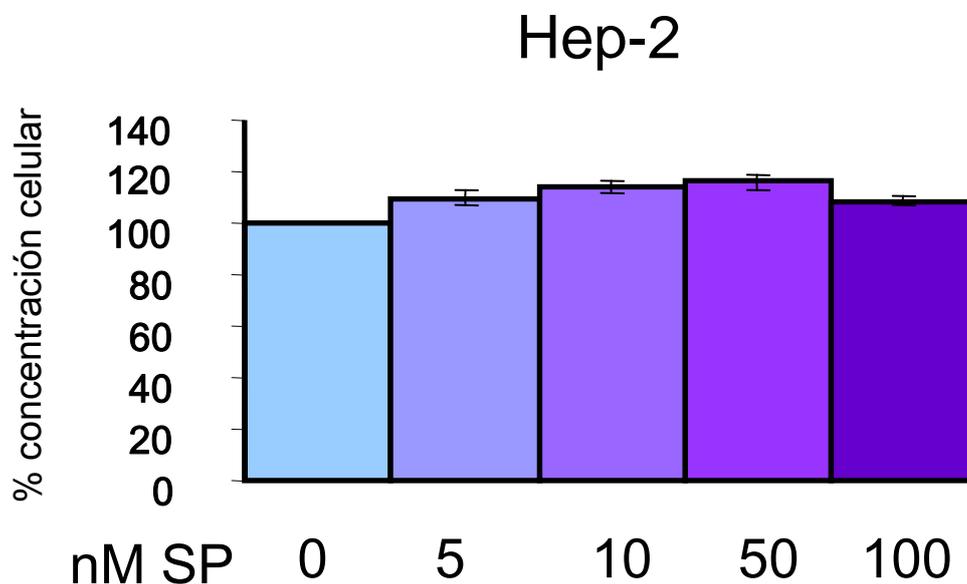


Figura 58. Inducción de la proliferación celular tras la administración de SP.

4.3.4. ESTUDIO DE LA COMPETICIÓN DE LA SP Y LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R L-733,060 Y L-732,138 EN LA LÍNEA CELULAR Hep-2

La adicción de 20 y 40 μM de L-733,060 y L-732,138 respectivamente induce una inhibición del crecimiento celular en relación con los controles. Para determinar si estos fármacos inhiben la proliferación vía interacción con el receptor de la SP, se llevó a cabo un experimento competitivo. De este modo, la adicción de 20 μM de L-733,060 y 50 nM de SP dio como resultado una concentración celular mayor que la observada cuando se añadió solamente el antagonista a 20 μM . De forma similar, la adicción de 40 μM de L-732,138 y 50 nM de SP dio como resultado una concentración celular mayor que la observada cuando se añadió solamente el antagonista a 40 μM . Todo esto parece indicar que tanto L-733,060 como L-732,138 bloquean el estímulo mitogénico de la SP ya que la acción inhibitoria de ambos antagonistas fue parcialmente revertida por la administración de una dosis nanomolar de SP exógena. Esto sugiere la especificidad de la activación de los receptores taquicinérgicos NK1R en el crecimiento celular de la línea Hep-2 en el presente experimento. El aumento en la concentración celular en este último caso fue del 17.5 y 47.7% respectivamente para L-733,060 y L-732,138 en relación con su administración sola sin la SP, no obstante estas diferencias no fueron significativas entre control y control y DMSO.

Las siguientes gráficas (Figura 59 y 60) además de mostrar la inducción de la proliferación celular tras la administración de SP a diferentes concentraciones nanomolar, también muestran el comportamiento del crecimiento celular en relación a la adicción de antagonistas de NK1R.

El L-733,060 se añadió a concentraciones de 20 μM en presencia y ausencia de 50 nM de SP. Los resultados mostrados son tras la incubación durante 48 horas. Se usó el test ANOVA para demostrar la presencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01^*$) entre cada grupo y el grupo control(nada-nada). # indica el valor de la significancia entre 50-nada vs

50-20 y x 50-20 vs nada-20. # y x con $p < 0,01$. Los datos fueron expresados como la media \pm el error standard.

Por otro lado, L-732,138 fue añadido a concentraciones de 40 μM en presencia y ausencia de 50 nM de SP. Se usó el test ANOVA para demostrar la presencia de diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01^*$ y $p < 0.05^{**}$) entre cada grupo y el grupo control(nada-nada). # indica el valor de la significancia entre 50-nada vs 50-40 y x 50-40 vs nada-40. # y x con $p < 0,01$. Los datos fueron expresados como la media \pm el error standard.

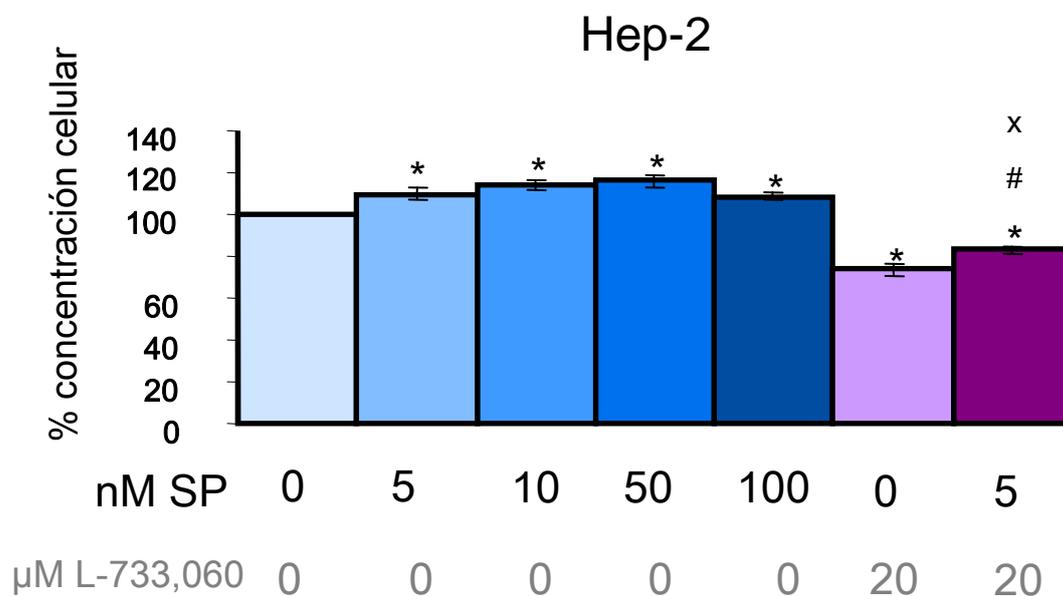


Figura 59. Inducción de la proliferación celular tras la administración de SP y su respuesta frente al L-733,060.

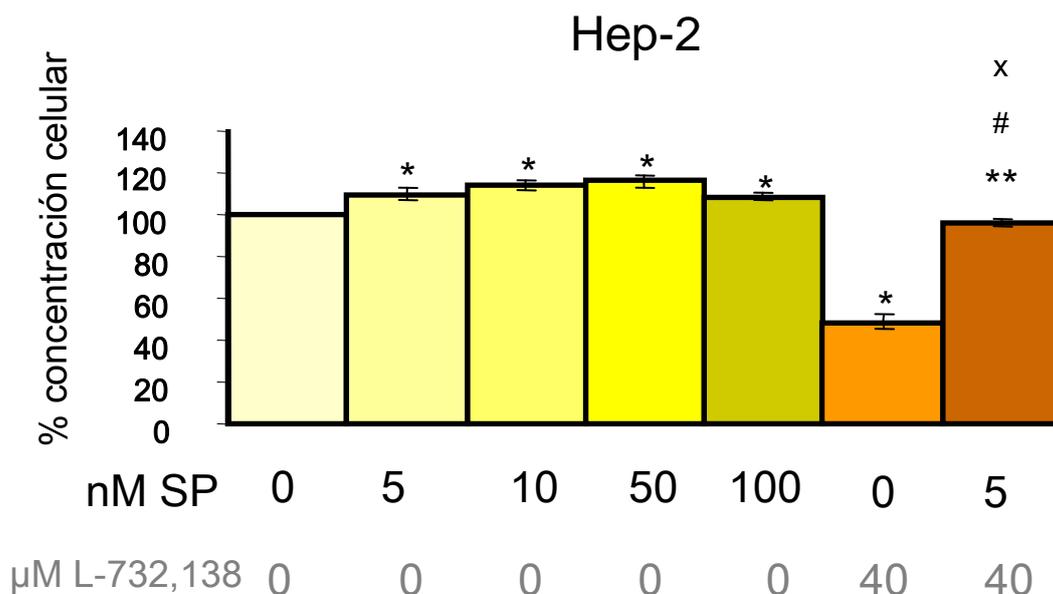


Figura 60. Inducción de la proliferación celular tras la administración de SP y su respuesta frente al L-732,138.

4.3.5. INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS DE LA LÍNEA CELULAR Hep-2 MEDIADA POR ANTAGONISTAS DEL NK1R

Se comprobó que tras la administración de ambos antagonistas del NK1R (733,060 y L-732,138) un gran número de células sufrían cambios apoptóticos. Concretamente, se observó un 42.88 ± 1.38 (desviación standard) % y un 36.34 ± 2.08 (desviación standard) % de células apoptóticas tras la administración de L-733,060 y L-732,138 respectivamente. La objetivación de estos cambios apoptóticos se llevaron a cabo mediante la técnica de tinción DAPI.

En las siguientes imágenes (Figura 61) se pueden apreciar dichos cambios, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear.

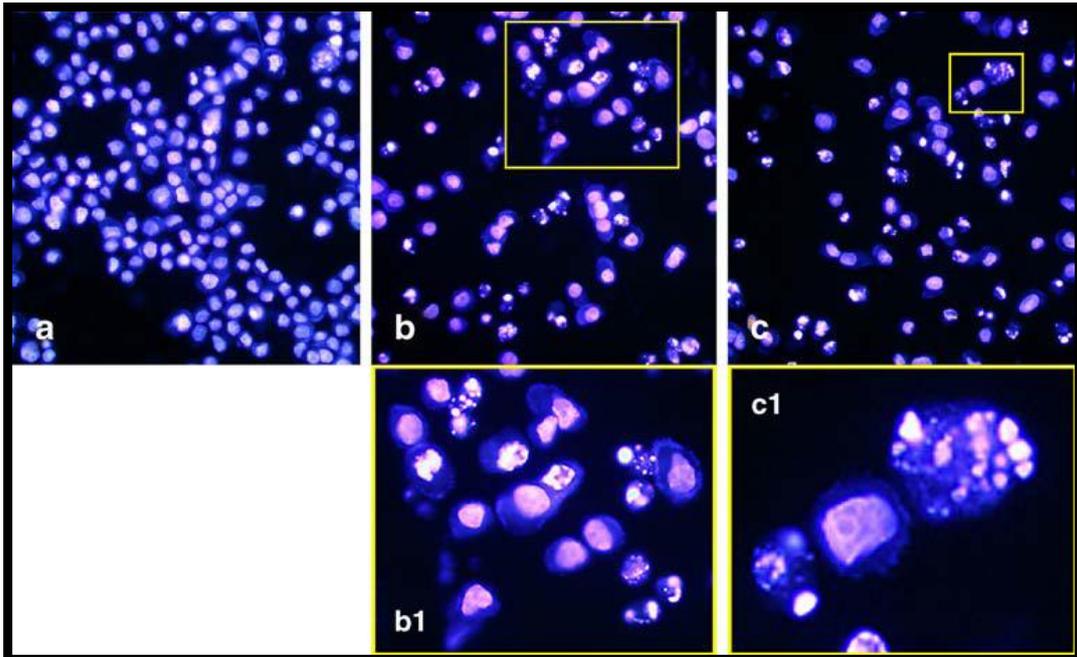


Figura 61. Técnica DAPI para demostrar la muerte por apoptosis de las células tumorales. Figuras a,b y c mostradas a 40x. B1 y C1 son una ampliación de B y C. (b1: 70x, c1: 120x).

V. DISCUSIÓN

5.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SP Y EL NK1R

El estudio inmunohistoquímico de SP sobre tejido sano indica que prácticamente la totalidad de las muestras (98,13%) expresaban en mayor o menor grado SP. Es importante recalcar que la localización predominante fueron las capas basales del epitelio. Este hecho coincide con la hipótesis de que la SP es un potente agente mitogénico ya que es en esta localización del tejido epitelial sano donde se producen las divisiones celulares que conforman la renovación continua del epitelio.

El análisis de las muestras de tejido tumoral presentaron, en mayor o menor grado, un 95,20% tinción positiva para SP. De este porcentaje, la mayoría (79,83%) lo hacían de manera muy intensa (4+). A nivel intracelular la distribución de la SP era predominantemente citoplasmática aunque también podía observarse en la membrana y en el núcleo, así como combinaciones de los tres. Estos resultados están en consonancia con los datos obtenidos en el tejido sano: La SP tiñe en las áreas de mitosis, tanto en tejido sano, en las capas basales del epitelio, como en tejido tumoral, en aquellas áreas donde se están replicando las células de manera descontrolada.

Por último las metástasis de los tumores en los ganglios linfáticos afectos 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 su citoplasma presentándose además en menor porcentaje SP en el núcleo y en la membrana. Esto apoya la teoría de la internalización del NK1R ya comentada anteriormente. Al igual que en el caso anterior la SP traduce regiones con una marcada actividad mitogénica.

Importancia de la sustancia P y su receptor en el cáncer de laringe

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.

Respecto al NK1R, los estudios realizados en tejido laríngeo sano muestran que el 85,24% de las muestras expresan NK1R. Al igual que en las muestras teñidas con SP, el NK1R se expresa fundamentalmente en las capas basales. Es importante recalcar se apreció una clara relación entre las áreas de captación del NK1R y la transformación gradual maligna desde tejido sano a carcinoma in situ. De este modo se constató un incremento gradual de la captación en áreas displásicas leves, moderadas y severas. Este hecho vuelve a poner de manifiesto la relación entre SP-NK1R y proliferación tumoral.

El tejido tumoral primario expresó, en mayor o menor grado, NK1R en un 77,66%. La distribución intracelular fue predominantemente en el citoplasma y en la membrana celular. El NK1R 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 ganglionares, el 91,67% expresó NK1R en las regiones afectas por el tumor.

Estos resultados coinciden con otros estudios inmunohistoquímicos realizados para otros tejidos tumorales^{376 377}.

El análisis univariable que hace referencia a las posibles relaciones entre la expresión de SP y NK1R y el resto de las variables recogidas en el estudio no mostraron ninguna relación estadísticamente significativa, presumiblemente, el hecho de que la mayoría de las muestras expresen tanto SP como NK1R hace poco probable que se puedan apreciar diferencias sustanciales entre las distintas variables.

Aunque parece ser que la expresión de la SP y el NK1R no está en relación con ningún factor, en el análisis se constató una cierta tendencia por la

cual los pacientes portadores de tumores con baja expresión de NK1R poseen una mayor duración de los síntomas antes del diagnóstico. Esto puede hacer pensar que este tipo de tumores con concentraciones bajas de NK1R puedan tener un lento crecimiento debido a la falta de la estimulación mitogénica que produce el binomio NK1R /SP.

5.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO IN VITRO DE LOS ANTAGONISTAS DE LA SP

La segunda parte del estudio consiste en analizar la actividad de la SP y de los antagonistas del NK1R L-733,060 y L-732,138 en la línea celular de cáncer de laringe Hep-2.

Para llevar a cabo este estudio es necesario demostrar previamente la existencia del NK1R en las células tumorales de la línea Hep-2. Mediante la técnica Western Blot se comprobó la presencia de 4 isoformas del NK1R de distinto peso molecular quedando demostrada la existencia del receptor. En estudios llevados a cabo con otras líneas celulares también se constató este hecho con distinto número de isoformas, a pesar de estos resultados constantes, todavía se desconoce cual es el papel funcional de estas distintas isoformas del NK1R ^{378 379 380}.

El siguiente paso fue demostrar como la adicción de los antagonistas del NK1R produce una inhibición del crecimiento de la línea tumoral en relación con los controles. Esto quedó demostrado para ambos antagonistas estudiados de tal modo que el efecto citotóxico obtenido fue dosis dependiente. Así pues, a concentraciones de antagonista bajas (5 µM) se obtuvo una escasa inhibición del crecimiento celular, por otro lado, cuando se usó a máxima dosis (40 y 80 µM respectivamente para L-733,060 y L-732,138) ninguna célula sobrevivió a las 48 horas. Estos resultados demuestran como los antagonistas del NK1R tienen la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral en la línea de cáncer de laringe Hep-2.

Los resultados del estudio inmunohistoquímico insinúan que la SP puede estar implicada en los mecanismos de proliferación celular, no obstante para demostrar esta hipótesis se procedió a estudiar la respuesta de la SP sobre el crecimiento de la línea celular de cáncer de laringe Hep-2. Para este fin se añadieron dosis crecientes nanomolares de SP al medio de cultivo. El resultado obtenido fue un incremento en la proliferación celular entre un 9,8 y un 16,2%. Queda por tanto demostrada que la SP no sólo se encuentra en las regiones donde existe proliferación celular sino que ella en sí misma la induce.

A pesar de estos resultados, es importante demostrar que los antagonistas del NK1R actúan inhibiendo la proliferación celular mediante su interacción con el receptor de la SP. Para ello se realizó un experimento competitivo. Los resultados mostraron como la proliferación celular inducida por una dosis fija de SP era mayor que la observada al añadir la misma dosis de SP junto con un antagonista del NK1R. Esto demuestra por tanto la especificidad de la actividad de la SP y los antagonistas del NK1R sobre los NK1R existentes en la línea celular Hep-2. A pesar de que ambos antagonistas son estructuralmente muy diferentes, L-733,060 es un derivado de la piperidina y L-732,138 es un derivado del L-triptófano, ambos tienen la misma acción antitumoral teniendo únicamente en común su especificidad para el NK1R. No obstante, comparando los resultados obtenidos se aprecia que el L-732,138 posee una actividad inferior que la del L-733,060, que es dos veces más potente. Este fenómeno podría estar relacionado con la afinidad de cada fármaco con el receptor (2,3 nM para el L-732,138 y 0,8 nM para el L-733,060)

Estos resultados de proliferación celular son similares a los obtenidos en otros estudios realizados con otras líneas celulares de cáncer ^{334 341 342 343 344 345}
^{346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361}

Por último, con el objeto de demostrar la muerte celular inducida por los antagonistas del NK1R se estudiaron mediante la técnica de tinción DAPI los cambios apoptóticos inducidos tanto por el L-733,060 como por el L-732-138. Los resultados obtenidos, condensación de la cromatina y fragmentación

celular entre otros, indican que los antagonistas del NK1R inducen la apoptosis en las células tumorales de la línea celular Hep-2 de cáncer de laringe. Esta técnica se llevó a cabo con otras líneas celulares en otros estudios obteniéndose resultados similares.

5.3. DISCUSIÓN DEL PAPEL DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE LARINGE

Ha quedado demostrado cómo los tejidos tumorales laríngeos estudiados expresan SP y NK1R tanto en el interior de la masa tumoral como en su periferia. Así mismo se ha detectado la existencia de NK1R en los vasos sanguíneos peritumorales, hecho que puede tener importantes implicaciones clínicas.

Las diferencias existentes entre la expresión de SP/NK1R en tejidos sanos y tejidos tumorales parecen residir tanto a nivel distributivo como cuantitativo. Ha quedado demostrado que el binomio SP/NK1R aparece en las zonas donde existe actividad mitogénica, a saber, en las capas basales del epitelio sano y en todo el espesor tumoral en tejido canceroso. En este último 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.

5.3.1. ACTIVIDAD MITOGENICA DE LA SP

La acción mitogénica mediada por SP no es del todo conocida. El mecanismo a nivel molecular por el que el NK1R induciría la mitogénesis es confuso. Una vez que el receptor es activado por su ligando, la SP, el NK1R 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 al crecimiento como a la apoptosis celular ^{372 373} El mecanismo por el que esta señal se transmite de forma específica es desconocido, no obstante, la explicación podría estar en unos complejos de proteínas “de andamio” que determinan la localización subcelular y consecuentemente la especificidad de las proteínas señalizadoras ^{381 382}. 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 ERK1/2 ³⁸³. 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 ^{384 385 386}. 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 andamio, 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 NK1R, 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 ³⁸⁷ de modo que en los colonocitos humanos activan metaloproteinasas de la matriz que inducen la liberación de TGF. Se ha podido demostrar la relación entre SP y ciertos

oncogenes, así pues, Luo et al.³⁴² 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 NK1R 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 transformación³⁸⁸. 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 Ras³⁸⁹. Se ha demostrado que el mecanismo de transactivación del EGFR por parte del complejo SP/NK1R 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 de colonocitos y células de astrocitomas. Esta nueva ruta puede participar tanto en la proliferación celular mediada por SP de varias líneas celulares, así como en el daño mucosa de la colitis crónica. Finalmente, estas señales inducidas por NK1R tienen cierta relevancia en la creciente idea de que el complejo SP/NK1R tiene capital importancia en el desarrollo y progresión del crecimiento de tumores de distinta etiología incluyendo cáncer de páncreas, gliomas humanos, cáncer de mama así como displasia de colon y carcinoma.

Se conoce que la SP estimula la mitogénesis activando NK1R tanto en células normales^{390 391 392} como neoplásicas. Además se ha demostrado la expresión aumentada del NK1R en diferentes líneas celulares tumorales como U373 MG, U138 MG, UC11 MG y GAMG de las líneas celulares de gliomas humanos así como astrocitomas y neuroblastomas. Apoyando esto, se ha

confirmado una función mitogénica en la regeneración de miembros en anfibios³⁹³, además se ha comprobado esta misma función en células del tejido conectivo en mamíferos³⁹⁴. En varias líneas celulares de gliomas humanos, la presencia de NK1R está estrictamente correlacionado 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 NK1R 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 NK1R 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. Esto mismo ha podido evidenciarse en otras líneas celulares como neuroblastoma SKN-BE así como en retinoblastoma humano WERI-Rb-1 y Y-79.

Se ha comprobado, gracias a la inmunohistoquímica como la expresión del NK1R se encuentra aumentada en diferentes líneas celulares tumorales humanas en relación a las células normales del organismo^{395 376}.

Esteban et al.³⁹⁶ proponen que, el aumento de los NK1R 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 oncogén se activa^{397 398 399 400 401}. Parece ser que células en senectud existen en tejidos en estadio pre-maligno pero no en los malignos⁴⁰². 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 oncogenes promotores del crecimiento. Esta activación dispara la apoptosis celular en un intento de contrarrestar el desarrollo del cáncer⁴⁰³. 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 NK1R podría producir la translocación celular del Nur-77, como ha sido demostrado por Castro-Obregon et al ⁴⁰⁴. Esto podría representar un nuevo y rápido factor de crecimiento de supervivencia independiente de la regulación génica.

Además, en varios estudios realizados sobre NK1R 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 peritumorales ⁴⁰⁵. 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 NK1R sea un mecanismo alternativo y más sencillo de obtener nuevos vasos sanguíneos en lugar de activar un variado repertorio de fenotipos proangiogénicos ³¹⁰. Además, el crecimiento de la masa tumoral, la infiltración peritumoral y las metástasis a distancia podrían estar regulados por una sobreexpresión del NK1R en el tejido tumoral y peritumoral.

5.3.2. ESTIMULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

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 estudio ³⁴⁶ que indica que en estos tejidos tumorales existe un incremento en la inervación nerviosa así como en la expresión de NK1R.

Ciertos estudios demuestran la capacidad de la SP para inducir la proliferación endotelial tanto *in vitro* como *in vivo*³⁹². Esta capacidad es mediada únicamente por el NK1R, no así por el NK2R ni NK3R. 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 NK1R bloqueó esta capacidad proliferativa.

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.

Estos hallazgos sugieren que la SP, a través del NK1R, tendría la capacidad de regular el crecimiento de la masa tumoral ya que hay que recordar que los NK1R están sobreexpresados tanto a nivel tumoral como peritumoral.

5.3.3. 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. En este sentido existe un estudio⁴⁰⁶ que trata de relacionar el desarrollo de de metástasis con la estimulación de GPCRs, entre ellos el NK1R. 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.

Por tanto es posible que el complejo SP/NK1R actúe no sólo favoreciendo el crecimiento tumoral si no que además permita la migración celular y con ello el desarrollo de metástasis.

5.3.4. 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 ^{407 408}. 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 NK1R. Es por ello que el antagonista del NK1R L-733,060 haya sido utilizado con éxito en como tratamientos antiinflamatorios ⁴⁰⁹ y analgésicos ⁴¹⁰.

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 consistente en la extravasación plasmática, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, degranulación de los mastocitos, etc ^{411 412}.

La SP y el NK1R 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 NK1R 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 ^{342 413}.

En tejidos sometidos a una inflamación crónica, como en la enfermedad inflamatoria intestinal, se ha comprobado un incremento en el número de NK1R en las pequeñas arteriolas y en los ganglios linfáticos en relación con otras muestras de colon 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 enfermedad inflamatoria intestinal, este fenómeno estaría apoyado por la existencia de receptores para la SP en linfocitos T en sangre periférica ^{414 415}.

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 abrazan 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 ^{405 416}.

Así, cabe destacar que la gran mayoría de los tumores estudiados presentaban NK1R en los vasos sanguíneos tanto tumorales como peritumorales. Todos estos hallazgos sugieren que la inflamación y el dolor crónico podrían inducir la aparición cáncer a través del binomio SP/NK1R ya que, como se ha demostrado, la SP tiene una importante actividad mitogénica y los tejidos tumorales son ricos en NK1R. Además el conjunto SP/NK1R 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 ⁴¹⁷.

5.3.5. RELACIÓN ENTRE SP, COMPORTAMIENTO EMOCIONAL 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 en no pocas ocasiones se comprueba en la clínica 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 ³⁵⁸.

Existen datos que apoyan que los factores psicológicos podrían estar implicados en el desarrollo y progresión del cáncer ⁴¹⁸. 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 ⁴¹⁹.

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 ^{420 421}.

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 ³²⁷. Además se ha demostrado que su administración induce una marcada reducción en la expresión de los genes que codifican las taquicininas y el NK1R en ciertas áreas cerebrales. Uno de los antagonistas del NK1R 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 NK1R 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/NK1R. Esto se apoya fundamentalmente en la existencia de aumento en la concentración de SP en estas áreas ^{322 354 422}.

Observando estos datos en conjunto, cabe la posibilidad de que la depresión podría inducir la proliferación tumoral por medio de la activación del SP/NK1R. Por tanto podría quedar aclarado al menos uno de los mecanismos que vincularían la depresión, estrés y ansiedad en los fenómenos de progresión tumoral ya que ambos están mediados por la SP. Por tanto se propone que los antagonistas del NK1R en los pacientes diagnosticados de cáncer podrían tener una función ansiolítica, antidepresiva y antitumoral.

5.3.6. POSIBLES USOS CLÍNICOS DE LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R EN EL CÁNCER DE LARINGE

Los fármacos antitumorales de los que se dispone hoy en día para la práctica clínica, 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 NK1R es completamente dosis dependientes. A bajas dosis actúan sobre los NK1R localizados en el tronco del encéfalo en el núcleo glosofaríngeo produciendo un efecto antiemético en situaciones de vómitos incoercibles secundarios a fármacos citostáticos. Cuando la dosis aumenta, los antagonistas actúan a nivel central en el sistema límbico (amígdala, hipotálamo, núcleos basales y áreas relacionadas con el comportamiento emocional) produciendo un efecto ansiolítico y antidepresivo. A dosis mayores actúa sobre ciertas áreas cerebrales como analgésico central. A dosis aun 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 NK1R se pueden posicionar como un prometedor grupo de fármacos para el control y tratamiento de los tumores malignos.

El grupo de Muñoz et al.⁴²³ ha llevado a cabo recientemente un estudio 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 NK1R. Queda por tanto probado la acción antitumoral *in vitro* de un fármaco ya comercializado. Futuras investigaciones podrían reconocer el uso de Aprepitant como fármaco antitumoral.

5.3.7. INVESTIGACIONES FUTURAS RELACIONADAS CON LOS ANTAGONISTAS DEL NK1R

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 NK1R:

1: Seguir investigando la acción *in vitro* de los antagonistas del NK1R en otras líneas celulares tumorales y con otros fármacos.

2: Realizar estudios *in vivo* en animales de experimentación. En este sentido sería conveniente llevar a cabo esta investigación en ratones “desnudos”.

3: Llevar a cabo estudios con Aprepitant, único fármaco antagonista del NK1R aprobado por la Agencia Europea del Medicamento, como uso compasivo en pacientes diagnosticados de cáncer de laringe en estadio avanzado.

VI. CONCLUSIONES

A la luz de los datos mostrados por los resultados y las interpretaciones realizadas en la discusión, se puede dar respuesta a los interrogantes planteados como objetivos del estudio:

1: Ante el objetivo principal de investigar la existencia de SP y su receptor (NK1R) en el epitelio laríngeo, cáncer de laringe y sus metástasis mediante inmunohistoquímica:

- Se ha demostrado mediante inmunohistoquímica la presencia de tanto la SP como el NK1R en los diferentes tejidos estudiados. El epitelio laríngeo sano expresa estas moléculas fundamentalmente en su proliferativa capa basal. El tejido tumoral, tanto el primario, como las metástasis ganglionares muestran así mismo un marcado incremento en la expresión tanto de SP como de NK1R, estando presente en la mayoría de las muestras estudiadas.

2: Respecto al segundo objetivo de la investigación, estudiar la acción antitumoral in vitro de los antagonistas del NK1R en la línea celular de cáncer de laringe Hep-2:

- Se constata por un lado, la existencia de los NK1R en la línea celular de cáncer de laringe Hep-2 mediante Western blot.

- Se demuestra como al añadir SP al medio cultivo celular de la línea Hep-2 se produce un incremento de la actividad mitogénica. De modo contrario, la aplicación de antagonistas del NK1R (L-733,060 y L-732,138) inhiben la proliferación celular en este cultivo. Por último, se constata como añadiendo de nuevo SP al medio esta inhibición es parcialmente revertida.

- Finalmente, para demostrar que los antagonistas del NK1R inducen la apoptosis celular, se constata mediante la técnica DAPI los cambios apoptóticos inducidos a las mismas bajo la acción de L-733,060 y L-732,138.

3: Se concluye finalmente que los antagonistas del NK1R tienen actividad antitumoral in vitro en la línea celular Hep-2 de cáncer de laringe. Esto, unido al hecho de que ya se encuentra comercializado un antagonista del NK1R con otros fines terapéuticos hacen que en un futuro, estos fármacos puedan constituir una nueva herramienta para el tratamiento del cáncer de laringe.

VII. ARTÍCULOS DE REFERENCIA

NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line HEp-2

Miguel Muñoz · Marisa Rosso · Francisco J. Aguilar · Miguel A. González-Moles · Maximino Redondo · Francisco Esteban

Received: 11 June 2007 / Accepted: 27 August 2007 / Published online: 29 September 2007
© Springer Science + Business Media, LLC 2007

Summary It has been demonstrated that substance P (SP) induces cell proliferation and neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonists inhibit growth in several human cancer cell lines, but it is currently unknown whether such actions are exerted on human laryngeal carcinoma cell line HEp-2. In addition, the presence of NK-1 receptor has not been demonstrated in this cell line. We carried out an in vitro study of the growth inhibitory capacity of the NK-1 receptor antagonists L-733,060 and L-732,138 against human laryngeal carcinoma cell line HEp-2. Coulter counter was used to determine viable cell numbers followed by application of the tetrazolium compound MTS. Furthermore, an immunoblot analysis was used to determine the NK-1 receptor, and the 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) method was applied to demonstrate apoptosis of the laryngeal carcinoma cells. We observed the presence of several NK-1 receptors isoforms (34, 46, 58 and 75 kDa). Nanomolar concentrations of SP increased the growth rate of the cell line and

micromolar concentrations of L-733,060 and L-732,138 inhibited the growth of the HEp-2 cells in a dose-dependent manner, with and without previous administration of SP. The 50% inhibition concentration values were 21.34 μ M and 37.97 (48 h) respectively for HEp-2. NK-1 receptor presence on HEp-2 cells was confirmed by western blotting. DAPI staining revealed the presence of apoptosis following NK-1 receptor antagonists treatment. We demonstrated that NK-1 receptors were present in this laryngeal cancer cell line; these findings demonstrate that SP acts as a mitogen on the human laryngeal carcinoma cell line HEp-2 through the NK-1 receptor, and also indicate that both NK-1 receptors antagonists induced apoptosis of the tumour cells. This new action, reported here for the first time, suggests that the NK-1 receptor is a new and promising target in the treatment of human laryngeal carcinoma.

Keywords Human laryngeal carcinoma cell · L-733,060 · L-732,138 · Antineoplastic agents · Apoptosis

M. Muñoz · M. Rosso · F. J. Aguilar · F. Esteban
Hospital Universitario Virgen del Rocío,
Seville, Spain

M. A. González-Moles
University of Granada,
Granada, Spain

M. Redondo
Department of Biochemistry, Hospital Costa del Sol,
Marbella, Spain

M. Muñoz (✉)
Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos,
Hospital Infantil Virgen del Rocío,
Av. Manuel Siurot s/n,
41013 Seville, Spain
e-mail: mmunoz@cica.es

Introduction

Laryngeal carcinoma is a common neoplasm in Spain, a country with the highest incidence of the world according to Globocan database. Laryngeal tumours arise in men, most of them being heavy smokers. Although there is a trend to manage tumours using different organ-preservation protocols, there are many patients undergoing total laryngectomy, a procedure with high morbidity in terms of quality of life and social adjustment.

Stress and inflammation are two processes which have a strong impact on development and progression on cancer [1]. It has been well described that a member of the

tachykinin neuropeptide family, such as substance P (SP), has been involved in stress, neurogenic inflammation and in mitogenic function [2]. SP, neurokinin A (NKA), neuropeptide K and neuropeptide Gamma (the two latter elongated forms of NKA) are derived from the preprotachykinin A gene, whereas NKB is derived from the preprotachykinin B gene. The biological actions of SP, NKA and NKB are mediated by three receptors, named NK-1, NK-2 and NK-3, the NK-1 receptor showing preferential affinity for SP. After binding the NK-1 receptor, SP regulates many biological functions [3–5]. SP is known to have a widespread distribution in both the central and peripheral nervous systems, and it is also known that the undecapeptide is released from primary sensory nerve fibers. Moreover, activation of the NK-1 receptor induces mitogenesis in several normal [2] and tumor cells [6–11]. In addition, SP a main mediator on the growth of capillary vessels *in vivo* and on the proliferation of cultured endothelial cells *in vitro*, as it has been demonstrated that NK-1 receptor agonists also induced neoangiogenesis [12]. Also, the active migration of tumor cells, a crucial requirement for metastasis development is regulated by signal SP [13].

L-733,060 a piperidine derivative is a selective, potent, and long-acting central non-peptide tachykinin NK-1 receptor antagonist showing high affinity for the human NK-1 receptor *in vitro* [14]. The administration of L-733,060 produces analgesia [15] and antidepressive effects [16, 17]. Moreover, the compound has been used in the treatment of a broad range of anxiety and mood disorders [18] and in inflammatory liver disease; its action is most likely to be due to an inhibition of the effects of SP [19]. In addition, *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that SP antagonists inhibit the growth of both small cell lung cancer and glioma [20–24]. Recently, we have also demonstrated that L-733,060 shows antitumor activity against human neuroblastoma, glioma, melanoma, retinoblastoma and pancreas carcinoma cell lines [9–11, 25, 26] and L-732,138 a tryptophan derivative NK-1 receptor antagonist, shows a competitive and selective antagonism for the NK-1 receptor. It is approximately 1,000-fold more potent in cloned human NK-1 receptor than in cloned human NK-2 receptor and NK-3 receptors; and approximately 200-fold more potent in human NK-1 receptor than in rat NK-1 receptor [27]. It is known that the administration of L-732,138 produces an attenuation of hyperalgesia [28] and it has been described that L-732,138 is able to antagonize H(3) antagonist-induced skin vascular permeability [29]. L-732,138 also exerted an anti-neoplastic action on human glioma, neuroblastoma and retinoblastoma cell lines [2, 30, 31].

However, to our knowledge no study has been carried out on the antitumor action of NK-1 receptor antagonists against human laryngeal carcinoma. It is also unknown whether SP exerts a mitogenic action or not on this cell line

and the presence of NK-1 receptor in these tumour cells is also unknown. Thus, the aims of this study were: 1) to demonstrate the presence of isoforms of the NK-1 receptor in the human laryngeal carcinoma cell line HEp-2; 2) to study the role of SP and the NK-1 receptor in the induction of the proliferation of human laryngeal carcinoma cell line HEp-2; 3) to demonstrate, the antitumor action of both NK-1 receptor antagonist L-733,060 and L-732,138 on laryngeal cancer cell line and to show that this antitumor action occurs through the NK-1 receptor; and 4) to know whether the NK-1 receptor antagonists produce apoptosis in human laryngeal carcinoma cell line HEp-2.

Material and methods

Cell cultures

We used the human laryngeal carcinoma cell line HEp-2 [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Germany] kindly provided by Dr. Ruiz-Cabello, from the Immunology Department, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. Cells were maintained in RPMI 1640 (GIBCO, Barcelona, Spain) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum according to the culture conditions suggested by American Type Culture Collection, Interlab Cell Line Collection and DSMZ. Cell lines were seeded in 75 cm² tissue culture flasks (Falcon, Heidelberg; Germany). The medium was renewed every 2 days and the cells were harvested by treatment with trypsin (0.05% and 0.02% EDTA without Ca²⁺ and Mg²⁺, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) on the sixth day after seeding. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂.

Western blotting

Total protein was prepared from subconfluent laryngeal carcinoma cell cultures in 125 cm² culture flasks. We included a protein extract from a rat pheochromocytoma cell line (PC12 cells) as a control. Briefly, cells were harvested by trypsin treatment, washed with phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) and resuspended in buffer HEN (5 mM EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7.3) containing 5 mM dithiothreitol, 1 mM Na₃VO₄, 0.2% IGEPAL CA-630 (Sigma) and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma). Once resuspended, cells were vortexed, incubated on ice for 5 min and centrifuged 15 min at high speed in a microcentrifuge after which, protein-containing supernatant was collected. Protein concentration was determined by protein assay kit from BIO-RAD according to manufacturer's instructions. From each sample, 50 µg of protein were separated by electrophoresis on 10% sodium

dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. Blots were incubated in blocking solution (5% non-fat milk in PBS, 0.1% Tween-20 [PBS-T]), followed by overnight incubation with an antibody against the conserved domain KTMTESSS-FYSNMLA corresponding to the C-terminus of NK-1 receptor (Sigma) and diluted 1:1,000. The membranes were then washed with PBS-T and incubated with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody for 2 h at room temperature (1:10,000 dilution). Antibody detection was performed with an enhanced chemiluminescence reaction (ECL Western blotting detection; Amersham Life Science).

Drug treatments

The NK-1 receptor antagonist (2*S*,3*S*)-[3,5-Bis(trifluoromethyl)phenyl]methoxy-2-phenylpiperidine, MW 438.9, (L-733,060) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was dissolved in distilled water containing 0.2% dimethylsulphoxide (DMSO) before treatment of the samples. In the same way, the NK-1 receptor antagonist N-acetyl-L-tryptophan 3, 5-bis (trifluoromethyl)benzyl ester (L-732,138) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), MW 472.39, was dissolved in distilled water containing 2.5% DMSO before sample treatment. In order to determine the 50% inhibition concentration (IC₅₀), different concentrations (5, 10, 20, 30 and 40 μ M) of L-733,060 and (5, 10, 20, 40, 60 and 80 μ M) L-732,138 were evaluated. SP acetate salt (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was dissolved in distilled water. In order to determine SP-induced cell proliferation, different concentrations of SP (5, 10, 50 and 100 nM) were evaluated. The most effective SP concentration for this cell line was incubated 1 h before the addition of L-733,060 or L-732,138.

Proliferation assays

Cell proliferation was evaluated using the tetrazolium compound 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS), according to the manufacturer's instructions (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corp., Madison, USA). At the time of the assay, cells cultured for 4–5 days were harvested by trypsinization and cell viability was evaluated by Trypan Blue exclusion. Cell numbers were quantified using a Coulter counter. Cells were cultured in 96-well plates: each well contained 10^4 cells in a total volume of 100 μ l. Each assay included one plate. The plate included blank wells (0 cells/0.1 ml), control wells (10^4 cells/0.1 ml), control wells with DMSO, control wells treated with L-733,060 or L-732,138, control wells treated with exogenous SP at different concentrations and control wells treated with the most effective SP concentration and L-733,060 or L-732,138. The plate was inoculated of L-733,060 (5, 10, 20,

30 and 40 μ M) or L-732,138 (5, 10, 20, 40, 60 and 80 μ M) and was incubated for a period of 48 h for HEP-2. The plate was also inoculated with exogenous SP (5, 10, 50 and 100 nM) with (20 and 40 μ M) and without L-733,060 or L-732,138 respectively for its first doubling times (48 h). For the proliferation assay, 20 μ l of the MTS reagent was added to each well 90 min before reading the samples on a multiscanner microplate reader (TECAN Spectra classic, Barcelona, Spain) at 492 nm. The quantity of product, as measured by optical density, is directly proportional to the number of living cells. Each experimental condition (blank wells, control wells, and control wells treated with different concentrations of L-733,060, L-732,138 or SP) was assayed in duplicate and all experiments were performed at least three times. The IC₅₀ of L-733,060 and L-732,138 was calculated using a curve-fitting parameter.

4',6-Diamidino-2-phenylindole staining

In order to determine whether apoptosis is induced by NK-1-receptor antagonists, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining was performed. Cells were first cultured on 4-chamber slides. After treatment with NK-1 receptor antagonists (L-733,060, L-732,138) for 48 h, cells were washed twice with PBS and fixed by incubation with 4% paraformaldehyde for 30 min. Following washing in PBS, cells were incubated in 1 μ g/ml DAPI solution for 30 min in the dark. The cells were analyzed by a fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Statistical analyses

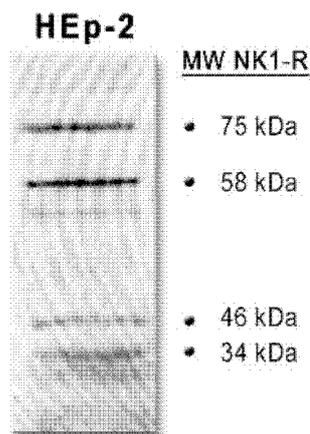
Data were expressed as means \pm SD. Statistical analysis was performed with SPSS statistical software for Microsoft Windows, release 14.0 (Professional Statistic, Chicago, IL). The homogeneity of the variance was tested using the Levene test. If the variances were homogeneous, the data were analyzed by using the one-way ANOVA test with Bonferroni's correction for multiple comparisons. For data sets with non-homogeneous variances, the ANOVA test with T3 Dunnett post hoc analysis was applied. The criterion for significance was $P < 0.05$ for all comparisons.

Results

NK-1 receptors

We performed Western blot analyses in order to test the presence of NK-1 receptor in laryngeal carcinoma HEP-2 cell line. Total cell protein extracts were loaded onto polyacrylamide gels, resolved, and transferred to mem-

Fig. 1 Western blot analysis of NK-1 receptors in human laryngeal carcinoma HEp-2 cell line showing the presence of different NK-1 receptor complex isoforms. *Dots* indicate bands with molecular weights similar to those previously reported



branes as described in Material and methods. Incubation with an antibody against an epitope whose sequence is conserved in several species (see Material and methods) revealed the presence of different isoforms of the NK-1 receptor in HEp-2 cell line (Fig. 1). Four bands (isoforms of about 34, 46, 58 and 75 kDa) were observed in the laryngeal carcinoma cell line (Fig. 1). Furthermore, no bands were detected when incubation was performed with the secondary antibody alone.

Growth inhibition of NK-1 receptor antagonists

Growth inhibition of the HEp-2 cell line by L-733,060 and L-732,138 was observed after the addition of increasing concentrations of both NK-1 receptor antagonists. Moreover, treatment of the cell line with L-733,060 and L-732,138 resulted in a concentration-dependent cytotoxicity (see Fig. 2a and b). Thus, the concentrations required for a 50% reduction in optical density (IC₅₀) observed in the controls treated with L-733,060 and L-732,138 were 21.34 μ M and 37.97 μ M for 48 h, respectively (Fig. 2a and b). For L-733,060 maximum inhibition was observed when the drug was present at a concentration of 40 μ M HEp-2 for the culture periods, whereas for L-732,138 of 80 μ M was needed. At the first doubling time, a strong decrease in the number of the cell line studied was found at intermediate concentrations and no remaining living cells were observed at the maximal concentration.

The NK-1 receptor antagonists L-733,060 and L-732,138 blocks SP-induced mitogen stimulation

Growth of the HEp-2 cell line was observed after the addition of SP and we detected that growing nanomolar concentrations of SP induced cell proliferation as compared to the controls (Fig. 3a and b). SP stimulation was evident at 5 nM and the maximum level being reached at 50 nM for the cell line. Thus, the activation of SP receptors leads to mitogenesis in the HEp-2 human laryngeal carcinoma cell

line. Percentage of cell proliferation of the cellular line increased from 9.8% to 16.2% depending on the dose of SP administered (Fig. 3a and b). The Fig. 3 also show that the standard deviations for the cell line were small, pointing to total agreement among the values obtained at the three times that the experiments were carried out.

In order to examine whether the NK-1 receptor antagonists inhibited cell proliferation via an interaction with the SP receptor, we used two specific NK-1 receptor antagonists for SP in competition experiments. Thus, the cellular concentration at 20 μ M of L-733,060 and 50 nM of SP was higher than that observed with L-733,060 alone for HEp-2 (Fig. 3a), and the cellular concentration at 40 μ M of L-732,138 and 50 nM of SP was higher than that observed with L-732,138 alone (Fig. 3b). These results indicate that both L-733,060 and L-732,138 block SP mitogen stimulation, since L-733,060 and L-733,138 growth inhibition were partially reversed by the

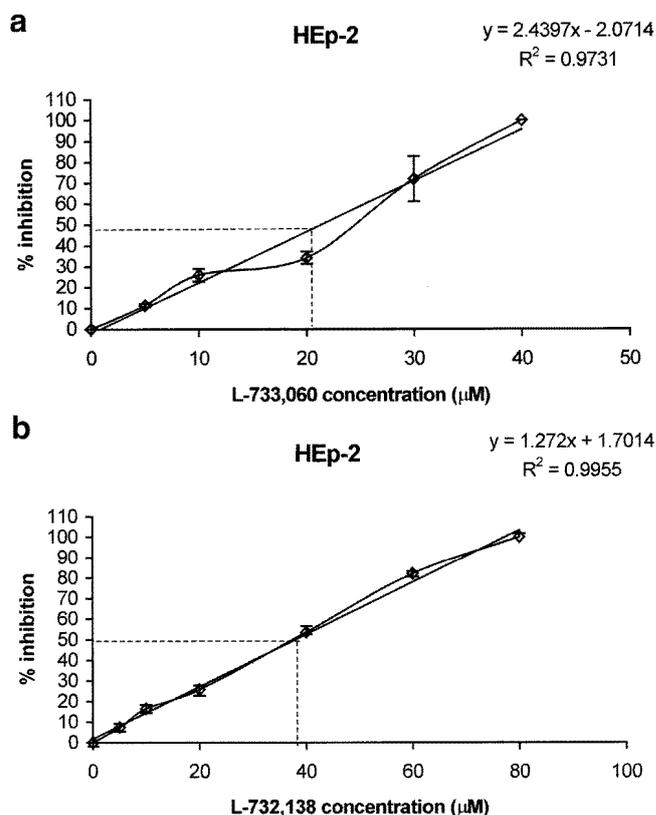


Fig. 2 a Percentage of growth inhibition of HEp-2 at 48 h cells *in vitro* cultures following the addition of increasing concentrations (5, 10, 20 and 40 μ M) of L-733,060. The percentage of inhibition for the first doubling time of incubation is plotted on a linear graph. Level of significance: $*p \leq 0.05$. Values are means \pm SD (bars). The regression line is indicated, as well as the equation to obtain the IC₅₀. b Percentage of growth inhibition of HEp-2 at 48 h cells *in vitro* cultures following the addition of increasing concentrations (5, 10, 20, 40, 60 and 80 μ M) of L-732,138. The percentage of inhibition for the first doubling time of incubation is plotted on a linear graph. Level of significance: $*p \leq 0.05$. Values are means \pm SD (bars). The regression line is indicated, as well as the equation to obtain the IC₅₀

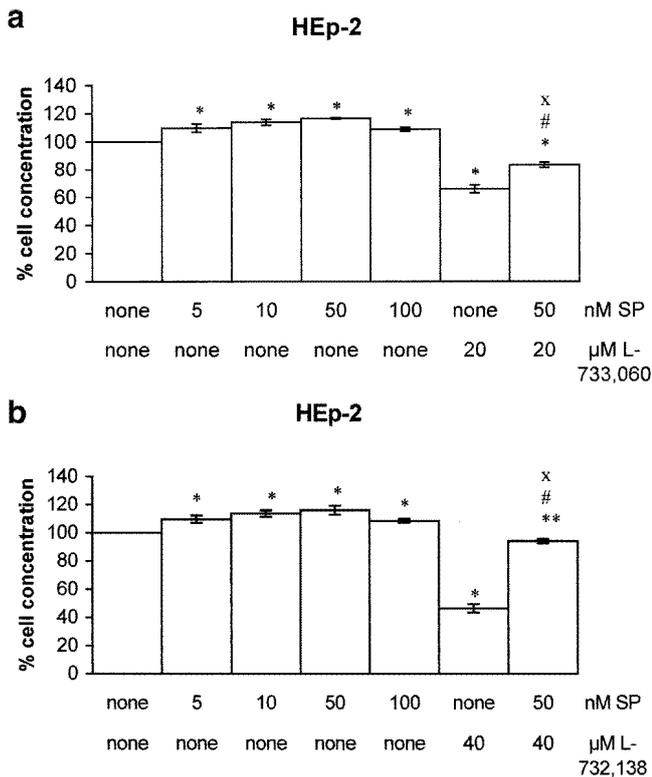


Fig. 3 a Induction of cell proliferation of HEp-2 cells by SP at several nanomolar concentrations (5, 10, 50 and 100 nM). The NK-1 receptor antagonist L-733,060 was added (20 μ M) in the presence (50 nM) or absence (none) of SP for 48 h. L-733,060 inhibited HEp-2 cell proliferation. Using the ANOVA test, a significant difference between each group and the control group (none–none) was found. Level of significance: $*p \leq 0.01$. # indicates the value of significance of 50–none vs 50–20 and x 50–20 vs none–20 # and x $p < 0.01$. Vertical bars indicate SD. **b** Induction of cell proliferation of HEp-2 cells by SP at several nanomolar concentrations (5, 10, 50 and 100 nM). The NK-1 receptor antagonist L-732,138 was added (40 μ M) in the presence (50 nM) or absence (none) of SP for 48 h. L-732,138 inhibited HEp-2 cell proliferation. Using the ANOVA test, a significant difference between each group and the control group (none–none) was found. Level of significance: $*p \leq 0.01$. $**p \leq 0.05$. # indicates the value of significance of 50–none vs 50–40 and x 50–40 vs none–40 # and x $p < 0.01$. Vertical bars indicate SD

administration of a nanomolar dose of exogenous SP, suggesting the specificity of tachykinin NK-1 receptor activation in the growth of the human laryngeal carcinoma HEp-2 cell line. Moreover, an increase in the cellular concentration (17.5 and 47.7% respectively) was observed in the human laryngeal carcinoma cell line (Fig. 3a and b) when comparing with the values found when the antagonists were administered alone. Differences were not significant between control and control-DMSO (data not shown).

NK-1 receptor antagonists induce apoptosis of human laryngeal cancer cells HEp-2

After administration of both NK-1 receptor antagonist L-733,060 and L-732,138 a great number of apoptotic cells were

found in human laryngeal carcinoma cell line HEp-2 (Fig. 4b and c). In fact, we observed respectively a 42.88 ± 1.38 (SD) % of apoptotic cells after administration of L-733,060 and 36.34 ± 2.08 (SD) following L-732,138 in DAPI-stained cultures of human laryngeal carcinoma cell line HEp-2.

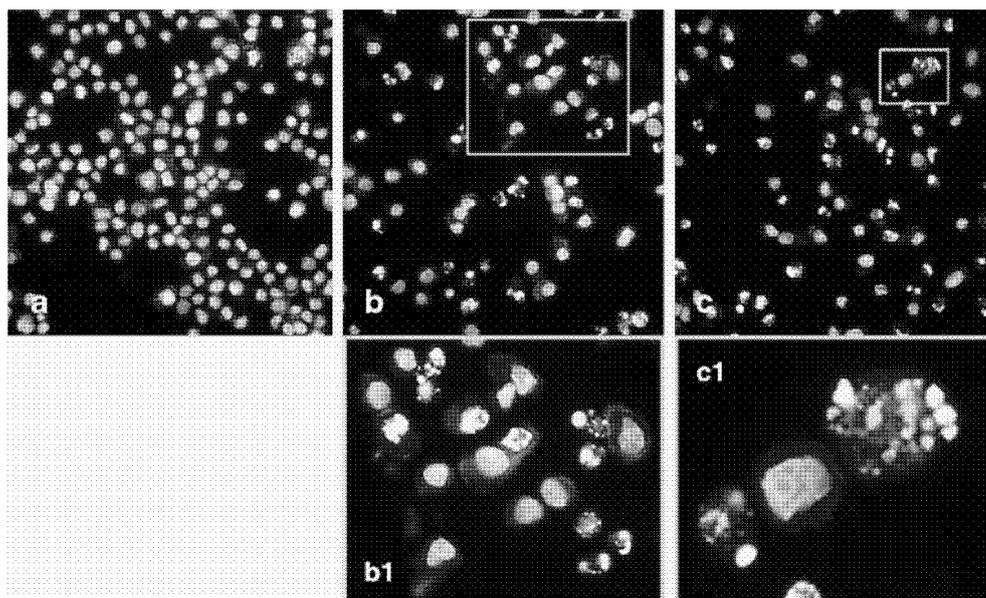
Discussion

We have demonstrated for the first time the presence of isoforms of NK-1 receptors in human laryngeal carcinoma HEp-2 cell line. Several previous reports have shown that different isoforms of the NK-1 receptor can be found in both human and rat tissues [32]. For instance, four different proteins with molecular weights of 33, 58, 78, and 116 kDa can be specifically affinity-labelled using [125 I]-SP in human lymphocytes [33], the main SP-binding protein present on human lymphocyte cell membranes being a 58 kDa hydrophobic glycoprotein [34]. We have demonstrated the presence of isoforms of the NK-1 receptor in both SKN-BE(2) neuroblastoma and GAMG glioma cell lines [10]. Thus, in the SKN-BE(2) cell line a major 54 kDa band was observed, whereas in GAMG cells two additional and more abundant isoforms of about 33 and 38 kDa were detected. In addition, in human pancreatic carcinoma CAPAN-1 and PA-TU 8902 cell lines were reported bands of 34, 46, 58, 75 kDa [11, 35] and human retinoblastoma cell lines bands of 33, 58, 75 kDa [30]. Thus, the present data are in agreement with those of previous studies, since we have demonstrated for the first time the presence of several NK-1 receptor isoforms (34, 46, 58 and 75 kDa) in human laryngeal carcinoma HEp-2 although the functional roles of these NK-1 receptor isoforms are currently unknown.

It is known that the stimulation of NK-1 receptors can generate several second messengers which, in turn, can trigger a wide range of effectors mechanisms that are responsible for regulating cellular excitability and function. In this sense, it is known that the following second-messenger systems are activated by NK-1 receptor agonists: a) arachidonic acid mobilization via phospholipase A2; b) stimulation, via phospholipase C, of phosphatidyl inositol turnover, leading to calcium mobilization from both intra- and extracellular sources; and c) cAMP accumulation via stimulation of adenylate cyclase [2].

Also we have demonstrated for the first time the potential of SP and its receptor NK-1 in laryngeal carcinoma. Thus, a potent growth inhibition on human laryngeal carcinoma is achieved by the use of non-peptide NK-1 receptor antagonists L-733,060 and L-732,138. This concurs with previous studies, in which the use of SP antagonists inhibited, in vitro and in vivo, the growth of small cell lung cancer [20–23]. Moreover, our findings concur with those showing that L-733,060 has antitumor action against

Fig. 4 DAPI staining of HEP-2 cell line. **a** Culture cells non-treated with the NK-1 receptor antagonists. Culture cells treated with L-733,060 (**b**) or with L-732,138 (**c**) NK-1 receptor antagonists. Numerous apoptotic figures of the treated cells can be observed: note the chromatin condensation and the nuclear fragmentation. (**a–c**: 40 \times). Higher-power magnifications of the regions, showed respectively in **b** and **c**, delimited by rectangles (**b1**: 70 \times , **c1**: 120 \times)



other human cancer cell lines such as human neuroblastoma, glioma, melanoma, retinoblastoma and pancreatic adenocarcinoma [9–11, 25] and L-732,138 has antitumor action against human cancer cell lines such as human glioma, neuroblastoma and retinoblastoma [2, 30, 31]. It should be noted that in cell lines as different as human neuroblastoma, glioma, melanoma, retinoblastoma, pancreatic adenocarcinoma and laryngeal carcinoma, both NK-1 receptor antagonists elicit growth inhibition. This observation suggests the possibility of a common mechanism for cancer cell proliferation mediated by SP and NK-1 receptors [9–11, 25, 26, 30, 31]. If it were the case, it would mean that NK-1 receptor antagonists could inhibit a large number of tumour cell types in which both SP and NK-1 receptors are expressed [13, 30, 31, 35–39, 43] and could be candidates as broad-spectrum antineoplastic drugs.

We have demonstrated that treatment of the human laryngeal carcinoma cell line with L-733,060 and L-732,138 produces growth inhibition and cell death. In our competition experiments, exogenous SP cell proliferation was partially reverted by administration of both antagonists, suggesting the specificity of tachykinin NK-1 receptor blockade on human laryngeal carcinoma cell line, and therefore, a specific effect through the NK-1 receptor. Moreover, the specific binding to the NK-1 receptor on human breast carcinoma of the L-733,060 has been demonstrated [13]. Thus, the action on these cell lines by both the NK-1 receptor antagonists is probably related to the ability of the antagonists to block the NK-1 receptor in such tumours. In this context, the NK-1 receptor antagonists L-733,060 and L-732,138 are designer molecules that bind specifically to this receptor, with a K_i value of 0.8 nM in the case of L-733,060 and 2.3 nM for L-732,138. Thus, the very structurally different molecules piperidine (L-733,060) and L-tryptophan (L-732,138) have

the same antitumor action and only have in common their specificity for the NK-1 receptor. However, on comparing the results obtained with L-732,138 and those with L-733,060 we observed a lower antitumor action of L-732,138 (L-733,060 is two-fold more potent than L-732,138), this action could be related with the affinity for NK-1 receptor (0.8 nM for L-733,060 and 2.3 nM for L-732,138) [2, 30, 31].

The blockade of NK-1 receptors in the human laryngeal carcinoma cell line could inhibit both DNA synthesis and cell proliferation by the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [6]. It is known that an SP antagonist (other than L-733,060) induces apoptosis in lung cancer and causes a concentration-dependent loss of cell viability [22], as we observed using L-733,060 and L-732,138 could involved a signal transduction pathway for apoptosis [11, 30, 31, 40]. In addition, the L-733,060 inhibits the metastatic progression of NK-1 receptor expressed breast cancer cells [13]. Furthermore, the L-733,060 has been successfully used in preclinical assays at 10–20 mg/kg doses (30–60 μ M) as anxiolytic and antiinflammatory compound to reduce inflammatory liver damage (e.g., edema formation, neutrophil infiltration); this means that NK-1 receptor antagonists display hepatoprotector effects [17, 19].

All the data mentioned above suggest that treatment with antagonists of the NK-1 receptor in cancer cell lines expressing the NK-1 receptor could improve cancer treatment. Further studies in this field are necessary in order to shed light on the mechanisms that produce growth inhibition of cancer cell lines by antagonists of the tachykinin receptors. It would be very interesting to know whether the treatment of cancer cell lines with the NK-1 receptor antagonists that have been studied in humans [41] might produce the same growth inhibitory action as we found with L-733,060 and L-732,138. At the present, there are

more than 30 compounds that act as NK-1 receptor antagonists [42]. Indeed, currently there is an FDA-approved selective high-affinity antagonist of human NK-1 receptor (Aprepitant) with safety and tolerability similar to placebo in a placebo-controlled trial in patients with depression [16].

The action of NK-1 receptor antagonists is dose-dependent, and depending on the concentration has more positive effects; at low doses have antiemetic action. If the dose is raised, the drugs act on the NK-1 receptors at central level in the limbic system, producing an antidepressive and anxiolytic action. At higher doses, they act on brain areas as a central analgesic. Higher doses still produce an anti-inflammatory action. And similar or slightly higher doses, depending on the tumour in question and its stage, elicit antitumor activity (inhibition of cellular proliferation, inhibition of the production of metastases, inhibition of peritumour inflammatory reaction and angiogenesis). When used at the highest doses, the NK-1 receptor antagonists produce all the positive pharmacological effects described above [2].

It is known that the maximum antitumor activity (100%) of L-733,060 on neuroblastoma, glioma, melanoma, retinoblastoma, pancreatic adenocarcinoma and laryngeal carcinoma cells was observed when such NK-1 receptor antagonist was administered at a concentration of $\leq 50 \mu\text{M}$ in those cancer cell lines, while the maximum antitumor activity (100%) of L-732,138 on neuroblastoma, glioma, retinoblastoma and laryngeal carcinoma was at a concentration of $\geq 80 \mu\text{M}$ [9–11, 25, 26, 30, 31]. Probably this different power action could be related with the affinity for the NK-1 receptor (see above) and with the expression of the amount of NK-1 receptors in the different tumor cells [2, 30, 31].

We have demonstrated for the first time that SP increases the growth of the human laryngeal carcinoma cell line. This concur with previous studies, since it has been reported that the activation of NK-1 receptors by SP induces mitogenesis in several cancer cell types [6–11, 25, 31], probably via autocrine/paracrine mechanisms [2]. It is also known that SP is expressed in almost 90% of metastatic human neuroblastoma cells [43], melanoma [38] and retinoblastoma [36], and that the NK-1 receptor is expressed in human glioma cell lines, as well as in astrocytoma [8, 10, 24], neuroblastoma [10, 31], retinoblastoma [30] and pancreatic carcinoma cell lines [11, 35]. In addition, it has been reported that astrocytoma/glioma primary tumours express more NK-1 receptors than do established astrocytoma/glioma cell lines in culture [6], and that the NK-1 receptor is overexpressed in breast cancer and metastasis [39]. Moreover, neoangiogenesis, a hallmark of tumour development, has been associated with increased tissue innervations and expression of NK-1 receptors. It has been reported the effect of SP, a main mediator of neurogenic inflammation, on the growth of capillary vessels *in vivo*, as well as it has been demonstrated that NK-1 receptor agonists also induced neoangiogenesis.

These findings indicate that this peptide can directly stimulate the process of neoangiogenesis, probably through induction of the endothelial cell proliferation NK-1 receptor pathway [12]. In addition, in the great majority of the tumours, NK-1 receptors were found on intra- and peritumoral blood vessels [35, 44]. Furthermore, it has been reported that SP induces the migration of tumour cells to specific organs through binding to the NK-1 receptor on human breast carcinoma [13]. Taken together, all the above data suggest that SP and NK-1 receptors could play an important role in the development of cell proliferation, neoangiogenesis and metastasis.

In sum, we have reported for the first time the presence of several isoforms of the NK-1 receptor in the human laryngeal carcinoma HEp-2 cell line. We also have demonstrated the antitumor action of the NK-1 receptor antagonists L-733,060 and L-732,138 on human laryngeal carcinoma cell line for the first time. Additionally, it is demonstrated that SP acts as a mitogen of this cancer cell line. All these observations suggest that the NK-1 receptor could be a new and promising target in the treatment of human laryngeal carcinomas and these NK-1 receptor antagonists could improve human laryngeal carcinomas treatment.

Acknowledgements The authors thank Manuel Sánchez for technical assistance.

References

1. Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, Joseph J, Zaenker KS (2005) Neurotransmitters and chemokines regulate tumor cell migration: potential for a new pharmacological approach to inhibit invasion and metastasis development. *Curr Pharm Des* 11:403–411
2. Muñoz M, Rosso M, Soult 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
3. von Euler US, Gaddum JH (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72:74–87
4. Pernow B (1983) Substance P. *Pharmacol Rev* 35:85–141
5. Hökfelt T, Pernow B, Wahren J (2001) Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med* 249:27–40
6. Luo W, Sharif TR, Sharif M (1996) Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res* 56:4983–4991
7. Sharif TR, Luo W, Houghron PJ, Sharif M (1996) Substance K peptide induces mitogenesis by activating the mitogen-activated protein kinase signalling pathway through the substance P receptor (NK-1 subtype) in human astrocytoma. *Cell Pharmacol* 3:441–449
8. Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA (1999) Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer* 79:236–243
9. Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarrigo C, Rosso R (2004) Antitumoural action of NK1 receptor antagonist L-733,060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 14:183–188
10. Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarrigo C, Piruat JI (2005) The NK1 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* 39:427–432
11. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R (2006) The NK-1 receptor is involved in the antitumoural action of L-733,060 and in the mitogenic action of substance P on human pancreatic cancer cell lines. *Lett Drug Des Discov* 3:323–329
 12. Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Gepetti P, Alessandri G, Maggi CA (1990) Substance P stimulates neovascularization in vivo and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res* 40:264–278
 13. Lang K, Drell TL, Lindecke A, Niggemann B, Kaltschmidt C, Zaenker KS, Entschladen F (2004) Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer* 112:231–238
 14. Harrison T, Willians BJ, Swain CJ, Ball RG (1994) Piperidine-ether based hNK1 antagonists 1: determination of the relative and absolute stereochemical requirements. *Bioorg Med Chem Lett* 4:2545–2550
 15. Rupniak NM, Carlson E, Boyce S, Webb JK, Hill RG (1996) Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils. *Pain* 67:189–195
 16. Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snaveley D, Wyatt-Knowles E, Halle JJ (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281:1640–1645
 17. Varty GB, Cohen-Williams ME, Hunter JC (2003) The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. *Behav Pharmacol* 14:87–95
 18. Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, de Felipe C, Hunt S, Wheelton A (2000) Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology* 39:1413–1421
 19. Bang R, Sass G, Kiemer AK, Vollmar AM, Neuhuber WL, Tiegs G (2003) Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 305:31–39
 20. Woll PJ, Rozengurt E (1988) [D-Arg¹-D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] 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 U S A* 35:1859–1863
 21. Langdon S, Sethi T, Richie A, Muir M, Smyth J, Rozengurt E (1992) Broad spectrum neuropeptide antagonists inhibit the growth of small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res* 52:4554–4557
 22. Reeve JG, Bleehen NM (1994) [D-Arg¹-D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] Substance P induces apoptosis in lung cancer cell lines in vitro. *Biochem Biophys Res Com* 199:1313–1319
 23. Seckl MJ, Higgins T, Wildmer F, Rozengurt E (1997) [D-Arg¹, D-Trp^{5,7,9}, Leu¹¹] Substance P: a novel potent inhibitor of signal transduction and growth in vitro and in vivo in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 57:51–54
 24. Palma C, Bigioni M, Irissuto C, Nardelli F, Maggi CA, Manzini S (2000) Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cancer* 82:480–487
 25. Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarriego C, Soult JA, Montero I (2005) 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
 26. Muñoz M, Pérez A, Coveñas R, Rosso M, Castro E (2004) Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch Ital Biol* 142:105–112
 27. MacLeod AM, Merchant KJ, Brookfield F, Kelleher F, Stevenson G, Owens AP, Swain CJ, Cascieri MA, Sadowski S, Ber E, Strader CD, Fong TM (1994) Identification of L-tryptophan derivatives with potent and selective antagonist activity at the NK1 receptor. *J Med Chem* 37:1269–1274
 28. Cahill CM, Coderre TJ (2002) Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist. *Pain* 95:277–285
 29. Hossen MA, Fujii Y, Sugimoto Y, Kayasuga R, Kamei C (2003) Histamine H3 receptors regulate vascular permeability changes in the skin of mast cell-deficient mice. *Int Immunopharmacol* 3: 1563–1568
 30. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R, Montero I, González-Moles MA, Robles MJ (2007) Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: antitumor action of its antagonists, L-732,138. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2775–2781
 31. Muñoz M, Rosso M, Coveñas R (2007) NK-1 receptor antagonists as new anti-tumoural agents: action on human neuroblastoma cell lines. In: Fernandes JA (ed) *Focus on neuroblastoma research*. Nova Science, New York, pp. 31–56
 32. 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
 33. McGillis JP, Organist ML, Scriven KH, Payan DG (1987) Purification of the 33,000-dalton ligand binding-protein constituent of the lymphoblast substance P receptor. *J Neurosci Res* 18(1): 190–194
 34. McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG (1990) Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci* 594:85–94
 35. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, Lieb K, Korc M, Palma C, Zimmermann A, Reubi JC, Buchler MW (2003) Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest* 83: 731–742
 36. Tarkkanen A, Tervo T, Tervo K, Eränkö L, Eränkö O, Cuello AC (1983) Substance P immunoreactivity in normal human retina and in retinoblastoma. *Ophthalmic Res* 15:300–306
 37. Lee CM, Kum W, Cockram CS, Teoh R, Young JD (1989) Functional substance P receptors on a human astrocytoma cell line (U-373 MG). *Brain Res* 488:328–331
 38. Khare VK, Albino AP, Reed JA (1998) The neuropeptide/mast cell secretagogue substance P is expressed in cutaneous melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* 25:2–10
 39. Singh D, Joshi DD, Hameed M, Qian J, Gascón P, Maloof PB, Mosenthal A, Rameshwar P (2000) Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:388–393
 40. Esteban F, Munoz M, González-Moles MA, Rosso M (2006) A role for substance P in carcinogenesis: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev* 25:137–145
 41. Diemunsch P, Grelot L (2000) Potential of substance P antagonists as antiemetics. *Drugs* 60:533–546
 42. Giardina GAM, Gagliardi S, Martinelli M (2003) Antagonists at the neurokinin receptors—recent patent literature. *Drugs* 6: 758–772
 43. Nowicki M, Miskowiak B (2002) Comparison of the cell immunophenotype of metastatic and primary foci in stage IV-S neuroblastoma. *Folia Histochem Cytobiol* 40:297–303
 44. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC (1995) Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer* 61:786–792

Correspondence

Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression

DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.03193.x

Sir: Substance P (SP) is an undecapeptide that belongs to the tachykinin family and has been implicated in a myriad of physiological processes.¹ In recent years it has been demonstrated that SP acts through the neurokinin-1 receptor (NK1R) as a mitogen on several human cancer cell lines.² It seems that the SP/NK1R system could play an important role in the development of cancer, as SP may be a universal mitogen in NK1R-expressing tumour cell types. However, in their pioneer work on SP receptors in human primary neoplasms, Henning and coworkers³ did not study squamous cell carcinoma. Although NK1R has been recently described in the Hep-2 laryngeal carcinoma cell line,⁴ this is, to our knowledge, the first study of SP and NK1R expression in laryngeal cancer.

We reviewed 114 consecutive cases of laryngeal carcinoma treated surgically from the Department of Otolaryngology. Surgical procedure, site of the primary tumour and TNM staging were recorded. None of the patients had received radiotherapy and/or chemotherapy prior to surgery. Of the 114 patients, 78 (68%) remained disease free at the end of the follow-up period (average 40 months, range 12–96 months).

Tumour differentiation was recorded according to World Health Organization criteria. Cases were also carefully staged to conform to the American Joint Committee on Cancer Staging and End Results Reporting. The presence of adjacent non-neoplastic epithelium was also recorded. Laryngeal non-neoplastic epithelium consisted of pseudostratified squamous epithelium. The histological and immunohistochemical analyses were performed without any knowledge of the clinical stage, treatment or further course of the disease.

For the detection of SP and NK1R we used monoclonal antibodies against SP (Sigma, St Louis, MO, USA) and NK1R (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), as previously described.⁵ The number of tumour cells showing immunoreactivity (brown staining) and its location were noted. Groups were formed according to the percentage of positive cells (0–24, 25–49, 50–74 and >75%). SP and NK1R expression in non-neoplastic epithelium adjacent to tumour was also recorded in the

same way. The presence of basal and suprabasal expression was also recorded.

The relationship between SP and NK1R expression and clinical and pathological parameters was determined by χ^2 analysis and Fisher's exact test. All *P*-values corresponded to two-sided significance testing. The relationship of survival to the expression of proteins was examined using the Kaplan–Meyer method and multivariate survival analysis.

SP was immunoreactive in 93 out of 97 samples of non-neoplastic epithelium close to the tumour. Reactivity was found mainly in the basal layers (Figure 1A), with >75% reactive cells.

Out of 114 cases, 111 studied showed homogeneous SP expression, with 90 tumours scored as ++++ (Figure 1B). Only three cases were classified as negative. Six were considered +, seven ++ and eight +++.

All 17 metastases studied were immunoreactive for SP (Figure 1C). All cases showed the same expression as the primary tumour (++++/++++).

Out of 97 cases, the basal layers were reactive for NK1R in 72 (Figure 2A).

Ninety of 97 samples were positive for NK1R, with >25% of tumour cells reactive (Figure 2B). Reactivity was detected both in the membrane and cytoplasm. We did not find any relationship between expression in primary carcinomas and clinicopathological parameters or survival (data not shown).

All cases of metastases (17 out of 17) were found to express NK1R in most tumour cells (++++/++++) (Figure 2C).

SP participates in acute inflammation and activates key proteins involved in mitogenic pathways, such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), stimulating DNA synthesis.^{1,2} We found both membranous and cytoplasmic SP immunoreactivity, which can be explained on the basis of NK1R internalization.⁶ Cytoplasmic reactivity has also been reported in lymphocytes of children who go on to develop acute lymphoblastic leukaemia.⁷ The ubiquitous presence of SP in laryngeal tumours may represent a common mechanism of tumour progression. In fact, an intriguing question is why some lymphocytes in normal mucosa express SP, whereas those in metastatic lymph nodes do not. We propose a SP link between chronic mucosal inflammation and cancer, with submucosal lymphocytes secreting SP, as has been described in neoplastic lymphocytes.⁷

In addition, it has been demonstrated that the activation of NK1R by SP or SP analogues induces

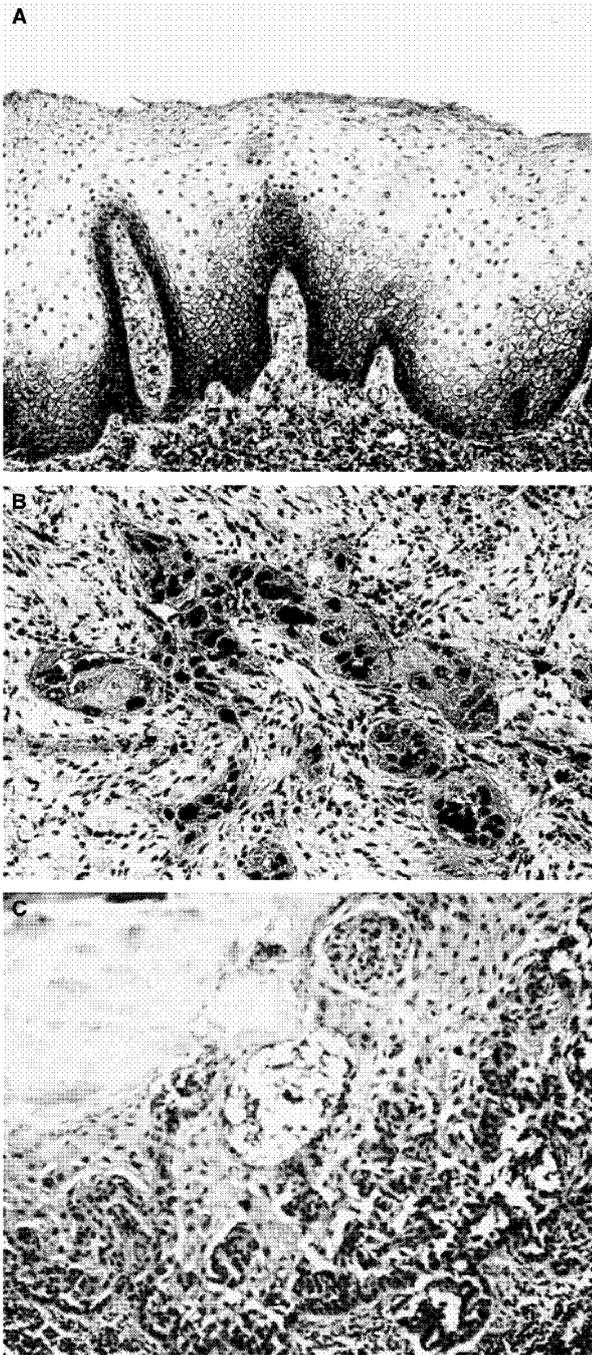


Figure 1. Substance P (SP) immunohistochemistry. A, Non-neoplastic mucosa: cytoplasmic and membranous staining are detected, in both basal and suprabasal layers. Diffuse expression can be also seen in infiltrating lymphocytes. B, SP in a infiltrating carcinoma. Both nucleus and cytoplasm are immunoreactive. C, SP immunoreactivity of a lymph node metastasis. Absence of SP expression can be seen in the lymph node.

mitogenesis in several cancer cell lines, including the human laryngeal carcinoma cell line Hep.^{2,4} This neuroactive substance acts as a neurotransmitter and

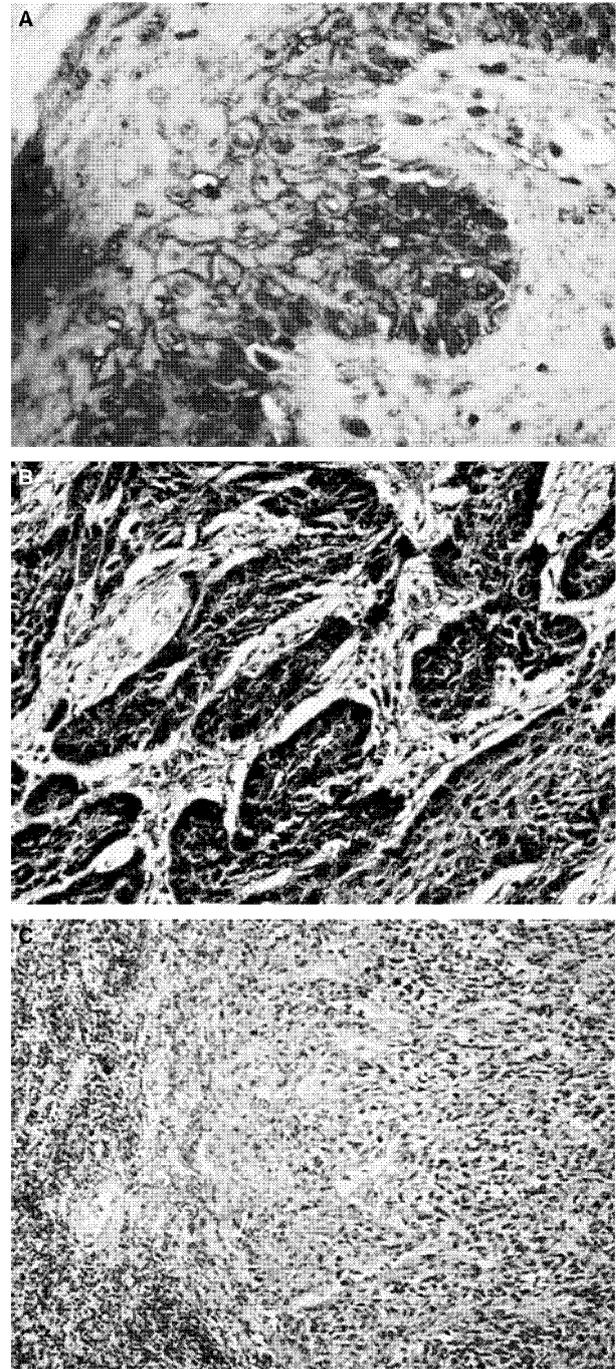


Figure 2. Immunohistochemistry for Neurokinin 1 receptor (NK1R). A, Non-neoplastic epithelium adjacent to tumour: Expression in the hyperplastic non-neoplastic epithelium adjacent to the tumour. B, NK1R in a laryngeal carcinoma showing both membranous and cytoplasmic expression of the tumour cells. C, Positivity for NK1R in a lymph node metastasis.

has the capacity to enhance laryngeal cancer growth through direct mitogenic effects via NK1 receptor 4. These findings suggest that SP could modulate the

growth of human laryngeal cancer cells and the possibility of treatment with antagonists of NK1R.

Francisco Esteban¹
Miguel Angel Gonzalez-Moles²
David Castro¹
Maria del Mar Martin-Jaen³
Maximino Redondo⁴
Isabel Ruiz-Avila⁵
Miguel Muñoz⁶

¹Department Otolaryngology, Hospital Virgen del Rocío, University of Seville, Seville, ²Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Granada University, Granada, ³Department of Pathology, Hospital de Valme, Seville, ⁴Biopathology Department, Hospital Costa del Sol, Marbella, Malaga, ⁵Department of Pathology, Hospital General de Jaen, Jaen, and ⁶Paediatric Intensive Care Unit, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Seville, Spain

1. Hökfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J. Intern. Med.* 2001; **249**: 27–40.
2. Esteban F, Muñoz M, González-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 Metastases Rev.* 2006; **25**: 137–145.
3. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoural and vascular localization. *Int. J. Cancer* 1995; **61**: 786–792.
4. Muñoz M, Rosso M, Aguilar FJ, González-Moles MA, Redondo M, Esteban F. NK-1 receptor antagonists induce apoptosis and counteract substance-P related mitogenesis in human laryngeal cancer cell line Hep-2. *Invest. New Drugs* 2008; **26**: 111–118.
5. González-Moles MA, Mosqueda-Taylor A, Esteban F *et al.* Cell proliferation associated with actions of the substance P/NK1 receptor complex in keratocystic odontogenic tumours. *Oral Oncol.* 2008; **44**: 1127–1133.
6. Koon HW, Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance p: the gastrointestinal system as a model. *Ann. NY Acad. Sci.* 2006; **1088**: 23–40.
7. Nowicki M, Ostalska-Nowicka D, Konwerska A, Miskowiak B. The predicting role of substance P in the neoplastic transformation of the hypoplastic bone marrow. *J. Clin. Pathol.* 2006; **59**: 935–941.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Del Barco Morillo, E, Cruz Hernández J.J. Nuevas dianas terapéuticas en los tumores de cabeza y cuello. Disponible en: <http://www.merck.de/> Consultado el Abril, 2, 2010.
- ² Forastiere, A.A., Goepfert, H., Maor, M. y cols. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cáncer. *N Engl J Med* 2003; 349: 2091-2098.
- ³ SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: US SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics. Disponible en: <http://seer.cancer.gov/publications/survival/> Consultado el Abril, 2, 2010.
- ⁴ Bourhis, J., Amand, C., Pignon, J.P. Update of MACH-NC (Meta-Analysis of Chemotherapy in Head & Neck Cáncer) database focused on concomitant chemoradiotherapy. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2004; 22: 5505.
- ⁵ Pignon, J.P., Bourhis, J., Domenge, C. y cols. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: Three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cáncer. Lancet* 2000; 355: 949-955.
- ⁶ Adelstein, D.J., Li, Y., Adams, G.L. y cols. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cáncer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 92-98.
- ⁷ F. Esteban, A. García-Perla y A. Abrante. Resultados de la preservación de órgano en los carcinomas de cavidad oral y orofaringe. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2009 Oct; Supp 2 60:16-24.
- ⁸ Degardin, M., Oliveira, J., Geoffrois, L. y cols. An EORTC-ECSG phase II study of vinorelbine in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Ann Oncol* 1998, 9: 1103-1107.
- ⁹ Espinosa, E., Zamora, P., Millà, A. y cols. A phase II trial of cisplatin and vinorelbine in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2002; 24: 1054-1059.
- ¹⁰ Airoldi, M., Cattell, L., Cortesina, G. y cols. Gemcitabine and vinorelbine in recurrent head and neck cáncer: Pharmacokinetic and clinical results. *Anticáncer Res* 2003; 23: 2845-2852.
- ¹¹ Pivot, X., Chamorey, E., Guardiola, E. y cols. Phase I and pharmacokinetic study of the association capecitabine-cisplatin in head and neck cáncer patients. *Ann Oncol* 2003; 14: 1578-1586.
- ¹² Wong, S.J., Ritch, P.S., Delzer, N. y cols. Phase II trial of capecitabine in patients with advanced incurable head and neck cáncer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003, 22: 2092.
- ¹³ Pivot X, Raymond E, Laguerre B, y cols. Pemetrexed disodium in recurrent locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cáncer* 2001, 85: 649-655.
- ¹⁴ Vermorken, J.B., Remenar, E., van Herpen, C. y cols. Standard cisplatin/infusional 5-fluorouracil (PF) vs docetaxel (T) plus PF (TPF) as neoadjuvant chemotherapy for

nonresectable locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (LA-SCCHN): A phase III trial of the EORTC Head and Neck Cancer Group (EORTC #24971). *J Clin Oncol* (Meeting Abstracts) 2004; 22: 5508.

¹⁵ Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*. 2009 Nov 6.

¹⁶ EMC (Enciclopedia Médico Quirúrgica), "Tratado de Otorrinolaringología (6 tomos)", Elsevier (ISBN: 2-84299-166-4)

¹⁷ López-Abente G, Ramis R, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Gómez-Barroso D, Carrasco JM, Lope V, García-Pérez J, Boldo E, García-Mendizabal MJ. Atlas municipal de mortalidad por cáncer en España 1989-1998. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer del Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII, año 2007

¹⁸ National Cancer Institute - Head and Neck Cancer. Disponible en: www.cancer.gov/cancertopics/types/head-and-neck/ Consultado el Abril, 2, 2010

¹⁹ Lefebvre JL, Chevalier D, Lubinski B, Kirkpatrick T, Collette L, Shamoud T. Larynx preservation in piriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. J Natl Cancer Inst* 1996;88:890-9.

²⁰ Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 1991;324:1685-90.

²¹ American Society of Clinical Oncology, Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, Clayman GL, Fisher SG, Forastiere AA, Harrison LB, Lefebvre JL, Leupold N, List MA, O'Malley BO, Patel S, Posner MR, Schwartz MA, Wolf GT. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 1;24(22):3693-704. Epub 2006 Jul 10. Review.

²² Thompson AM. Dissecting the molecular mechanisms of human cancer: translating laboratory avances into clinical practice. *Surg J R Coll Surg Edinb Irel* 2004;2:1-6

²³ Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. *BIOLOGIA MOLECULAR DE LA CELULA*, 4ª ed. (2002) Ed. Omega, Barcelona.

²⁴ Kim MN, Califano JA. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J Cáncer* 2004;112:545-553

²⁵ Ramzi S. Cotran, Stanley L. Robbins, Vinay Kumar. *Robbins: Patología Estructural Y Funcional* (6ª ED.). MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A. 1999.

- ²⁶ 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.
- ²⁷ 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
- ²⁸ 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.
- ²⁹ Jiang WW, Masayesva B, Zahurak M, et al. Increased mitochondrial DNA content in saliva associates with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2486-2491
- ³⁰ Rinaldo A, Devankey 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
- ³¹ Rodrigo Tapia, J.P. Aplicaciones diagnósticas de la biología molecular en los carcinoma epidermoides de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2006 Jun;57 Suppl 1:251-2.
- ³² Von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol (Lond)* 1931;72: 74±87.
- ³³ Pernow B. Studies on substance P purification, occurrence, and biological actions. *Acta Physiol Scand* 1953; 29: 1±90.
- ³⁴ Ehrenpreis T, Pernow B. On the occurrence of substance P in the rectosigmoid in Hirschsprung's disease. *Acta Physiol Scand* 1952; 27: 380.
- ³⁵ 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.
- ³⁶ Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino acid sequence of substance P. *Nature (New Biol)* 1971; 232: 86±7.
- ³⁷ Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nature (New Biol)* 1971; 232: 87±9.
- ³⁸ Powell D, Leeman SE, Tregear GW, Niall HD, Potts JJT. Radioimmunoassay for substance P. *Nature (New Biol)* 1973; 241: 252±4.
- ³⁹ 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.
- ⁴⁰ Henry JL. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res* 1976; 114: 439±51.
- ⁴¹ 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.

- ⁴² Hökfelt 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.
- ⁴³ Nilsson G, Larsson LT, Hökanson R, Brodin E, Pernow B, Sundler F. Localization of substance P-like immunoreactivity in mouse gut. *Histochemistry* 1975; 43: 97±9.
- ⁴⁴ Cuello AC, Kanazawa I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1978; 178: 129±56.
- ⁴⁵ Ljungdahl AÊ , Hökfelt 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.
- ⁴⁶ Schultzberg M, Hökfelt 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.
- ⁴⁷ 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.
- ⁴⁸ Otsuka M, Konishi S. Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature* 1976; 264: 83±4.
- ⁴⁹ 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.
- ⁵⁰ Otsuka M, Takahashi T. Putative peptide neurotransmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1977; 17: 425±39.
- ⁵¹ Nicoll RA, Schenker C, Leeman SE. Substance P as a neurotransmitter candidate. *Annu Rev Neurosci* 1980; 3: 227±68.
- ⁵² Pernow B. Substance P. *Pharmacol Rev* 1983; 35: 84±141.
- ⁵³ Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 1993; 73: 229±308.
- ⁵⁴ 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
- ⁵⁵ 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)*
- ⁵⁶ 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)
- ⁵⁷ 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)*
- ⁵⁸ Harmor, A.J. Three tachykinins in mammalian brain. *Trends Neurosci.*, 1984, 7, 57.

- ⁵⁹ Maggi, C.A.; Santicioli 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.
- ⁶⁰ 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.
- ⁶¹ Taurig, 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.
- ⁶² 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.
- ⁶³ 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.
- ⁶⁴ MAGGI, C. A., AND A. MELI. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 19: 1-43, 1988.
- ⁶⁵ Regoli D, Boudon A, Fauchere J. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 1994; 46(4): 551-599.
- ⁶⁶ 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.
- ⁶⁷ 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.
- ⁶⁸ 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.
- ⁶⁹ 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.
- ⁷⁰ Linnik, M.D.; Moskowitz, M.A. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides*, 1989, 10, 957.
- ⁷¹ 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.
- ⁷² 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.
- ⁷³ Lai, J.P.; Douglas S.D.; Ho W.Z. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J. Neuroimmunol.*, 1998, 86, 80.

- ⁷⁴ Pinto, F.M.; Cintado, C.G.; Devillier, P.; Candenás, M.L. Expression of preprotachykinin-B, the gene that encodes neurokinin B, in the rat uterus. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 425, R1.
- ⁷⁵ 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.
- ⁷⁶ Severini, C.; Improta, G.; Falconieri-Erspamer, G.; Salvadori, S.; Erspamer, V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54, 285.
- ⁷⁷ Krause, J.E.; MacDonald, M.R.; Takeda, Y. The polyprotein nature of substance P precursors. *Bioessays*, 1989, 10, 62.
- ⁷⁸ Maggio, J.E. Tachykinins. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1988, 11, 13.
- ⁷⁹ Saffroy, M.; Torrens, Y.; Glowinski, J.; Beaujouan, J.C. Presence of NK2 binding sites in the rat brain. *J. Neurochem.*, 2001, 79, 985.
- ⁸⁰ 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.
- ⁸¹ 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.
- ⁸² 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.
- ⁸³ 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.
- ⁸⁴ Maggi, C.A. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J. Auton. Pharmacol.*, 1991, 11, 173.
- ⁸⁵ Lembeck, F.; Holzer, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1979, 310, 175.
- ⁸⁶ 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.
- ⁸⁷ 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.
- ⁸⁸ Jancso, G.; Kiraly, E.; Jancso-Gabor, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, 1977, 270, 741.
- ⁸⁹ Lundberg, J.M.; Saria, A. Bronchial smooth muscle contraction induced by stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol. Scand.*, 1982, 116, 473.

- ⁹⁰ Moussaoui, S.M.; Le Prado, N.; Bonici, B.; Faucher, D.C.; Cui n , 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.
- ⁹¹ 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.
- ⁹² Massi, M.; Panocka, I.; de Caro, G. The psychopharmacology of tachykinin NK3 receptors in laboratory animals. *Peptides*, 2000, 21, 1597.
- ⁹³ Patacchini, R.; Maggi, C.A.; Holzer, P. Tachykinin autoreceptors in the gut. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, 21, 166.
- ⁹⁴ Pascual, D.W.; Bost, K.L. Substance P production by P388D1 macrophages: a possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology*, 1990, 71, 52.
- ⁹⁵ 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.
- ⁹⁶ 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.
- ⁹⁷ 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.
- ⁹⁸ 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.
- ⁹⁹ Cintado, C.G.; Pinto, F.M.; Devillier, P.; Merida, A.; Canden s, 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.
- ¹⁰⁰ Patak, E.; Canden s, M.L.; Pennefather, J.N.; Ziccone, S.; Lilley, A.; Martín, J.D.; Flores, C.; Mantec n, A.G.; Story, M.E.; Pinto, F.M. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 139, 523.
- ¹⁰¹ Pintado, C.O.; Pinto, F.M.; Pennefather, J.N.; Hidalgo, A.; Baamonde A.; Sanchez, T.; Canden s, M.L. A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol. Reprod.*, 2003, 69, 940.
- ¹⁰² 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.
- ¹⁰³ Nakanishi, S. Structure and regulation of the preprotachykinin gene. *Trends Neurosci.*, 1986, 9, 41.
- ¹⁰⁴ Nakanishi, S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol. Rev.*, 1987, 67, 1117.

- ¹⁰⁵ 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.
- ¹⁰⁶ 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.
- ¹⁰⁷ 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.
- ¹⁰⁸ 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.
- ¹⁰⁹ 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. Commun.*, 1986, 139, 1040.
- ¹¹⁰ 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.
- ¹¹¹ 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.
- ¹¹² 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.
- ¹¹³ 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.
- ¹¹⁴ 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.
- ¹¹⁵ 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.
- ¹¹⁶ 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.
- ¹¹⁷ Kotani, H.; Hoshimaru, M.; Nawa, H.; Nakanishi, S. Structure and gene organization of bovine neuropeptide K precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 7074.
- ¹¹⁸ Folkers, K.; Lu, Y.A.; Rosell, S. Synthesis and biological activities of neurokinin A and B. *Biophys. Res. Commun.*, 1984, 118, 405.

- ¹¹⁹ Gurrath, M. Peptide-binding G protein-coupled receptors: new opportunities for drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8, 1605.
- ¹²⁰ Hoyle, C.H. Neuropeptide families: evolutionary perspectives. *Regul. Pept.*, 1998, 73, 1.
- ¹²¹ Holmgren, S.; Jensen, Evolution of vertebrate neuropeptides. *J. Brain Res. Bull.*, 2001, 55, 723.
- ¹²² 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.
- ¹²³ 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.
- ¹²⁴ 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.
- ¹²⁵ 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.
- ¹²⁶ O'Harte, F.; Burcher, E.; Lovas, S. Smith, D.D.; Vaudry, H.; Conlon, J.M. Ranakinin: a novel NK1 tachykinin receptor agonist isolated with neurokinin B from the brain of the frog *Rana ridibunda*. *J. Neurochem.*, 1991, 57, 2086
- ¹²⁷ 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.
- ¹²⁸ 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.
- ¹²⁹ 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.
- ¹³⁰ 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.
- ¹³¹ 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.
- ¹³² Waugh, D.; Bondareva, V.; Rusakov, Y.; Bjening, 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.

- ¹³³ 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.
- ¹³⁴ Lin, X.W.; Peter, R.E. Goldfish gamma-preprotachykinin mRNA encodes the neuropeptides substance P, carassin, and neurokinin A. *Peptides*, 1997, 18, 817.
- ¹³⁵ 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.
- ¹³⁶ 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.
- ¹³⁷ 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.
- ¹³⁸ Waugh, D.; Sower, S.; Bjening, C.; Conlon, J.M. Novel tachykinins from the brain of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the skate, *Raja rhina*. *Peptides*, 1994, 15, 155.
- ¹³⁹ 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.
- ¹⁴⁰ 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.
- ¹⁴¹ 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.
- ¹⁴² 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.
- ¹⁴³ 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.
- ¹⁴⁴ 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.
- ¹⁴⁵ Anastasi, A. Structure and pharmacological actions of eledoisin, the active endecapeptide of the posterior salivary glands of *Eledone*. *Experientia* 1962, 18, 58.
- ¹⁴⁶ Erspamer, V.; Falconieri-Erspamer, G. Pharmacological actions of eledoisin on extravascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 1962, 19, 337.
- ¹⁴⁷ Schoofs, L.; Holman, G.M.; Hayes, T.K.; Nachman, R.J.; De Loof, A. Locust tachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS Lett.*, 1990, 261, 397.

- ¹⁴⁸ 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
- ¹⁴⁹ 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.
- ¹⁵⁰ 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.
- ¹⁵¹ 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.
- ¹⁵² Gerard, N.P.; Bao, L.; Xiao-Ping, H.; Gerard, C. Molecular aspects of the tachykinin receptors. *Regul. Pept.*, 1993, 43, 21.
- ¹⁵³ Krause, J.E.; Blount, P.; Sachais, B.S. In: *The tachykinin receptors*; Buck, S.H., Ed.; Humana Press: Totowa, 1994; pp 165-218.
- ¹⁵⁴ Maggi, C.A. The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmacol.*, 1995, 26, 911.
- ¹⁵⁵ Attwood, T.K. A compendium of specific motifs for diagnosing GPCR subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2001, 22, 162.
- ¹⁵⁶ 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
- ¹⁵⁷ Baldwin, J.M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.*, 1993, 4, 1693.
- ¹⁵⁸ 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.
- ¹⁵⁹ 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.
- ¹⁶⁰ 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-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry*, 1991, 30, 10640.
- ¹⁶¹ 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.
- ¹⁶² Page, N.M.; Bell, N.J. The human tachykinin NK1 (short form) and tachykinin NK4 receptor: a reappraisal *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 437, 27.
- ¹⁶³ Shigemoto, R.; Yokota, Y.; Tsuchida, K.; Nakanishi, S. Characterization of benzodiazepine receptors with a fluorescence-quenching ligand. *J. Biol. Chem.*, 1990, 15, 623.

- ¹⁶⁴ 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.
- ¹⁶⁵ 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.
- ¹⁶⁶ Sasai, Y.; Nakanishi, S. Molecular characterization of rat substance K receptor and its mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 165, 695.
- ¹⁶⁷ 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.
- ¹⁶⁸ 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.
- ¹⁶⁹ 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.
- ¹⁷⁰ 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.
- ¹⁷¹ 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.
- ¹⁷² Hershey, A.D.; Krause, J.E. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science*, 1990, 247, 958.
- ¹⁷³ 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.
- ¹⁷⁴ 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.
- ¹⁷⁵ 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.
- ¹⁷⁶ 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.
- ¹⁷⁷ Saffroy, M.; Torrens, Y.; Glowinski, J.; Beaujouan, J.C. Autoradiographic distribution of tachykinin NK2 binding sites in the rat brain: comparison with NK1 and NK3 binding sites. *Neuroscience*, 2003, 116, 761.

- ¹⁷⁸ 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.
- ¹⁷⁹ 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.
- ¹⁸⁰ 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.
- ¹⁸¹ 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.
- ¹⁸² 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.
- ¹⁸³ 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.
- ¹⁸⁴ Barnes, P.J.; Belvisi, M.G.; Rogers, D.F. Modulation of neurogenic inflammation: novel approaches to inflammatory disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1990, 11, 185.
- ¹⁸⁵ 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.
- ¹⁸⁶ Patacchini, R.; Maggi, C.A. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 429, 13.
- ¹⁸⁷ 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.
- ¹⁸⁸ 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 NK1, NK2, and NK3 neurokinin receptors and their utilization to localize receptors in the rat gastrointestinal tract. *J. Neurosci.*, 1996, 16, 6975.
- ¹⁸⁹ 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.
- ¹⁹⁰ Patak, E.N.; Pennefather, J.N.; Story, M.E. Effects of tachykinins on uterine smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2000, 27, 922.
- ¹⁹¹ 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.

- ¹⁹² 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
- ¹⁹³ 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.
- ¹⁹⁴ 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.
- ¹⁹⁵ 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.
- ¹⁹⁶ 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.
- ¹⁹⁷ 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.
- ¹⁹⁸ Mitsuhashi M, Ohashi Y, Shichijo Set al. Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide SP receptor. J Neurosci Res 1992; 32: 437-443.
- ¹⁹⁹ 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.
- ²⁰⁰ S. A. Khedkar, A. K. Malde, and E. C. Coutinho Internet Electronic Journal of Molecular Design 2005, 4, 329–341
- ²⁰¹ 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 NK1 receptor. Mol Biol Cell. 1995 May;6(5):509-24.
- ²⁰² 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.
- ²⁰³ 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).
- ²⁰⁴ 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.

- ²⁰⁵ 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.
- ²⁰⁶ 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.
- ²⁰⁷ 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.
- ²⁰⁸ 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.
- ²⁰⁹ 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.
- ²¹⁰ 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.
- ²¹¹ 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.
- ²¹² 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.
- ²¹³ 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.
- ²¹⁴ 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.
- ²¹⁵ 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.
- ²¹⁶ 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
- ²¹⁷ 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.
- ²¹⁸ BEAL, M. F., AND M. F. MAZUREK. Substance P-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Neurology* 37: 1205-1209, 1987.

- ²¹⁹ 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.
- ²²⁰ 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.
- ²²¹ 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.
- ²²² 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.
- ²²³ LANGEVIN, H., AND P. C. EMSON. Distribution of substance P, somatostatin and neurotensin in the human hypothalamus. *Brain Res.* 246: 65-69, 1982.
- ²²⁴ 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.
- ²²⁵ 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.
- ²²⁶ 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.
- ²²⁷ RUBIN, B. S., AND R. J. BARFIELD. Priming of estrous responsiveness by implants of 17P-estradiol in the ventromedial hypothalamic nucleus of female rats. *Endocrinology* 106: 504-509, 1980.
- ²²⁸ 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.
- ²²⁹ HIRAI, T., AND E. G. JONES. Distribution of tachykinin- and enkephalin-immunoreactive fibers in the human thalamus. *Brain Res. Rev.* 14: 35-52, 1989.
- ²³⁰ 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.
- ²³¹ 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.
- ²³² ROVERO, P., V. PESTELLINI, C. A. MAGGI, R. PATACCHINI, D. REGOLI, AND A. GIACHETTI. A highly selective NK2 tachykinin receptor antagonist containing D-triptófano. *Eur. J. Pharmacol.* 175: 113-115, 1990.

- ²³³ 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.
- ²³⁴ 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.
- ²³⁵ 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.
- ²³⁶ DE LANEROLLE, N. C., AND C. C. LAMOTTE. The human spinal cord: substance P and methionine-enkephalin immunoreactivity. *J. Neurosci.* 2: 1369-1386, 1982.
- ²³⁷ 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.
- ²³⁸ 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
- ²³⁹ 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.
- ²⁴⁰ 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.
- ²⁴¹ BJORKLUND, A., T. HGKFELT, AND C. OWMAN (Editors). *Handbook of Chemical Neuroanatomy. The Peripheral Nervous System.* New York: Elsevier, 1988, vol. 6.
- ²⁴² 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.
- ²⁴³ 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.
- ²⁴⁴ ZALUTSKY, R. A., AND R. F. MILLER. The physiology of substance P in the rabbit retina. *J. Neurosci.* 10: 394-402, 1990.
- ²⁴⁵ 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,
- ²⁴⁶ 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.
- ²⁴⁷ 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.

- ²⁴⁸ 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.
- ²⁴⁹ 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
- ²⁵⁰ 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.
- ²⁵¹ 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.
- ²⁵² 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.
- ²⁵³ 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.
- ²⁵⁴ 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.
- ²⁵⁵ Lima-Rodrigues M, Nunes R, Almeida A. Intraepithelial nerve fibers project into the lumen of the larynx. *Laryngoscope.* 2004 Jun;114(6):1074-7.
- ²⁵⁶ Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 219±63.
- ²⁵⁷ Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther* 1997; 73: 173±217.
- ²⁵⁸ Furness JB, Costa M. *The Enteric Nervous System.* New York: Churchill Livingstone, 1987.
- ²⁵⁹ 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.
- ²⁶⁰ 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.
- ²⁶¹ BUCSICS, A., P. HOLZER, AND F. LEMBECK. The substance P content of peripheral tissues in several mammals. *Peptides* 4: 451-455, 1983.

- ²⁶² 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.
- ²⁶³ 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.
- ²⁶⁴ 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.
- ²⁶⁵ 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
- ²⁶⁶ HUNTER, J. C., G. J. KILPATRICK, AND J. R. BROWN. Pharmacological analysis of 125I-Bolton and Hunter labelled eledoisin binding sites in rat spinal cord by quantitative autoradiography. *Neurosci. Lett.* 78: 12-16, 1987.
- ²⁶⁷ 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.
- ²⁶⁸ 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.
- ²⁶⁹ 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.
- ²⁷⁰ 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.
- ²⁷¹ 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.
- ²⁷² 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.
- ²⁷³ 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.
- ²⁷⁴ 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.

- ²⁷⁵ 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: 1297-1310, 1984
- ²⁷⁶ 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.
- ²⁷⁷ 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.
- ²⁷⁸ 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.
- ²⁷⁹ 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.
- ²⁸⁰ 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.
- ²⁸¹ 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.
- ²⁸² 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.
- ²⁸³ FERGUSON, M., AND C. BELL. Ultrastructural localization and characterization of sensory nerves in the rat kidney. *J. Comp. Neurol.* 274: 9-16, 1988.
- ²⁸⁴ 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.
- ²⁸⁵ 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.
- ²⁸⁶ BUCSICS, A., A. SARIA, AND F. LEMBECK. Substance P in the adrenal gland: origin and species distribution. *Neuropeptides* 1: 329-341,1981.

- ²⁸⁷ BJURHOLM, A., A. KREICBERGS, E. BRODIN, AND M. SCHULTZBERG. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 9: 165-171, 1988.
- ²⁸⁸ 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.
- ²⁸⁹ 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.
- ²⁹⁰ 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.
- ²⁹¹ DALSGAARD, C.-J., C.-E. JONSSON, T. HOKFELT, AND A. C. CUELLO. Localization of substance P-immunoreactive nerve fibers in the human digital skin. *Experientia Base* 39: 1018- 1020, 1983.
- ²⁹² 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.
- ²⁹³ FOREMAN, J. C. Neuropeptides and the pathogenesis of allergy. *Allergy* 42: 1-11, 1987.
- ²⁹⁴ Fernandes ES, Schmidhuber SM, Brain SD. Sensory-nerve-derived neuropeptides: possible therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(194):393-416
- ²⁹⁵ 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.
- ²⁹⁶ Brain SD, Cox HM. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S202-11.
- ²⁹⁷ LEWIS, T. *The Blood Vessels of the Human Skin and their Responses.* London: Shaw, 1927, p. 47.
- ²⁹⁸ HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24: 739- 768, 1988.
- ²⁹⁹ PAYAN, D. G. Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. *Annu. Rev. Med.* 40: 341-352, 1989.
- ³⁰⁰ FOREMAN, J. C. Peptides and neurogenic inflammation. *Br. Med. Bull.* 43: 386-400, 1987.
- ³⁰¹ 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.
- ³⁰² LEMBECK, F. Sir Thomas Lewis's nocifensor system, histamine and substance-P-containing primary afferent nerves. *Trends Neurosci.* 6: 106-108, 1983.

- ³⁰³ 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.
- ³⁰⁴ 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.
- ³⁰⁵ HARTUNG, H.-P., AND K. V. TOYKA. Substance P, the immune system and inflammation. *Int. Rev. Immunol.* 4: 229-249, 1989.
- ³⁰⁶ Zhang Y, Berger A, Milne CD, Paige CJ. Tachykinins in the immune system. *Curr Drug Targets*. 2006 Aug;7(8):1011-20.
- ³⁰⁷ 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.
- ³⁰⁸ Lam FF, Ng ES. Substance P and glutamate receptor antagonists improve the anti-arthritic actions of dexamethasone in rats. *Br J Pharmacol*. 2010 Jan 29.
- ³⁰⁹ Schäffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK. Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? *Arch Surg*. 1998 Oct;133(10):1107-16.
- ³¹⁰ 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.
- ³¹¹ Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol*. 2001 Dec;60(6):404-15.
- ³¹² 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.
- ³¹³ Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides*. 1997 Dec;31(6):537-63. Review.
- ³¹⁴ Folkers K, Hakanson R, Horig J, Jie-Cheng X, Leander S. Biological evaluation of substance P antagonists. *Br J Pharmacol* 1984; 83: 449-456.
- ³¹⁵ 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.
- ³¹⁶ Maggi C A, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A. Tachykinin receptors and receptor antagonists. *J Auton Pharmacol* 1993; 13: 958-962.
- ³¹⁷ Seabrook GR, Shephard SL, Williamson DJ, Tyrer P, Rigby M, Cascieri MA, Harrison T, Hargreaves RJ, Hill RG. L-733,060, a novel tachykinin NK1 receptor antagonist; effects in [Ca²⁺]_i mobilisation, cardiovascular and dural extravasation assays. *Eur J Pharmacol*. 1996 Dec 12;317(1):129-35.

- ³¹⁸ 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.
- ³¹⁹ MacLeod A M, Merchant K J, Cascieri M A et al. N-acyl-Ltryptófano benzil esters: potent substance P receptor antagonists. *J Med Chem* 1993; 36(14): 2044-2045.
- ³²⁰ Ficha farmacológica APREPITANT . Disponible en: <http://www.merck.com> Consultado el Abril, 2, 2010
- ³²¹ Curran MP, Robinson DM. Aprepitant: a review of its use in the prevention of nausea and vomiting. *Drugs*. 2009;69(13):1853-78.
- ³²² DeVane CL. Substance P: a new era, a new role. *Pharmacotherapy*. 2001 Sep;21(9):1061-9.
- ³²³ Madaan V, Wilson DR. Neuropeptides: relevance in treatment of depression and anxiety disorders. *Drug News Perspect*. 2009 Jul-Aug;22(6):319-24.
- ³²⁴ Ebner K, Sartori SB, Singewald N. Tachykinin receptors as therapeutic targets in stress-related disorders. *Curr Pharm Des*. 2009;15(14):1647-74
- ³²⁵ Chahl LA. Tachykinins and neuropsychiatric disorders. *Curr Drug Targets*. 2006 Aug;7(8):993-1003.
- ³²⁶ 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/anti-anxiety response. *J Psychiatry Neurosci*. 2004 May;29(3):208-18.
- ³²⁷ 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
- ³²⁸ Jessell TM. The role of substance P in sensory transmission and pain perception. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1981;28:189-98.
- ³²⁹ 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.
- ³³⁰ 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.
- ³³¹ 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
- ³³² 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.

- ³³³ 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.
- ³³⁴ 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.
- ³³⁵ 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
- ³³⁶ Viale PH. Integrating Aprepitant and palonsetron into clinical practice: a role for the new antiemetics. *Clin J Oncol Nurs.* 2005 Feb;9(1):77-84.
- ³³⁷ Navari RM. Role of neurokinin-1 receptor antagonists in chemotherapy-induced emesis: summary of clinical trials. *Cancer Invest.* 2004;22(4):569-76.
- ³³⁸ 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.
- ³³⁹ Dando TM, Perry CM. Aprepitant: A review of its use in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Drugs* 2004; 64: 777-794.
- ³⁴⁰ 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.
- ³⁴¹ Rollandy I, Dreux C, Imhoff V, Rossignol B: Importance of the presence of the N-terminal tripeptide of substance P for the stimulation of phosphatidylinositol metabolism in rat parotid gland: a possible activation of phospholipases C and D. *Neuropeptides* 13: 175–185, 1989
- ³⁴² 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
- ³⁴³ Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R: Antitumoural action of NK1 receptor antagonist L-733,060 on human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 14:183–188, 2004b
- ³⁴⁴ 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
- ³⁴⁵ Palma C, Nardelli F, Manzini S, Maggi CA: Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cells line bearing tachykinin NK1 receptors. *Br J Cancer* 79:236–243, 1999

- ³⁴⁶ 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
- ³⁴⁷ Sitohy B, El Salhy M: Changes in the colonic enteric nervous system in rats with chemically induced colon dysplasia and carcinoma. *Acta Oncol* 41:543–549, 2002
- ³⁴⁸ Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarriego C, Piruat JI: The NK1 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
- ³⁴⁹ Muñoz M, Rosso M, Pérez A, Coveñas R, Rosso R, Zamarriego C, Soult 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
- ³⁵⁰ 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
- ³⁵¹ 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
- ³⁵² 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
- ³⁵³ Muñoz M, Rosso M, Soult 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
- ³⁵⁴ 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 Cáncer* 112:231–238, 2004
- ³⁵⁵ 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. *Cáncer Res* 52:4554–4557, 1992
- ³⁵⁶ Reeve JG, Bleehen NM: Substance P induces apoptosis in lung cancer cell lines in vitro. *Biochem Bioph Res Com* 199:1313–1319, 1994
- ³⁵⁷ 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. *Cáncer Res* 57:51–54, 1997
- ³⁵⁸ Palma C, Bigioni M, Irrissuto C, Nardelli F, Maggi CA, Manzini S: Anti-tumour activity of tachykinin NK1 receptor antagonists on human glioma U373 MG xenograft. *Br J Cáncer* 82:480–487, 2000
- ³⁵⁹ 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

- ³⁶⁰ Bigioni M, Benzo A, Irrissuto C, Maggi CA, Goso C. Role of NK-1 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.
- ³⁶¹ 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.
- ³⁶² 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
- ³⁶³ 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
- ³⁶⁴ Nowicki M, Miskowiak B. Substance P--a potent risk factor in childhood lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. 2003 Jun;17(6):1096-9.
- ³⁶⁵ Palma C, Maggi CA. The role of tachykinins via NK1 receptors in progression of human gliomas. *Life Sci*. 2000;67(9):985-1001. Review.
- ³⁶⁶ 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.
- ³⁶⁷ 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.
- ³⁶⁸ A C MacKinnon, R A Armstrong, C M Waters, J Cummings, J F Smyth, C Haslett, T Sethi. [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
- ³⁶⁹ 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.
- ³⁷⁰ 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.
- ³⁷¹ 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.
- ³⁷² Hepler JR, Gilman AC: G proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 383-387, 1992

- ³⁷³ Clapham D, Neer EJ: New roles: G protein $\beta \gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365: 406, 1993
- ³⁷⁴ Muñoz, M., Rosso, M., COVEÑAS, R. *Neuropeptides Research Trends*. Levine, B.A. (ed.), Nova Science Publishers, New York, pp. 97-119, 2007
- ³⁷⁵ 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.
- ³⁷⁶ 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.
- ³⁷⁷ Rosso M, Robles-Frías MJ, Coveñas R, Salinas-Martín MV, Muñoz M. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines. *Tumour Biol*. 2008;29(4):245-54.
- ³⁷⁸ 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
- ³⁷⁹ McGillis JP, Organist ML, Scriven KH, Payan DG (1987) Purification of the 33,000-dalton ligand binding-protein constituent of the lymphoblast substance P receptor. *J Neurosci Res* 18(1):190–194
- ³⁸⁰ McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG (1990) Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci* 594:85–94
- ³⁸¹ 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
- ³⁸² 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
- ³⁸³ 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
- ³⁸⁴ 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
- ³⁸⁵ 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

- ³⁸⁶ 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, 19
- ³⁸⁷ 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
- ³⁸⁸ 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
- ³⁸⁹ Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A: Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16 7032–7044, 1997
- ³⁹⁰ Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ: Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J Immunol* 131:1613–1615, 1983
- ³⁹¹ Lotz M, Carson DA, Vaughan JH: Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 235:893–895, 1987
- ³⁹² Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Dolara P, Maggi CA: NK1-receptors mediate the proliferative response of human fibroblasts to tachykinins. *Br J Pharmacol* 100:11–14, 1990
- ³⁹³ 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
- ³⁹⁴ Nilsson J, von Euler AM, Dalsgaard CJ: Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature* 315:61–63, 1985
- ³⁹⁵ 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-1 receptor complex in cell proliferation in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009 Jun;29(6):2323-9.
- ³⁹⁶ Esteban F, Munoz M, Gonzalez-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cáncer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cáncer Metastasis Rev.* 2006 Mar;25(1):137-45.
- ³⁹⁷ Bringold F, Serrano M: Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35: 317–329, 2000
- ³⁹⁸ 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
- ³⁹⁹ 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
- ⁴⁰⁰ 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

- ⁴⁰¹ 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
- ⁴⁰² 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
- ⁴⁰³ Ding HF, Fisher DE: Induction of apoptosis in cáncer: new therapeutic opportunities. *Ann Med* 34(6): 451–469, 2002
- ⁴⁰⁴ 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
- ⁴⁰⁵ Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC: Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cáncer* 61:786–792, 1995
- ⁴⁰⁶ 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.
- ⁴⁰⁷ Mantyh, PW. Substance P and the inflammatory and immune response. *Ann NY Acad Sci* 1991; 632, 263-271.
- ⁴⁰⁸ Harrison, S; Geppetti, P. Substance P. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33, 555-576.
- ⁴⁰⁹ 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.
- ⁴¹⁰ Rupniak, NM; Carlson, E; Boyce, S; Webb, JK; Hill, RG. Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils. *Pain* 1996; 67, 189-195.
- ⁴¹¹ 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.
- ⁴¹² 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.
- ⁴¹³ 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.
- ⁴¹⁴ Keranen, U; Jarvinen, H; Karkkaine, P; Kiviluoto, T; Kivilaakso, E; Soinila, 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.
- ⁴¹⁵ 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.

- ⁴¹⁶ 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.
- ⁴¹⁷ 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.
- ⁴¹⁸ 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.
- ⁴¹⁹ 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.
- ⁴²⁰ 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.
- ⁴²¹ Spiegel, D; Giese-Davis, J. Depression and cancer: mechanisms and disease progression. *Biol Psychiatry* 2003; 54, 269-282.
- ⁴²² Fehder, WP. Alterations in immune response associated with anxiety in surgical patients. *CNRA* 1999; 10, 124-129.
- ⁴²³ Muñoz M, Rosso M. The NK-1 receptor antagonist Aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Invest New Drugs*. 2009 Jan 17.