

## LA INFORMACIÓN EN LA SOCIEDAD CELULAR

ÁNGEL MARTÍN MUNICIO \*

\* Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. C/ Valverde, 22. 28004 Madrid

### INTRODUCCIÓN

Si la llamada *sociedad de la información* se refiere al conjunto de posibilidades tecnológicas que facilitan al hombre el acceso a las más variadas fuentes de conocimiento, también las células de los seres vivos —la *sociedad celular*—, del hombre incluido, necesitan para su crecimiento, nutrición y diferenciación, recibir una información procedente de su entorno y a través de sus componentes de la más variada naturaleza —*hormonas, factores de crecimiento y de angiogénesis, neurotransmisores, feromonas, interferones*—, así como de la *luz*, los *aromas*, y los múltiples *mensajeros químicos* que, desde el exterior de la célula y sin penetrar en ella, constituyen el fundamento de numerosos e importantes fenómenos biológicos: la *visión*, la *inflamación*, la *respuesta inmunitaria*, la *acción hormonal*, la *transmisión del impulso nervioso*, la *angiogénesis*, la *apoptosis o muerte celular programada*, etc. Fenómenos que, en su conjunto, se caracterizan por la maravillosa variedad de las señales, la complejidad de las cascadas y de sus entrecruzamientos, la diversidad de etapas y ramificaciones, la enorme heterogeneidad de las respuestas, la gran flexibilidad evolutiva, la complejidad y variabilidad de sus mecanismos, y la importancia de sus implicaciones fisiopatológicas.

Ante la gran variedad de fenómenos y de la complejidad molecular que los interpretan, va solamente a figurar en esta exposición una selección representativa de esta importante área biológica.

La mayoría de los tipos de células de mamíferos expresan una gran variedad de receptores de citoquinas en su superficie. Estos receptores transducen esa gran variedad de señales desde el ambiente externo hacia el interior de la célula para generar la respuesta apropiada. Si estos agentes externos no penetran en la célula, y, sin embargo, inician el gobierno de cada uno de los fenómenos mencionados a través de la actividad de los genes nucleares, no cabe más remedio que concluir y los hechos experimentales así lo demuestran: 1) la existencia en las membranas celulares de *receptores* capaces de unir a cada uno de los variados agentes externos, los llamados *ligandos*; y 2) la existencia de mecanismos capaces de transformar esta señal inicial, a través de *cascadas específicas* de interacciones, en otra señal que actúe sobre la actividad génica de los núcleos de las células, principalmente sobre los conocidos como *factores de transcripción*.

Mecanismos extraordinariamente complejos y variados a través de los que se transmiten las múltiples *informaciones en la sociedad celular* y que, por analogía con los fenómenos físicos, se conocen en su conjunto como la *transducción de señales*.

En el último cuarto de siglo, una serie de acontecimientos bioquímicos han preparado la emergencia de este complejo campo. Y, efectivamente, el conocimiento de la *transducción de señales* hace uso de los avances realizados en los campos de la regulación enzimática por modificación covalente, los cambios conformacionales, la fluidez de membranas y los modelos de membrana —principalmente el modelo de bicapa lipídica—, las interacciones moleculares, las

proteínas oligoméricas, la amplificación de señales y la participación de los segundos mensajeros en la actividad hormonal. Durante este tiempo, se ha definido asimismo una amplísima lista de enzimas implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos, los aminoácidos y las proteínas, sobre todo las implicadas en la regulación por modificación covalente; entre las que hay que destacar los sistemas de fosforilación-defosforilación y las enzimas que, utilizando las proteínas como sustratos, catalizan estas transformaciones: *proteína quinasa* y *proteína fosfatasa*, respectivamente, que van a constituir ingredientes fundamentales en los sistemas de *transducción de señales* en las células.

Las bases moleculares de la *transducción de señales* a través de las membranas celulares constituye uno de los campos de mayor interés, que incluye importantes mecanismos biológicos tales como la diferenciación y la proliferación celular y la comunicación célula-célula.

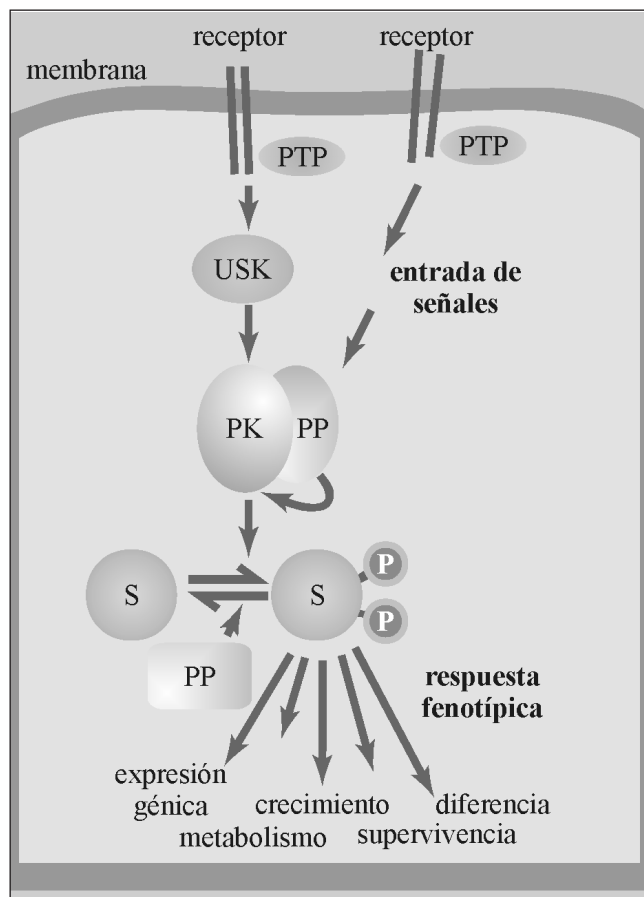
## GENERALIDADES

El estudio de la *transducción de señales* constituye uno de los campos más activos de la moderna biología, sobre todo por la nueva y gran cantidad de blancos de acción que se definen para la acción de múltiples clases de medicamentos. Bajo el dominio de la *transducción de señales* hay que analizar:

1. Los componentes y la estructura química de las *membranas celulares* —lípidos y proteínas receptoras y de adhesión—;
2. la naturaleza de los *ligandos* y su interacción con los receptores de membrana;
3. la naturaleza de los *receptores* y la modificación de sus actividades bioquímicas bajo la acción de los ligandos;
4. los componentes de las numerosas *cascadas de transmisión de señales* hasta alcanzar el núcleo de las células, y las bases moleculares de su intervención, las *interacciones proteína-proteína*, y

5. las numerosas *implicaciones fisiopatológicas* de estos mecanismos y sus alteraciones en los ámbitos de la inflamación, la respuesta inmunitaria y las enfermedades autoinmunes, las neoplasias y metástasis.

La figura 1 representa esquemáticamente este conjunto de etapas que componen la totalidad del mecanismo por el que ciertos ligandos extracelulares ejercen su actividad que se traduce finalmente en la de la modificación de la expresión génica. De forma que el proceso de *transducción de señales* consiste, en su conjunto, en una serie de *señales externas* —factores de crecimiento, citoquinas, antígenos, hormonas polipeptídicas, neurotransmisores, óxido nítrico—, *proteínas receptoras específicas* o *canales de iones*, *proteínas ligantes de GTP*, *enzimas formadoras de segundos mensajeros* —fosfolipasas, fosfoinositi-



**Figura 1.** Esquema general de un proceso de *transducción de señales*, desde la unión de ligandos a los receptores hasta las diversas respuestas fenotípicas. (PK) *proteína quinasa*; (PP) *proteína fosfatasa*.

- los componentes y la **estructura química de las membranas celulares** -lípidos y proteínas receptoras y de adhesión-;
- la naturaleza de los **ligandos** y su interacción con los receptores de membrana;
- la naturaleza de los **receptores** y la modificación de sus actividades bioquímicas bajo la acción de los ligandos;
- los componentes de las numerosas **cascadas de transmisión de señales** hasta el núcleo de la célula y las bases moleculares de su intervención; las **interacciones proteína-proteína**;
- las numerosas **implicaciones fisiopatológicas** de estos mecanismos y sus alteraciones -inflamación, respuesta inmunitaria y enfermedades autoinmunes, neoplasias y metástasis-;
- la existencia de **numerosos blancos de acción** para el diseño de medicamentos modificadores de cada uno de los fenómenos implicados, como la acción hormonal, la neurotransmisión, la apoptosis, la angiogénesis, la drogadicción, el crecimiento, la diferenciación, etc.

**Tabla 1.** Etapas fundamentales del proceso de *transducción de señales*, desde la presencia de ligandos extracelulares hasta la respuesta celular.

dasas, esfingomielinasa—, *segundos mensajeros intracelulares* —Ca<sup>2+</sup>, AMP cíclico (cAMP), GMP cíclico (cGMP), inositolfosfatos (InsP), diacilgliceroles (DAGs), ADP-ribosa—, *proteína quinasa*, *proteínas reguladoras* y *proteínas blanco*. Así, a nivel molecular, la situación aparece cada día más compleja a causa de la gran variedad de la naturaleza química de las señales y de las células implicadas; las variedades estructurales de los receptores; la vinculación de la estimulación del receptor a las actividades enzimáticas que actúan sobre GTP o sobre fosfolípidos; la diversidad de los productos de degradación y su participación en la actividad reguladora de las múltiples especies de *proteína quinasa* y de otras proteínas funcionales. De otro lado, muchos de los componentes de las cascadas intracelulares de transmisión de las señales —*proteína quinasa* catalizadoras de la fosforilación específica de residuos de tirosina o treonina en el seno de proteínas blanco, proteínas ligantes de DNA, proteínas ligantes de GTP— son productos de expresión de oncogenes. Lo que significa que ciertos tipos de procesos de señalización intracelular son responsables del control del crecimiento y la diferenciación celulares, y, por tanto, conectados con los mecanismos de la malignidad celular.

En la tabla 1 se detallan las etapas fundamentales del proceso de *transducción de señales*, al lado de los

participantes moleculares fundamentales en cada una de ellas.

Por consiguiente, un estudio general de la *transducción de las señales biológicas* podrá efectuarse desde el punto de vista de los ingredientes de los diferentes sistemas; y, así, bien considerar la estructura y propiedades de cada uno de los conjuntos de los *ligandos*, los *receptores*, los *coestimuladores*, los *canales*, las *proteínas G* y sus *proteínas reguladoras*, las *enzimas* —*quinasa*, *fosfolipasas*, *fosfatasas* y *caspasas*, principalmente—, la participación de los *lípidos* y el Ca<sup>2+</sup>, etc. O desde el ángulo de examinar los conjuntos de etapas que corresponden a cada uno de los procesos aislados, como la acción de las hormonas y de la insulina en particular, la activación de las células T como iniciación de la respuesta inmunitaria, la inflamación, la angiogénesis, el ciclo celular, la transmisión nerviosa o la apoptosis celular; y, a su lado, las manifestaciones patológicas que acompañan a cada uno de estos procesos.

De otro lado y para mayor complicación, las consecuencias fisiopatológicas del entrecruzamiento de los diferentes sistemas de señalización celular son evidentes a múltiples niveles dentro de una cascada determinada, incluyendo actividades enzimáticas, interacciones proteína-proteína, la función de los canales de

iones y la expresión génica. Y los avances en los conocimientos de los *modelos de transducción*, al lado de la posibilidad de que las actividades de cada uno de los componentes de cada sistema pueda ser considerado como blanco de la acción farmacológica para el diseño de nuevos medicamentos, abren permanentemente nuevas puertas a la intervención de estrategias terapéuticas innovadoras.

A continuación se van a señalar las características más importantes de los *ligandos* extracelulares, las *membranas* y sus *lípidos* y *proteínas* integrantes, los *receptores* y *coestimuladores*, las *proteínas G* y sus *proteínas reguladoras*. Tras de lo cual se examinarán algunos de los mecanismos moleculares de *transducción de señales*, que constituyen, sin embargo, el fundamento de muchos procesos fisiopatológicos.

## LIGANDOS

Los efectos a largo plazo sobre la regulación celular se originan mediante señales engendradas por la estimulación de los *receptores* de membrana. Las hormonas polipeptídicas y los neurotransmisores son los ejemplos clásicos de factores señalizadores que transportados por la sangre ejercen su función sobre receptores celulares específicos. En la actualidad, uno de los aspectos centrales de los mecanismos de transducción de señales se basa en las redes celulares complejas formadas por las células productoras de *citoquinas* y la gran familia de *citoquinas* como proteínas mediadoras de la *proliferación*, la *diferenciación*, y las funciones de varios tipos de células blanco. A esta complejidad contribuyen asimismo los múltiples tipos de células sobre las que son capaces de actuar los diferentes tipos de citoquinas, el sinergismo o interferencia entre citoquinas, las funciones pleiotrópicas de las células blanco, y un cierto tipo de redundancia funcional entre las diferentes citoquinas. En la actualidad, más de medio centenar de distintas citoquinas han sido identificadas como señales moleculares, capaces de inducir diferentes respuestas biológicas sobre una colección de células blanco.

Las *citoquinas* están implicadas en la información intercelular, principalmente en lo referente al *sistema inmunitario* al determinar la calidad y la magnitud de la respuesta. Desde un punto de vista evolutivo,

algunas citoquinas aparecieron simultáneamente en vertebrados y en linfocitos, aunque otras citoquinas aparecieron mucho más primitivamente en la escala evolutiva como la estrella de mar. A las *citoquinas* pertenecen dos familias principales: *interleuquinas* (IL) y *factores de crecimiento*.

Las *interleuquinas* deben su principal actividad a la información que realizan entre los leucocitos sanguíneos. Así, una población de linfocitos T (TH1) libera IL-2 e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), y promueve la inmunidad mediada por células; mientras que otra población (TH2) produce IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, e induce la inmunidad humoral, con la producción de IgG, IgE e IgA. Simultáneamente, IL-4 e IL-10 inhiben el desarrollo de la serie TH1, mientras que IFN- $\gamma$  suprime la respuesta TH2. El desarrollo de las células hematopoyéticas a partir de una célula madre multipotente viene regulada por la acción secuencial de un cierto número de *interleuquinas* (IL-3 e IL-5) y de *factores estimulantes de colonias* (FSC) de granulocitos (G-FSC), macrófagos-granulocitos (MG-FSC) y monocitos (M-FSC), de acuerdo con la progenie celular. Asimismo, un cierto número de citoquinas circulantes —por ejemplo, IL-1, IL-2 e IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)— ejercen actividades endocrinas o sobre el sistema nervioso central. Los niveles de IL-16 en suero se han relacionado con el progreso de la infección por HIV-1 y su síntesis por células T CD8<sup>+</sup>.

La disregulación del sistema hematopoyético conduce a una plétora de enfermedades, algunas de índole fatal. Las aplicaciones más importantes de las *citoquinas* se basan en su participación en los regímenes terapéuticos para salvar los sistemas hematopoyéticos comprometidos de alguna manera. Obviamente, las principales aplicaciones clínicas de estos factores tienen lugar ante la carencia de uno o más de los componentes celulares del sistema hematopoyético o en las citopenias inducidas por la quimioterapia, en particular las producidas como consecuencias de los trasplantes de médula ósea y de las terapias citotóxicas.

Una serie de *citoquinas* se encuentran implicadas en los mecanismos moleculares de muchas enfermedades humanas. Entre las *neoplasias*: mieloma (IL-6), linfoma de Burkitt (IL-10), carcinoma de mama

(TGF-β), carcinoma de células escamosas (G-CSF), osteosarcoma (GM-CSF), leucemia mieloide (IL-1, GM-CSF, G-CSF, M-CSF), leucemia linfóide (IL-2, IL-7, TNF). Entre las *enfermedades autoinmunes*: diabetes tipo II (IL-1, IL-4, GM-CSF), lupus eritematoso sistémico (IL-2, GM-CSF, IFN-γ), esclerosis múltiple (IL-1, IL-6, TNF). En la *inflamación*: artritis reumatoide (IL-1, IL-6, TNF, GM-CSF), psoriasis (IL-6, IL-8), eritroderma (IL-6, IL-8), espondilitis anquilosante (IL-1, IL-6). En *asma alérgica* (IL-1, IL-4, IL-5), *shock séptico* (IL-1, IL-6, TNF), *fibrosis* (TGF-β), *anemia aplásica* (IFN-γ) y *malaria cerebral* (IL-3). A la vista, pues, de este tipo de participaciones en los mecanismos moleculares de las actividades de señalización celular, las terapias a base de citoquinas y anticitoquinas —anticuerpos anticitoquinas, receptores solubles de citoquinas, antagonistas de receptores e IL-10— han adquirido importancia clínica. De otro lado, los vectores codificadores de citoquinas pueden aumentar la seguridad de los vectores virales y permitir la manipulación de la respuesta inmune con la que lograr una efectiva inmunidad protectora.

A este respecto es importante subrayar que los genes del *factor de necrosis tumoral* (TNF) son los únicos capaces de codificar una citoquina localizada dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). A pesar de la fuerte asociación entre diferentes alelos de MHC y varias enfermedades autoinmunes, continúa desconocida la función de las proteínas HLA de las clases I o II en este tipo de enfermedades; e, incluso, sigue siendo cuestionable si los genes MHC predisponen a la enfermedad o, más bien, se trata de marcadores de otros genes íntimamente relacionados. Por ello, resulta interesante considerar si la producción de TNF-α por los macrófagos peritoneales de ratón, inducidos por lipopolisacárido o por interferon γ (IFN-γ), varía con la estirpe celular y se vincula al MHC clase II.

### MEMBRANAS CELULARES. LÍPIDOS Y PROTEÍNAS

La certeza de la existencia de una membrana plasmática discreta en la superficie de las células ha emergido progresivamente en la biología celular del siglo XIX a través de múltiples observaciones fisiológicas y de comprobaciones físicas y químicas. Y de

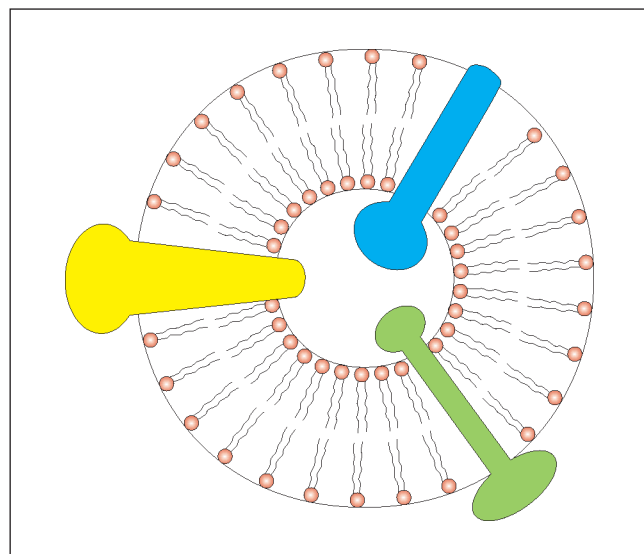


Figura 2. Modelo de membrana de Danielli y Davson basado en una bicapa lipídica.

los estudios de permeabilidad de las células a toda una variedad de no electrolitos, se especuló en seguida acerca de la naturaleza lipídica de la barrera de permeabilidad. Los primeros estudios químicos importantes de las membranas datan de 1925 al extraerse los lípidos de glóbulos rojos y extenderse como una monocapa en una interfase aire-agua y comparar el área ocupada con la superficie total de las células originales; las conclusiones iniciales fueron compatibles con la existencia de cantidades suficientes de lípidos para formar una bicapa alrededor de toda la superficie de la célula. Hechos que se confirmaron rápidamente mediante medidas ópticas y eléctricas de las membranas y la dilucidación química de los componentes

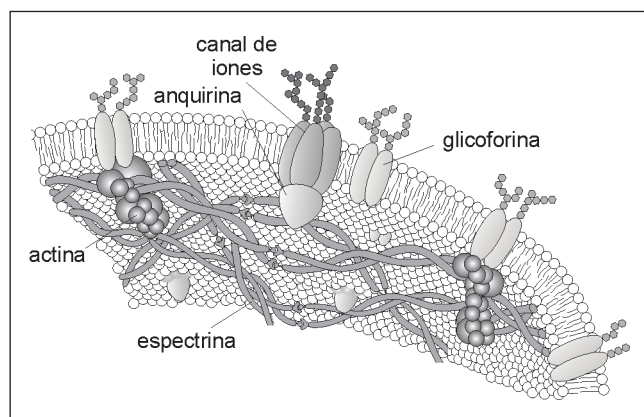


Figura 3. Modelo de membrana de Singer y Nicolson de glóbulos rojos humanos.

lipídicos. En 1935, Danielli y Davson establecieron un modelo fundado en una estructura lipídica en forma de bicapa (figura 2) que pudiera ser atravesada de manera total o parcial por las proteínas —*proteínas intrínsecas*—, e, incluso, que pudieran estar simplemente colocadas sobre la superficie —*proteínas extrínsecas*—. Sobre esta base, y mediante los procedimientos de la microscopía electrónica se pudo establecer en 1972 el modelo del “mosaico fluido” por Singer y Nicolson (figura 3).

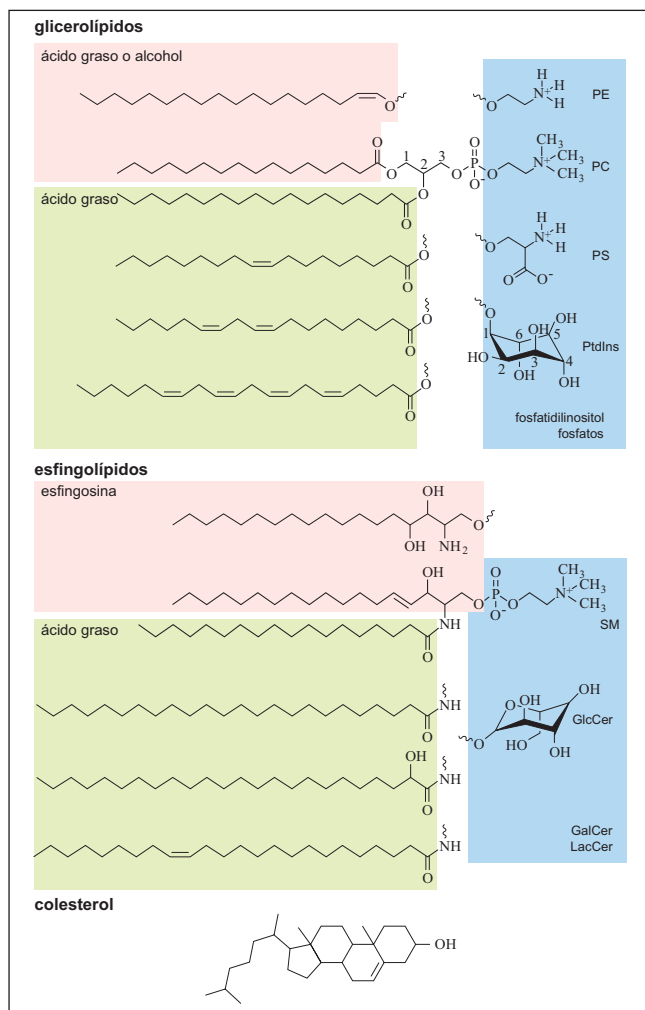
Las células determinan las características de las diferentes membranas mediante el control de su composición lipídica. A su vez, cambios locales en las propiedades físicas de las bicapas permiten la deformación de las membranas y facilitan su fusión y la for-

mación de vesículas. Sin embargo, lípidos específicos en localizaciones específicas reclutan proteínas citosólicas implicadas en funciones estructurales o en la transducción de señales.

Aunque cada membrana celular posee una colección propia de proteínas para llevar a cabo sus funciones especializadas, los constituyentes fundamentales responsables de la estabilidad mecánica y de la tendencia a formar estructuras cerradas son siempre lípidos, cuyas clases responden a glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides (figura 4).

Los *glicerolípidos* (figura 4) constan de una molécula de glicerol esterificada en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 por las correspondientes moléculas de ácidos grasos largos; una molécula de ácido fosfórico da lugar a una nueva función ester y el ácido resultante se conoce como ácido fosfatídico (PA). El ácido fosfatídico, a través de una nueva función ester, se une a los grupos —OH de la colina, la etanolamina, la serina o el inositol, originando respectivamente fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) o fosfatidilinositol (PI). Este último posee cinco grupos —OH adicionales capaces de originar nuevas uniones ester con restos de ácido fosfórico —merced a la acción catalítica de las *quinasas* correspondientes—, y así dar lugar a los variados fosfatidilinositolfosfatos (PtdInsP) —o también, fosfoinosítidos (PI)—, algunas de cuyas especies (PIP, PIP<sub>2</sub>, PIP<sub>3</sub>) cumplen importantes funciones celulares. La rotura enzimática de la unión ester en la posición *sn*-2 de los glicerolípidos (PC, PE, PS o PI) origina los correspondientes lisoderivados con una notoria diversidad de efectos fisiológicos, por ejemplo, morfológicos y proliferativos.

Los *esfingolípidos* (figura 4) contienen una base esfingóide, preferentemente esfingosina, que posee grupos alcohólicos —OH y un grupo amino —NH<sub>2</sub>. La acilación del grupo amino con una molécula de ácidos grasos de cadena larga da lugar a las *ceramidas*. Cuando el grupo —CH<sub>2</sub>OH de la base origina una unión ester con fosforilcolina se obtienen las *esfingomielinas*; y si en lugar de la unión ester se forma una unión glicosídica con un monosacárido (glucosa o galactosa) o disacárido (lactosa) se originan glucosilceramida (GlcCer), galactosilceramida (GalCer) o lactosilceramida (LacCer), respectivamente.



**Figura 4.** Estructura de glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides, caracterizados por largas cadenas apolares dirigidas hacia el interior de la bicapa.

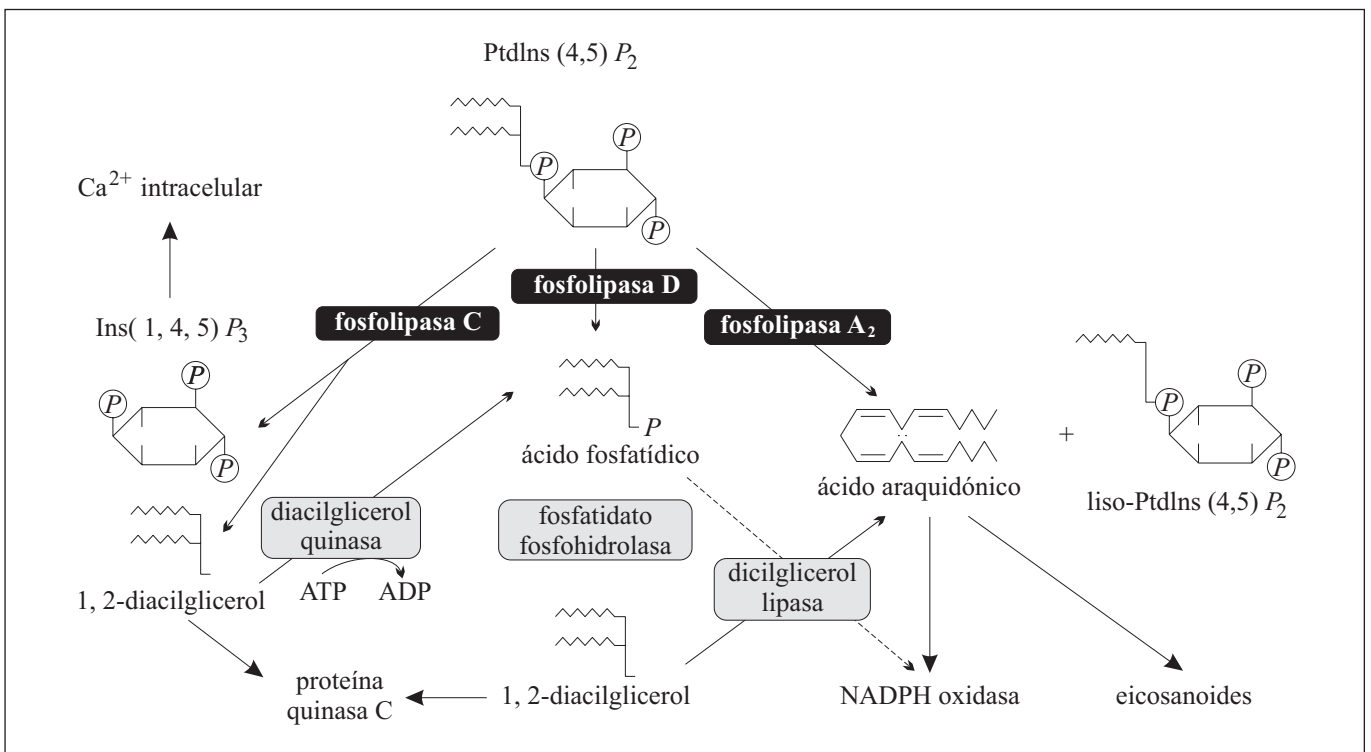
En tercer lugar, los *esteroles* (figura 4) se caracterizan por la presencia de anillos tetracíclicos rígidos y planares. Las membranas animales contienen principalmente *colesterol* y pequeñas cantidades de esteroles relacionados, sobre todo 7-dehidrocolesterol. Los esteres de colesterol con ácidos grasos largos constituyen lípidos de reserva, análogos a los triacilgliceroles. Las plantas contienen principalmente *sistosterol* y *estigmasterol*.

Dentro de este conjunto de lípidos que forman parte de la estructura de las membranas celulares, merece subrayar la participación de los fosfoinosítidos en la transducción de señales, la regulación del citoesqueleto y la dinámica de las membranas. A esta complejidad contribuyen las múltiples transformaciones enzimáticas que pueden experimentar y, por tanto, la gran variedad de productos resultantes (figura 5). Asimismo, los inositolfosfatos —y los fosfatidilinositolfosfatos de los que forman parte— son capaces de transformarse en virtud de reacciones enzimáticas de fosforilación (acción de *quinasas*) y defosforilación (acción de *fosfatasas*) en una gran red de derivados, como puede observarse en la figura 6. Desde el punto de vista de la participación de estos lípidos en la transducción de

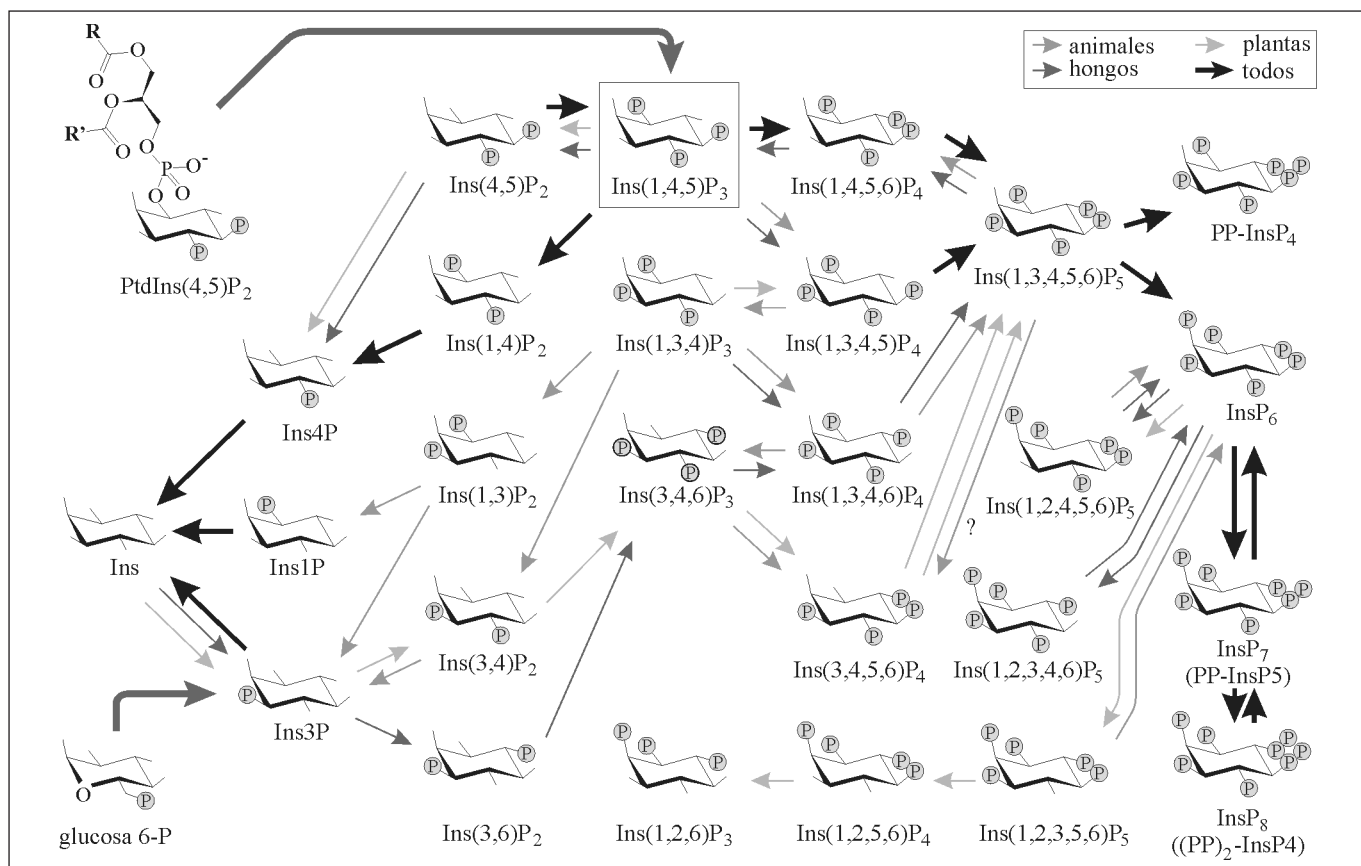
señales, hay que hacer notar su reconocimiento específico por ciertos dominios de los receptores en más de un centenar de proteínas; a lo que hay que añadir su utilización como sustratos de la acción de *quinasas*, *fosfatasas* y *fosfolipasas C* y *D*, y la formación de ciertos productos con actividad reguladora, por ejemplo la de los diacilgliceroles (DGs) sobre la actividad de la *proteína quinasa C* y la activación de los canales de  $Ca^{2+}$ ; de igual forma, el  $Ins(1,4,5)P_3$  abre los canales de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplásmico. Análogamente, la ceramida producida por la *esfingomielinasa* durante la apoptosis es capaz de activar *proteína quinasa* y *fosfatasas* específicas.

Los fosfatidilinositolfosfatos de membrana, en particular el  $PI(4,5)P_2$ , regulan fundamentales procesos de las células como el tráfico de vesículas y la remodelación del citoesqueleto; el  $PI(4,5)P_2$  estimula la polimerización *de novo* de la actina por activación de la familia de proteínas WASP —del síndrome de Wiskott-Aldrich—.

Otros lípidos que participan en la comunicación entre células a través de receptores específicos son el *factor activante de plaquetas* (PAF) —cuya estructura



**Figura 5.** Esquema de transformaciones enzimáticas que puede experimentar el  $PtdIns(4,5)P_2$ , y la variedad de productos que origina.



**Figura 6.** Esquema de las transformaciones enzimáticas de los inositolfosfatos en diversas especies de seres vivos.

responde a la alquil-acetil-fosfatidilcolina—, uno de los más potentes mediadores del daño celular en la respuesta inflamatoria; y los productos de peroxidación de la PC con actividad de PAF como los *eicosanoides* —prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos— que son sintetizados a partir del ácido araquidónico (20:4), tras su producción por la acción de la *fosfolipasa A<sub>2</sub>*.

Finalmente, ciertos tipos de lípidos, y su distribución diferencial en las membranas, sirven a la vez para definir la situación de las proteínas en la membrana, y para regular el transporte vesicular de proteínas. A ello hace referencia la figura 7, en la que pueden observarse diferentes mecanismos físicos para mantener la distribución de las proteínas en el seno de las membranas: oligomerización, remaches citosólicos, y su fijación mediante anclajes de largas cadenas hidrofóbicas —acilación con 14:0 y 16:0, prenilación con cadenas de farnesilo o geranilgeranilo, o la fijación con glicosilfosfatidilinositol (GPI); aparte de la influencia que la composición lipídica ejerce

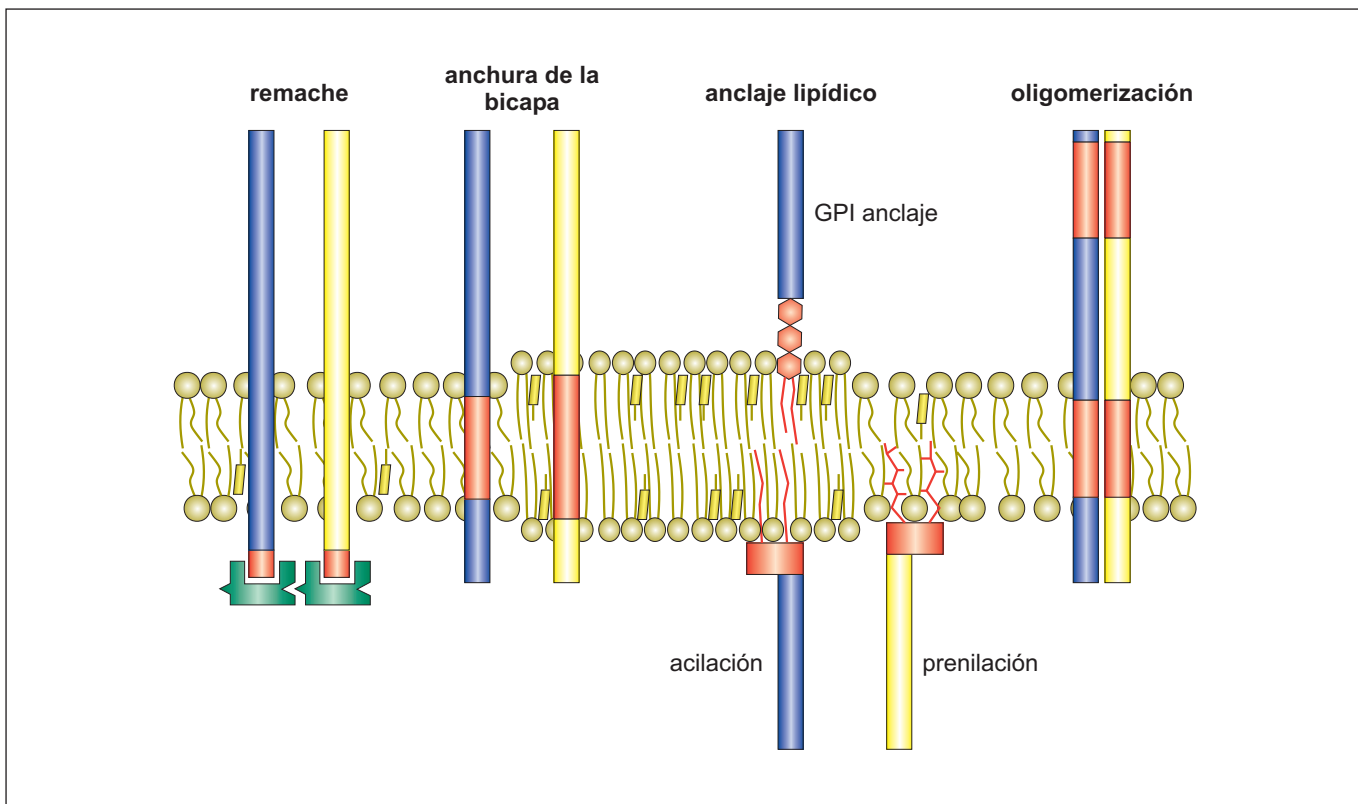
sobre la anchura de la membrana y, con ella, sobre la naturaleza de la cadenas de proteínas.

## RECEPTORES

La actividad biológica de las moléculas señaladoras del exterior de las células requieren la presencia de receptores transductores de señales en las membranas celulares. Desde el punto de vista de su estructura, los receptores pueden clasificarse en tres tipos generales de estructuras:

1. *Proteínas con un único dominio hidrofóbico.* Estas cadenas polipeptídicas pueden poseer o no secuencias transmembranares. En el segundo caso, la cadena polipeptídica se fija a la membrana por medio de porciones glicolipídicas. Dependiendo de la composición en subunidades, los receptores pueden ser monómeros, homodímeros, heterodímeros, heterotrímeros o heterotetrámeros.





**Figura 7.** Fijación lateral de las proteínas en el seno de las membranas mediante diferentes tipos de mecanismos.

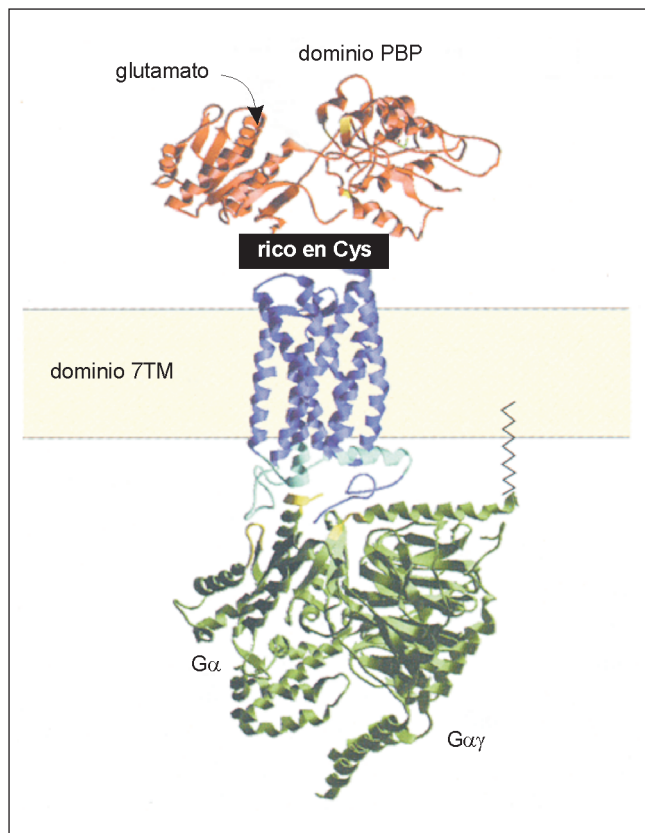
Como sistemas de transducción, estas subunidades pueden poseer ciertas actividades enzimáticas tales como *tirosina quinasa* (en los receptores de insulina y de factores de crecimiento mitogénicos) o de *guanilato ciclasa* (en los péptidos natriuréticos). Por el contrario, los receptores de muchas citoquinas, hormona de crecimiento, prolactina y neurotrofinas, no exhiben actividad enzimática alguna tras la unión del ligando.

2. *Proteínas con siete dominios hidrofóbicos*, estructurados bajo la forma de monómeros, homodímeros y heterodímeros. Cada subunidad posee una secuencia de reconocimiento de una proteína G sobre su cara intracelular. La proteína G interactúa directamente con un canal (muscarínico atrial,  $\alpha_1$ -adrenérgico neuronal) o vía mensajeros difusibles (PAF, eicosanoides, IL-8, neuropéptidos, algunos neurotransmisores).
3. *Oligómeros formadores de canales*, poseedores de subunidades homoméricas o heteroméricas. Estos receptores llevan a cabo rápidamente los procesos de transducción debido a su independencia de factores difusibles de membrana o intracelulares.

La redundancia funcional exhibida por diferentes citoquinas puede interpretarse por la estructura molecular de sus receptores. En efecto, los receptores de elevada afinidad para un grupo de citoquinas con función similar comparten una subunidad común con un papel crítico en la transducción. Así, la subunidad gp130 se comparte por los receptores de IL-6, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la oncostatina M y el factor neurotrófico ciliar (CNTF).

Son obviamente estos receptores de la superficie de las membranas el origen intracelular de la transducción de las señales que los ligandos extracelulares han iniciado. Hecho que se pone de manifiesto en la figura 8 que muestra la estructura terciaria del receptor de glutamato con 7 dominios transmembranarios y su interacción con una proteína G en la cara intracelular. El detalle transmembranario de un receptor de este tipo y sus regiones de interacción con las proteínas G aparecen en la figura 9.

Se trata exclusivamente (figura 9) de un tipo de receptor, y de una de las diversas posibilidades de con-



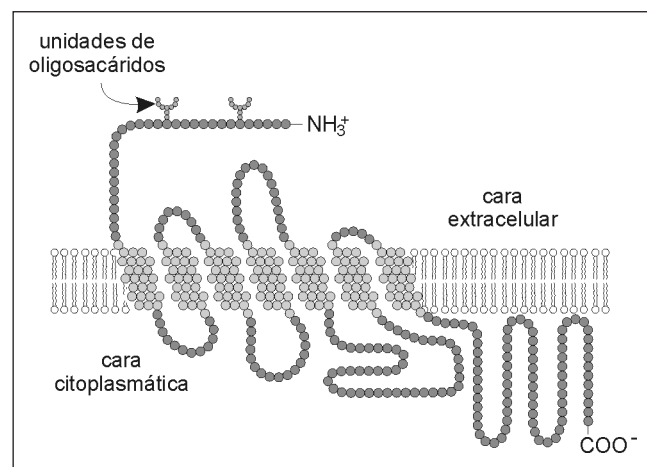
**Figura 8.** Estructura terciaria del receptor de glutamato y su interacción con las proteínas G.

tinuar la transducción de una señal hasta alcanzar el blanco que supone la expresión génica del núcleo de la célula. Los receptores con siete dominios transmembranares (7-TM) ofrecen un magnífico ejemplo de estructuras singulares y su relación con actividades biológicas características. Ha sido la estructura de la rodopsina fotorreceptora la primera que, mediante rayos X, se ha conocido a una resolución de 2.8Å; lo que ha facilitado la interpretación de la relación estructura-actividad, los datos de mutagénesis, interacciones intramoleculares, afinidad hacia ligandos y formación de complejos con proteínas G. Además, los receptores con siete dominios transmembranares constituyen la cuarta familia más larga en el genoma humano con más de 600 genes; dentro de ellos, la subdivisión de la rodopsina constituye la mayor de las tres de que se componen las estructuras de los receptores 7-TM. La rodopsina es única entre los receptores 7-TM a causa de que su ligando, 11-*cis*-retinal, se une covalentemente al grupo amino de la lisina-296 por formación de una base de Schiff. Por absorción de un fotón, la forma 11-*cis* pasa a 11-*trans* con lo que el ligando pasa

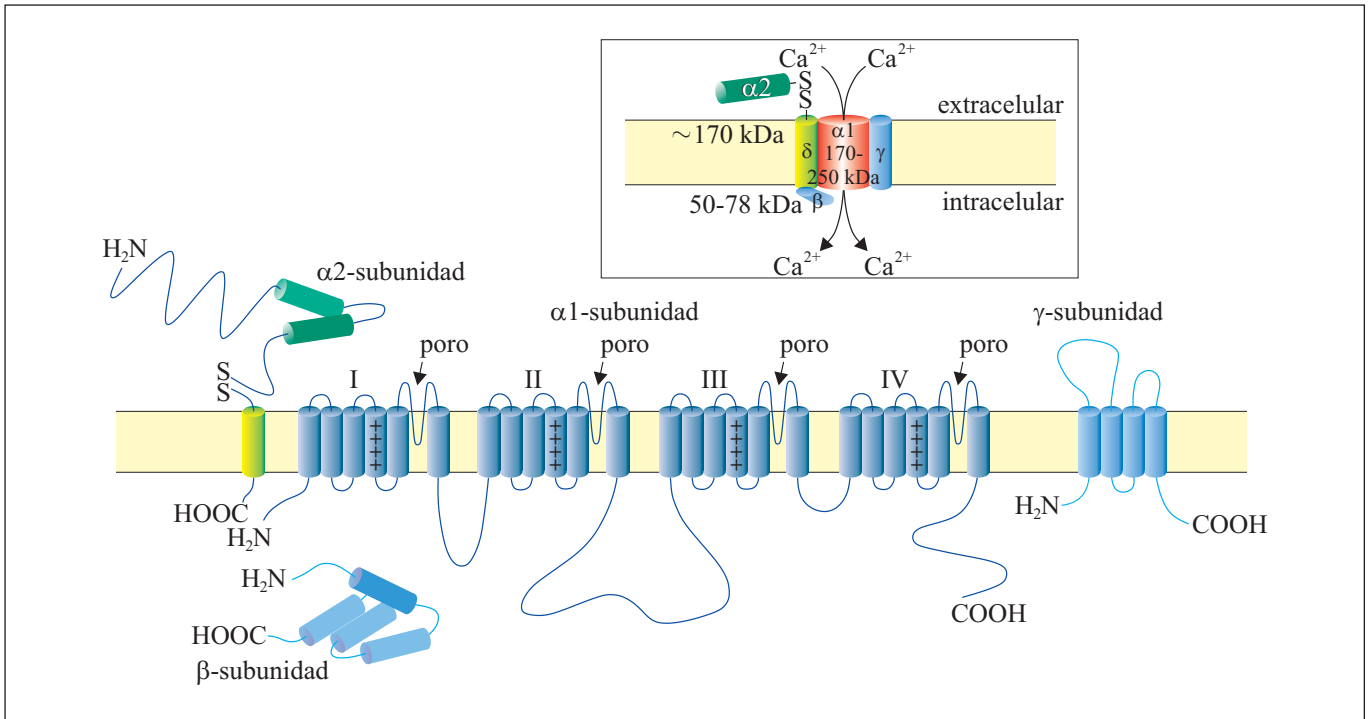
a ser un agonista. La importancia de los receptores 7-TM queda subrayada por el hecho de que constituyen los blancos de acción de alrededor del 40% de los medicamentos utilizados clínicamente por el hombre.

La topología de los anteriores receptores 7-TM guarda una cierta relación con las estructuras de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. El influjo de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales (figura 10) media una serie de respuestas citoplásmicas que incluyen la liberación de neurotransmisores, la activación de enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y la regulación de la excitabilidad neuronal. La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que penetra a través de estos canales viene modulada por una plétora de mensajeros intracelulares incluyendo las *proteína quinasa* y la subunidad  $\beta\gamma$  de las proteínas G. De otro lado, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  interactúan físicamente con las proteínas de la maquinaria de liberación de vesículas, que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , a la vez que regulan la actividad de estos canales. Datos experimentales recientes sugieren que la neurotransmisión y, por tanto, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales dependientes de voltaje, son dependientes de la interacción entre ambos sistemas, la actuación de segundos mensajeros y las proteínas liberadoras de vesículas presinápticas.

De otro lado, hay que señalar la abundancia tanto de las estructuras particulares de los receptores específicos, como de los procesos de continuación de la señal, que pueden reducirse a unas cuantas formas generales por lo que hace referencia a los mecanismos



**Figura 9.** Detalle de un receptor con siete dominios transmembranares y sus porciones extra e intracelulares.

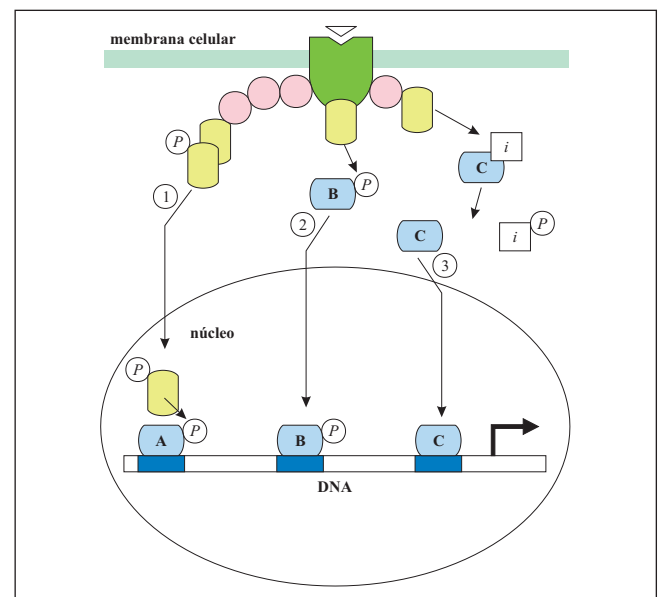


**Figura 10.** Topología transmembrana de los canales  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje y composición de las distintas subunidades.

de modificación de la expresión génica. En la figura 11 se pueden observar tres dispositivos citoplásmicos generales para finalizar en la modulación de la expresión génica: 1) por transferencia completa de un sistema fosforilante al núcleo celular, que, en su seno, lleve a cabo la fosforilación del factor de transcripción correspondiente; 2) por incorporación total al núcleo celular de un factor fosforilado que, en su conjunto, sea capaz de llevar a cabo la activación génica; y 3) por incorporación al núcleo celular de un factor modificador de la expresión.

En algunas ocasiones la plena función de los receptores necesita de la presencia de *moléculas coestimuladoras*. Uno de los ejemplos más característicos sucede con motivo de la activación de las células T cuando el complejo receptor del antígeno detecta la presencia del péptido presentado por la célula presentadora del antígeno (APC); en esta situación, los *receptores coestimuladores*, coexpresados en las células T, interactúan con proteínas ligadas a las células APC. Las proteínas coestimuladoras CD28 y B7 son las más efectivas en la activación de las células T. La actuación coordinada de ambos tipos independientes de receptores en las células T asegura la ocupación correcta del receptor como consecuencia de una presencia anti-

génica; y, en este caso, la producción eficiente del factor de crecimiento autocrino *interleuquina 2 (IL-2)* conducente a la generación de una población de células T efectoras. La ocupación del receptor de los



**Figura 11.** Mecanismos generales para llevar a cabo la transferencia citoplásmica de la señal desde el receptor al núcleo celular.

linfocitos T en ausencia de las señales coestimuladoras no se interpreta por las células como situación intrínsecamente peligrosa; tal ocupación no conduce al desarrollo de la autoinmunidad, sino a la pérdida de la respuesta al antígeno, conocida como anergia clonal. De aquí el interés de la identificación en las células T de moléculas con actividad coestimuladora.

La **adhesión celular** es un fenómeno crítico para la génesis y el mantenimiento tanto de las estructuras tridimensionales como del funcionamiento normal de los tejidos. Las entidades moleculares que median la adhesión celular son *complejos multiproteínas* que comprenden tres grandes clases de macromoléculas: los **receptores de adhesión** que incluyen las familias de *integrinas*, *caderinas*, *Ig-CAM* —inmunoglobulina-molécula de adhesión celular— y *selectinas*; las **moléculas de la matriz extracelular** y las **proteínas de la placa de adhesión**.

Las **integrinas** comprenden una gran familia de receptores de membrana presentes en muchas especies animales, desde las esponjas a los mamíferos. Constan de dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , y cada combinación  $\alpha\beta$  posee su propia especificidad de unión de ligandos y propiedades de señalización. La mayoría de las integrinas reconocen diversas proteínas de la matriz extracelular (proteínas ECM); y, a la inversa, una serie de proteínas individuales de la matriz, tales como fibronectina, lamininas, colágenos, y vitronectina, se unen a varias integrinas. Las integrinas pueden transmitir una señal en ambas direcciones de la membrana celular: la actividad de unión extracelular de las integrinas viene regulada desde el interior de la célula (señal dentro-fuera); mientras que la unión de ECM origina señales que son transmitidas hacia el interior (señal fuera-dentro). Y en dependencia parcial de estas señales de la matriz, las células proliferan o salen del ciclo celular y se diferencian.

Las **integrinas** son receptores heterodiméricos mediadores de la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. Las colas citoplásmicas de las integrinas son por lo general cortas y desprovistas de acciones enzimáticas; por lo tanto, las integrinas transducen las señales por asociación con proteínas adaptadoras que establecen conexiones con el citoesqueleto y las *quinasas* citoplásmicas. De todo ello resulta que las proteínas ECM, las integrinas y las proteínas del cito-

esqueleto componen una red de agregados a ambos lados de la membrana. Las integrinas no solamente unen ligandos adhesivos sino que actúan como receptores de señales; ambas funciones son las que permiten a la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  mediar la agregación plaquetaria. La subunidad  $\beta\text{3}$  contiene dos residuos citoplásmicos de tirosina que se fosforilan durante la agregación plaquetaria. Estas tirosinas forman parte de un motivo común a varias subunidades de  $\beta$ -integrina —conocido como motivo ICY de tirosina citoplásmica— y consta de dos tirosinas separadas por 11-19 residuos. Los dominios citoplásmicos de las integrinas se asocian con múltiples complejos de proteínas intracelulares para dar lugar a redes de proteínas. Estas redes que forman las proteínas citoesqueléticas y señalizadoras sirven de estabilizantes de la adhesión celular, inducen las alteraciones en el movimiento y forma celulares y transducen las señales que regulan la proliferación y la diferenciación de las células. El estudio detallado de la composición de estas redes resulta necesario para la comprensión de los fenómenos inducidos por integrinas. Uno de estos complejos implica la participación de las *quinasas* de adhesión focal (FAK). En esta proteína se localizan los sitios de adhesión focal, exhibe actividad enzimática de *proteína(tirosina) quinasa* y funciona como proteína multiligante, capaz de ligar diversas proteínas citoesqueléticas y señalizantes —integrinas, talina, paxilina, *Src* *quinasas*, *fosfatidilinositol 3'-quinasa* y *Grb2*—.

## LA TRANSFERENCIA CITOPLÁSMICA

Una vez que la señal del ligando ha sido captada por el *receptor específico* correspondiente, y teniendo en cuenta la existencia de los sistemas generales antes apuntados para el envío de la señal al núcleo celular, existen algunos mecanismos singulares de tipo más o menos general, que pueden reducirse a: la *actividad catalítica de los receptores*, *proteínas G*, sistema de *nucleótidos cíclicos* y *quinasas*, sistema de *fosfolipasas* e *inositolfosfatos*, y la participación de *proteínas singulares*, por lo general propias de procesos específicos. A todo lo que hay que añadir el conjunto de los *segundos mensajeros* como elementos integradores del gran proceso de la transferencia citoplásmica de la señal.

En efecto, tras la estimulación de los receptores, se origina en muchos casos la activación de proteínas

efectoras —canales de iones o enzimas— que movilizan **segundos mensajeros químicos** que inician acciones características en el seno de las células (figuras 5 y 6). Así, la activación de la *fosfolipasa C-β* —a través del acoplamiento del receptor con proteínas G— y de la *fosfolipasa C-γ* —mediada por *tirosina quinasa*— producen segundos mensajeros intracelulares, a saber *inositol 1,4,5-trifosfato* (IP<sub>3</sub>) y *diacilglicerol* (DAGs). El IP<sub>3</sub> moviliza los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, mientras que los DAGs son activadores fisiológicos de la *proteína quinasa C*. En muchas células, IP<sub>3</sub> media los efectos de los receptores ligados a la hidrólisis de los fosfoinosítidos en la movilización del Ca<sup>2+</sup> intracelular. Algunas características estructurales de los receptores de IP<sub>3</sub> —cierta homología en la estructura primaria y algunos componentes de la estructura terciaria— son compartidas con los canales homotetraméricos responsables de la movilización de Ca<sup>2+</sup> en el retículo endoplásmico. El creciente número de *inositol fosfatos* ha promovido el estudio de su asignación a variadas funciones celulares. Así, la función de IP<sub>4</sub> se ha relacionado con la regulación celular de los flujos de Ca<sup>2+</sup>; IP<sub>5</sub> regula la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina aviar; mientras que ambos, IP<sub>5</sub> e IP<sub>6</sub>, se han descrito como neurotransmisores. Otros *inositol fosfatos* muy singulares participan de actividades especiales: los pirofosfatos, IP<sub>3</sub>P e IP<sub>6</sub>P, se han descrito en *Dictyostelium discoideum* y algunas estirpes celulares, participando en transformaciones metabólicas singulares.

De otro lado, la *adenilato ciclasa* y la *guanilato ciclasa* pertenecen a las enzimas efectoras activadas a través del acoplamiento de los receptores con ligandos extracelulares; estas actividades enzimáticas dan lugar a la formación de **mensajeros intracelulares**, AMP cíclico (cAMP) y GMP cíclico (cGMP), que regulan funciones bioquímicas características en los tejidos blanco. Esta regulación por nucleótidos cíclicos constituye uno de los principios básicos de la acción hormonal, establecida hace varias décadas.

Así, la actividad de la *fosfolipasa C* sobre los fosfolípidos, fosfatidilinositol y fosfatidilcolina, contribuye a la formación de DAGs, mientras que la hidrólisis por *fosfolipasa A* produce ácidos grasos libres insaturados y lisofosfolípidos. La *fosfolipasa D* origina ácido fosfatídico que rinde posteriormente DAGs por la acción de la *fosfatídico fosfohidrolasa*. Todos estos metabo-

litos lipídicos se producen en respuesta a reacciones particulares de degradación de los fosfolípidos de membrana, inducidas por algún tipo de señal, y juegan un papel fundamental en la activación de la *proteína quinasa C* con sus múltiples acciones en el interior de la célula. La concurrencia de las *fosfolipasas D* y *A<sub>2</sub>* sobre los fosfolípidos origina monoacilglicerol 3-fosfato (ácido lisofosfatídico) que puede actuar como mensajero intracelular, posiblemente a través de un receptor acoplado a una proteína G, en el gobierno de la motilidad y el crecimiento celular. Además, el segundo mensajero cAMP ejerce casi todos sus efectos a través de una *proteína quinasa* dependiente de cAMP (PKA); mientras que el cGMP activa una *proteína quinasa* (PKG) localizada predominantemente en la musculatura lisa y el cerebelo.

Además de las interacciones descritas del Ca<sup>2+</sup> con otros mensajeros, los iones Ca<sup>2+</sup> se unen a la calmodulina con lo que se producen cambios conformacionales en la estructura proteica que conducen a la activación de muchas enzimas, entre otras un cierto número de *proteína quinasas*. Las *proteína quinasas* dependientes de calmodulina (CaM) pueden ejercer acciones específicas, por ejemplo sobre la cadena ligera de miosina, la *fosforilasa quinasa* y el factor de elongación 2, que, respectivamente, regulan la contracción muscular, la glucogenolisis y la síntesis de proteínas. Asimismo, las interacciones entre los segundos mensajeros, cAMP y Ca<sup>2+</sup>, regulan la glucogenolisis del músculo esquelético en mamíferos y la contractilidad del músculo cardíaco.

Las **proteínas G heterotriméricas** pertenecen a una familia de proteínas homólogas ligantes de nucleótidos de guanina, y suponen el engarce citoplásmico de buen número de receptores estimulados por hormonas, neurotransmisores, quimioatrayentes, odorantes, y otros ligandos. Estas proteínas triméricas (αβγ) se unen a nucleótidos de guanina por medio de la subunidad α poseedora de un sitio de alta afinidad para ambos GDP y GTP, lo hidrolizan, y participan en la regulación de procesos celulares como transcripción, tráfico de proteínas, proliferación y diferenciación celular. Efectivamente, los receptores, una vez excitados, catalizan la sustitución de GDP por GTP en la subunidad α, y, simultáneamente, la disociación del heterotrímero (αβγ) da lugar a Gα-GTP y Gβγ libres que regulan la actividad de otras proteínas efectoras,

las que, a su vez, forman parte de otros sistemas de transducción de la señal con funciones efectoras específicas; por ejemplo, la actuación sucesiva de *proteína(tirosina)quinasas* y diversas isoformas de *fosfolipasa C*, PLC- $\gamma$  y PLC- $\beta$ , conducen a la formación de los mediadores diacilgliceroles e inositolfosfatos, en la actuación de los antígenos sobre los linfocitos T y B.

Como ha quedado señalado, la subunidad  $\alpha$  del heterotrímero — $\alpha$ (39-46 kDa),  $\beta$ (37 kDa) y  $\gamma$ (8 kDa)— posee una unión de elevada afinidad para GDP o GTP; y la forma  $\alpha$  unida al GDP ( $G\alpha$ -GDP) se une fuertemente a la  $\beta\gamma$  rindiendo la forma inactiva ( $\alpha_{GDP}\beta\gamma$ ) que es la estimulada por el receptor activado para realizar el intercambio de GDP por GTP. Y es en la forma activa de  $\alpha_{GTP}$  bajo la que se disocia de  $\beta\gamma$  —complejo fuertemente asociado que funciona como una unidad—, y ambos — $\alpha_{GTP}$  y  $\beta\gamma$ — interaccionan específicamente con las moléculas efectoras hasta desembocar en la adecuada respuesta celular. Precisamente, son las diferentes clases de subunidades  $\alpha$  —más de 20 formas diferentes— las que describen tradicionalmente las proteínas G heterotriméricas:  $G_s$

(la más distribuida, neuroepitelio olfatorio),  $G_i$  (cerebro, conos y bastones de la retina, plaquetas, papilas gustativas),  $G_q$  (linfocitos B y T, células mieloides, hígado, riñón, pulmón y  $G_{12}$  (de distribución general). Cada una de estas familias interacciona con efectores particulares; entre ellos, *adenilato quinasa*, *fosfolipasas C* ( $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ ), *fosfolipasa A<sub>2</sub>* y canales de iones. Frecuentemente, las subunidades  $\alpha$  dan cuenta de la actividad primaria de las proteínas G. Así,  $G_s\alpha$  estimula la *adenilato quinasa* y la  $G_i\alpha$  activa en la retina una fosfodiesterasa dependiente de cGMP. El complejo  $\beta\gamma$ , asociado enérgicamente bajo condiciones fisiológicas, puede actuar directamente con las moléculas efectoras. Sin embargo, mientras que todas las secuencias polipeptídicas descritas de la subunidad  $\beta$  son similares, se conocen diversas secuencias del cDNA de la subunidad  $\gamma$ ; y a causa de la aparente heterogeneidad de las subunidades  $\gamma$ , las diferencias funcionales de los complejos  $\beta\gamma$  se atribuyen a la especificidad de estas subunidades  $\gamma$ . Así, entre las subunidades  $\gamma$ , el subtipo  $\gamma_3$  se requiere para el acoplamiento del receptor de somatostatina a los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje; y el subtipo  $\gamma_4$  se requiere

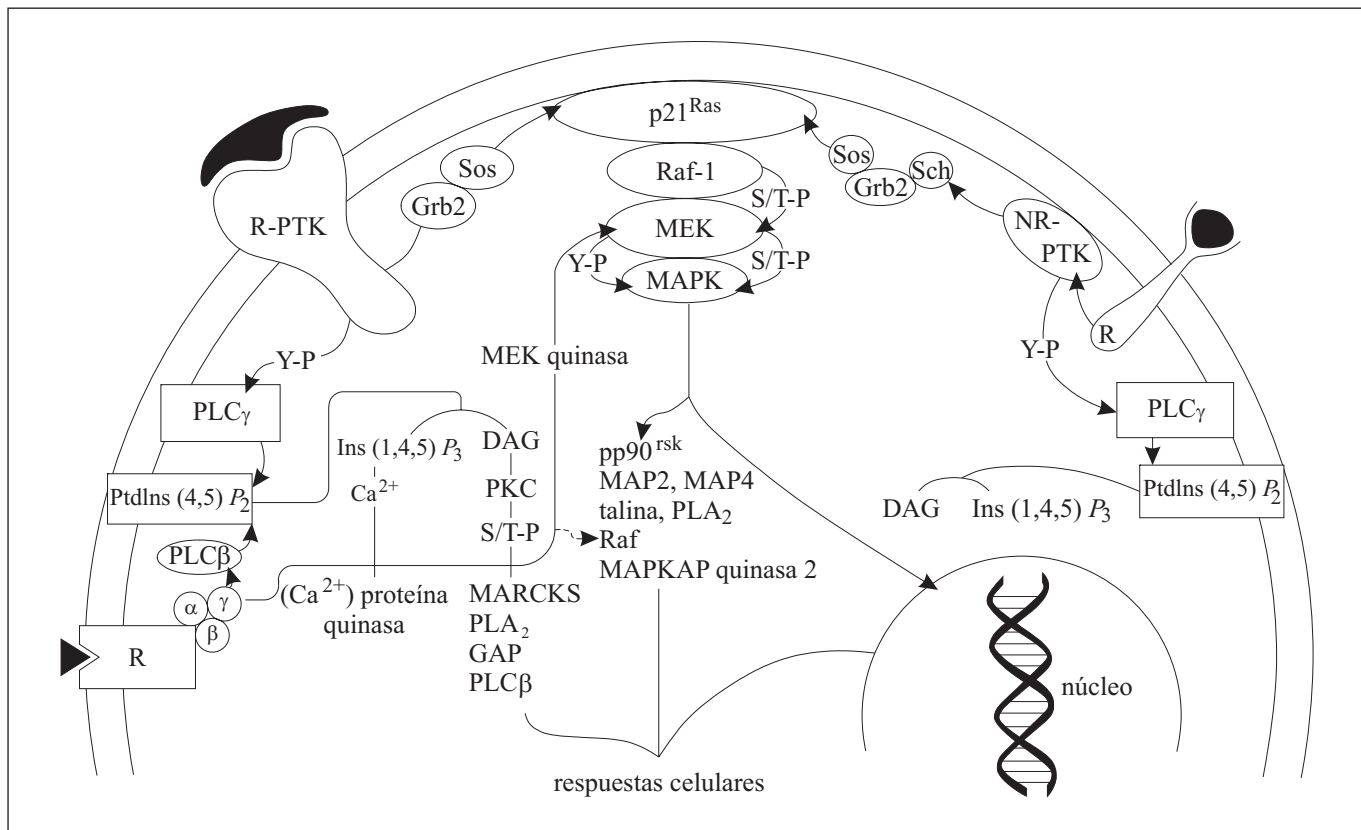
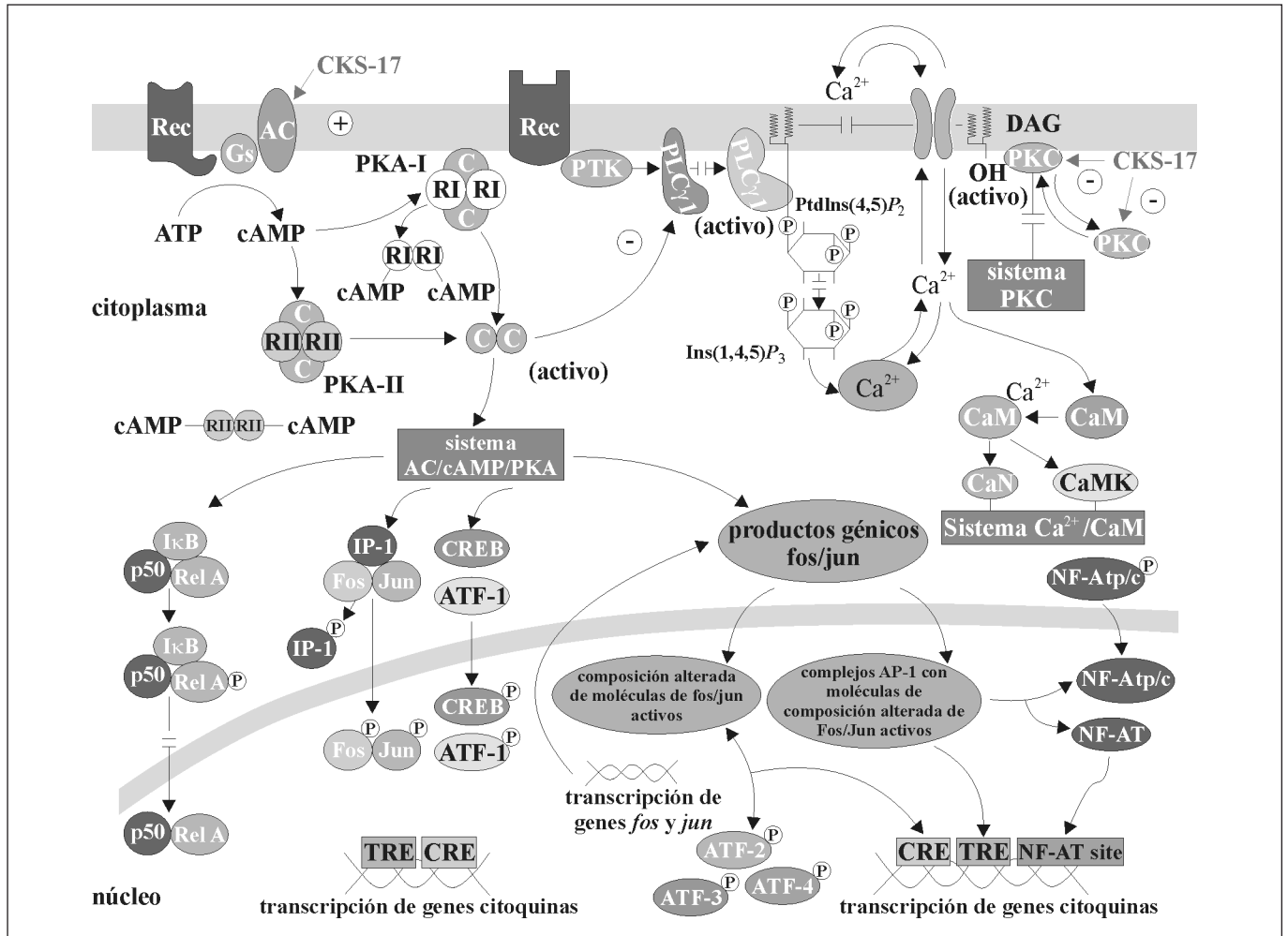


Figura 12. Ejemplos de las maneras de conexión de diferentes receptores de membrana con las respuestas celulares.



**Figura 13.** Detalles de las diferentes maneras de enganche de los receptores de membrana con las transcripciones de los genes.

para el acoplamiento a estos canales del receptor muscarínico. Asimismo, la subunidad βγ puede regular la función del receptor incrementando su capacidad de interactuar con la subunidad α, u originando la desensibilización del receptor por una *quinasa* específica. Las figuras 12 y 13 dan una idea general de la variedad de procesos para conectar los receptores de membrana con la regulación de la expresión génica en el núcleo de las células.

Sin embargo, recientemente se ha descrito un mecanismo de cambio conformacional del heterotrímero para justificar su actividad en la transducción de señales, en lugar de la disociación antes señalada.

La regulación de las proteínas G ha sido estudiada en los dos estados monoméricos interconvertibles de la familia relacionada con *ras*: unido a GTP (activo) y

unido a GDP (inactivo). El ciclo GTP/GDP de las proteínas tipo *ras* viene regulada: 1) por factores que promueven el intercambio, tales como los estimuladores de la disociación de GDP, volviendo la proteína G a su estado activado; y 2) por las proteínas RGS —*regulators of G protein signalling*— estimuladoras de la GTP-asa. Las proteínas RGS son una familia de diversas proteínas multifuncionales que comparten un dominio muy conservado de 120 aminoácidos (dominio RGS). Los dominios RGS ligan directamente las subunidades Gα activadas —Gα<sub>GTP</sub>— y actúan como activadoras de GTP-asa, con lo que atenúan o modulan la transmisión de la señal iniciada, por ejemplo, en el receptor hormonal o del neurotransmisor, a través de Gα<sub>GTP</sub> o βγ. Aparte de este dominio estructural RGS, compartido por todas las proteínas RGS conocidas, estas proteínas difieren ampliamente en su tamaño y en la gran variedad de otros dominios y

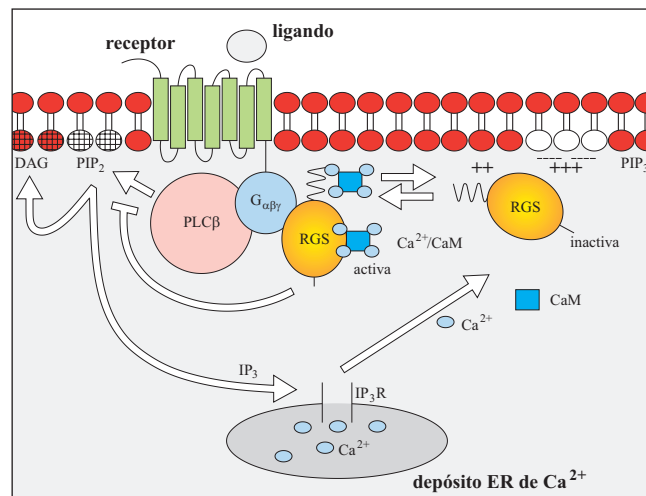
motivos estructurales. Las proteínas RGS contribuyen a los complejos de señalización mediante su unión a los receptores, a las proteínas efectoras del tipo de la PLC $\beta$ , o a otras proteínas multiligandos. En la figura 14 aparece un modelo de la participación de las proteínas RGS, y su retroregulación por calmodulina (CaM)/Ca<sup>2+</sup>; la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> origina DAG e IP<sub>3</sub> que se une a su receptor IP<sub>3</sub>R para estimular la liberación de Ca<sup>2+</sup> de sus depósitos intracelulares y contribuir a la activación de RGS.

Algunas de las proteínas RGS están implicadas en los fundamentos moleculares de diversas enfermedades humanas. Sirvan como ejemplo las siguientes: poliposis adenomatosa familiar y cánceres colorrectales (axina, conductina); enfermedad renal policística (RGS7); cáncer debido a la inactivación del supresor de tumores p53 (RGS16); y alteraciones del sistema nervioso central (RGS2).

Asimismo la capacidad de la subunidad  $\beta\gamma$  para interactuar con la subunidad  $\alpha$  en la proteína G de retina está modulada por la fosfoproteína fosducina. La fosducina inhibe *in vitro* la fosfodiesterasa de cGMP, por unión a la subunidad  $\beta\gamma$  e impedir la formación del heterotrímero. Las arrestinas se encuentran implicadas en la regulación de muchas cascadas de transducción de señales acopladas a proteínas G; y mutaciones en dos genes de arrestina —*arrestina 1* y *arrestina 2*— específicos de fotorreceptores de *Drosophila* han demostrado la participación de la familia de proteínas de la arrestina en la regulación de receptores acoplados a proteínas G.

La interleuquina 8, uno de los más potentes quimioatrayentes de neutrófilos, media la migración endotelial de neutrófilos inducida por citoquinas, induce la angiogénesis y desencadena una variedad de otros efectos asociados a la respuesta inflamatoria. Los receptores de IL-8 —designados como  $\alpha$  y  $\beta$ — se acoplan a proteínas G y activan la *fosfolipasa C* en neutrófilos. Hechos que sugieren que la IL-8 actúa a través de los procesos de transducción de señales limitados a proteínas G específicas y efectoras, a la vez que suministran blancos adecuados para el desarrollo de nuevos agentes antiinflamatorios.

Dadas las numerosas funciones fisiológicas de los receptores acoplados a proteínas G en los procesos de



**Figura 14.** Modelo de regulación de la señal de proteínas G por la acción reguladora de proteínas RGS.

neurotransmisión, señalización endocrina, visión y quimiotaxis, cabe esperar que las anomalías de sus receptores originen una variedad de disfunciones patológicas humanas. Y las mutaciones que distorsionan la estructura y función de los receptores hormonales se encuentran asociadas a los estados de hipo e hiperfunción de los receptores afectados. También, mutaciones en los lazos intracelulares (figura 9) de los receptores acoplados con proteínas G han mostrado una activación constitutiva de la *fosfolipasa C* mediada por proteínas G. De igual manera, los defectos moleculares responsables de una forma rara de hipertiroidismo y de la pubertad precoz familiar se han identificado con mutaciones en los receptores acoplados con proteínas G. Conocimiento de tales defectos, que constituyen el fundamento del desarrollo de las terapias correspondientes.

Finalmente, el neuropéptido humano *galanina*, con 30 residuos de aminoácidos, se sintetiza como prohormona de función desconocida. La *galanina* regula los canales de K<sup>+</sup>, *adenilato ciclasa* y *fosfolipasa C* actuando sobre los receptores acoplados a proteínas G. El fragmento N-terminal 1-16 actúa sinérgicamente con la morfina en el sistema somatosensorial y posee propiedades analgésicas; por lo tanto, sus antagonistas pueden ser potenciales agentes terapéuticos en neurología y endocrinología.

Las **proteína quinasas** y las **proteína fosfatasa**s, reguladas por los segundos mensajeros, participan en toda una variedad de respuestas a muchos estímulos



fisiológicos. En efecto, la fosforilación o la defosforilación enzimáticas de los residuos serina o treonina, y eventualmente tirosina, desencadenan cambios conformacionales en las proteínas sustratos conducentes a las respuestas fisiológicas evocadas por los receptores activados por los correspondientes ligandos. Así pues, la fosforilación y la defosforilación de proteínas constituyen mecanismos fundamentales de la integración de las señales en las células eucarióticas; y la diversidad de efectos producidos dependen de la variedad de agonistas, las acciones pleiotrópicas de *proteína quinasa* y *fosfatasas* y la presencia celular de proteínas particulares que sirven de sustratos.

La actividad de la *proteína quinasa C*, mantenida por los DAGs, es esencial para el mantenimiento de las respuestas celulares. Toda una colección de especies y subespecies de PKC han sido detectadas: cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), nPKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) y aPKC ( $\zeta$ ,  $\lambda$ ), poseen diferentes propiedades fisicoquímicas y reguladoras, y muestran una localización específica intracelular. Todos los miembros de la familia PKC son dependientes de fosfatidilserina y exhiben diferentes requerimientos de metabolitos de fosfolípidos y de  $\text{Ca}^{2+}$ . Todas las subespecies de cPKC poseen semejante tamaño molecular y se activan por los mismos efectores:  $\text{Ca}^{2+}$ , DAGs, ácidos grasos libres y lisoPC; sin embargo, responden de manera desigual a las combinaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y metabolitos de fosfolípidos en relación con la extensión y duración de la respuesta, sugiriendo así sus funciones singulares en la transmisión celular de las señales. A la vez, muestran una diferente expresión tisular; mientras la distribución de PKC $\alpha$  es universal, la de PKC $\gamma$  aparece restringida al cerebro.

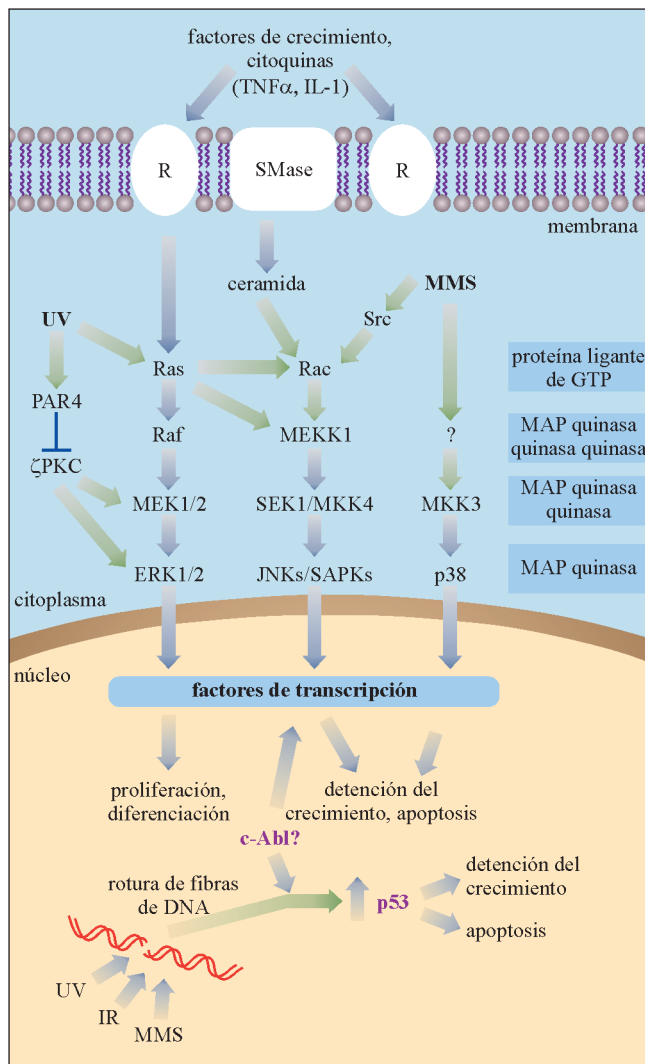
La *proteína quinasa C* participa en la regulación de importantes mecanismos fisiológicos. Así, la potenciación a largo plazo (LTP) se considera un mecanismo celular que contribuye a la formación de la memoria en mamíferos; de forma que los inhibidores de *proteína quinasa* bloquean la inducción y el mantenimiento de la LTP. En lo que se refiere a la identificación de la *proteína quinasa* particular implicada en este mecanismo, se ha identificado un sustrato peptídico específico, que se corresponde con el sitio de fosforilación de una proteína neural —neurogranina (28-43)—, sustrato selectivo endógeno para PKC. De igual manera, existen datos bioquímicos que muestran, en la fases de

inducción y mantenimiento de LTP, la activación y translocación de PKC; lo que significa la participación de las *proteína quinasa* en la elaboración molecular de los procesos cognitivos. Asimismo, la activación de *proteína quinasa C* reduce el péptido  $\beta$ A4, derivado de la proteína amiloide precursora en la enfermedad de Alzheimer, en una proporción de 50-80%; lo que ofrece la posibilidad, a través de la regulación de PKC, de influir sobre la producción del péptido  $\beta$ A4.

La *proteína quinasa C* participa en otros muchos procesos fisiopatológicos. Así, la PKC regula la unión, dependiente de GTP, a las membranas del Golgi de las dos proteínas, el factor de ADP-ribosilación y la  $\beta$ -COP, en las células leucémicas basofílicas de rata; lo que permite sugerir que el tráfico secretor puede ser modulado por los receptores de membrana y segundos mensajeros. Una PKC específica del ojo se ha identificado en *Drosophila*, cuya activación por  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y DAGs se requiere en los mecanismos de adaptación. Asimismo, entre las diversas interpretaciones moleculares de los mecanismos de anestesia se ha señalado la inhibición de la subunidad reguladora de PKC.

Entre estas funciones cabe también señalar que los canales de  $\text{Na}^{+}$  dependientes de voltaje, responsables del origen de los potenciales de acción en las neuronas de cerebro de mamíferos, están regulados por la fosforilación de ambas, *proteína quinasa C* y *proteína quinasa dependiente de cAMP*. Esta modulación convergente de los canales de  $\text{Na}^{+}$  requiere la fosforilación de la serina-1056 por PKC y la fosforilación adicional de algunos otros sitios por PKA.

La *proteína quinasa A* (*proteína quinasa dependiente de cAMP*), así como la *proteína quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina* (CaM quinasa), participan en numerosos procesos fisiopatológicos. Los canales de iones dependientes de glutamato participan en la mayoría de las transmisiones sinápticas excitatorias del sistema nervioso central y juegan un papel fundamental en la plasticidad sináptica, el desarrollo neuronal y algunas condiciones neuropatológicas. Esta función dependiente de glutamato puede modularse directamente por fosforilación; lo que sugiere la asociación del aprendizaje y la memoria con una regulación dinámica de los receptores excitatorios en el cerebro de mamíferos. La fosforilación del receptor de



**Figura 15.** Sistemas de actuación en cascada de *proteína quinasa* en la transducción de señales, iniciadas por diversos estímulos extracelulares.

glutamato por una *proteína quinasa* dependiente de cAMP ha sido sugerida como forma reguladora de ciertos mecanismos de plasticidad sináptica, tales como la potenciación y la depresión a largo plazo.

Otros muchos importantes sustratos de *quinasas* se han descrito; entre ellos, la *miotónica-proteína quinasa* y la *quinasa* del receptor  $\beta$ -adrenérgico. Las bases genéticas de la distrofia muscular miotónica incluye la expansión mutacional de una secuencia nucleotídica repetitiva  $(CTG)_n$  localizada en la porción 3' de mRNA no traducida de un gen conocido como *miotónica-proteína quinasa*. El producto del gen exhibe una extensa homología con los dominios catalíticos de *proteína quinasa*. Otras dos enfermedades

causadas por la expansión del triplete son el síndrome de Kennedy y el síndrome del cromosoma X frágil.

A pesar de la identificación de centenares de *proteína quinasa* diferentes, no ha sido fácil establecer con rigor las conexiones entre ellas. Muchos mitógenos extracelulares, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento nervioso inducen la autofosforilación de sus receptores respectivos, sobre los residuos de tirosina, por activación de dominios catalíticos intrínsecos de *quinasa*. En la figura 15 se resumen algunas de las cascadas de fosforilaciones sucesivas catalizadas por *quinasas*, que participan en los sistemas de transducción de señales provocadas por diversos estímulos extracelulares. Efectivamente, las *proteína quinasa* activadas por mitógenos (MAP) regulan toda una gran variedad de procesos celulares en respuesta a señales extracelulares. Las MAP *quinasas* se activan a través de una cascada en la que una MAP *quinasa quinasa quinasa* activa una MAP *quinasa quinasa*, que a su vez activa una MAP *quinasa* por fosforilación. Estos módulos de MAP *quinasas* se asocian frecuentemente a *proteínas multiligando* con funciones específicas muy diversas.

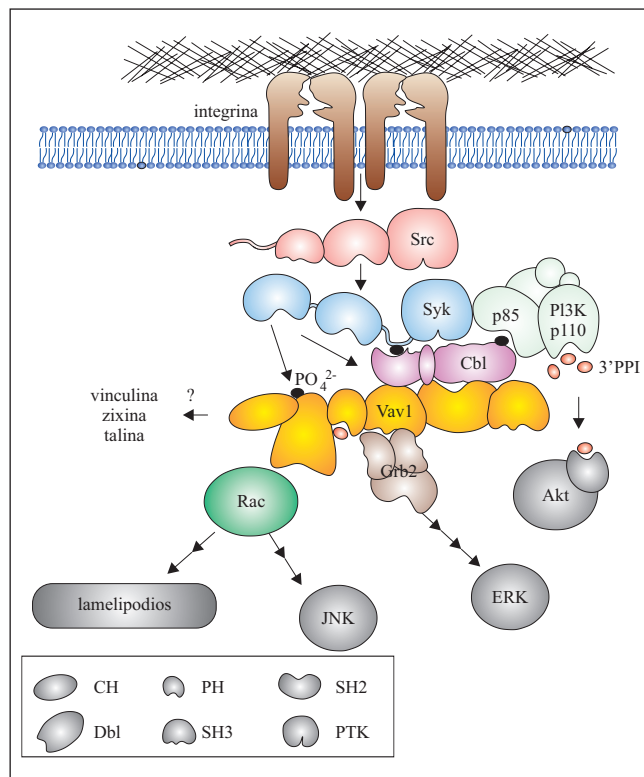
Dos *proteína quinasa* activadas por mitógenos (MAPKs) se expresan universalmente en los vertebrados: p44<sup>mapk</sup> y p42<sup>mapk</sup>. Una característica singular de esta familia de *proteína quinasa* es la exigencia de una fosforilación dual sobre residuos de tirosina y treonina para exhibir su máxima actividad. La activación de estas MAPKs juega un papel esencial en la transmisión de señales necesarias para el crecimiento y la diferenciación; particularmente, es esencial a la entrada en el ciclo celular de los fibroblastos en fase G<sub>0</sub>.

Toda una colección de *proteína quinasa* participan en cascadas específicas de las porciones citoplásmicas de la *transducción de señales*. La fosforilación de la subunidad ribosómica S6 constituye uno de los mecanismos de regulación conocidos desde más antiguo en el control de la proliferación celular. En los últimos años se han caracterizado dos *proteína quinasa* catalizadoras de la fosforilación de la subunidad S6: una de ellas, la p90 S6 *quinasa* ribosómica (p90 Rsk), activada por el sistema de MAP *quinasa*; la otra, referida como p70/p85 S6 *quinasa*, participa más acti-

vamente en los mecanismos de activación e inactivación. La *p70 S6 quinasa* (p70S6K) es activada en el transcurso de la transmisión de acción de la insulina y de algunos factores de crecimiento a través de una secuencia de múltiples fosforilaciones. Las isoformas de ambas *quinasas*, p70β y p70α, comparten los sitios de fosforilación y contienen los dominios catalíticos del tipo de la subclase AGC; un segmento de alrededor de 65 aminoácidos inmediato a la terminación carboxilo terminal, muy conservado en la mayoría de las AGC *quinasas*, entre otras PKBs, PKCs y SGKs. La secuencia de p70 flanqueada por los segmentos N-terminal (64-88 aminoácidos) y C-terminal (104 aminoácidos) son únicos a todas las *quinasas*; y cada uno de ambos segmentos posee importantes dominios reguladores.

Las *fosfoinosítido 3-quinasas* (PI 3-Ks) catalizan la fosforilación del 3-OH en el fosfatidilinositol(4,5)-bifosfato con la producción de 3'-fosfoinosítidos (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>). Las PI 3-Ks son activadas por una diversa serie de receptores que participan en la determinación del papel de las células T.

La *quinasa* de adhesión focal (FAK), señalada con anterioridad a propósito de las integrinas señaladoras, regula los procesos conducentes a la migración celular, el crecimiento y la supervivencia, a través de la activación de *quinasas* reguladas por señales extracelulares (ERKs) —de la familia de las MAP *quinasas*—, *fosfatidilinositol 3'-quinasa* y múltiples *GTPasas*. La activación de FAK y la organización de sus complejos se inhibe por citocalasina D, que impide la polimerización de la actina bajo la acción de la integrina. Sin embargo, estudios con la integrina αIIbβ3 de plaquetas y en un sistema modelo de células de ovario de hamster chino (CHO) han demostrado la existencia de procesos diferentes del regulado por integrina, a base de una *proteína (tirosina) quinasa* específica de células hematopoyéticas (Syk). La activación de Syk en respuesta a la unión de fibrinógeno a αIIbβ3 no se inhibe por citocalasina D y puede inducirse por la dimerización experimental de αIIbβ3, aun en ausencia de fibrinógeno. A diferencia de la activación de FAK, la activación de Syk requiere la actividad de una o más *quinasas* de la familia Src y la presencia de ambos extremos citoplásmicos, αIIb y β3. Un ingrediente importante de la red en las células hematopoyéticas — en las que se expresan αIIbβ3 y Syk— es el efector



**Figura 16.** Modelo de interacciones entre integrinas de membrana y algunos de los componentes de la red de proteínas citoplásmicas.

conocido como Vav1, específico de dichas células y factor de intercambio de nucleótidos de guanina, de la familia Rho. En la figura 16 se representa un esquema de las redes constituidas por integrinas señalantes de membrana y una colección de proteínas citoplásmicas.

Un nuevo tipo de *proteína quinasa* utiliza DNA como señal para actuar catalíticamente. La fosforilación activada por DNA se observó primeramente en lisados de reticulocitos de conejo, y con posterioridad, en extractos de cultivos de células humanas, y en oocitos, huevos y embriones de invertebrados marinos. La *proteína quinasa activada por DNA* es una *proteína (serina/treonina) quinasa* que se activa *in vitro* por fragmentos de DNA. Sus blancos celulares son proteínas nucleares reguladoras ligantes de DNA, tales como los factores de transcripción cJun, cFos, cMyc y Sp1; el antígeno tumoral SV40, el factor A de replicación, la proteína p53 supresora de tumores, las topoisomerasas I y II y el poliomavirus VP1; así como diversas proteínas no ligantes de DNA —la proteína 90 de choque térmico y la proteína tau asociada a los microtúbulos.

Otra familia de proteínas, conocida como la familia 14-3-3, extraordinariamente conservada, ha sido identificada como una serie de proteínas ácidas del cerebro, se encuentra muy distribuida en tejidos de mamíferos y en un amplio campo de organismos eucarióticos, que incluye plantas, insectos, anfibios y levaduras. Inicialmente, la primera función atribuida a las proteínas 14-3-3 fue la activación de *tirosina* y *triptófano hidroxilasas*, las enzimas limitantes de velocidad implicadas en la biosíntesis de los neurotransmisores catecolamina y serotonina, respectivamente. *PKC*, *proteína quinasa dependiente de cAMP* y las *proteínas 14-3-3* fosforilan un sitio idéntico de la *tirosina hidroxilasa*; la *proteína quinasa II dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina* fosforila un único sitio adicional. Las proteínas ácidas de 29-33 kDa de cerebro ovino son inhibidores potentes de *PKC* (KCIP-1); y miembros de esta familia de proteínas pueden regular la subclase de isoformas de *PKC* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) que son dependientes de  $Ca^{2+}$  y traslocan la membrana plasmática como parte de sus mecanismos de activación.

Ya ha sido mencionado, por otro lado, que muchos receptores de ligandos extracelulares poseen actividad de *tirosina quinasa* que catalizan la autofosforilación y la fosforilación de un cierto número de proteínas citoplásmicas. Aunque la primera *tirosina quinasa* fue descubierta como componente del virus del sarcoma de Rous, las formas celulares normales de estas enzimas se presentan como receptores transmembrana o como proteínas citoplásmicas no receptoras asociadas a la superficie interna de las membranas plasmáticas. La transmisión subsiguiente a la señal inducida por el ligando depende del reconocimiento de los residuos de *tirosina* fosforilados por dominios de unos 100 aminoácidos, los conocidos como SH2 (*src* homology-2). Estos dominios complementan la acción de la actividad catalítica de la *quinasa* comunicando los estados de fosforilación de las proteínas transductoras de señales a otros elementos del proceso de señalización. Las estructuras tridimensionales de los complejos de los dominios SH2 de los productos de los oncogenes *v-src*, con dos péptidos que poseen fosfotirosina, se han determinado mediante cristalografía de rayos X. Una estructura  $\beta$  antiparalela central está flanqueada por dos  $\alpha$ -hélices, con un sitio de unión del péptido del que forman parte simultáneamente la hoja  $\beta$  y una de las  $\alpha$ -hélices.

Las *tirosina quinasas* son importantes también en los procesos de transmisión de señales que regulan la expresión ordenada de los marcadores de la superficie celular frente a las señales de activación específica de las células B. La *tirosina quinasa* citoplásmica es crucial para el desarrollo de las células B y la pérdida de su actividad aparece relacionada con estados de inmunodeficiencia humana, principalmente la  $\alpha$ - $\gamma$ -globulinemia ligada al cromosoma X caracterizada por un fallo en la producción de células B. En la inmunodeficiencia murina XID, las células B, aunque presentes, responden anormalmente; la interferencia con el normal funcionamiento de la señalización de las células B viene determinada por una mutación en la región amino terminal de la *tirosina quinasa*.

Las *quinasas Janus* (JAKs) interaccionan con diversos receptores de citoquinas y fosforilan a otra serie de transductores y activadores de la transcripción (STATs). El sistema JAK-STAT es un componente integral de la transducción de señales iniciada por muchas citoquinas. El prototipo de esta familia se denota como CIS o CIS1 (cytokine-inducible Src homology 2 —proteína que contiene el dominio (SH2)—). CIS se puso de manifiesto inicialmente asociado con el receptor de eritropoyetina y la cadena  $\beta$  del receptor de IL-3; y con posterioridad asociado con la cadena  $\beta$  común,  $\beta_c$ , de los receptores de IL-3, IL-5 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y la cadena  $\beta$  del receptor de IL-2. La expresión del gen CIS1 viene regulado por las proteínas STAT5 que, a su vez, resultan activadas por IL-2, IL-3 y eritropoyetina. Recientemente, se ha clonado una proteína inducible por citoquinas que inhibe las acciones de la IL-6 y el factor inhibidor de la leucemia. Esta nueva proteína se ha denotado como SOCS-1 (supresor of cytokine signaling-1), JAB (JAK-binding protein) o SSI-1 (STAT-induced STAT-inhibitor-1); y relacionadas con ellas las proteínas SOCS-2 y SOCS-3 que, al igual que CIS1, contienen dominios SH2.

## BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA APOPTOSIS

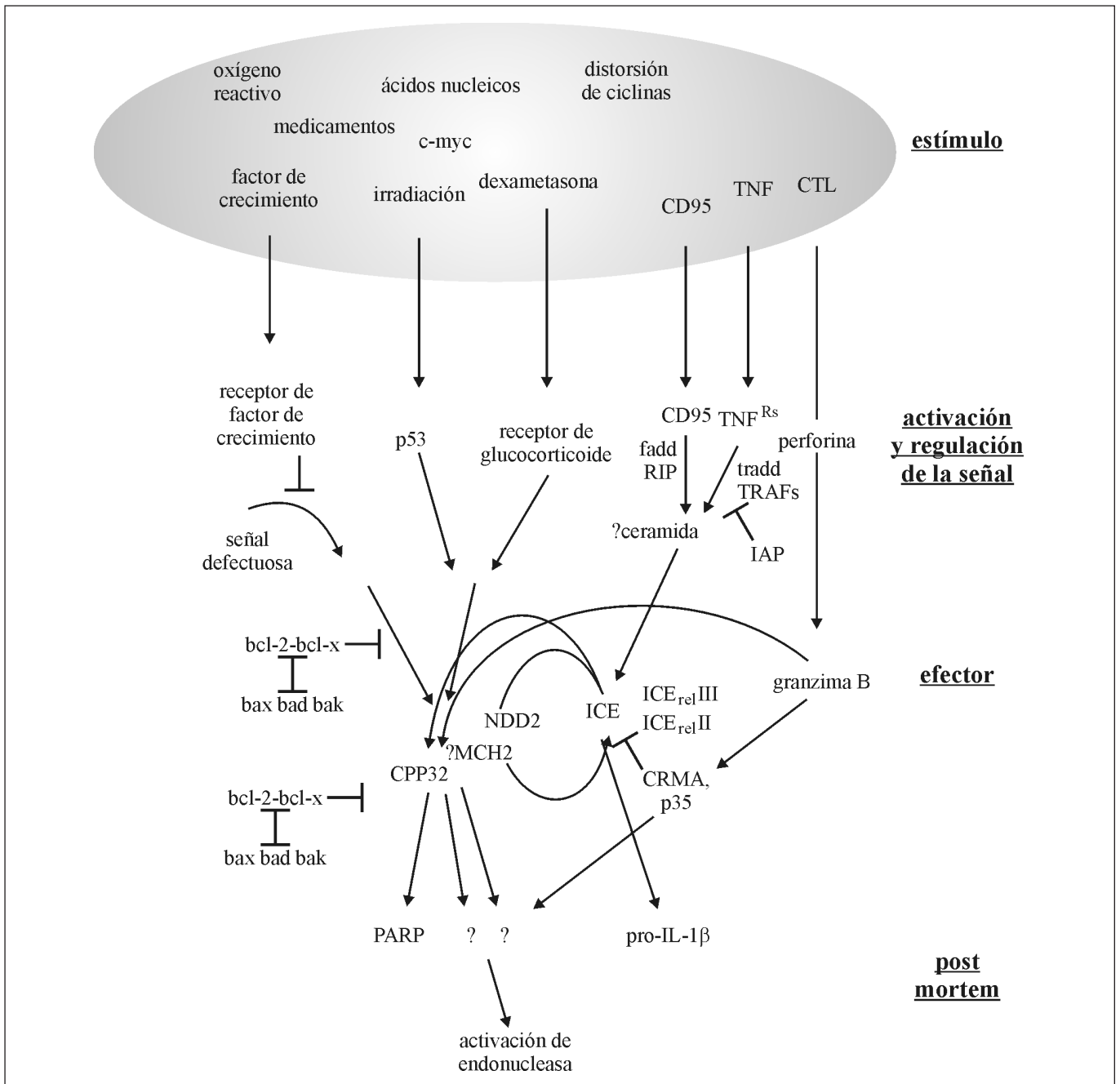
La **apoptosis**, o *muerte celular programada*, es una parte esencial de la vida de todos los organismos multicelulares, que ha sido muy conservada evolutiva-

mente con arreglo a un mecanismo muy especializado. Con este nombre se designa la eliminación de las células perjudiciales o superfluas de una forma altamente regulada. De esta manera, las células mueren por apoptosis durante la morfogénesis o la sinaptogénesis en el desarrollo embrionario; y en el animal adulto, durante el metabolismo tisular o al final de una respuesta inmunitaria. Todos los organismos multicelulares tienen mecanismos codificados en su propio genoma para programar la muerte fisiológica de sus propias células no deseadas, en virtud de situaciones tales como: *desarrollo y homeostasis, defensa y envejecimiento*. Así, durante el *desarrollo*, la **apoptosis** se utiliza para modelar o eliminar por completo ciertos tejidos, así como para seleccionar los linfocitos B y T inmunológicamente competentes. Y, en ulteriores etapas de desarrollo y durante la edad adulta la **apoptosis** es un mecanismo clave para asegurar la homeostasis celular a través de la eliminación activa de las poblaciones celulares potencialmente perjudiciales; la participación de este fenómeno es, pues, fundamental en la eliminación de células no deseadas tales como las infectadas por virus o las que poseen mutaciones genómicas potencialmente nocivas. No sorprende, por tanto, que cualquiera de las posibles disfunciones de este proceso tan fundamental sea motivo de estados patológicos muy variados, que van desde las enfermedades autoinmunes y de inmunodeficiencia al conjunto de alteraciones neurodegenerativas y al cáncer; así, la **apoptosis** no programada de ciertas neuronas cerebrales contribuye a alteraciones como las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y ALS, mientras que el fallo de las células en división a iniciar la apoptosis tras un daño severo del DNA contribuye a la enfermedad cancerosa. Además de las mencionadas, otras enfermedades —SIDA, trombosis, enfermedad de Huntington, traumatismos cerebrales y lesiones medulares— aparecen ligadas e un exceso de apoptosis; mientras que se vinculan a apoptosis inadecuadas los cánceres, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus y la artritis reumatoide.

Todo lo cual sugiere, además, que el proceso apoptótico constituye un blanco complejo para el diseño de nuevos medicamentos; y de aquí que las compañías farmacéuticas y biotecnológicas estén explotando activamente el rápido crecimiento de la maquinaria molecular sobre la que se fundamenta la muerte celular programada.

En los metazoos, esta muerte celular fisiológica o **apoptosis** se desencadena mediante estímulos intra o extracelulares que, una vez iniciado, tiene lugar a través de una serie de etapas transductoras de la señal, que culminan en la activación de la activación de un tipo singular de enzimas pertenecientes a la familia de proteasas conocida como *caspasas* —*cisteína proteasas* que hidrolizan ciertas proteínas en posiciones adyacentes a residuos específicos de ácido aspártico—. Actividad proteolítica que actúa sobre diversos sustratos, tales como las enzimas reparadoras del DNA y la proteína Mdm2 —*Murine double minute 2*— que regula la estabilidad de la proteína p53, con lo que ocurre una etapa final de desintegración celular que incluye la escisión de la cromatina, la rotura de orgánulos celulares y la fragmentación del material celular en vesículas rápidamente engullidas por las células vecinas. Proceso que, obviamente, tiene que llevarse a cabo bajo estrictas medidas de control y que, de acuerdo con estas ideas, puede considerarse dividido en cuatro fases características (figura 17): el *estímulo* que provoca la respuesta apoptótica; la *detección y transducción de la señal*; la *fase efectora* que incluye la *activación de proteasas* y los *reguladores positivos y negativos*; la *fase postmortem* en la que la cromatina celular se condensa y tiene lugar la degradación del DNA. De acuerdo con las observaciones recientes, las *caspasas* y las moléculas reguladoras de la apoptosis ejercen importantes funciones además de las exclusivas de la muerte celular, tales como el control de la proliferación de las células T y la progresión del ciclo celular.

El nemátodo *Caenorhabditis elegans* constituye un excelente sistema modelo en el que pueden observarse durante su desarrollo los anteriores estadios de muerte fisiológica. Los mutantes en los que se observa una muerte celular anormal constituyen un estudio valioso de los genes *ced* —*cell death abnormal*—. Asimismo, la proteína p35 de los *baculovirus* impide la apoptosis con gran eficacia debido a su amplio espectro de inhibición de *caspasas*. Tres productos génicos del *C.elegans* son esenciales para la apoptosis: CED-3 y CED-4 son promotores de la apoptosis, mientras que el CED-9 es un inhibidor. CED-3 es una *caspasa*, existente como zimógeno que se autoactiva hidrolíticamente. CED-4 se une a CED-3 y promueve la activación de CED-3, mientras que CED-9 se une a CED-4 e impide la activación de CED-3. Normalmente,



**Figura 17.** Modelo de apoptosis en células de mamíferos desencadenado por estímulos internos o externos. El proceso puede dividirse en cuatro fases principales iniciadas por estímulos diversos.

CED-9 forma un complejo con CED-4 y CED-3, que mantiene inactivo a CED-3. El estímulo apoptótico ocasiona la disociación de CED-9 con lo que se promociona la activación de CED-3 y, por consiguiente, dispone a la célula a morir por apoptosis.

En *C.elegans*, la capacidad del gen *ced-3* para originar la muerte celular puede bloquearse por el

homólogo *bcl-2*, el *ced-9*, o por el humano *bcl-2* mismo. La mayoría de los genes *ced* —*ced-1*, -2, -5, -6, -7, -8, -10— se requieren para la disposición eficaz de los ingredientes de la muerte celular.

En los vertebrados ha evolucionado una familia completa de genes análoga a los promotores de la muerte celular en *C.elegans*. En los mamíferos se han

identificado varias *cisteína proteasas* homólogas de CED-3; entre otras proteasas, la ICE o *caspasa-1* — enzima convertidora de interleuquina  $1\beta$ —, Nedd2, CPP32, ICE<sub>rel II</sub>/TX/Ich-2, ICE<sub>rel III</sub>, mch2, que comparten de distinta manera su analogía con la CED-3 del nemátodo, y cuya sobreexpresión es causa de apoptosis y, al contrario, la muerte celular puede inhibirse por interferencia con la actividad proteásica. En el sistema de mamíferos, la *caspasa-8* comparte homología con la proteína CED-3 de *C.elegans*. La *caspasa-8* es una caspasa iniciadora que activa las caspasas efectoras, incluyendo la *caspasa-6*, la *caspasa-3* y la *caspasa-7* a través de hidrólisis selectivas. La *caspasa-8* contiene un *dominio de muerte* que es capaz de interaccionar con los dominios análogos de las moléculas adaptadoras que la ligan con las señales específicas intra y extracelulares. Todas las *cisteína proteasas* hidrolizan sus sustratos tras los residuos de ácido aspártico, aunque su afinidad hacia el sustrato dependa de otros residuos. La estructura cristalina de las *caspasas* indica que la enzima activa es un heterotetramero formado por dos heterodímeros derivados de dos moléculas precursoras.

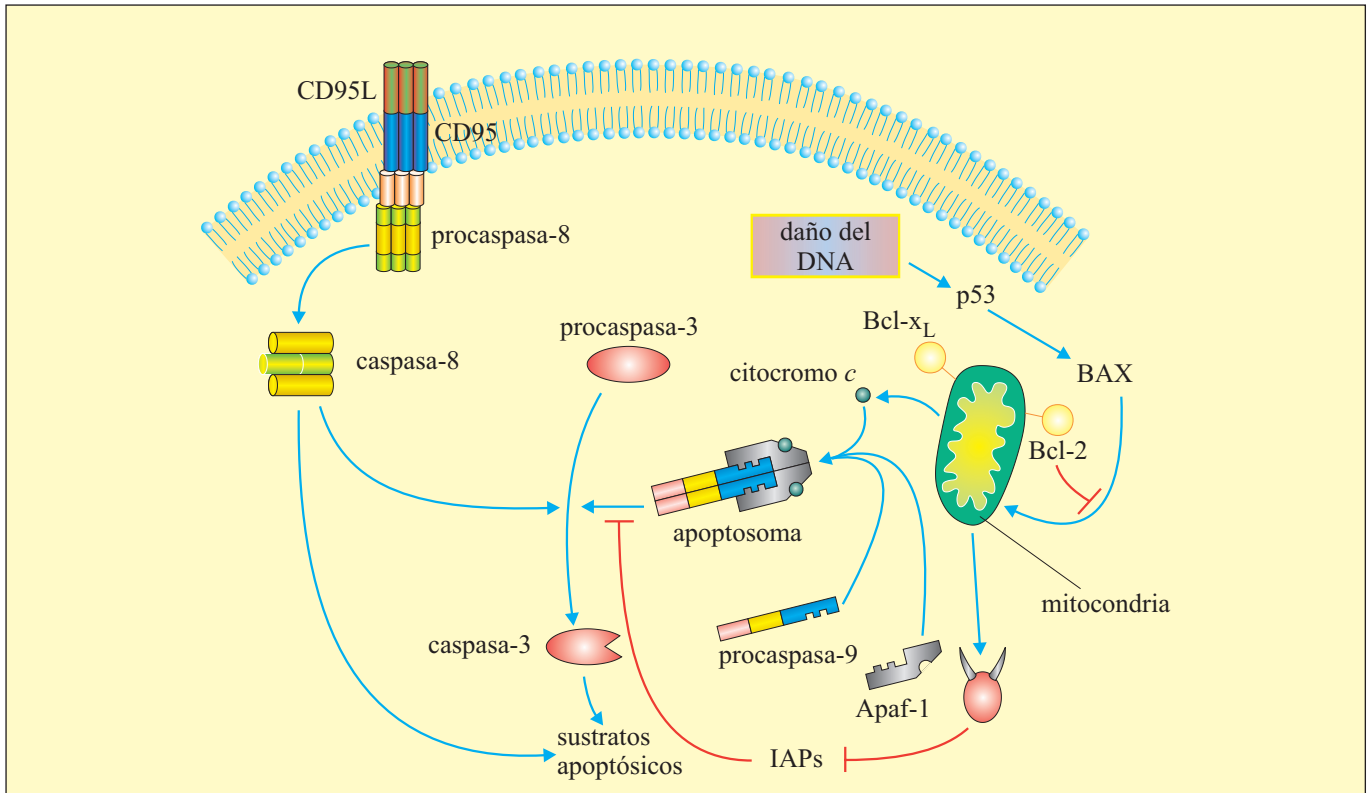
La activación proteolítica de la cascada de las *caspasas* ha emergido recientemente como la etapa central de la apoptosis. Hasta la fecha han sido identificadas 14 *caspasas* de mamíferos que toman parte en diferentes aspectos de la muerte celular, aunque permanezca desconocida aún la precisa función de cada una de las caspasas individuales. Las *caspasas* hidrolizan precursores para producir citoquinas maduras — *caspasas-1* y *-11*— con lo que se inicia la propagación de las señales apoptóticas —*caspasas-8* y *-9*— y ejecuta el programa apoptótico a través de la escisión de varias proteínas fundamentales —*caspasas-3*, *-6* y *-7*—. Y aunque los procesos de proliferación celular y muerte celular son, en efecto, contradictorios entre sí, ambos procesos están mutuamente ligados. El mantenimiento de la estabilidad genómica es esencial para la supervivencia de los organismos; y a favor de esta estabilidad existen puntos especiales para interrumpir la progresión del ciclo celular cuando se detecte algún daño del genoma. En los organismos multicelulares, otro punto singular prevé la inducción de apoptosis para eliminar las células que con algún daño irreparable en el DNA fueran deletéreas. De manera que la apoptosis, frecuentemente considerada como una catástrofe mitótica, se contempla en la actualidad más

bien como esencial para el control de la progresión del ciclo celular.

En la actualidad se admite que los diversos estímulos apoptóticos convergen en un esquema apoptótico común consistente en *moléculas receptoras*, *moléculas efectoras* —*caspasas*—, *moléculas adaptadoras* —Apaf-1— y *moléculas reguladoras* —miembros pro y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2, inhibidores de apoptosis (IAPs) y Smac/DIABLO—. Consistente con su papel en el bloqueo de la muerte celular, Bcl-2 fue identificado inicialmente por análisis de las traslocaciones cromosómicas en los linfomas foliculares y difusos. La familia de proteínas Bcl-2 incluye las proteínas Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w y Mcl-1 que comparten múltiples dominios, en particular los BH1, BH2, BH3 y BH4 y un anclaje hidrofóbico a la membrana. Los miembros de la familia Bcl-2 se localizan en la membrana externa mitocondrial y su función se debe, al menos parcialmente, al bloqueo de la liberación de citocromo c de las mitocondrias.

En la figura 18 se reúnen esquemáticamente estos tipos de moléculas. Los *receptores* mejor caracterizados de la iniciación de este fenómeno pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), que se definen por la presencia común de dominios extracelulares ricos en cisteína: son los CD95 (también conocidos como Fas o Apo1) y TNFR1 (también conocidos como p55 o CD120a). Estos receptores contienen secuencias homólogas citoplásmicas, conocidas como *dominios de muerte*; estos dominios (DD) facilitan el ensamblamiento del receptor con la maquinaria apoptótica de la célula (figura 18). El ligando CD95L se une a CD95; TNF y linfotóxina  $\alpha$  se unen a TNFR1; el ligando Apo3 se une a DR3; y el ligando de Apo2, Apo2L (también conocido como TRAIL) se une a DR4 y DR5.

Los *inhibidores* de apoptosis (IAP) suprimen la muerte celular por inhibición de la actividad de las *caspasas*, que se lleva a cabo por medio de los dominios BIR ligantes de Zn (*baculoviral IAP repeat*), presentes de uno a tres en todos los miembros de la familia de IAP. La proteína mitocondrial Smac/DIABLO promueve la apoptosis antagonizando el efecto inhibitorio de los IAPs a través de interacciones proteína-proteína. Las secuencias NH<sub>2</sub>-terminal en Smac/DIABLO son exigencias estructurales para la



**Figura 18.** Esquema general del mecanismo de actuación de las moléculas que inician y regulan el proceso de apoptosis celular.

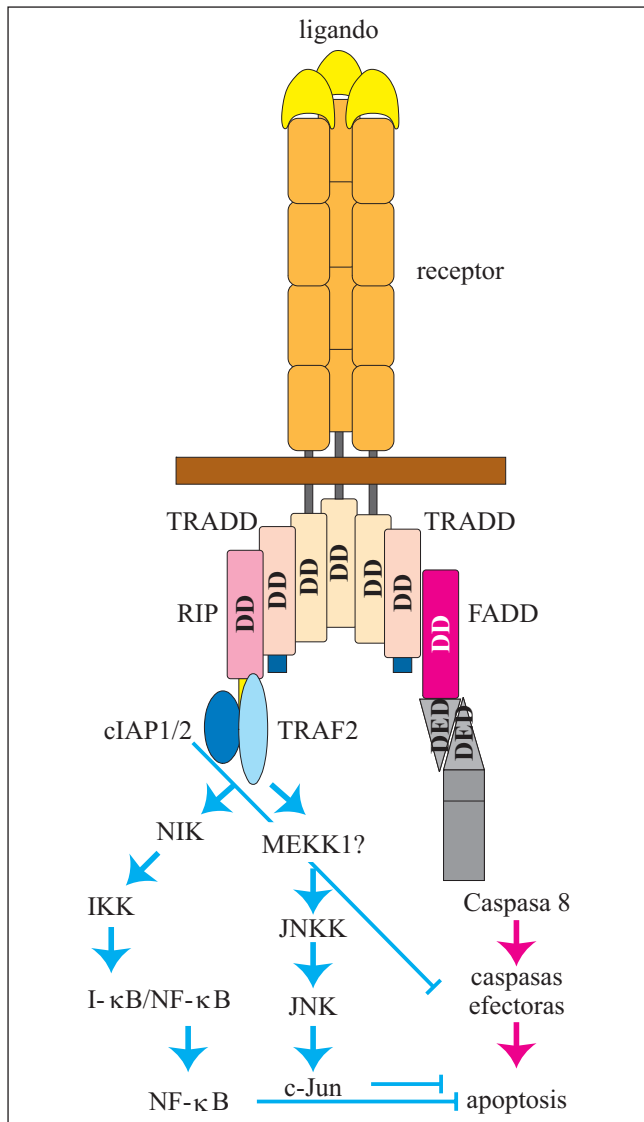
función, ya que mutaciones de los primeros aminoácidos de la cadena conduce a una pérdida de interacción con los IAPs y la pérdida concomitante de su función.

Las interacciones entre los componentes de los *complejos de muerte* son cruciales en la señalización apoptótica; en ella se han señalado tres tipos de interacciones proteína-proteína: los *dominios de muerte* (DD), los *dominios muerte-efector* (DEDs), y los *dominios de reclutamiento de caspasas* (CARDs). Los dominios DDs se presentan en los componentes de iniciación del proceso apoptótico, tal como en los receptores de muerte (CD95, TNFR-1 y DR3) y las moléculas ligantes con estos receptores (FADD, TRADD y RIP); mientras que los dominios DEDs y CARDs son responsables del reclutamiento de las *caspasas* para construir los complejos específicos con moléculas adaptadoras. La asociación mediada por DD entre receptores y adaptadores es consecuencia de la activación por ligandos de los receptores de muerte. La estructura general de las interacciones DDs, DEDs y CARDs es muy semejante y basada en la presencia de seis  $\alpha$ -hélices; existen, sin embargo, ciertas diferencias

entre los tres dominios. Por ejemplo, ciertas mutaciones en el dominio Fas DD inhiben las interacciones proteína-proteína; las correspondientes mutaciones no tienen efecto sobre el dominio FADD DED; de otro lado, una región hidrofóbica en la FADD DED que es crucial para la unión a la *caspasa-8* DED está ausente en la Fas DD. Además, residuos requeridos para la actividad apoptótica de DEDs y DDs no se conservan en CARDs, lo que sugiere que estos tres dominios usan diferentes series de residuos en la definición de su especificidad de unión y la función pertinente. La figura 19 muestra la participación fundamental de estas interacciones en el proceso general de apoptosis.

En los últimos años se ha señalado la ubiquitinación como mecanismo de regulación de la apoptosis. Este sistema sirve principalmente para marcar las proteínas para su degradación por el proteasoma 26S, *proteasa* multicatalítica altamente específica. En primer lugar, una cascada de reacciones catalizada por las *enzimas activantes de ubiquitina* (E1), las *enzimas conjugantes de ubiquitina* (E2) y las *ubiquitina ligasas* se requieren para incrustar el resto de ubiquitina a un residuo de lisina de una proteína aceptora. La repe-





**Figura 19.** Esquema de los tipos de interacciones (DD y DED) en la señalización de TNFR1 en la iniciación del proceso de apoptosis.

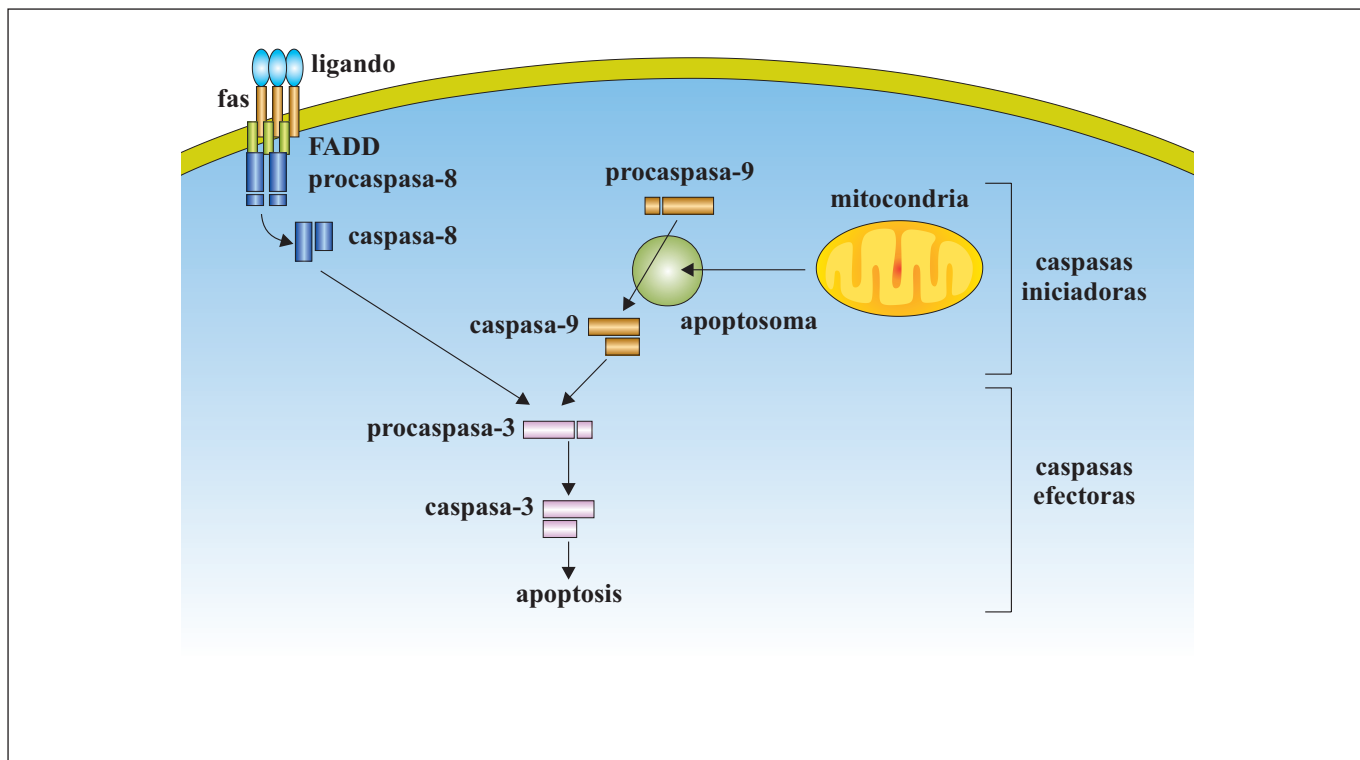
tición del proceso da lugar a una multiubiquitinación con la formación de una cadena de multiubiquitina formada progresivamente mediante enlaces peptídicos entre una lisina de la última molécula de ubiquitina y la glicina carboxilo-terminal de la nueva molécula de ubiquitina. Las proteínas modificadas de esta forma se reconocen y degradan por el proteasoma.

La compartimentalización conjunta de las *caspasas* y sus cofactores es otra forma de regulación de la actividad de las *caspasas*. Idea soportada por el hecho de que los extractos de algunas células vivas pueden activar las *caspasas* espontáneamente, lo que sugiere

que todos los componentes requeridos para la activación de las *caspasas* están presentes, aunque secuestradas, en las células vivas. Observación que ha conducido al descubrimiento de que el citocromo c se requiere para la activación *in vitro* de la *caspara-9*, y a la subsiguiente hipótesis de que la apoptosis puede desencadenarse por la inducción de cambios mitocondriales que originan la liberación de este cofactor (figura 20).

Dado el comportamiento activo de los procesos apoptóticos, la modulación del fenómeno es importante en la comprensión de la fisiopatología celular. Datos recientes han demostrado la inhibición de la apoptosis en diferentes tipos de células expuestas a ciertas citoquinas. De manera que la terapéutica que modula la regulación de la apoptosis suministra una excelente oportunidad para el tratamiento de ciertas enfermedades. Así, la inducción de la apoptosis puede mostrarse de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de células neoplásicas malignas, a través de la destrucción de las células tumorales. De esta forma se ha establecido una conexión directa de la apoptosis con alteraciones específicas tales como la linfoproliferación y el cáncer debido a la pérdida de la función de la proteína p53 o a la ganancia de Bcl-2. La inhibición de la apoptosis puede colaborar con el proceso de reparación tisular mediante la promoción de la proliferación celular y la regeneración de los tejidos, con lo que influir sobre las enfermedades causadas por la muerte celular apoptótica. En la tabla 2 figura una amplia variedad de inhibidores de apoptosis; en la actualidad se ha demostrado que algunas citoquinas y factores de crecimiento inducen verdaderas señales antiapoptóticas. Así, el factor IGF-I y los miembros de la familia IGF (*Insulin-like Growth Factor*) ejercen múltiples acciones biológicas en las células. El desarrollo y el crecimiento de tejidos requieren una regulación balanceada de replicación y muerte celular; y la inhibición de apoptosis por IGF-I juega un importante papel en el mantenimiento de la supervivencia celular.

Los fenómenos apoptóticos se encuentran implicados en numerosos procesos patológicos cuyos mecanismos se conocen en distinto grado. El crecimiento y la proliferación celulares son necesarios para el desarrollo del sistema nervioso; además, la apoptosis es asimismo importante en la modulación de la función y



**Figura 20.** Esquema de la participación mitocondrial en la compartimentalización de la regulación de la actividad de las caspasas.

la estructura final del sistema nervioso. Entre el 20% y el 80% de las neuronas del sistema nervioso central experimentan apoptosis antes de la edad adulta. El desencadenamiento de la muerte celular programada coincide usualmente cuando los axones alcanzan sus tejidos blanco y se piensa que en muchos casos se regula por el acceso de las neuronas a los factores tróficos de los blancos. Los movimientos descontrolados

de los pacientes con la *enfermedad de Huntington* tienen como origen la muerte de un grupo específico de células nerviosas; una de cuyas causas es, al menos, la presencia de un mutante de la proteína *huntingtina*, desencadenante del suicidio sistemático de este tipo de células. En efecto, los fenómenos apoptóticos se están averiguando en la actualidad como participantes de buen número de situaciones neurodegenerativas, desde

agente	sistema celular	resultado
vitamina E óxido nítrico dexametasona Zn 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> poliinsaturados péptido vasoact. ácido retinoico quercetina trombopoyetina factores transcrip.	células PC12 de rata hepatocitos modelo neonatal rata cáncer gástrico células HL60 carcinosarcoma timocitos rata línea celular Y6 fibroblastos cel. hematopoyéticas cel. leucémicas	inhibe la apoptosis inhibe la apoptosis inhibe la apoptosis apoptosis diferida protege la apoptosis suprime la apoptosis previene la apoptosis impide la apoptosis impide la apoptosis inhibe la apoptosis inhibe la apoptosis

**Tabla 2**

las enfermedades de Alzheimer y Parkinson hasta las trombosis, si bien los mecanismos desencadenantes sean diferentes; por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, la situación molecular desencadenante es la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide, en tanto que en los fenómenos trombóticos es el defectuoso suministro de oxígeno al cerebro; aunque en ambos casos sea la cascada de *caspasas*, en especial la *caspasa-8* y la *caspasa-3*, la conducente a la desintegración del DNA neuronal. Hoy se reconoce que los daños neurológicos necróticos desencadenan frecuentemente la apoptosis en una subserie de neuronas; fenómeno mecanísticamente idéntico a la apoptosis clásica.

La apoptosis juega también un papel en la patogénesis de la *inflamación crónica*, que puede explotarse terapéuticamente. Hoy se conoce que un cierto número de enfermedades inflamatorias crónicas se conducen por linfocitos T activados que desencadenan ciclos de infiltración celular y destrucción de tejidos mediante la liberación de diferentes tipos de citoquinas que, a su vez, definen la naturaleza de las respuestas inmunitarias celular y humoral en el órgano afectado. Por ejemplo, en el asma los linfocitos T auxiliares (Th) con el marcador superficial CD4 gobiernan la destrucción tisular mediante la secreción de un grupo singular de citoquinas, en particular las interleuquinas 4 (IL-4) y 5 (IL-5) que promueven, respectivamente, la sensibilización por IgE de los tejidos respiratorios y la inflamación eosinofílica. La mayor parte de las células CD4<sup>+</sup> en asmáticos contiene una serie expandida de células T específicas para pocos antígenos. Las células T se activan inicialmente por antígenos presentados en los tejidos linfoides regionales, pero en las enfermedades crónicas respiratorias, las células CD4<sup>+</sup> expresan marcadores superficiales asociados con la activación de células T, incluyendo CD45RO<sup>+</sup> y moléculas de adhesión, lo que sugiere que son crónicamente reestimuladas *in situ*. Las células T en reposo expresan muy poco Fas, mientras que durante la activación y expansión, Fas es sobreexpresado con intensidad de forma que las células T estimuladas de manera crónica son particularmente susceptibles de muerte celular mediada por Fas. Esta diferente susceptibilidad en dependencia del estado de activación ha conducido a la hipótesis de que la sobreexpresión de Fas, y en particular de FasL, restringe las respuestas inmunitarias a un nivel al que no daña al huésped a través de la muerte selectiva de las células T activadas. La enfer-

medad crónica podría resultar simplemente, por tanto, del escape de algunas de estas células CD4 de la muerte producida por la interacción Fas-FasL; en tanto que podría corregirse por anticuerpos activantes de Fas o mediante la administración adicional de FasL.

A causa de que la deficiente regulación de la proliferación y la inhibición de la apoptosis residen en el corazón mismo del desarrollo tumoral, ambas suponen dos blancos obvios para la intervención terapéutica en todos los tipos de cáncer. Existen, sin embargo, numerosos mecanismos a través de los que pueden tener lugar ambos defectos.

## BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA INFLAMACIÓN

La **inflamación**, fenómeno en apariencia sencillo, se funda en uno de los más complejos mecanismos fisiopatológicos para interpretar la relación entre las *causas* iniciadoras del proceso y los *efectos* finales comunes a todas ellas. Las causas iniciadoras de la inflamación pueden reducirse a dos: los *traumatismos físicos* de diversa naturaleza, y la *estimulación por antígenos* que pueden participar bajo formas distintas —la penetración de un agente infeccioso, las infecciones crónicas y los complejos autoinmunes—. Los *efectos* finales se concretan en tres grupos generales de acciones: aumento del *flujo sanguíneo* en la zona, incremento de la *permeabilidad vascular capilar* y *migración de varios tipos de células* hacia los tejidos en que la inflamación se localiza.

Las diversas *causas* inductoras de la **inflamación** conducen a los variados *efectos* finales a través de una complicada red de mecanismos de regulación, en la que participan *sistemas celulares*, *sistemas enzimáticos* de actuación en cascada y *múltiples sistemas de reconocimiento*. Todos estos mecanismos tienen en común su participación en la elaboración de *mediadores* —citoquinas, linfoquinas, agentes quimiotácticos, activadores, etc.— que cumplen funciones variadas en la globalidad de los *efectos* de la **inflamación**. La inflamación implica, en cualquier caso, la activación secuencial de una transmisión de señales conducente a la producción de mediadores tanto pro como antiinflamatorios. Hasta el momento, la mayor atención se ha prestado hacia los procesos proinflama-

torios iniciadores del fenómeno, en tanto que se conoce relativamente poco de los mecanismos que cortan y resuelven el proceso. De todo el conjunto de mecanismos moleculares conviene destacar la posición central del *factor de transcripción* NF- $\kappa$ B en la inducción de la expresión génica proinflamatoria, que, a la vez, ofrece un blanco excepcional para el tratamiento farmacológico del proceso. La actividad del factor NF- $\kappa$ B se induce rápidamente por los estímulos proinflamatorios, principalmente TNF $\alpha$ , interleuquina-1, virus y componentes de las paredes bacterianas. Además, el factor NF- $\kappa$ B protege a las células de la inducción de una muerte celular programada por estímulos proapoptóticos.

En el conjunto de los *sistemas de reconocimiento* participan, de un lado, el *reconocimiento específico de los antígenos*, característico de la **respuesta inmunitaria** adaptativa, con sus dos tipos de moléculas implicadas, las inmunoglobulinas (Ig) y los receptores de antígenos de los linfocitos T (TCR); y, de otro, las variadas muestras de *reconocimiento celular* por parte de receptores de linfocitos y células accesorias —plaquetas, mastocitos y basófilos—. La migración de los leucocitos, uno de los múltiples efectos de la inflamación, se basa asimismo en el *reconocimiento celular* debido a la presencia de marcadores de superficie en los leucocitos, y de moléculas de adherencia en las células endoteliales.

Los *sistemas enzimáticos* de actuación en cascada participantes en el proceso de inflamación, que, interconectados entre sí, juegan a su vez un papel importante en la homeostasis general, responden a cuatro tipos principales: *coagulación*, *fibrinólisis*, *quininas* y *complemento*. Algunos de los productos finales de estos sistemas actúan directamente en la consecución de efectos finales del tipo de la *vasodilatación*, la *permeabilidad vascular*, el *quimiotactismo*, la *contracción de la musculatura lisa* y la *movilidad celular*, aunque pueden actuar asimismo sobre algunas de las células integrantes del sistema de células accesorias.

Las *células accesorias* —mastocitos, basófilos y plaquetas, principalmente— producen también mediadores de la inflamación, tales como el *factor activante de plaquetas* (PAF), *prostaglandinas*, *leucotrienos*, *tromboxanos*, *citoquinas*, *interleuquinas*, etc., para lo cual necesitan ser activadas por ligandos diversos,

entre otros las inmunoglobulinas y los antígenos. Así, la acción de los antígenos sobre los mastocitos provoca su desgranulación y la liberación de mediadores como la histamina y sus derivados; y la reacción de los antígenos sobre los linfocitos T provoca la liberación de linfoquinas que activan los macrófagos y producen mediadores de la inflamación. Estas dos acciones de los antígenos inician las reacciones de hipersensibilidad tipos I y IV.

Así pues, el complejo mecanismo molecular responsable de la respuesta inflamatoria a una acción externa consta de toda una colección de entidades participantes, conexionadas entre sí, que poseen como fundamento físico común el de las *interacciones ligando-proteína* o *proteína-proteína*. Interacciones que subyacen en todas las etapas individuales que contribuyen a elaborar la red reguladora de la inflamación. Y a poco que se penetre en este mecanismo regulador y en su complejidad surge la **transducción de señales** con diversas *entradas* —las causas inductoras— y *salidas* —los efectos finales— de múltiple naturaleza.

Para facilitar el estudio, y sin perder de vista sus relaciones, no hay más remedio que acudir a los tratamientos parciales integradores de la globalidad del proceso, y considerar el comportamiento de cada uno de los ligandos individuales aislados cuyas acciones se transducen a lo largo de una ruta sucesiva de eslabones que interaccionan y se ramifican con los de las rutas procedentes de otros ligandos individuales. Y dentro de estos tratamientos parciales, el mayor interés lo muestra la acción desencadenante de la respuesta inflamatoria por parte de los *antígenos* a través de ambas rutas de recepción: linfocitos B y linfocitos T. Hecho que ha de considerarse ligado tanto a la actuación de las clases I y II de los *antígenos de histocompatibilidad* (HLA) en la presentación de los antígenos por las células presentadoras, como a la actuación de los receptores no convencionales — $\gamma/\delta$ — de los linfocitos T, la función de los correceptores y la participación de las moléculas coestimuladoras asociadas a la presentación de los antígenos, y la gran variedad de estímulos extracelulares —choque térmico, daño del DNA, terapias citotóxicas, irradiación UV, etc.—; todo ello vinculado asimismo a la acción transductora de las cascadas específicas —ya mencionadas— de **proteína quininas** y de **proteínas G**. Por otro lado, el estudio de la **inflamación** ha de comportar una gran diversidad

de *citoquinas proinflamatorias*; una gran variedad de *sistemas de adhesión*, moduladores de las interacciones leucocitos, células endoteliales; la extraordinaria variedad de efectos inflamatorios finales, desde la *inflamación sistémica* y las *enfermedades inflamatorias autoinmunes* —artritis reumatoide, cirrosis biliar primaria, diabetes dependiente de insulina, por ejemplo— a la inflamación de órganos y tejidos particulares como los casos de *aterosclerosis*, *uveitis*, *inflamación crónica de la vejiga*, etc. e, incluso, a la inflamación debida a la presencia de proteínas específicas inductoras de artritis autoinmunes —colágenos II y XI— y la proteína no colagenosa *agrecano*; la contribución a la respuesta inflamatoria de *enzimas inducibles*, tales como la iNOS y la prostaglandina sintasa/ciclooxigenasa; la implicación de la *migración de ciertos tipos de células* en la génesis de lesiones celulares como las *placas ateroscleróticas* y la *reestenosis arterial*; la participación de nuevas proteínas superficiales, como las *integrinas complejas*, y, entre ellas, la *integrina  $\alpha V \beta 3$* ; y la participación de *citoquinas especiales* en la regresión del conjunto inflamatorio.

Ya se ha señalado la posición central del factor de transcripción NF- $\kappa$ B como regulador de la respuesta inmune innata, cuya actividad viene inducida por los estímulos proinflamatorios y se relaciona asimismo con los fenómenos apoptóticos. La *regulación por quinasas* constituye otro aspecto de gran interés en la modulación de la respuesta inflamatoria. La actividad de la *proteína quinasa Akt* (conocida también como *proteína quinasa B*), fuertemente estimulada por los factores de crecimiento, está implicada en la activación de NF- $\kappa$ B, mediada por TNF $\alpha$ ; lo que sugiere que la participación de la actividad antiapoptótica de la *quinasa Akt* pudiera estar mediada por el factor NF- $\kappa$ B.

La activación del factor NF- $\kappa$ B requiere la degradación de las proteínas I $\kappa$ B que, de otra manera, lo mantendrían inactivo en el citoplasma de las células no estimuladas. La degradación de las proteínas I $\kappa$ B, y la consiguiente activación de NF- $\kappa$ B, descansan en la actividad de la *I $\kappa$ B quinasa (IKK)* que consta de dos subunidades catalíticas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y una subunidad reguladora, IKK $\gamma$ . Ambas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , fosforilan *in vitro* I $\kappa$ Bs en localizaciones específicas de las que depende su degradación; sin embargo, *in vivo* es

solamente IKK $\beta$  la subunidad que se requiere para la degradación de I $\kappa$ B en respuesta a los estímulos proinflamatorios, incluyendo TNF $\alpha$ . IKK $\beta$  es también esencial para impedir la apoptosis inducida por TNF $\alpha$ .

Una vez más, el conocimiento de todos los motivos y circunstancias que intervienen en los mecanismos moleculares de cada una de estas etapas sirve de fundamento al diseño de medicamentos controladores de los efectos finales inflamatorios, globales o específicos, sobre los tejidos.

En el seno del presente estudio de la **transducción de señales**, es la *presentación de antígenos a los linfocitos T* uno de los aspectos parciales mejor conocidos. En efecto, las proteínas HLA fueron descubiertas en el hombre, en 1958, por el inmunólogo francés Dausset, veinte años más tarde de su descubrimiento por Gorer en el ratón, y a las que se responsabilizó de los rechazos de los injertos de piel entre donadores y receptores de cepas diferentes. Los estudios genéticos, químicos y físicos de las diferentes clases, I y II, de estas proteínas permitieron en seguida el perfecto conocimiento de la estructura primaria y su disposición en la membrana celular, de la estructura tridimensional y la presencia de diversos dominios mediante la difracción de rayos X, de las localizaciones en las que se experimentan fosforilaciones, y de su existencia bajo numerosas formas polimórficas. A fin de cuentas, un extraordinario polimorfismo génico manifestado bajo numerosas estructuras primarias diferentes. Estas propiedades de las proteínas HLA y, obviamente, su notable polimorfismo, se adscribieron inmediatamente a los fundamentos responsables de la incompatibilidad de tejidos; y, así, las proteínas HLA se vincularon a la puesta en marcha de la respuesta inmunitaria, a través de su participación en la presentación de los antígenos a las células B y T. La dicotomía estructural de las proteínas HLA de las clases I y II se ha traducido en los dos distintos mecanismos de procesado de los antígenos: la clase I tiene que ver con el procesado de los antígenos celulares; y la clase II con los extracelulares. La figura 21 esquematiza el procesado de los antígenos como condición previa a su presentación a las células T cuyo detalle se aprecia mejor en la figura 22. Tras el procesado de las proteínas antigénicas, éstas se transforman en péptidos sencillos que se acomodan en un surco que forma la disposición espacial de las proteínas HLA, particular-

mente sus dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en las de la clase I; a lo largo de este surco se disponen las regiones hipervariables de las proteínas HLA, a causa del polimorfismo. Y así, el fruto de la interacción *HLA-péptido antigénico* es el que se presenta a las células; y, por ejemplo, los péptidos derivados de los antígenos intracelulares se presentan por lo general a las células TCD8<sup>+</sup> por las moléculas de la clase I que se expresan virtualmente en todas las células; en tanto que los péptidos derivados de los antígenos extracelulares se presentan, por lo general, a las células TCD4<sup>+</sup> por las moléculas de la clase II presentes en células especializadas.

A dos de estas propiedades, el polimorfismo, de un lado, y la inducción inmunitaria, de otro, se debe la vinculación de una larga serie de enfermedades autoinmunes —diabetes, artritis, enfermedad celíaca, escle-

rosis múltiple, etc.— a marcadores estructurales; y de aquí surge la relación de los motivos estructurales de las proteínas HLA con la predicción de las alteraciones autoinmunes.

Toda esta colección de hechos estructurales y funcionales se centra en la complicada averiguación de la estructura tridimensional del conjunto *HLA-péptido antigénico* y de las interacciones entre sus componentes, fruto de la aplicación de refinadas técnicas físicas y químicas. Este conjunto *HLA-péptido* contacta con el receptor de las células T (figura 22), estableciéndose así un engarce molecular del tipo:

célula presentadora-**HLA-péptido**-TCR-linfocito T

para cuya fortaleza se necesita la colaboración de otras moléculas —CD4, CD28, LFA, ICAM, etc.— que, a

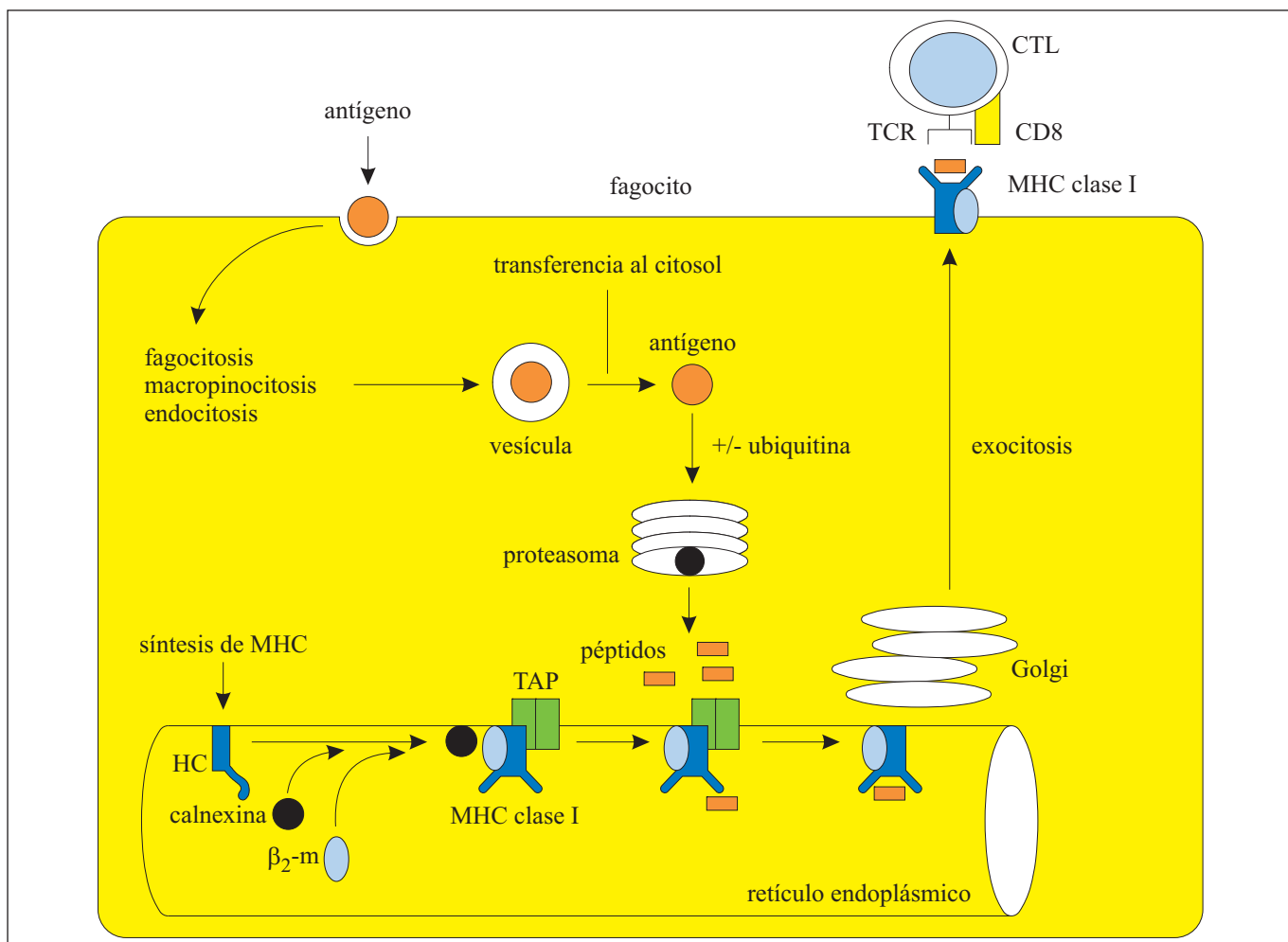
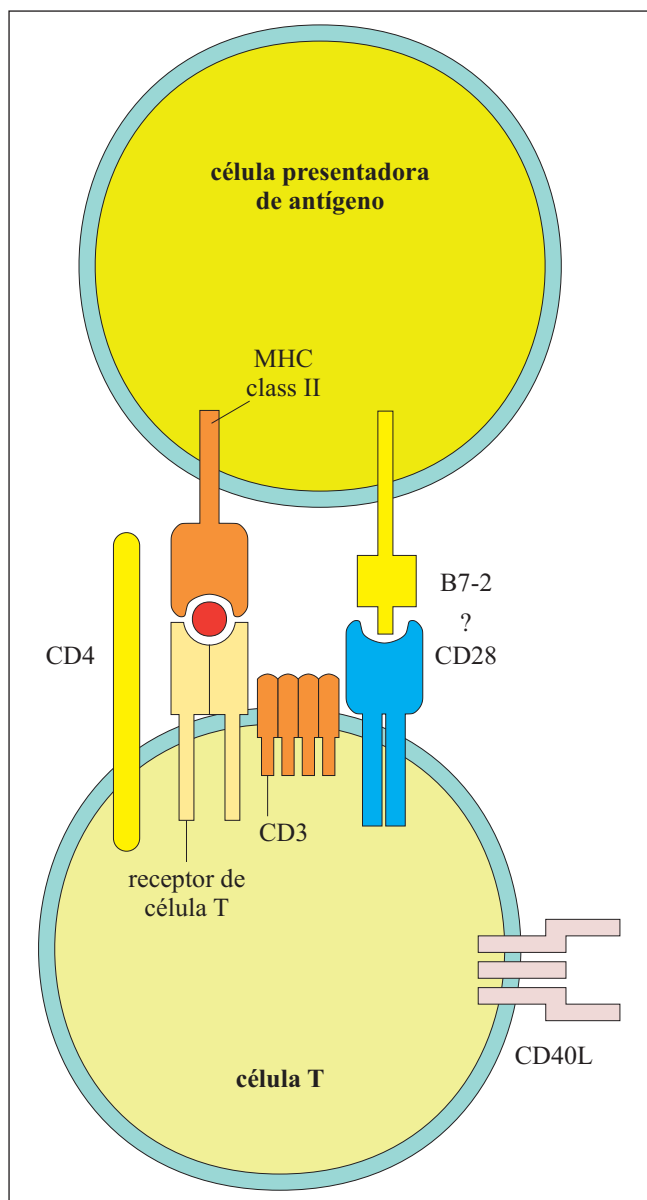


Figura 21. Mecanismo general del proceso de antígenos, previamente a su ulterior presentación a las células T.



**Figura 22.** Detalle de la presentación antigénica por células presentadoras a los receptores T, en presencia de correceptores.

modo de bridas intercelulares, favorecen la capacidad de las células para presentar los antígenos a los linfocitos T; y, en consecuencia, la **transducción de señales** y la *secreción de citoquinas*. La **transducción** se inicia en la fosforilación de residuos de tirosina de las cadenas del complejo receptor, de las proteína quinasas de las familias **src** ( $p56^{lck}$ ,  $p59^{fyn}$ ) y **syk** (ZAP-70) y de la PI 3-quinasa. En la cascada de este flujo de señales (figura 23) participan la fosforilación de la *fosfolipasa C $\gamma$*  y la hidrólisis de fosfoinosítidos, lo que conduce a un influjo intracelular de  $Ca^{2+}$  y a la acti-

vación de la *proteína quinasa C*. Y al final se encuentra la generación en el núcleo de factores de transcripción que facilitan la expresión de los genes de interleucina-2 y otras citoquinas. En la figura 24 se aprecia con mayor detalle la complejidad del fenómeno de la transducción de señales iniciada por los antígenos.

El conocimiento del conjunto *HLA-péptido* contribuye, de otro lado, al diseño racional de medicamentos en su capacidad de optimizar la afinidad y la especificidad de unión de ligandos —sustratos o inhibidores— a la superficie de las proteínas. Algunos defectos en los fenómenos de transducción en las células T constituyen la base de las alteraciones en la inmunogenicidad de ciertas células tumorales, colorectales y renales, principalmente.

### TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y SISTEMA NERVIOSO

Contiene el cerebro alrededor de cien mil millones de células nerviosas, cada una de las cuales se comunica directamente con otras mil células colindantes. Es bien conocido como durante el segundo tercio del pasado siglo XX surgió un intenso debate acerca de la naturaleza de la comunicación a través de las sinapsis entre las células nerviosas: la teoría de la *comunicación eléctrica* establecía que el impulso nervioso o potencial de acción se propagaba a lo largo de los axones a las terminales nerviosas y cambiaba el campo eléctrico a través de la membrana plasmática de la célula postsináptica, con lo que se producía una respuesta fisiológica. La teoría de la *comunicación química* suponía que cuando el potencial de acción llegaba a la terminal nerviosa se producía la fusión de las vesículas contenedoras del neurotransmisor con la membrana plasmática presináptica, con lo que se liberaba el neurotransmisor a la hendidura sináptica, que al actuar como ligando de los receptores postsinápticos producía la respuesta fisiológica. Demostrado que la práctica totalidad de las sinapsis del cerebro utilizan la *transmisión química*, el interés quedó centrado en el estudio de los mecanismos por los que los neurotransmisores producen sus efectos fisiológicos vía los receptores postsinápticos de las células nerviosas.

Hoy se conoce la existencia de dos categorías de transmisión química entre las células nerviosas, cono-

cidas como la *transmisión sináptica rápida y lenta*. Alrededor de la mitad de las sinapsis rápidas en el cerebro son excitatorias, la mayoría de las cuales utilizan glutamato como neurotransmisor; y la otra mitad de las sinapsis rápidas son inhibitorias, la mayoría de las cuales utilizan el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor. La transmisión sináptica de las sinapsis rápidas tienen lugar en menos de 1 milise-gundo y se atribuye a la capacidad de sus neurotran-smisores para llevar a cabo la apertura de los canales operados por ligandos presentes en las membranas plasmáticas de las células postsinápticas. En la *transmisión excitatoria rápida*, el glutamato se une a un receptor en el que se origina un cambio conforma-

cional que permite a los iones  $\text{Na}^+$  penetrar en la célula y causar una señal despolarizante, esto es *excitatoria*. En la *transmisión inhibitoria rápida*, el GABA se une a su receptor, y el correspondiente cambio conforma-cional permite a los iones  $\text{Cl}^-$ , negativamente cargados, causar una señal hiperpolarizante, esto es *inhibidora*, en la célula blanco.

El segundo tipo de comunicación entre las células nerviosas, la *transmisión sináptica lenta*, tiene lugar en periodos desde cientos de milisegundos a minutos y es mucho más compleja que la forma *rápida* de comu-nicación. Tanto es así que se ha identificado alrededor de un centenar de sustancias que actúan en el cerebro

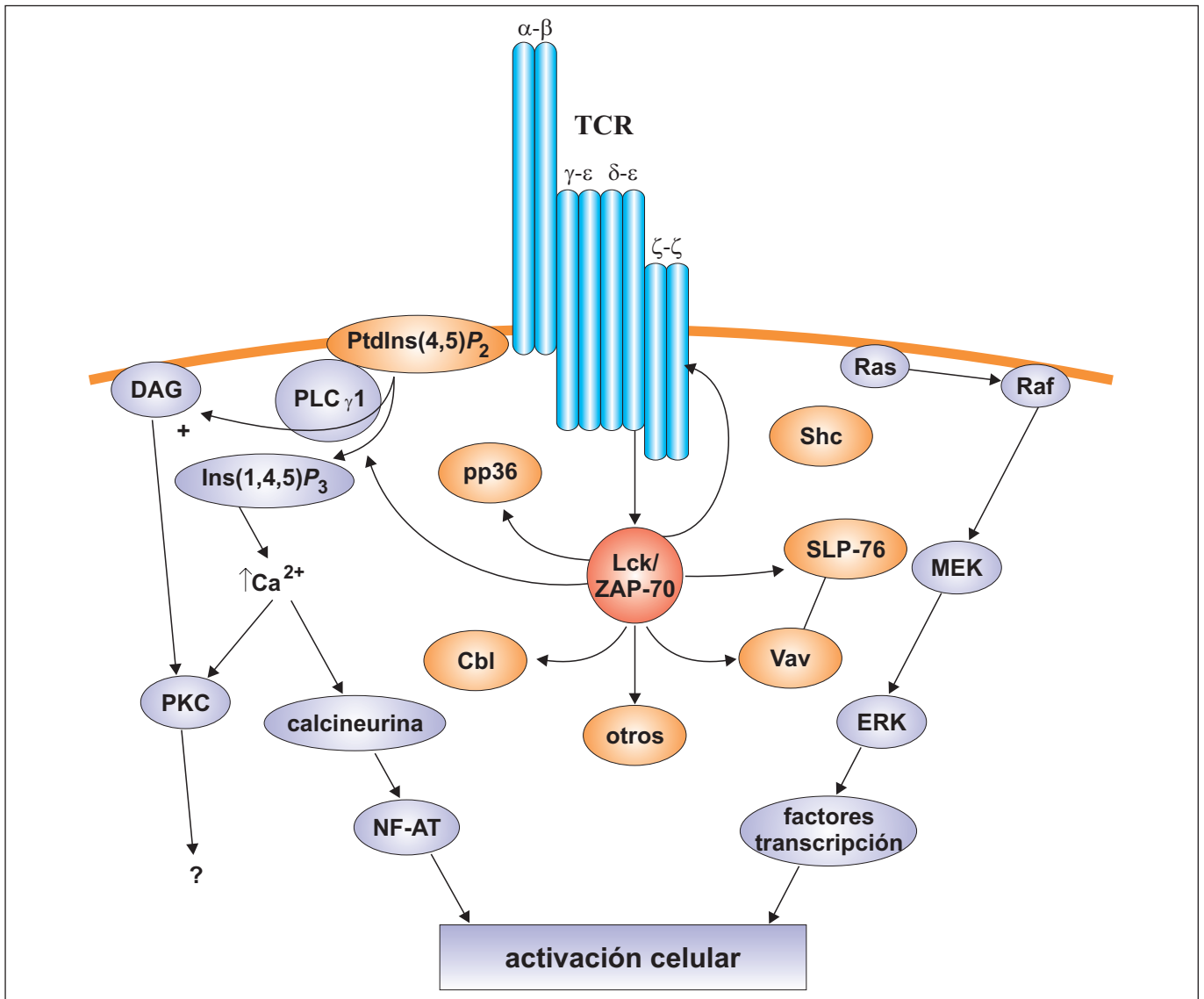
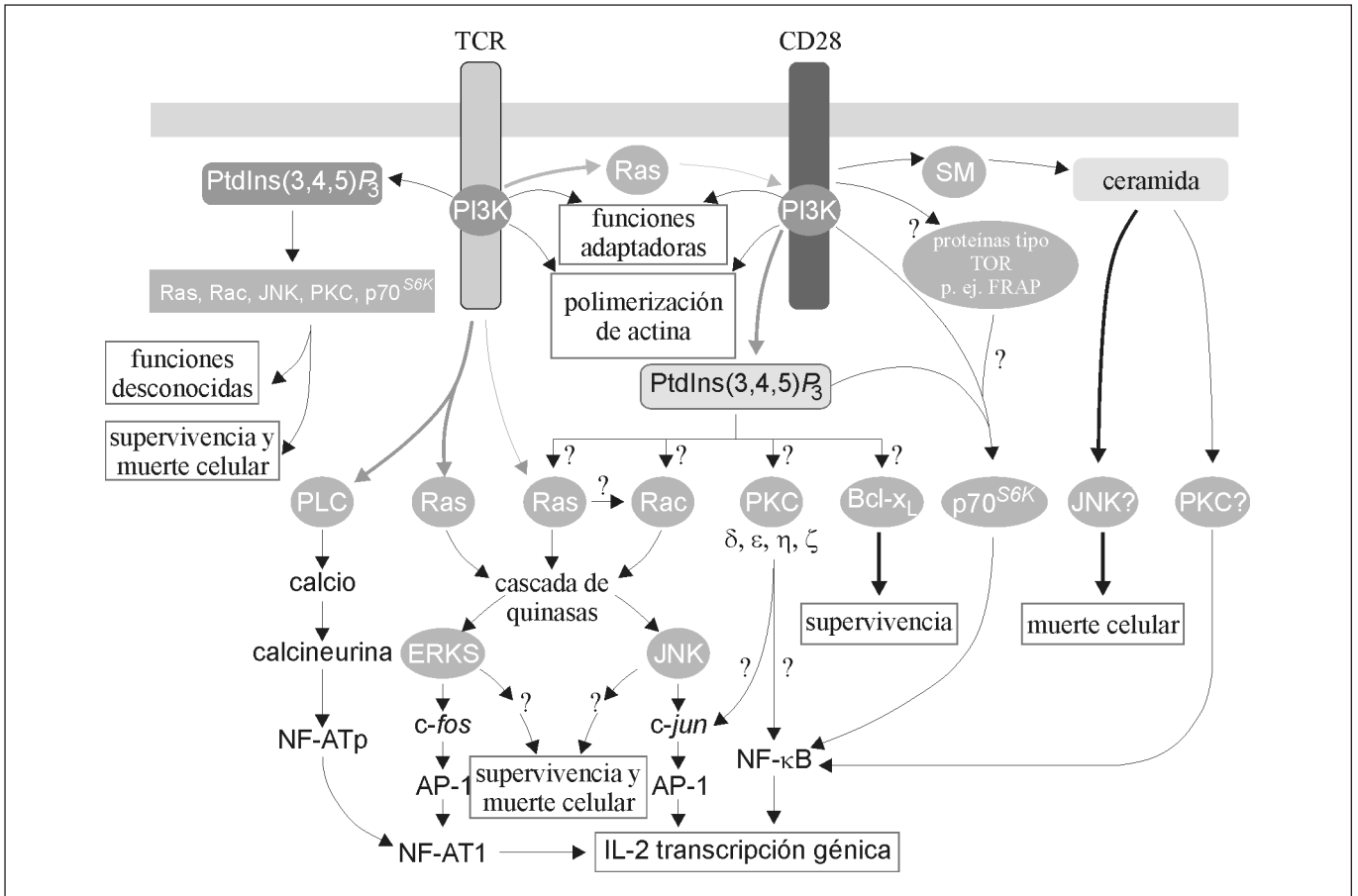


Figura 23. Esquema general de la activación de las células T desde el receptor TCR y detalle de su estructura.

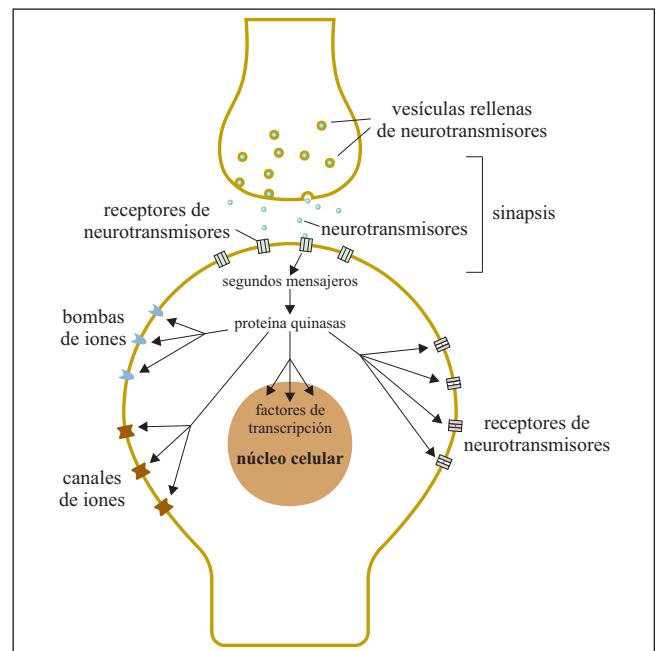




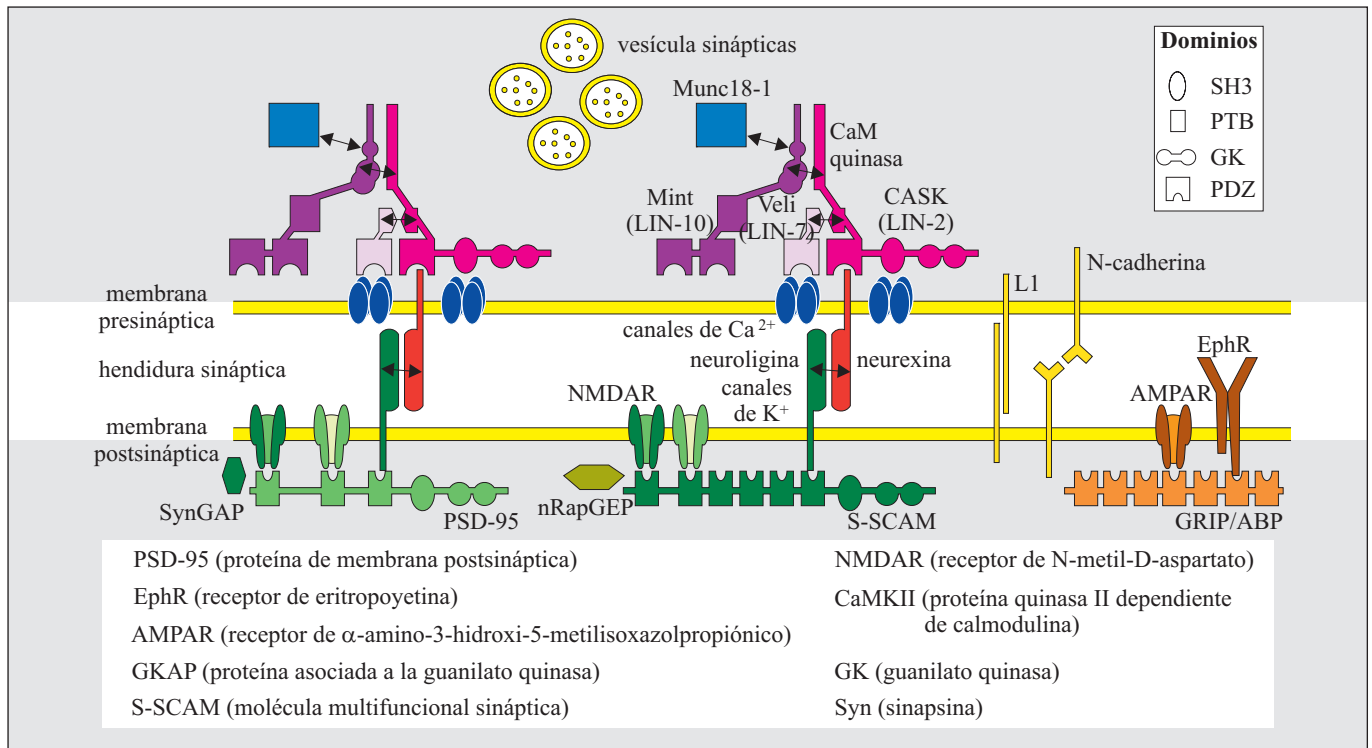
**Figura 24.** Interacción del receptor TCR y la proteína CD28 en la elaboración de funciones y su soporte molecular.

como neurotransmisores que responden a los tres tipos: aminoácidos, péptidos y aminas biógenas. La gran mayoría de estos neurotransmisores actúan a través de procesos de transmisión sináptica lenta. Sin embargo, los neurotransmisores de actuación rápida — incluso los aminoácidos GABA y glutamato— producen muchos de sus efectos a través de los mecanismos de actuación lenta. En la figura 25 se esquematizan los principales mecanismos moleculares de transducción de señales implicados en la *transmisión sináptica lenta*.

La unión de estos neurotransmisores a sus receptores cambia el nivel de un segundo mensajero — cAMP, cGMP, Ca<sup>2+</sup> o DAGs—, los que, a su vez, activan diferentes tipos de *proteína quinasa*. Las *proteína quinasa* activadas catalizan la fosforilación y el cambio de propiedades de proteínas específicas que sirven de efectores fisiológicos. La actividad enzimática de las *proteína quinasa* actúan sobre *canales de iones* —de Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, dependientes de



**Figura 25.** Esquema general de la transducción de señales en la *transmisión sináptica lenta*.



**Figura 26.** Esquema ilustrativo de la participación de bridas intercelulares para asegurar la cesión de neurotransmisores a las sinapsis.

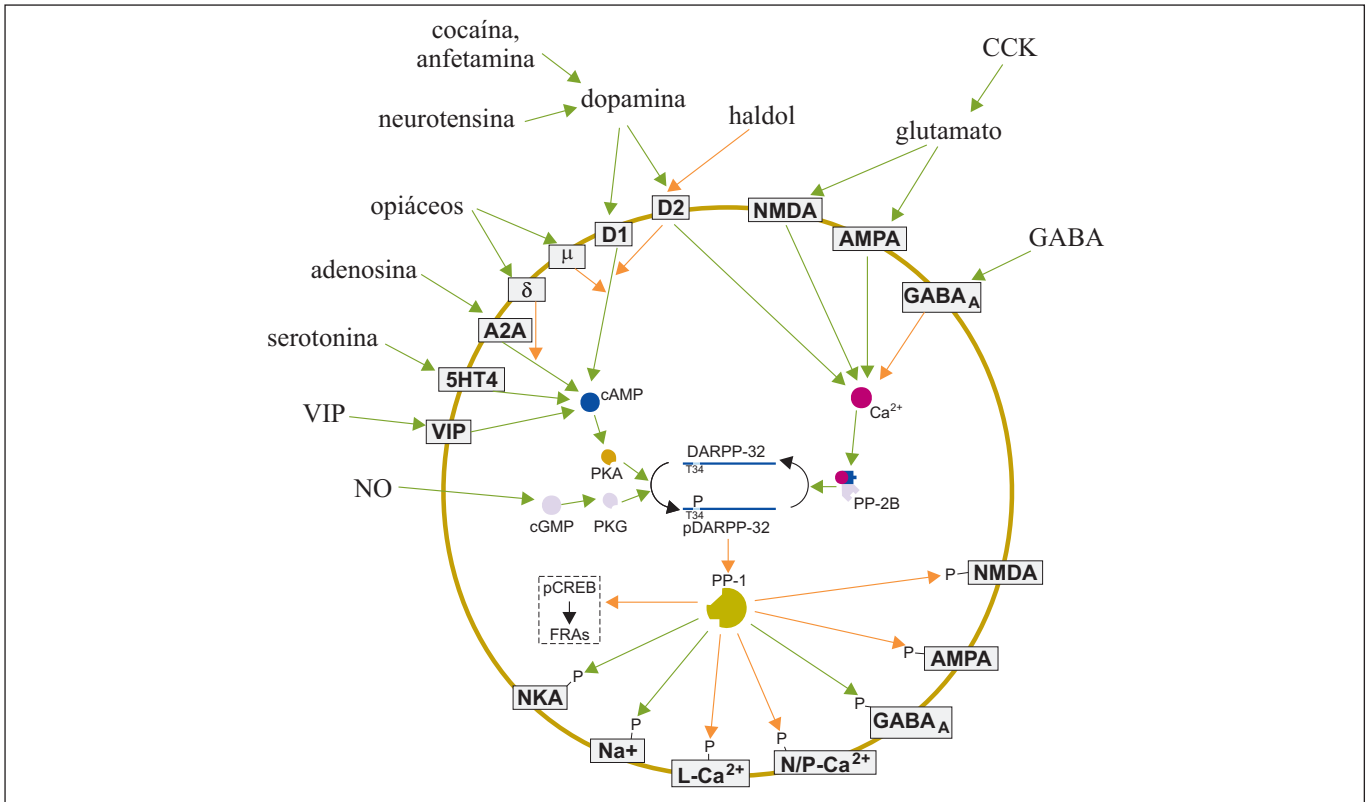
voltaje—; sobre *bombas de iones* que restauran el equilibrio de iones tras una intensa actividad neuronal; y sobre los *factores de transcripción* que, presentes en el núcleo celular, controlan la síntesis de proteínas exigible en los cambios a largo plazo de las células nerviosas.

Estos procesos de comunicación lenta modulan la transmisión sináptica rápida de dos maneras principales: a) por regulación del estado de fosforilación de las proteínas de las terminales presinápticas, con lo que resulta modulada la liberación de los neurotransmisores en respuesta a los potenciales de acción; b) por regulación del estado de fosforilación de los receptores de neurotransmisores presentes en las membranas plasmáticas de las células postsinápticas, con lo que se modula la magnitud de la respuesta electrofisiológica a una molécula de neurotransmisor.

En algunos casos descritos anteriormente, sobre todo en el de la *activación antigénica de las células T*, se ha establecido la existencia de bridas intercelulares soportadas por la interacción entre proteínas ancladas en ambas células, donadora y receptora, con lo que se facilita la transmisión de algo, un antígeno por

ejemplo. Análoga situación, aunque seguramente más compleja dada la variedad y la naturaleza de las proteínas implicadas, se presenta en la neurotransmisión de la que se muestra un ejemplo en la figura 26.

Las situaciones fisiopatológicas relacionadas con la neurotransmisión y los mecanismos moleculares participantes son muy numerosas en dependencia principal de la naturaleza del neurotransmisor. Así, se ha descrito una colección de anomalías neurológicas y psiquiátricas relacionadas con la señalización por dopamina; las cuatro principales enfermedades de este tipo son: la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, el desorden de hiperactividad con déficit de atención (ADHD) y la drogadicción. La *enfermedad de Parkinson* está asociada con la muerte de células nerviosas productoras de dopamina, y en su tratamiento más general interviene la levodopa, un precursor de la dopamina. En el tratamiento de la *esquizofrenia* se utilizan bloqueantes de una subclase de receptores de dopamina. La *ADHD* se trata con sustancias —la Ritalina, por ejemplo— que estimula la liberación de dopamina. Y muy generalmente, los mecanismos de *drogadicción* ocasionan perturbaciones en la transmisión de señales por medio de la dopamina. En



**Figura 27.** Regulación por modificación covalente de DARPP-32 de los procesos de señalización en el neostriatum, iniciados por una variedad de ligandos: dopamina, glutamato, NO, GABA, opiáceos, adenosina y serotonina, entre otros.

análoga dirección se ha descubierto recientemente una sustancia identificada por las siglas DARPP-32 —acrónimo de *dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein* (peso molecular 32 kD)—, mediadora en la acción de la dopamina por fosforilación de su treonina-34, a través de la anterior activación de una *proteína quinasa A* (PKA), a su vez regulada por los niveles aumentados de cAMP, ocasionados por la activación de una subclase de receptores de dopamina. La secuencia de DARPP-32 consta de 205 aminoácidos y está muy conservada en los mamíferos. En efecto, su fosforilación en la posición 34 modifica profundamente sus propiedades biológicas, convirtiéndola de una molécula inactiva a un potente inhibidor de la *proteína fosfatasa 1* (PP1).

Esta sustancia se encuentra concentrada en el *neostriatum* y el *nucleus accumbens*. Las neuronas neostriatales que contienen DARPP-32 constituyen el único sistema eferente para transmitir información de esta región del cerebro. Uno de los más importantes sistemas aferentes está compuesto de neuronas que se proyectan desde el *cortex* al *estriatum* y usa glutamato

para excitar las neuronas DARPP-32. La excitabilidad de las neuronas con DARPP-32 se modula por las neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde la *substantia nigra* al *neostriatum*. La regulación de la excitabilidad de las neuronas que contienen DARPP-32 se ha utilizado como modelo para el estudio de los mecanismos por los que la transmisión sináptica lenta, ejemplificada por la dopamina, actúa como moduladora de la transmisión sináptica rápida, ejemplificada por el glutamato.

Se han descrito tres clases principales de receptores de glutamato —NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA y los receptores metabotrópicos (mglu)— y dos clases principales de receptores de dopamina —D1 y D2—, de forma que las interacciones entre los procesos de señalización por glutamato y dopamina son complejas y vienen moduladas por los procesos en los que participan otros neurotransmisores; y, precisamente, DARPP-32 juega un papel central en el mantenimiento de este tipo de interacciones en virtud de sus posibilidades de fosforilación-defosforilación (figura 27). Así, los neurotransmisores que aumentan o disminuyen la

fosforilación en la treonina-34 de DARPP-32, inhiben o activan, respectivamente, la *proteína fosfatasa 1* y, por tanto, aumentan o disminuyen el estado de fosforilación y actividad de una serie de efectores fisiológicos. Y como buena prueba de ello, se ha demostrado en ratones privados de DARPP-32 que se suprimen o disminuyen en gran medida las respuestas bioquímicas, fisiológicas, farmacológicas y toxicológicas a la dopamina, a los medicamentos antiesquizofrénicos y a las drogas psicoestimulantes.

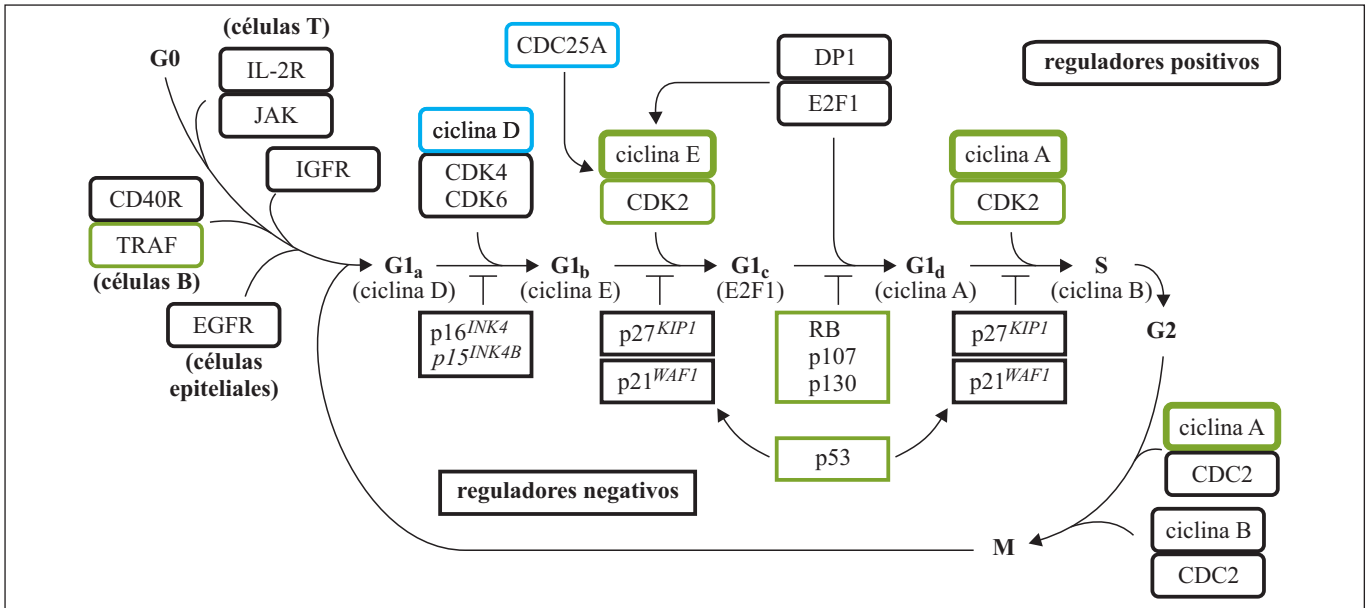
En la figura 27 se observa que la acción de la dopamina sobre la subclase D1 de receptores estimula la fosforilación de DARPP-32 en la posición treonina-34, a través de la activación de la *adenilato ciclasa*, la formación de cAMP y la activación de la *proteína quinasa A*. A su vez, la recepción de la dopamina por la subclase D2 ocasiona la defosforilación de DARPP-32 a través de dos mecanismos sinérgicos: impide la formación de cAMP por inactivación de la acción de D1 y, a la vez, eleva el  $Ca^{2+}$  intracelular que activa una *proteína fosfatasa* (PP2B) dependiente de  $Ca^{2+}$ , la cual cataliza la defosforilación de DARPP-32 en treonina-34. El glutamato, por otro lado, opera como neurotransmisor de actuación rápida y lenta; su actuación sobre AMPA ocasiona una respuesta rápida y la transmisión sináptica lenta tiene lugar a través de las subclases receptoras AMPA y NMDA.

De otro lado, los receptores metabotrópicos de glutamato están implicados en la regulación de muchos procesos fisiológicos y patológicos del sistema nervioso central, que incluyen la plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria, la coordinación motora, la transmisión del dolor y la neurodegeneración. Forman un conjunto de ocho subtipos que pertenecen a tres subgrupos: subgrupo I)  $mglu_1$  y  $mglu_5$ ; subgrupo II)  $mglu_2$  y  $mglu_3$ ; y subgrupo III)  $mglu_4$ ,  $mglu_6$ ,  $mglu_7$  y  $mglu_8$ ; cada uno de ellos con sus correspondientes agonistas y antagonistas. La multiplicidad de los procesos fisiopatológicos en los que participan los receptores  $mglu$  y el interés creciente sobre su papel en la neurodegeneración y la neuroprotección destacan la importancia del conocimiento de los mecanismos moleculares regulados por las señalizaciones establecidas a su través. Los *receptores del grupo I* se localizan en las partes periféricas de las regiones postsinápticas y contribuyen a la regulación de la plasticidad sináptica. Por ejemplo, los receptores de  $mglu_1$  se encuentran en las

células de Purkinje cerebelares y juegan un papel central en la coordinación motora, en tanto que los receptores  $mglu_5$  del hipocampo contribuyen a la inducción de los potenciales de larga duración (LTP) y al aprendizaje asociativo. Ambos,  $mglu_1$  y  $mglu_5$ , están implicados en los procesos neurodegenerativos; de aquí que sus antagonistas sean eficaces frente a la muerte neuronal excitotóxica. Los *receptores presinápticos del grupo II* regulan negativamente la liberación de glutamato, mientras que los receptores  $mglu_3$  gliales ejercen efectos neuroprotectores a través de la producción de factores neurotróficos. Los *receptores  $mglu_6$  del grupo III* se expresan exclusivamente por las células bipolares de la retina y juegan un papel importante en la amplificación de los influjos visuales; en tanto que el resto de los receptores del mismo grupo se localizan presinápticamente e inhiben la localización de glutamato o GABA.

Los receptores metabotrópicos de glutamato forman parte de la familia de proteínas con siete dominios transmembranares y se asocian con las proteínas G heterotriméricas para la transducción de las señales. Familia que incluye a todos los subtipos de receptores  $mglu$ , y receptores de feromonas, aromas y sabores.

Como ha quedado señalado, la información neuronal codificada por los potenciales de acción se transmite a través de las sinapsis químicas en la dirección anterograda por liberación de neurotransmisores, neuropéptidos y otros factores desde las terminales presinápticas. Estas moléculas producen cambios inmediatos en los potenciales de membrana, así como cambios metabólicos y estructurales a largo plazo, en las células postsinápticas. Sin embargo, durante las últimas décadas se ha demostrado que el intercambio de información en las sinapsis es bidireccional y, además, que la célula postsináptica puede también suministrar una variedad de señales retrogradas dirigidas hacia las neuronas presinápticas. De forma que esta interacción recíproca es crucial para la diferenciación y mantenimiento de la célula presináptica, así como para la maduración de la sinapsis; para lo cual se han señalado varios mecanismos: *factores permeabilizantes de membrana* que se difunden a través de las membranas plasmáticas desde las células postsinápticas hacia las terminaciones nerviosas presinápticas; *factores solubles* que no son permeables a las mem-



**Figura 28.** Regulación del ciclo celular a través de la actividad de una serie de quinasas dependientes de ciclinas.

branas pero que, empaquetados y secretados vía vesículas exocíticas por la célula postsináptica, ejercen su acción retrógrada por su unión y activación de los receptores de la membrana presináptica; y, en tercer lugar, la *señalización directa* mediante el acoplamiento físico de bridas intercelulares formadas por la interacción de proteínas vinculadas a las células pre y postsinápticas. Este tipo de *interacción retrógrada* juega un papel importante en la *plasticidad sináptica* dependiente de la actividad.

## BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ANGIOGÉNESIS

Durante la embriogénesis, el sistema cardiovascular es el primero que se desarrolla, lo que tiene lugar a través de varios procesos complejos que implican interacciones coordinadas de sistemas de señalización. Las células endoteliales embrionarias suministran un marco alrededor del cual se organizan el corazón, las arterias, las venas y el sistema capilar, con los que suministrar el oxígeno y los nutrientes necesarios para el desarrollo del resto de órganos y tejidos. La expansión de la vasculatura embrionaria a través de la regulación de la proliferación, la migración y la diferenciación de las células endoteliales, se corresponde con dos tipos de procesos: la *vasculogénesis* y la *angiogénesis*. Durante la *vasculogénesis*, los angio-

blastos —células endoteliales precursoras derivadas del mesodermo— se diferencian y reúnen para originar una primitiva red tubular que, subsiguientemente, se remodela a través del proceso de *angiogénesis*, con formación de nuevos capilares y de una red vascular más compleja con una jerarquía de vasos de diferente tamaño.

El crecimiento y la regresión de los vasos sanguíneos son asimismo importantes en la remodelación continua del sistema reproductor femenino y de la reparación de tejidos; y las perturbaciones de este delicado balance contribuyen a procesos patológicos como el crecimiento tumoral. El *factor de crecimiento endotelial vascular* (VEGF) se requiere para el crecimiento de órganos y huesos y para el desarrollo y función endocrina del *corpus luteum* del ovario. La neovascularización ejerce una función central en procesos fisiopatológicos normales tales como la reparación de tejidos, la cicatrización de heridas y la recuperación circulatoria tras la isquemia; a los que hay que añadir su asociación a enfermedades entre las que se cuentan el crecimiento tumoral y las metástasis.

Los distintos ligandos del tipo VEGF y angiopoyetinas (Ang) actúan, respectivamente, sobre los receptores VEGFR-1, -2 y -3, y los receptores Tie-1 y -2. Los receptores Tie se requieren para la remodelación angiogénica tras las actividades vasculogénicas ini-

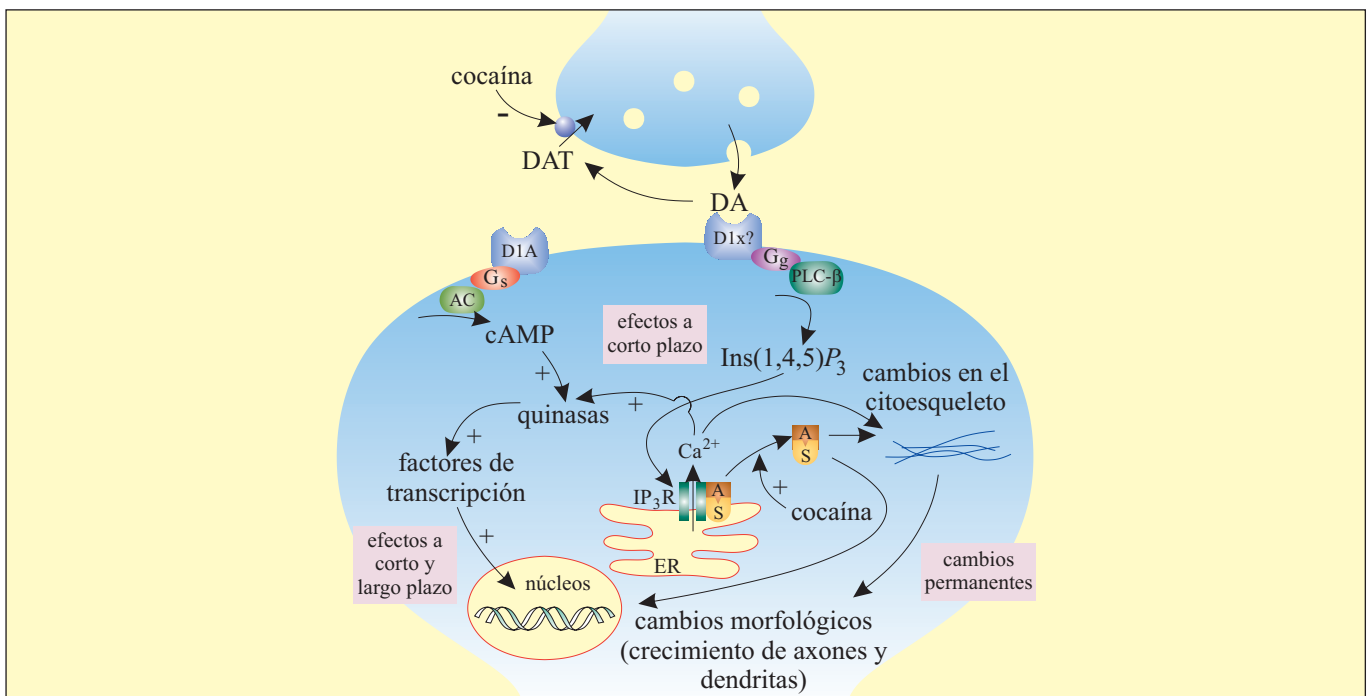
ciales de VEGFR. Los embriones carentes de la señalización a través de Tie2 mueren a consecuencia de un desarrollo incompleto del corazón y un mantenimiento insuficiente del plexo capilar primario. Las anteriores interacciones ligando-receptor provocan la activación de *fosfatidilinositol 3-quinasa* que promueve los contactos célula-célula y célula-matriz extracelular, a través de moléculas de adhesión del tipo de caderinas, selectinas e integrinas. Asimismo, se provocan las interacciones entre  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -catenina, vinculina y  $\alpha$ -actinina contribuyen al citoesqueleto de actina.

La expresión coordinada de angiopoyetinas y de los receptores Tie1 y Tie2 mantiene la plasticidad vascular, y las perturbaciones de esta regulación contribuyen al crecimiento vascular anormal. En este sentido se han identificado mutaciones del locus *Tie2* en familias con malformaciones venosas hereditarias.

## EL CICLO CELULAR

Las células de todos los organismos han elaborado sus propios mecanismos de defensa frente a los defectos de su propio desarrollo y de las enfermedades devastadoras como el cáncer; y de esta manera ejercen

un riguroso control sobre las proteínas que conforman la maquinaria reguladora del **ciclo celular**. La modulación de la abundancia de estas proteínas, como las *ciclinas*, es crucial para la progresión del ciclo y es uno de los medios por los que las células controlan su proliferación. En la figura 28 se resume el control dual, positivo y negativo, de la colección de factores que actúan sobre las etapas de la división celular. Este control dual asegura que cada *ciclina* alcance el nivel necesario para activar su correspondiente *quinasa* —*dependiente de ciclina* (CDK)— durante la fase correcta del ciclo celular. Por ejemplo, la *ciclina E* tiene bajos niveles durante las fases primeras de  $G_1$ , alcanza su máximo nivel en las fases finales de  $G_1$ , activa la *CDK2* durante la transición  $G_1 \rightarrow S$ , y desciende nuevamente durante las fases S,  $G_2$  y M del ciclo. Este perfil de expresión refleja la importancia del complejo *ciclina E-CDK2* en la promoción de la iniciación de la replicación del genoma durante la fase S. Así pues, el control de la abundancia de *ciclina E* y de la actividad de la *quinasa* asociada son esenciales a la periódica puesta en marcha de la síntesis de DNA. Una insuficiente *ciclina E* ocasiona la detención celular en  $G_1$ , mientras que su exceso provoca la entrada prematura en la fase S, inestabilidad genómica y la formación de tumores.



**Figura 29.** Puntos de acción de la cocaína sobre la actividad neurotransmisora de la dopamina.

De otro lado, se ha señalado recientemente la existencia en el hombre de proteínas, conocidas como Fbw7 o hCdc4 —perteneciente a la familia de proteínas F-box—, que actúan como adaptadoras entre la ciclina E y una ubiquitina ligasa que, al catalizar la ubiquitinación, introduce la señal adecuada para la rápida degradación del sustrato por el proteosoma 26S.

Los defectos moleculares del cáncer asociados a mutaciones de Fbw7/hCdc4 han suministrado información acerca de las circunstancias en las que ciertos tumores poseen elevados niveles de ciclina E en ausencia de un incremento de su amplificación génica o de la producción de mRNA. De otro lado, la proteína supresora de tumores pRb protege la transcripción de ciclina E; y el inhibidor p27, supresor de tumores, bloquea la actividad del complejo ciclina E-CDK2. Y las formas aberrantes de estas proteínas comparten la capacidad de promover la sobreactividad de ciclina E-CDK2, así como las consecuencias semejantes de desregular el crecimiento de las células conducentes al cáncer. De todo lo que puede concluirse que tanto los inhibidores de la actividad del complejo como los moduladores de la proteólisis dependiente de ubiquitina constituyen blancos singulares de los nuevos medicamentos anticancerosos.

En el seno del esquema de la regulación del **ciclo celular** hay que señalar la presencia singular de la quinasa *Cdk5* que no se activa durante la división celular. La actividad de *Cdk5* está restringida al sistema nervioso central y es dependiente de activadores específicos, tal como el p35 que se expresa solamente en las neuronas postmitóticas. La quinasa *Cdk5* se ha encontrado recientemente implicada en la desactivación de los cambios neurales del sistema nervioso central inducidos por la exposición crónica a la cocaína. Cambios celulares de múltiple naturaleza, a corto y a largo plazo, inducidos por su presencia en distintos momentos de la actuación de la dopamina. En la figura 27 aparece la influencia de los opiáceos sobre la recepción de dopamina y la actividad de la proteína quinasa A (PKA) que, a su vez, regula la fosfoproteína DARPP-32. Asimismo, en la figura 29 se representa el efecto de la cocaína sobre el retículo endoplásmico y la liberación de la subunidad AS que induce cambios morfológicos en el citoesqueleto.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, G.P. "Resolution of chronic inflammation by therapeutic induction of apoptosis". *TIPS*, 17, 1996, págs. 438-442.
2. Archelos, J.J., Previtali, S.C. y Hartung, H.P. "The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system". *TINS*, 22, 1999, págs. 30-38.
3. Ashkenazi, A. y Dixit, V.M. "Death Receptors: Signaling and Modulation". *Science*, 281, 1998, págs. 1305-1308.
4. Balla, T., Bondeva, T. y Várnai, P. "How accurately can we image inositol lipids in living cells?". *TIPS*, 21, 2000, págs.238-241.
5. Bartek, J. y Lukas, J. "Order from Destruction". *Science*, 294, 2001, págs. 66-67.
6. Belham, C., Wu, S. Y Avruch, J. "Intracellular signalling: PDK1 – a kinase at the hub of things". *Current Biology*, 9, 1999, págs. R93-R96.
7. Bos, J.L. y Zwartkruis, F.J.T. "Rhapsody in G proteins". *Nature*, 400, 1999, págs. 820-821.
8. Bos, J.L., Rooij, J. y Reedquist, K.A. "RAP1 signalling: adhering to new models". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 369-377.
9. Bratton, S.B. y Cohen, G.M. "Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego?". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 306-315.
10. Canman, C.E. y Kastan, M.B. "Three paths to stress relief". *Nature*, 384, 1996, págs. 213-214.
11. Carmeliet, P. "Creating unique blood vessels". *Nature*, 412, 2001, págs. 868-869.
12. Cary, L.A. y Cooper, J.A. "Molecular switches in lipid rafts". *Nature*, 404, 2000, págs.945-947.
13. Clarke, P.R. "Switching off MAP kinases". *Current Biology*, 4, 1994, págs. 647-650.
14. Cohen, P. y Frame, S. "The renaissance of GSK3". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 769-776.
15. Cross, M.J. y Claesson-Welsh, L. "FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 201-207.
16. Cullen, P.J., Cozier, G.E., Banting, G. Y Mellor, H. "Modular phosphoinositide-binding domains – their role in signalling and membrane trafficking". *Current Biology*, 11, 2001, págs. R882-R893.
17. De Blasi, A., Conn, P.J., Pin, J.P. y Nicoletti, F. "Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs.114-120.
18. De Laurenzi, V. y Melino, G. "The little devil of death". *Nature*, 406, 2000, págs 135-136.
19. Dekker, L.V. y Segal, A.W. "Signals to move cells". *Science*, 287, 2000, págs.982-983.

20. Delhase, M., Li, Nanxin y Karin, M. "Kinase regulation in inflammatory response". *Nature*, 406, 2000, págs. 367-368.
21. Desai, B.J. y Gruber, H.E. "Anti-apoptotic actions of cytokines in mammalian cells". *Soc. Exp. Biol. Med.*, 221, 1999, págs. 1-13.
22. Dhavan, R. Y Tsai, L.H. "A decade of CDK5". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 749-757.
23. Downes, C.P. y Currie, R.A. "Lipid signalling". *Current Biology*, 8, 1998, págs. R865-R867.
24. Edwards, S.W., Tan, Ch.M. y Limbird, L.E. "Localization of G-protein-coupled receptors in health and disease". *TIPS*, 21, 2000, págs. 304-308.
25. Evan, G.I. y Vousden, K.H. "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer". *Nature*, 411, 2001, págs. 342-348.
26. Ferrel, J.E. "Six steps to destruction". *Nature*, 414, 2001, págs. 498-499.
27. Foord, S.M. y Marshall, F.H. "RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors". *TIPS*, 20, 1999, págs. 184-187.
28. Funk, C.D. "Prostaglandins and Leukotrienes: advances in Eicosanoid Biology". *Science*, 294, 2001, págs. 1871-1875.
29. Giancotti, F.G. y Ruoslahti, E. "Integrin Signaling". *Science*, 285, 1999, págs. 1028-1032.
30. Golstein, P. "Cell death: TRAIL and its receptors". *Current Biology*, 7, 1997, págs. R750-R753.
31. Gottlieb, R.A. y Kitsis, R.N. "Seeing death in the living". *Nature Medicine*, 7, 2001, págs. 1277-1278.
32. Green, D.R. "Death deceiver". *Nature*, 396, 1998, págs. 629-630.
33. Greenberg, Ph.D. y Riddell, S.R. "Deficient cellular Immunity – Finding and Fixing the Defects". *Science*, 285, 1999, págs. 546-551.
34. Greengard, P. "The Neurobiology of slow Synaptic Transmission". *Science*, 294, 2001, págs. 1024-1029.
35. Gu, H., Saito, K., Klaman, L.D., Shen, J., Fleming, T., Wang, Y.P., Pratt, J.C., Lin, G., Lim, B., Kinet, J.P. y Neel, B.G. "Essential role for Gab2 in the allergic response". *Nature*, 412, 2001, págs. 186-200.
36. Hannun, Y.A. "Functions of Ceramide in Coordinating Cellular Responses to Stress". *Science*, 274, 1996, págs. 1855-1859.
37. Harper, J.W. "Protein destruction: adapting roles for Cks proteins". *Current Biology*, 11, 2001, págs. R431-R435.
38. Hemmings, B.A. "PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> get its Message across". *Science*, 277, 1997, pág. 534.
39. Hepler, J.R. "Emerging roles for RGS proteins in cell signalling". *TIPS*, 20, 1999, págs. 376-382.
40. Holcik, M. Y Korneluk, R.G. "XIAP, the guardian angel". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 550-556.
41. Holtzman, D.M. y Deshmukh, M. "Caspases: a treatment target for neurodegenerative disease?". *Nature Medicine*, 3, 1997, págs. 954-955.
42. Howard, M.C., Spack, E.G., Choudhury, K., Greten, T.F. y Schneck, J.P. "MHC-based diagnostics and therapeutics – clinical applications for disease-linked genes". *Immunology Today*, 20, 1999, págs. 161-168.
43. Howard, A.D., McAllister, G., Feighner, S.D., Liu, Q., Nargund, R.P., Van der Ploeg, L.H.T. y Patchett, A.A. "Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 132-139.
44. Hunot, S. y Flavell, R.A. "Death of a Monopoly?". *Science*, 292, 2001, págs. 865-866.
45. Ilangumaran, S., He, H.T. y Hoessli, D. "Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins". *Immunology Today*, 21, 2000, págs. 2-6.
46. Irvine, R.F. y Schell, M.J. "Back in the water: the return of the inositol phosphates". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 327-337.
47. Janetopoulos, C., Jin, T. y Devreotes, P. "Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells". *Science*, 291, 2001, págs. 2408-2411.
48. Jarvis, S.E. y Zamponi, G.W. "Interactions between presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 519-525.
49. Jones, N., Iljin, K., Dumont, D.J. y Alitalo, K. "TIE receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 257-267.
50. Kaplan, H.J., Leibole, M.A., Tezel, T. y Ferguson, T.A. "Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina". *Nature Medicine*, 5, 1999, págs. 292-297.
51. Kastan, M.B. "Checking two steps". *Nature*, 410, 2001, págs. 766-767.
52. Kloetzel, P.M. "Antigen processing by the proteasome". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 179-187.
53. Kemp, B.E., Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Michell, B.J., Chen, Z. Y Witters, L.A. "Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase". *TIBS*, 24, 1999, págs. 22-26.
54. Kovanen, P.E. y Leonard, W.J. "Cytokine signaling: Inhibitors keep cytokines in check". *Current Biology*, 9, 1999, págs. R899-R902.
55. Kumanogoh, A. y Kikutani, H. "The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation". *Trends in Immunology*, 22, 2001, págs. 670-676.
56. Los, M., Stroh, Ch., Jänicke, R.U., Engels, I.H. y Schulze-Osthoff, K. "Caspases: more than just killers?". *Trends in Immunology*, 22, 2001, págs. 31-



- 34.
57. Lüscher, Ch. Y Frerking, M. "Restless AMPA receptors: implications for synaptic transmission and plasticity". *Trends in Neurosciences*, 24, 2001, págs. 665-670.
  58. Marinissen, M.J. y Gutkind, J.S. "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 368-376.
  59. Marshall, F.H., Jones, K.A., Kaupmann, K. Y Bettler, B. "GABA<sub>B</sub> receptors – the first 7TM heterodimers". *TIPS*, 20, 1999, págs. 396-399.
  60. Martín Municio, Á. "Cell signal transduction. Second messengers and protein phosphorylation in health and disease". En *Cell Signal Transduction, Second Messengers, and Protein Phosphorylation in Health and Disease*. A.M.Municio y M.T.Miras-Portugal ed., págs. 1-22. Plenum Press, New York, 1994.
  61. Martín Municio, Á. "Medicamentos viejos para enfermedades nuevas". En *Horizontes Culturales. Las Fronteras de la Ciencia*. Real Academia de Ciencias. Espasa. (1998).
  62. Milligan, G. y White, J.H. "Protein-protein interactions at G-protein-coupled receptors". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 513-518.
  63. Muth, J.N., Varadi, G. Y Schwartz, A. "Use of transgenic mice to study voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 526-531.
  64. Nicholson, D.W. y Thornberry, N.A. "Caspases: killer proteases". *TIBS*, 22, 1997, págs. 299-306.
  65. O'Connell, J., Houston, A., Bennett, M.W., O'Sullivan, G.C. y Shanahan, F. "Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma". *Nature Medicine*, 7, 2001, págs. 271-274.
  66. Ostberg, J.R., Barth, R.K. y Frelinger, J.G. "The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43". *Immunology Today*, 19, 1998, págs. 546-549.
  67. Pawlowski, J. y Kraft, A.S. "Bax-induced apoptotic cell death". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 2000, págs. 529-531.
  68. Pomerantz, J.L. y Baltimore, D. "A cellular rescue team". *Nature*, 406, 2000, págs.26-28.
  69. Prieschl, E.E. y Baumruker, T. "Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling". *Immunology Today*, 11, 2000, págs. 555-560.
  70. Redegeld, F.A., Caldwell, C.C. y Sitkovsky, M.V. "Ecto-protein kinases: ectodomain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation?". *TIPS*, 20, 1999, págs. 453-459.
  71. Revillard, J.P., Adorini, L., Goldman, M., Kabelitz, D. y Waldmann, H. "Apoptosis: potential for disease therapies". *Immunology Today*, 7, 1998, págs. 291-293.
  72. Rich, B.E. y Kupper, T.S. "Cytokines: IL-20 – a new effector in skin inflammation". *Current Biology*, 11, 2001, págs. R531-R534.
  73. Riedl, S.J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G.S. y Bode, W. "Structural basis for the activation of human procaspase-7". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 2001, págs. 14790-14795.
  74. Rothwell, N.J. y Luheshi, G.N. "Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target". *TINS*, 23, 2000, págs. 618-625.
  75. Rudolph, U., Crestani, F. Y Möhler, H., "GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 188-194.
  76. Scales, S.J., Finley, M.F.A. y Scheller, R.H. "Fusion without SNAREs?". *Science*, 294, 2001, págs.1015-1016.
  77. Skerry, T.M. y Genever, P.G. "Glutamate signalling in non-neuronal tissues". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 174-181.
  78. Somlo, S. Y Ehrlich, B. "Human disease: calcium signaling in polycystic kidney disease". *Current Biology*, 11, 2001, págs. R356-R360.
  79. Stenmark, H. "Membrane traffic: Cycling lipids". *Current Biology*, 10, 2000, págs. R57-R59.
  80. Taniguchi, T. y Takaoka, A. "A weak signal for strong responses: interferon- $\alpha/\beta$  revisited". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 378-386.
  81. Tao, H.W. y Poo, M. "Retrograde signaling at central synapses". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 2001, págs. 11009-11015.
  82. Taylor, C.W. y Thom, P. "Calcium signalling: IP<sub>3</sub> rises again and again", *Current Biology*, 11, 2001, págs. R352-R355.
  83. Thien, C.B.F. y Langdon, W.Y. "CBL: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases". *Nature Reviews*, 2, 2001, págs. 294-304.
  84. Thrasher, A.J., Jones, G.E., Kinnon, Ch., Brickell, P.M. y Katz, D.R. "Is Wiskott-Aldrich syndrome a cell trafficking disorder?" *Immunology Today*, 19, 1998, págs. 537-539.
  85. Vandenberg, J.I. y Lummis, S.C.R. "Ion channels – a plethora of pharmaceutical targets". *TIPS*, 21, 2000, págs. 409-410.
  86. Vaux, D.L. y Strasser, A. "The molecular biology of apoptosis". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 1996, págs. 2239-2244.
  87. Volk, H.D., Asadullah, K., Gallagher, G., Sabat, R. Y

- Grütz, G. "IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic agents". *Trends in Immunology*, 22, 2002, págs. 414-417.
88. Wertz, I.E. y Hanley, M.R. "Diverse molecular provocation of programmed cell death". *TIBS*, 21, 1996, págs. 359-364.
89. Weston, C.R. y Davis, R.J. "Signaling specificity – a complex affair". *Science*, 292, 2001, págs. 2439-2440.
90. Whitmarsh, A.J. y Davis, R.J. "Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals". *TIBS*, 23, 1998, págs. 481-485.
91. Wilcox, R.A., Primrose, W.U., Nahorski, S.R., y Challiss, R.A.J. "New developments in the molecular pharmacology of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor". *TIPS*, 19, 1998, págs. 467-475.
92. Wilkie, T.M. "G protein signaling: Satisfying the basic necessities of life". *Current Biology*, 10, 2000, págs. R853-R856.
93. Wilkie, T.M. "Treasures throughout the life-cycle of G-protein-coupled receptors". *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 2001, págs. 396-397.
94. Wurgler-Murphy, S.M. y Saito, H. "Two-component signal transducers and MAPK cascades". *TIBS*, 22, 1997, págs. 172-177.
95. Wymann, M.P., Sozzani, S., Altruda, F., Mantovani, A. y Hirsch, E. "Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function". *Trends in Immunology Today*, 21, 2000, págs. 260-263.
96. Zheng, T.S. y Flavell, R.A. "Death by numbers". *Nature Biotechnology*, 18, 2000, págs. 717-718.
97. Zwick, E., Hackel, P.O., Prenzel, N. y Ullrich, A. "The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems". *TIPS*, 20, 1999, págs. 408-412.