

Curso 2010/11
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/15
I.S.B.N.: 978-84-15287-36-0

TILMAN E. KLASSERT

**Expresión y regulación de las taquicinas
en células del sistema inmune:
implicación en el inicio y/o progresión del asma**

Directores

**MARIANO HERNÁNDEZ FERRER
TERESA ACOSTA ALMEIDA**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

**“The most important thing
is not any one particular piece, but finding enough pieces
and enough connections between them
to recognize the whole picture”**

Christiane Nüsslein-Volhard

A mis amigos,

A mi familia,

A Cristina.

AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer, de todo corazón, la inestimable ayuda que he recibido durante el periodo de elaboración de esta tesis doctoral, tanto por parte de diferentes instituciones, como por parte de numerosas personas que ahora tengo el placer de llamar amigos.

A Mariano Hernández Ferrer y Teresa A. Acosta, mis directores de tesis, que me han dirigido con inteligencia y paciencia, donde no sólo enseñaron con palabras, sino predicaron con ejemplo. Un ejemplo que aspiraré seguir, vaya donde vaya. Gracias por toda la dedicación todos estos años!!!

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Genética, mil gracias por hacer tan agradable estar ahí, en nuestro segundo hogar. A Mercedes (la loca de los matorrales, mi lemur preferido), gracias por tu amistad, tu “locura” y por ser como eres. A mi amiguita Verónica (Veroniki), cómo echaré en falta nuestras bromas y tu risa. A Haridian, por los ratos en el labo y fuera de él..... gracias a todos!

A todos los que han pasado por el laboratorio a lo largo de estos años: Juana, Fran, Nazaret, Martita, Anita Palmero, Jacob, María del Mar, Noemí, Cristina, Martina K Pec, Elena Millán....

También quiero agradecer la ayuda tantas veces prestada por los miembros del maravilloso Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales (“IUETSPC” para los amigos). A los parasitólogos Cris Pou, María (Mary to the query), Emma, María Ynigo, Rachel, Toña, Ana Cristina (la española), Merche, Gara, Víctor, Pili, Aarón, Néstor, Cristina, Nuria, Nieves, Marino, Jacob, Carmen, Atteneri, Ariadna, Ángela, Ana RoGracias a todos!!!!

Gracias a los “jefazos”, Basilio Valladares y Enrique Martínez, por haberme permitido desarrollar este trabajo en un centro puntero como el que tenemos. Mil gracias a Elena Figueruelo,....que habría yo hecho sin ti y tus conocimientos!!! Y a Natalia, gracias!!! Y Montse de Investigación....mil gracias!!!

Gracias a todos los profesores cuya pasión en la enseñanza me han motivado hasta llegar aquí hoy: Margarita, Enrique Meléndez-Hevia, Melo, Javier Corzo..... A tí José Antonio, por todos esos buenos momentos y discusiones científicas.

A quienes iniciaron la línea de las taquicininas en nuestro laboratorio, Luz Candenas y Francisco Pinto, y a los que me han ayudado a lo largo del apasionante mundo de la genética de los neuropéptidos....gracias por todo Juan (viejiño)!!!! Gracias también a toda la gente de Anatomía Patológica: Beatriz Esquivel (Lala), Luisa, Manolo..... A Orlando Acosta y su equipo de Neumología. A Aixa, Idaira y Yurena de Citología, gracias a todos!!! Y a tí Carlos Flores, por todos esos consejos!!!

A la Dra. Rameshwar por acogerme en su laboratorio de la UMDNJ, y a los maravillosos compañeros que allí tuve, Shyam, Phil, Ash, Steve.

AGRADECIMIENTOS

A Nino, Pepe y Ramón, por todas esas bromas diarias, y por darme litros y litros de vuestra sangre. Gracias!!! A Mary Light e Idaimis, qué divertido es el pasillo del Instituto con ustedes.

A mis amigos (esos de toda la vida): Fernando, Roberto, Javi Zurdo, Marquetes, Matti Matt, Ivancete, Danilovic, Manuel,..... ustedes han llenado mi vida en estos años.

A mi familia, mis padres Roland y Kirsten, mis hermanas Maren y Maike, mis abuelos Wolfgang y Marlies, gracias por estar ahí siempre!!!

Y muy especialmente, a quien ha compartido mi día a día durante todos estos años,.....gracias Cris, ...gracias Bi. Gracias por poder contar contigo siempre, por tus ánimos cuando los míos se agotaban, tu sonrisa, tu bondadpor ser tú, siempre.

Por último, también quiero agradecer la financiación recibida por parte del Ministerio de Educación y Ciencia, en forma de beca FPU.

ABREVIATURAS



- 5-LO/15-LO:** 5- y 15- lipo-oxigena
- A_{xxx}:** absorbancia a XXX nm
- AA:** ácido araquidónico
- ab:** anticuerpo
- AChE:** acetilcolinesterasa
- ADNc:** ADN complementario
- AH:** acetil-hidrolasa
- AMPc:** adenosín monofosfato cíclico
- ARNm:** ARN mensajero
- AT:** acetil-transferasa
- BAL:** lavados broncoalveolares
- BSA:** albúmina de suero bovino
- Ca⁺⁺:** calcio
- CBR1:** carbonil reductasa 1
- CCR3:** el receptor de quimioquinas C-C tipo 3
- CEU:** residentes de Utah con ancestros del Norte y Oeste de Europa
- CI:** intervalos de confianza del 95%
- CLC:** cristales de Charcot-Leyden
- COX1/2:** ciclo-oxigenasa 1/2
- CTCF:** factor de unión a CTC
- CV:** coeficiente de variación
- CysLTR1, CysLTR2:** receptor de cisteinil-leucotrienos 1/2
- CysLTs:** cisteinil-leucotrienos
- D1, D2:** receptor de PGD₂ 1/2
- DAB:** tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina
- DAG:** diacilglicerol
- dbAMPc:** dibutiril-AMP-cíclico
- ddNTPs:** didesoxinucleótidos
- DEPC:** dietil-piro-carbonato
- DMSO:** dimetil sulfóxido
- dNTPs:** desoxinucleótidos
- DSMZ:** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
- ECP:** proteína catiónica de eosinófilos
- EDN:** neurotoxina derivada de eosinófilos
- EDTA:** etilendiaminotetraacético
- EIA:** inmunoensayo enzimático
- EKA/EKB/EKC/EKD:** endocinas A/B/C/D
- EP1, EP2, EP3, EP4:** receptor de la PGE₂ 1/2/3/4
- EPX:** peroxidasa de eosinófilo
- ER:** expresión relativa
- ES:** error estándar

- EtOH:** etanol
- FBS:** suero bovino fetal
- FLAP:** proteína activante de 5-LO
- FN:** fibronectina
- GPCRs:** receptores asociados a proteína G
- HK-1:** hemocinina 1
- HPETE:** ácido hidroperoxieico-satetraenoico
- hPGDs, PGEs, PGFs:** prostaglandina D/E/F sintasa
- HPRT1:** hipoxantina fosforribosiltransferasa 1
- HRP:** peroxidasa de rábano
- ICAM-1:** molécula de adhesión inter-celular 1
- Ig:** Inmunoglobulina
- IL-X:** interleucina X
- iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible
- IP3:** inositol trifosfato
- LD:** desequilibrio de ligamiento
- LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄:** leucotrieno A₄/B₄/C₄/D₄/E₄
- LTA4h:** leucotrieno A₄ hidrolasa
- LTA₄s/LTC₄s:** LTA₄-sintasa/ LTC₄-sintasa
- LTB4R1, LTB4R2:** receptor de LTB₄ 1/2
- LXA₄:** lipoxina A₄
- MAF:** frecuencia del alelo minoritario
- MBP:** proteína mayor básica
- MCP:** proteína quimiotáctica de monocitos
- MIP-1β/1α:** proteína inflamatoria de macrófagos 1β/1α
- M-MLV:** retrotranscriptasa del virus Moloney de la leucemia murina
- MPO:** mieloperoxidasa
- NANC:** no-adrenérgico, no-colinérgico
- NEP:** neutral-endorpeptidasa
- NGF:** factor de crecimiento nervioso
- NK1R/NK2R/NK3R:** receptores de neurocinina 1, 2 y 3
- NKA/NKB:** neurocinina A/B
- NPK/NPγ:** neuropéptidos K/ γ
- NSRF/REST:** elemento-silenciador-restrictivo-de-neuronas
- o.n.:** durante toda la noche
- OR:** odds ratios
- PAF:** factor de activación de plaquetas
- PAFR:** receptor de PAF
- PBL:** linfocitos de sangre periférica
- PBS:** tampón fosfato salino
- PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

-
- PGG₂, PGH₂, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}**: prostaglandina G₂/H₂/D₂/E₂/F_{2α}
- PHA**: fitohemaglutinina
- PKA/PKC**: proteínas quinasas A/C
- PLA/PLC/PLD**: fosfolipasa A/C/D
- PMA**: forbol miristato acetato
- PMN**: células polimorfonucleares (neutrófilos)
- PPIB**: peptidil-propil isomerasa B
- PPP1CB**: isoforma β de subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1
- PPT**: Preprotaquicinas
- RT**: retrotranscripción
- SAP**: Fosfatasa Alcalina de Camarón
- SBE**: extensión de base única
- SNC**: sistema nervioso central
- SNPs**: polimorfismos de nucleótido único
- SP**: Sustancia P
- T-25/T-75**: botellas de cultivo de 25/75 cm² de superficie
- TE**: Tris-EDTA
- TGF-β1**: factor de crecimiento transformante β1
- TM**: dominios transmembrana
- TNF-α**: factor de necrosis tumoral α
- TXA₂/TXB₂**: tromboxano A₂/B₂
- TXAs**: tromboxano A sintasa
- VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE DE CONTENIDOS



INTRODUCCIÓN

1. LAS TAQUICININAS	3
1.1. Estructura peptídica y genética de las taquicinas	3
2. LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS	8
3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y PATOLÓGICA DE LAS TAQUICININAS: ASPECTOS GENERALES	11
4. LAS TAQUICININAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA: EL MODELOS DEL ASMA	14
4.1. LAS TAQUICININAS EN LAS VÍAS AÉREAS	14
4.1.1. Origen neuronal de las taquicinas: LA INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA.....	15
4.1.2. Origen periférico de las taquicinas: LAS CÉLULAS INMUNES.....	18
4.2. COMUNICACIÓN BIDIRECCIONAL: SISTEMA INMUNE - SISTEMA NERVIOSO	19
4.2.1. Activación de las fibras nerviosas sensoriales	19
4.2.2. Actividad Inmunomoduladora de las taquicinas	19
4.2.3. Los eosinófilos: modelo de estudio de la interacción neuroinmune.....	23
OBJETIVOS	31

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS EN SANGRE PERIFÉRICA	35
1.1. DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE TAC3 Y TAC4	
EN LAS CÉLULAS INMUNES	35
1.1.1. AISLAMIENTO DE LAS ESTIRPES CELULARES	35
1.1.2. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TAC3, TAC4, Y DE TAC1R, TAC2R Y TAC3R	38
1.1.2.1. Extracción de ARN total	38
1.1.2.2. Transcripción reversa (RT)	39
1.1.2.3. Diseño de cebadores.....	39

1.1.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
1.1.2.5. Secuenciación	41
1.2. EXPRESIÓN RELATIVA DE <i>TAC3</i> Y <i>TAC4</i> EN LINFOCITOS Y PHA-LINFOCITOS	42
1.2.1. PCR cuantitativa a Tiempo Real (qPCR).....	42
1.2.2. Cálculo de la expresión relativa.....	43
1.2.3. Análisis estadístico	43
1.3. DETECCIÓN DEL PÉPTIDO NKB EN LAS DIFERENTES ESTIRPES CELULARES	43
1.3.1. Preparación y fijación de muestras	43
1.3.2. Tinción inmunocitoquímica	44
1.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL GLUCOCORTICOIDE BUDESONIDA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS TAQUICININAS EN SANGRE PERIFÉRICA	45
1.4.1. Muestras biológicas.....	45
1.4.2. Ensayo de estimulación con Budesonida	45
1.4.3. Detección de la expresión génica de las taquicininas	45
1.4.4. Análisis estadístico	46
2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES COMUNES DE <i>TAC1</i>, <i>TAC3</i> Y <i>TAC4</i> CON EL ASMA	47
2.1. Participantes en el estudio	47
2.2. Extracción de ADN	47
2.3. Selección de polimorfismos.....	47
2.4. Genotipado	48
2.5. Análisis de datos	51
3. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR EOSINOFÍLICA EoL-1	52
3.1. TÉCNICAS DE CULTIVO: Expansión, congelación y descongelación	52
3.2. DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR EoL-1	53
3.3. ENSAYO DE ESTIMULACIÓN CON SP	54
3.3.1. Condiciones de cultivo.....	54
3.3.2. Estudio de la expresión génica de mediadores en el asma.....	55
3.3.3. Detección de PGF2 α en el sobrenadante.....	58

RESULTADOS

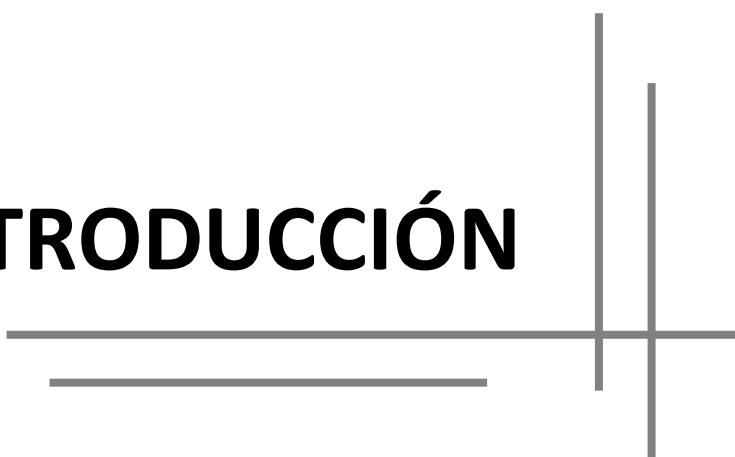
1. EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS EN SANGRE PERIFÉRICA	61
1.1. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS	61
1.2. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TAC3 Y TAC4.....	61
1.3. DETECCIÓN DEL PÉPTIDO NKB	63
1.4. EFECTO DE LA BUDESONIDA EN LA EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS EN SANGRE PERIFÉRICA	65
2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES COMUNES DE TAC1, TAC3 Y TAC4 CON EL ASMA	68
3. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR EOSINOFÍLICA EoL-1	72
3.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS TAQUICININAS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR	72
3.2. EFECTO INMUNOMODULADOR DE SP EN LA LÍNEA CELULAR EOSINOFÍLICA EoL-1	74
3.2.1. MODULACIÓN DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO POR SP.....	75
3.2.1.1. Detección de PGF2 α en el sobrenadante de los cultivos.....	78
3.2.2. EFECTO DE SP SOBRE LA EXPRESIÓN DE CCR3 Y PAFAH.....	79
3.2.3. EL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FIBRONECTINA.....	80

DISCUSIÓN

1. EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS EN CÉLULAS INMUNES, REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN MEDIADA POR BUDESONIDA Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS	87
2. EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS Y SUS RECEPTORES DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE ESTIRPES LINFOIDES Y MIELOIDES.....	93
3. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR EOSINOFÍLICA EoL-1	96

CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXOS	143
ARTÍCULOS RELACIONADOS	155

INTRODUCCIÓN



1. LAS TAQUICININAS

En su laboratorio de Hampstead (Londres), el estudiante de postgrado U.S. von Euler y J.H. Gaddum descubren en 1931 un preparado extraído de intestino de caballo que era capaz de provocar vasodilatación y contracción muscular en conejos. Cinco años más tarde se constata que aquel había sido el descubrimiento de la primera taquicinina en mamíferos, a la que se dio el nombre de Sustancia P (SP) (von Euler & Gaddum, 1931). Hubo que esperar unos cuarenta años hasta lograr su purificación y caracterización química (Chang & Leeman, 1970), y no fue hasta la década de los ochenta cuando se descubrieron otras taquicininas, como la neurocinina A (NKA) y la neurocinina B (NKB) (Kimura et al, 1983; Kangawa et al, 1983; Nawa et al, 1984). Sin embargo, aquel fue el punto de partida para un sinnúmero de investigaciones y esfuerzos por caracterizar esta nueva familia de péptidos, considerados durante muchos años como neuropéptidos de origen exclusivamente neuronal. En este sentido, tanto el hallazgo de fuentes no-neuronales de estos péptidos, como el descubrimiento de nuevas taquicininas en los últimos años, y su implicación en el desarrollo de numerosas patologías, suscitan cada vez mayor interés en la comunidad científica.

1.1. ESTRUCTURA PEPTÍDICA Y GENÉTICA DE LAS TAQUICININAS

Las taquicininas son una familia de péptidos de pequeño tamaño que están relacionados estructuralmente y conservados a lo largo de la evolución. Por definición, las taquicininas comparten una región hidrofóbica C-terminal conservada, FXGLM-NH₂, donde X es siempre un residuo hidrofóbico y la metionina final está amidada (Almeida et al, 2004) (ver tabla 1). Esta zona hidrofóbica del péptido es determinante en la activación de los receptores taquicinérgicos (Maggi, 1995; Cascieri et al, 1992), mientras que en el extremo N-terminal, las taquicininas poseen regiones divergentes e hidrofílicas que parecen estar implicadas en la especificidad hacia un determinado receptor (Ingi et al, 1991).

Todas las taquicininas conocidas están codificadas por tres genes: *TAC1*, *TAC3*, y el recientemente descubierto *TAC4*. Estos genes también son conocidos por el nombre de Preprotaquicininas (*PPT*) A, B y C, respectivamente (Almeida et al, 2004). En todos los casos,

a partir de cada gen, y por acción de la *ARN polimerasa II*, se genera un transcrito primario de ARNm. Este transcrito sufrirá transformaciones de corte y empalme para dar lugar a nuevos transcritos más cortos, con distintas combinaciones de los exones originales (Pennefather et al, 2004; Page, 2005). La traducción del ARNm maduro, genera un largo polipéptido llamado pre-propéptido, que consiste en un péptido señal, una o varias copias de neuropéptido, y una o varias partes espaciadoras. El péptido señal permite la unión e introducción del precursor en el retículo endoplasmático, para posteriormente ser eliminado, generándose el propéptido. Éste, a su vez, es transportado al aparato de Golgi, donde los espaciadores son eliminados (Pennefather et al, 2004) (ver figura 1). Generalmente, el precursor peptídico de las taquicininas presenta dos lugares de corte dibásicos que flanquean la secuencia peptídica final, y que son diana de diferentes enzimas que cortan al precursor a este nivel. Por un lado, convertasas de prohormonas cortan la diana dibásica en el lado amino-terminal (Seidah & Prat, 2002; Page, 2004). Posteriormente, una carboxi-peptidasa elimina los residuos dibásicos C-terminales, y una enzima peptidil-glicina α -amidante convierte la glicina expuesta en una amida C-terminal (Eipper et al, 1992; Page, 2004). Una vez concluido este procesamiento a nivel post-transcripcional y post-traducciona, obtenemos la secuencia definitiva, que se presenta en la mayoría de los casos como decapeptido o undecapeptido (ver tabla 1). Sin embargo, también podemos encontrar formas más cortas de las taquicininas, resultado de la degradación enzimática por parte de enzimas endógenas, como la neutral-endopeptidasa (NEP) (Joos et al, 2000; Marvizon et al, 2003).

GEN	PÉPTIDO	SECUENCIA
<i>TAC1</i>	SP	RPKPQQFFGLM-NH ₂
<i>TAC1</i>	NKA	HKTDSFVGLM-NH ₂
<i>TAC1</i>	NPK	DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTDSEFVGLM-NH ₂
<i>TAC1</i>	NPγ	DAGHGQISHKRHKTDSEFVGLM-NH ₂
<i>TAC3</i>	NKB	DMHDFVGLM-NH ₂
<i>TAC4</i>	hHK-1	TGKASQFFGLM-NH ₂
<i>TAC4</i>	EKA	DGGEEQTLSTEAE TWIVALEEGAGPSIQLQLQEVKTGKASQFFGLM-NH ₂
<i>TAC4</i>	EKB	DGGEEQTLSTEAE TWEGAGPSIQLQLQEVKTGKASQFFGLM-NH ₂
<i>TAC4</i>	EKC	KKAYQLEHTFQGLL-NH ₂
<i>TAC4</i>	EKD	VGAYQLEHTFQGLL-NH ₂

Tabla 1.- Secuencia aminoacídica de las taquicininas humanas.

TAC1 (ó *PPT-A*) es el gen a partir del cual se generan SP, NKA, y los neuropéptidos K y γ (NPK y NPy) (Nawa et al, 1984; Carter, 1990). En humanos y ratas, este gen presenta siete exones, mientras que en ratones sólo encontramos seis. Existen cuatro procesamientos alternativos (α , β , γ , δ) para este gen en humanos (ver figura 1). Mientras el β *TAC1*-ARNm conserva todos los exones, el transcrito α carece del exón VI, el transcrito γ del exón IV, y el transcrito δ no presenta ni el exón IV ni el VI. SP está contenida en el exón III, NKA en el exón VI, mientras que la secuencia que codifica NPy abarca los exones III, V y VI, y la secuencia para NPK está contenida en los exones III, IV, V, y VI (Almeida et al, 2004; Page, 2005; Page et al, 2009). De ello se puede deducir, por ejemplo, que cualquiera de los transcritos es capaz de producir SP, mientras que NKA sólo puede ser codificado por las isoformas β y γ . Por tanto, la distribución cuantitativa de SP y NKA, va a estar en función del procesamiento alternativo de los pre-ARNm de *TAC1*. Recientemente, se ha descrito un posible modelo de regulación de este procesamiento de *TAC1* en células estromales de la médula ósea, mediante el cual el ratio SP:NKA estaría regulado por mecanismos que involucran tanto miARNs como proteínas de unión al ARN (RBPs por sus siglas en inglés) (Murthy et al, 2008).

El segundo gen de las taquicininas es *TAC3* o *PPT-B*, que codifica NKB (Kotani et al, 1986; Almeida et al, 2004). El homólogo de este gen en ratón (*TAC2*) presenta 8 exones, mientras que en ratas se han descrito 7. En humanos también se han descrito siete exones para *TAC3*, aunque nuevas evidencias han identificado un exón adicional entre los exones V y VI, al que se llamó V-a, y otros dos no-codificantes entre los exones VI y VII, a los que dio el nombre de VI-a y VI-b (ver figura 1). La secuencia que codifica NKB está localizada en el exón V (Page, 2005; Page et al, 2009).

Por último, cabe destacar un tercer gen *TAC4* o *PPT-C* (Zhang et al, 2000; Kurtz et al, 2002), descubierto inicialmente en ratones. La proteína que codifica se denominó hemocinina 1 (HK-1), dada su clara expresión en médula ósea y su implicación en la maduración de células B en esta especie. En humanos, este gen presenta una pequeña diferencia en su secuencia con respecto a los otros dos genes de taquicininas, ya que carece del punto de corte dibásico típico en el extremo N-terminal, por lo que se había sugerido una diana monobásica como lugar de corte (ver figura 2). Esto produciría dos posibles péptidos: HK-1 y HK-1(4-11) (Kurtz et al, 2002).

BIOSÍNTESIS DE LAS TAQUICININAS

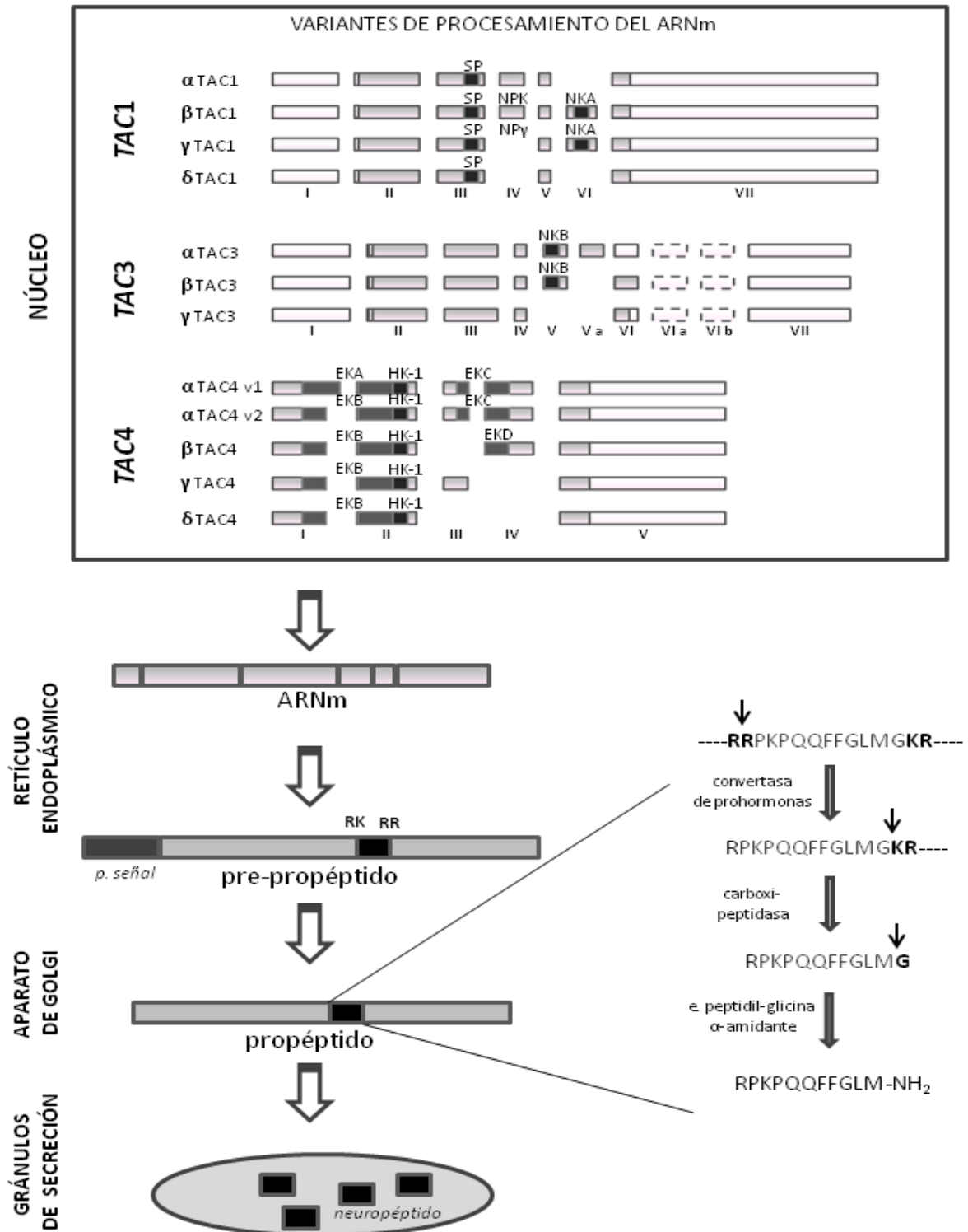


Figura 1.- Esquema típico de la síntesis de las taquicininas, incluyendo el procesamiento alternativo de los transcritos de *TAC1*, *TAC3* y *TAC4*, donde se representan los exones (rectángulos) indicándose en gris las regiones codificantes, y en negro la secuencia correspondiente a los principales productos codificados: SP, NKA, NKB y HK-1.

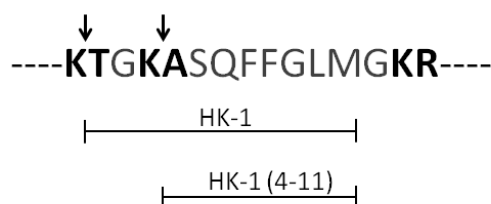


Figura 2.- Representación de las secuencias de HK-1 y HK(1-4) mostrando las dianas de corte monobásicas.

Page y cols. (2003) demostraron que el gen *TAC4* está formado por cinco exones en humanos, donde el procesamiento alternativo del ARNm se produce por inclusión o exclusión de los exones III y IV, de modo que pueden generarse cuatro posibles transcritos (α , β , γ , δ) (ver figura 1). La traducción de éstos, y la acción posterior de las convertasas/peptidasas genera la HK-1 propuesta por Kurtz y cols. (2002), codificada por el exón II presente en todas los transcritos. Adicionalmente, pueden generarse 2 formas extendidas de la HK-1, denominadas endocininas A (EKA) y B (EKB), que sí presentarían puntos de corte dibásicos (Page et al, 2003; Page, 2004). Además, estos autores proponen la creación de dos nuevas endocininas (EKC y EKD), con un motivo consenso distinto a las taquicininas tradicionales, FQGLL-NH₂, codificadas por las isoformas α y β , y con actividad biológica desconocida y discutida (Page et al, 2003; Page, 2004, Patak et al, 2008).

La actividad biológica de las taquicininas clásicas SP, NKA y NKB ha sido ampliamente estudiada, y está mediada, en la mayoría de los casos, por la unión de éstos péptidos a sus receptores: los receptores taquicinérgicos.

2. LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS

Los receptores de las taquicininas pertenecen a la superfamilia de receptores de membrana asociados a proteína G (GPCRs) (Regoli et al, 1994). En general, los GPCRs son capaces de reconocer una gran variedad de ligandos y estímulos del medio extracelular, transmitiendo esta información hacia el interior celular mediante la interacción con las proteínas G. Por medio de la activación de mensajeros secundarios, los GPCRs regulan una intrincada red de rutas de señalización (Woehler et al, 2009). La importancia de esta familia de receptores queda patente por el hecho de que los GPCRs son la diana de más de la mitad de los fármacos disponibles en el mercado (Minneman, 2001).

Los receptores pertenecientes a la superfamilia de los GPCRs se caracterizan por compartir la misma estructura, que incluye siete dominios transmembrana (TM I-VII), con tres lazos en la cara extracelular (E 1-3) y otros tres en la cara intracelular (C 1-3), un terminal amino en el exterior y un terminal carboxilo en el lado citosólico (Baldwin, 1993) (ver figura 3).

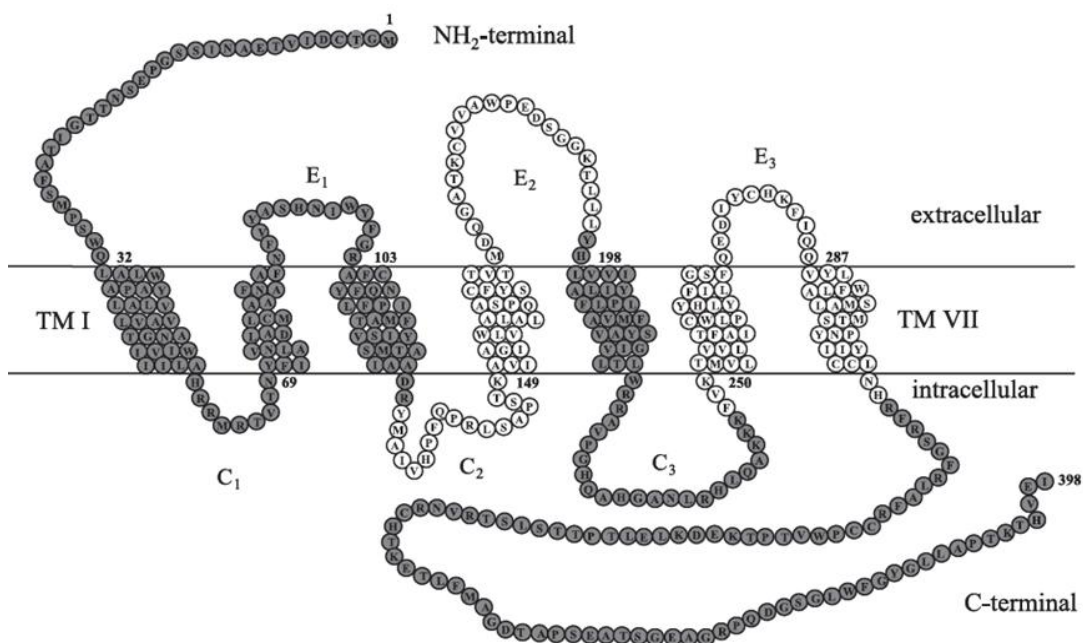


Figura 3.- Representación gráfica de la estructura de los receptores taquicinérgicos. En el dibujo se muestra al receptor NK2, especificando los dominios transmembrana y los lazos extracelulares e intracelulares (Pennefather et al, 2004).

Hasta la fecha, se han descrito tres receptores taquicinérgicos, denominados receptores de neurocinina 1, 2 y 3 (NK1R, NK2R y NK3R) (Nakanishi, 1991; Krause et al, 1994; Regoli et al, 1994; Maggi, 1995). En humanos, la longitud de su secuencia varía entre los distintos receptores, siendo de 407 residuos en NK1R, de 398 en NK2R y de 465 en NK3 (Gerard et al, 1990; Gerard et al, 1991; Takahashi et al, 1992). Las taquicininas naturales pueden interactuar indistintamente con cualquiera de los tres receptores taquicinérgicos, aunque las mayores afinidades se observan entre NK1R y SP, NK2R y NKA, y NK3R y NKB (Almeida et al, 2004).

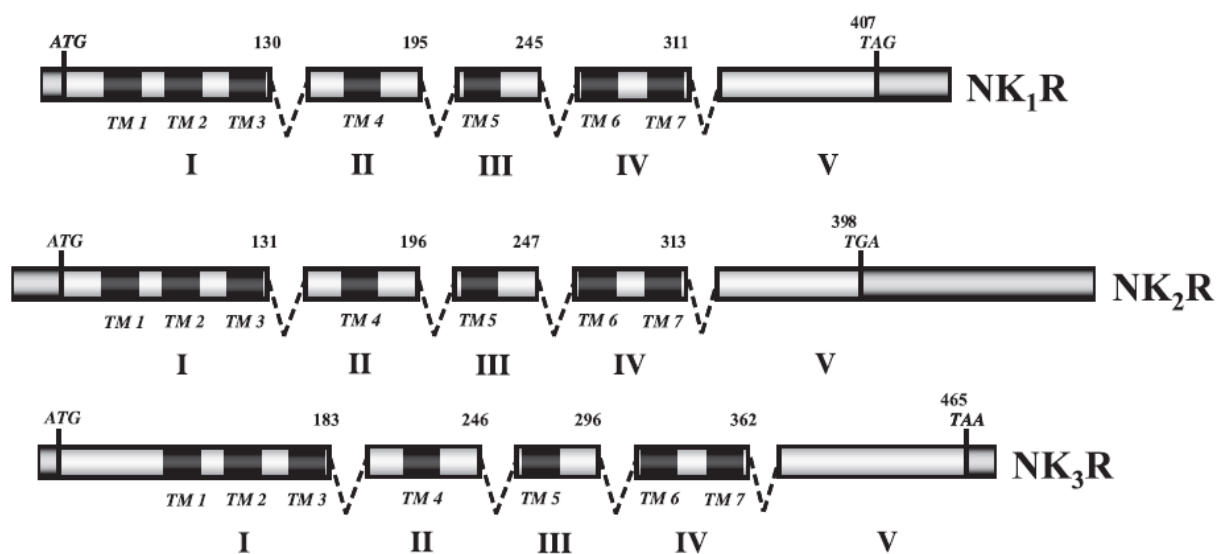


Figura 4.- Esquema de la organización de los genes que codifican los tres receptores taquicinérgicos NK1, NK2 y NK3, mostrando la ubicación de las secuencias correspondientes a cada dominio transmembrana (TM).

Los genes que codifican estos receptores son *TAC1R*, *TAC2R* y *TAC3R*, respectivamente. Cabe destacar el origen monofilético de estos genes como un aspecto evolutivo interesante. Artrópodos, nemátodos, urocordados y vertebrados apenas presentan diferencias en la secuencia nucleotídica, observándose este grado de conservación también con relación a la presencia y posición de los intrones. Además, estos genes presentan una estructuración similar entre ellos, distinguiéndose en cada uno de ellos cinco exones (Almeida et al, 2004, ver figura 4). El exón I codifica los dominios transmembrana (TM) I-III, C1 y E1, el exón II contiene la secuencia para C2, TM IV y E2, el exón III contiene TM V y C3, el exón IV codifica TM VI, E3 y TM VII, mientras que el exón V contiene el extremo C-terminal citoplasmático

(Almeida et al, 2004). Los genes codificantes de los receptores taquicinérgicos presentan intrones, siendo esto una característica poco habitual dentro de la familia de los GPCRs (Minneman, 2001). Precisamente esta característica de los receptores taquicinérgicos permite la formación de diferentes variantes del ARNm procesado, que podrían desempeñar funciones importantes tanto en su localización, tráfico intracelular y señalización. En este sentido, varios estudios indican la existencia de una isoforma del receptor NK1, que difiere en la longitud del extremo C-terminal, y que desempeña un importante papel tanto en la modulación de la respuesta inmune, como en la transformación oncogénica (Patel et al, 2005; Tuluc et al, 2009). Para NK2R, también se ha descubierto que existe un procesamiento alternativo del transcrito primario por el que se formaría una nueva variante NK2R- β . Sin embargo, se desconoce si esta variante da lugar a una proteína funcional (Candenas et al, 2002).

Al igual que en el resto de GPCRs, los mecanismos de señalización intracelular desencadenados por la unión de las taquicininas a sus receptores son complejos. Son muchas las posibles rutas de señalización que pueden ser activadas por GPCRs. La habilidad de los receptores taquicinérgicos de ser capaces de inducir diferentes rutas de transducción de señales, se explica por el hecho de que los GPCRs existen en equilibrio entre diferentes estados conformacionales activos (Almeida et al, 2004; Vauquelin et al, 2005). En ese modelo multiconformacional de los GPCRs, tanto el microambiente como el ligando parecen condicionar la conformación adoptada por el receptor, y por tanto la activación de una o más rutas de señalización. Entre éstas, se ha demostrado que los receptores taquicinérgicos son capaces de inducir respuestas que implican tanto las rutas mediadas por calcio (Ca^{++}) como por el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Quartara et al, 1997; Palanche et al, 2001; Valant et al, 2009). La proteína G responsable de la ruta de señalización que implica un aumento en las concentraciones de Ca^{++} es la proteína $G_{\alpha q}$, mientras que la proteína $G_{\alpha s}$ es la que activa las adenilato ciclasas (Palanche et al, 2001). Además, se ha visto que los receptores taquicinérgicos también pueden asociarse a la proteína $G_{\alpha i}$, que es la responsable de la inhibición de las adenilato ciclasas (Ramkisson et al, 2006). Tras la activación de la proteína G, se inicia una cascada de transducción de señales. En el caso de los receptores taquicinérgicos, los mensajeros secundarios implicados en estas posibles cascadas incluyen las proteínas quinasas A (PKA) o C (PKC), Ras, Raf-1, MAP/ERK quinasas o

NFκB (Krause et al, 1993; Palanche et al, 2001; Williams et al, 2007). Estudios recientes también han demostrado una cascada inducida por activación de NK1R que envuelve PI3K-Akt (Corcoran et al, 2008; Janelsins et al, 2009). Sin embargo, la ruta de transducción de señales clásica y más documentada del receptor NK1, es la que se inicia con fosfolipasa C (PLC) como mensajero secundario, produciendo inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), con posterior liberación de Ca^{++} y activación de PKC (Klassert et al, 2010).

Además de poder unirse a las diferentes variantes de los receptores taquicinérgicos, cabe destacar que también se han descrito mecanismos de acción de las taquicininas que son independientes de los receptores taquicinérgicos (Kroegel et al, 1990; Cocchiara et al, 1997; Grant et al, 2002). Así por ejemplo, se han identificado receptores atípicos de SP acoplados a proteína $G_{\alpha i}$, PLC, fosfolipasa D (PLD) y MAP-quinasas (Kavelaars et al, 1994; Jeurissen et al, 1994). En otros casos, no se han identificado receptores selectivos y se ha visto que SP, a altas concentraciones, puede actuar directamente sobre la proteína G (Mousli et al, 1990; Columbo et al, 1996).

3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y PATOLÓGICA DE LAS TAQUICININAS: ASPECTOS

GENERALES

Como ya se ha indicado antes, la mayor parte de la actividad biológica de las taquicininas está mediada por su unión a los receptores taquicinérgicos. Por tanto, la acción de estos péptidos en nuestro organismo estará en función de la localización tanto de las taquicininas como de sus receptores.

Inicialmente, las taquicininas fueron consideradas como neuropéptidos debido a su amplia distribución en el sistema nervioso central (SNC) y periférico. Sin embargo, y sobre todo con el descubrimiento de las endocininas, está cambiando el concepto de las taquicininas como meros neurotransmisores restringidos a tejidos neuronales (Almeida et al, 2004). Así, aunque la expresión de los genes de las taquicininas presenta una localización principalmente neuronal (Holzer, 1988; Maggi & Meli, 1988), estudios recientes demuestran la expresión de *TAC1* en la práctica totalidad de tejidos humanos, destacando el corazón, el

colon, las glándulas mamarias, las células endoteliales y el cerebro (Linnik & Moskowitz, 1989; Page et al, 2003; Pinto et al, 2004), así como en la mayor parte de las células sanguíneas inmunes (Aliakbari et al, 1987; Ho et al, 1997; Lai et al, 1998; Lambrecht et al, 1999). Respecto a *TAC3*, se ha demostrado que NKB se expresa incluso en la placenta (Page et al, 2000), un tejido que carece de cualquier forma de innervación nerviosa, mientras que *TAC4*, de hecho, presenta una expresión principalmente no-neuronal (Zhang et al, 2000). Al igual que las taquicininas, los receptores taquicinérgicos también están ampliamente representados en multitud de tejidos y tipos celulares (Pinto et al, 2004). En mamíferos, el receptor NK1 se expresa de forma ubicua, encontrándose en neuronas, endotelio vascular, músculo, células inmunes, y médula ósea entre otros. El receptor NK2 presenta una distribución mayoritariamente en tejidos periféricos, mientras que el receptor NK3 se expresa en mayor grado en el SNC (Pinto et al, 2004, Pennefather et al, 2004). Estos datos sugieren una distribución muy amplia de estos péptidos y sus receptores, y un papel relevante en la señalización intercelular y la comunicación entre el sistema nervioso y los demás sistemas biológicos. Como se mostrará a continuación, la activación de los receptores taquicinérgicos se manifiesta en un amplio rango de respuestas, lo cual unido a su amplia distribución, ha relacionado a las taquicininas con multitud de funciones biológicas y patológicas. Utilizando el símil de la Dra. Candenias, “desde un punto de vista hipotético, si los mediadores de las respuestas celulares fueran atletas en una olimpiada, las taquicininas pertenecerían al equipo de decatlón”.

Dada su expresión en el sistema nervioso, no es de extrañar que las taquicininas hayan sido relacionadas con la respuesta al estrés, y con diversos desórdenes psiquiátricos como son la ansiedad y la depresión. Así por ejemplo, estudios con antagonistas de los receptores taquicinérgicos muestran que el bloqueo de NK1R y NK2R repercute en un efecto ansiolítico y antidepresivo (Kramer et al, 1998; Griebel, 1999; Mantyh, 2002), mientras que agonistas y antagonistas de NK3R pueden provocar respuestas ansiolíticas y ansiogénicas, respectivamente (Massi et al, 2000). Así mismo, las taquicininas también han sido relacionadas con condiciones neurológicas como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, traumatismos cerebrales, la encefalopatía isquémica, y la epilepsia (Rioux et al, 1993; Stumm et al, 2001; Vink et al, 2001; Liu et al, 2000). En tejidos periféricos, las taquicininas están implicadas en procesos como el mantenimiento de la homeostasis a nivel

de la presión sanguínea (Page et al, 2003), o de la hematopoyesis, como reguladores del eje neural-hematopoyético-inmune (Greco et al, 2004; Klassert et al, 2010). En la hematopoyesis, SP y NKA tienen efectos antagónicos sobre las células progenitoras: SP, a través del receptor NK1, promueve la proliferación y maduración celular, mientras que NKA, a través de NK2R, inhibe esta proliferación (Rameshwar et al, 1993; Rameshwar & Gascon, 1996). La comunicación entre el sistema nervioso y otros sistemas periféricos, donde las taquicininas actúan como nexos, también se observa en el sistema reproductor. Aquí las taquicininas actúan como reguladores del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (Debeljuk & Lasaga, 1999; Candenias et al, 2005). Por otra parte, en el tracto digestivo, donde estos péptidos fueron descubiertos por primera vez, las taquicininas regulan la motilidad gastrointestinal (Lecci et al, 2008).

Por otro lado, una gran cantidad de estudios muestran la implicación de las taquicininas, y especialmente de SP y su receptor NK1, en la nocicepción y la inflamación. Tras un estímulo nocivo, las fibras nerviosas sensoriales pueden liberar taquicininas a nivel de la espina dorsal o de tejidos periféricos, causando dolor, vasodilatación y formación de edemas (Jancsó et al, 1967; Lembeck & Holzer, 1979; Maggi & Meli, 1988; Regoli et al, 1994; Mantyh et al, 1997; O'Connor et al, 2004). Esto ha sido confirmado mediante diversos estudios con ratones noqueados para el gen *TAC1* o *TAC1R* (Cao et al, 1998; De Felipe et al, 1998). Otros estudios muestran, además, una implicación adicional de NK2R y NK3R en la transmisión del dolor y la inflamación (Julia et al, 1994; Kamp et al, 2001). Entre las respuestas inflamatorias que implican a las taquicininas, cabe destacar las enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal, como el síndrome inflamatorio intestinal (Shimizu et al, 2008; Margolis & Gershon, 2009), o las del tracto urogenital (Candenias et al, 2005). En este sentido, la relación entre taquicininas y el proceso inflamatorio de las vías respiratorias, es la más documentada (Patachini & Maggi, 2001; Joos et al, 2000; O'Connor et al, 2004; De Swert & Joos, 2006), y su implicación en el asma será discutida a continuación.

4. LAS TAQUICININAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA:

EL MODELO DEL ASMA

El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes a nivel mundial, con una prevalencia que varía entre el 1-18% de la población en diferentes países. A nivel global, se estima que afecta a más de 300 millones de individuos y es causa de muerte de más de 250.000 personas al año (Masoli et al, 2004). Se trata de una compleja enfermedad inflamatoria, en cuyo desarrollo están implicados multitud de células inflamatorias y mediadores que, como resultado, dan lugar a los cambios patofisiológicos característicos del asma: inflamación, broncoconstricción, formación de edemas y remodelado de las vías aéreas (Barnes, 1996; Barnes et al, 1998; GINA, Estrategia Global para el Manejo y Prevención del Asma 2009; <http://www.ginasthma.org>).

4.1. LAS TAQUICININAS EN LAS VÍAS AÉREAS

El asma es un modelo ideal para el estudio de las taquicininas en la respuesta inflamatoria, dado que las vías aéreas presentan numerosas dianas fisiológicas/patológicas de las taquicininas (Joos et al, 2000). A este respecto, se ha demostrado que las taquicininas pueden actuar sobre las glándulas de las vías aéreas induciendo la secreción mucosa (Khan et al, 2001; Phillips et al, 2003, Springer et al, 2005), que SP y NKA actúan sobre el músculo liso provocando la broncoconstricción (Tanaka & Grunstein, 1984; Finney et al, 1985; Martling et al, 1987; Advenier et al, 1999), que facilitan la transmisión colinérgica a través de las terminaciones parasimpáticas (Hall et al, 1989, Groneberg et al, 2004), y que tanto SP, como NKB, inducen la extravasación de plasma desde los vasos sanguíneos, generando edemas (Lundberg & Saria, 1982; Yoshihara et al, 1995; Grant et al, 2002). Así mismo, SP puede actuar sobre el epitelio bronquial y las células inmunes, induciendo la formación de mediadores pro-inflamatorios, y colaborando en el reclutamiento de más células inflamatorias hacia las vías aéreas (Joos et al, 2000). Finalmente, SP y NKA también inducen

la proliferación de fibroblastos y su migración al foco de infección (Harrison et al, 1995; Parenti et al, 1996), donde podrían contribuir a la remodelación de las vías aéreas.

Aunque en condiciones normales las taquicininas en las vías aéreas pueden cumplir una función protectora frente a irritantes exógenos, manteniendo la homeostasis pulmonar mediante reflejos como la broncoconstricción, la secreción de moco y la tos (Barnes, 1986; Kraneveld & Nijkamp, 2001), su liberación en el pulmón podría estar más relacionada con condiciones patológicas que fisiológicas, pudiendo jugar un importante papel en el desarrollo y propagación de la respuesta inflamatoria en el asma (De Swert & Joos, 2006). De hecho, Nieber y cols. (1992) encontraron niveles de SP significativamente mayores en los lavados broncoalveolares (BAL) de asmáticos comparados con individuos sanos no alérgicos. Resultados similares se obtuvieron en un estudio en el que se midieron los niveles de SP en el esputo, donde asmáticos y pacientes con bronquitis crónica mostraron mayores cantidades de SP (Tomaki et al, 1995). Los niveles de SP en plasma también son significativamente mayores en pacientes asmáticos durante la fase de exacerbación de la enfermedad, comparados con controles sanos (Cardell et al, 1994). Además, en un estudio llevado a cabo por Heaney y cols. (1998), se observaron concentraciones más elevadas de NKA en los BAL de asmáticos previamente sensibilizados mediante exposición a ácaros del polvo. Sin duda, estos datos sugieren la implicación de las taquicininas en la respuesta alérgica, e irremediamente nos remiten a la cuestión de su origen o fuente en las vías aéreas.

4.1.1. Origen Neuronal de las Taquicininas: INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA

Los pulmones, paralelamente con la innervación simpática y parasimpática, presentan fibras nerviosas sensoriales, que abarcan todos los compartimentos pulmonares (Joos et al, 2000). Este tipo de innervación de las vías aéreas en mamíferos ha sido denominado también sistema no-adrenérgico, no-colinérgico (NANC), e incluye a las fibras C no mielinizadas que contienen SP y NKA (Joos et al, 2000; Belvisi, 2003). La estimulación periférica de estas fibras sensoriales por medio de estímulos mecánicos, térmicos, o químicos, tiene una función triple (ver figura 5). Por un lado provocará una despolarización

que se propaga en sentido ortodrómico (hacia el SNC), produciendo sensación de dolor (Neumann et al, 1996) y estimulando la tos (Mazzone, 2004). Por otro lado, constituye el inicio de un reflejo parasimpático central, ya que la señal, tras su modulación por interneuronas, es transmitida a través de fibras nerviosas parasimpáticas eferentes hasta los ganglios intrínsecos de las vías aéreas, donde se produce la sinapsis con neuronas que

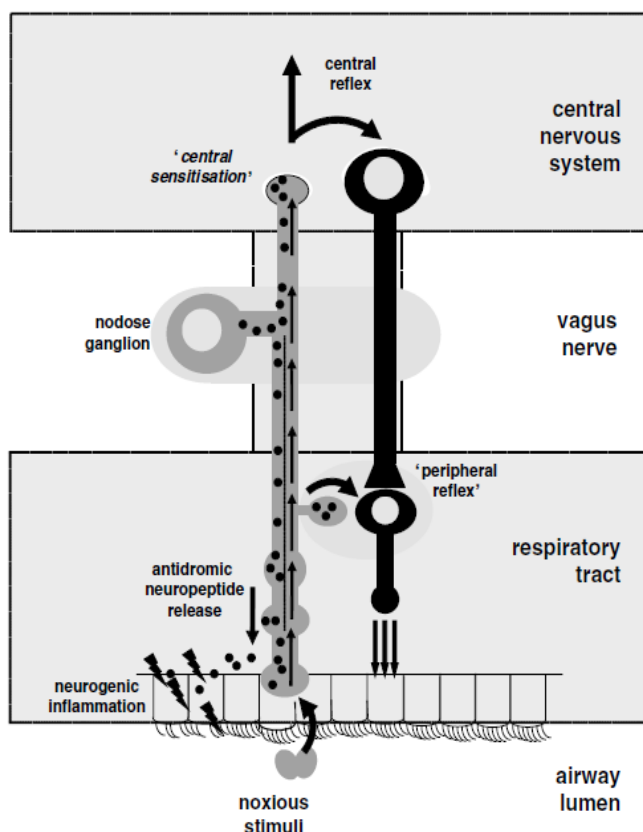


Figura 5.- Representación del reflejo multilinear, y la respuesta inmediata de las neuronas sensoriales mediante liberación antidrómica de neuropéptidos (Groneberg et al, 2004).

inervan el tejido pulmonar (Groneberg et al, 2004). Se sabe además, que las neuronas sensoriales se proyectan hasta estos ganglios nerviosos, y la liberación de neuropéptidos produce despolarización de las neuronas colinérgicas del ganglio. A este nivel se produce una modulación del reflejo central previamente descrito, donde la activación de NK3R influye en la eficacia sináptica de la transmisión nerviosa proveniente del SNC (Canning et al, 2002). Finalmente, además de este ciclo multilinear, la estimulación de estos terminales nerviosos induce la expresión y liberación de las taquicinas (como SP y NKA) por parte de las fibras nerviosas. Así, estos neuropéptidos son transportados en sentido antidrómico hasta los terminales nerviosos que inervan las vías aéreas, donde son liberados, iniciando la inflamación neurogénica (Coleridge & Coleridge, 1984; Groneberg et al, 2004).

Estas fibras inervan tanto el epitelio bronquial, como los vasos sanguíneos, las glándulas submucosas y las capas de musculo liso bronquiales (Groneberg et al, 2004). Por tanto, la liberación local de las taquicininas en estos tejidos llevará a las consecuencias descritas previamente, y que incluyen la secreción mucosa, la broncoconstricción, la extravasación de plasma y en definitiva, la propagación de la respuesta inmune (ver figura 6).

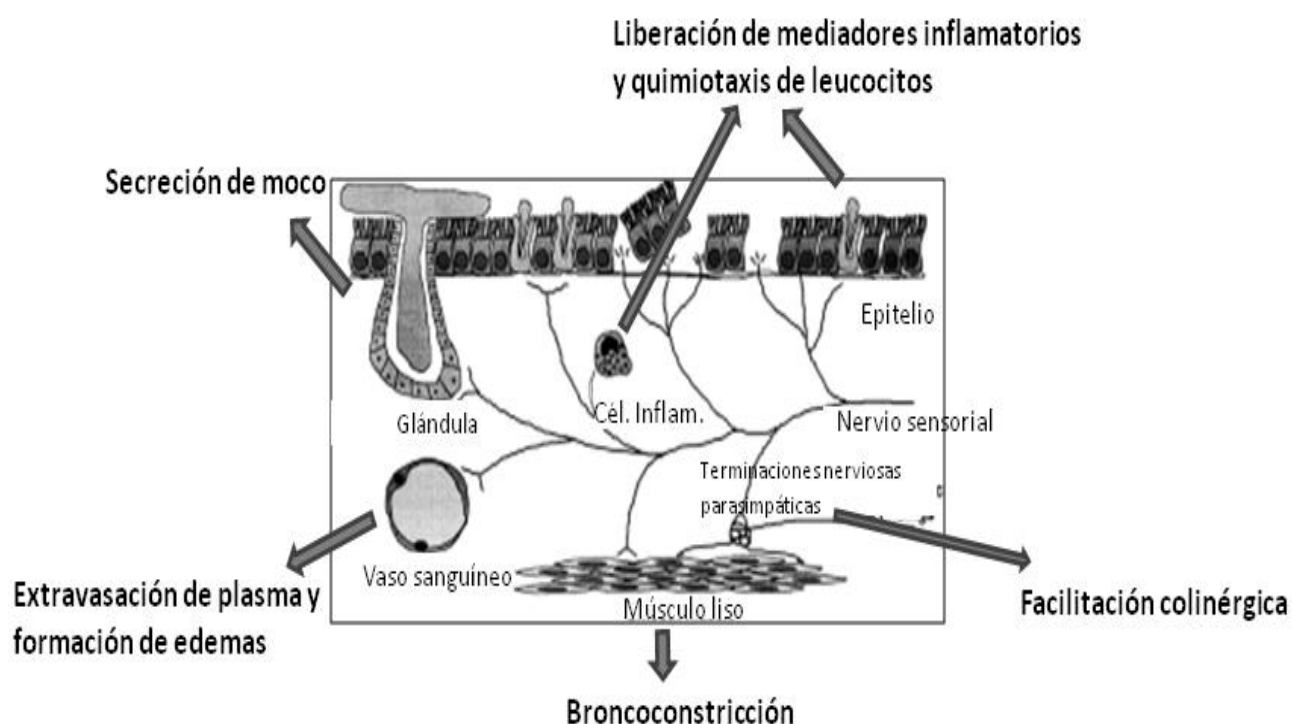


Figura 6.- Inervación de las fibras C sensoriales en los pulmones, mostrando las dianas de sus terminales nerviosas, así como el efecto de la liberación local de neuropéptidos (modificado de Joos et al, 2000).

Durante mucho tiempo se consideró a estas fibras nerviosas como principal fuente de las taquicininas en el tracto respiratorio. Sin embargo, los altos niveles de SP y NKA observados en los BAL de individuos asmáticos (Nieber et al, 1992; Heaney et al, 1998) no se corresponden necesariamente con un aumento de fibras C que contienen estos péptidos (Howarth et al, 1995; Chanez et al, 1998), lo cual sugiere un posible aporte no-neuronal de estos “neuropéptidos” en el pulmón.

4.1.2. Origen Periférico de las Taquicininas: LAS CÉLULAS INMUNES

Además de las fibras nerviosas sensoriales, se ha demostrado que tanto las células estructurales como las células inmunes constituyen una fuente adicional de taquicininas en las vías aéreas. Existen evidencias de la expresión de *TAC1* en eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos, células dendríticas, células del epitelio bronquial y del músculo liso (Aliakbari et al, 1987; Ho et al, 1997; Lai et al, 1998; Lambrecht et al, 1999; Chu et al, 2000; Maghni et al, 2003).

La importancia de un aporte no neuronal de taquicininas por parte de células del sistema inmune en el desarrollo de la inflamación queda patente en un brillante experimento realizado por Chavolla-Calderón y cols. (2003). En este sentido, tanto los estímulos alérgicos que inducen la formación de complejos inmunes antígeno-anticuerpo, como los estímulos mecánicos, son capaces de producir una respuesta inflamatoria en el pulmón de ratones. Ahora bien, si se utilizan ratones knock-out para *TAC1* o se agota la fuente de *TAC1* en las fibras nerviosas tras tratamiento con capsaicina y se inducen los mismos estímulos, éstos son incapaces de desarrollar una respuesta inflamatoria. Además, si a los ratones knock-out se les inyecta médula normal que expresa *TAC1*, tampoco se produce respuesta inflamatoria frente al estímulo alérgico o mecánico. Sorprendentemente, si a un ratón normal se le elimina su médula ósea y se reconstituye con médula cuyas células se han tratado para eliminarles el gen *TAC1*, tampoco se produce la respuesta inflamatoria. Este experimento demuestra que ni las células sensoriales ni las células hematopoyéticas que expresan *TAC1* son suficientes por sí solas para inducir una respuesta inflamatoria frente al estímulo, y por tanto existe una sinergia esencial entre fibras sensoriales sensibles a capsaicina (fibras C) y células hematopoyéticas que expresan taquicininas (Chavolla-Calderón et al, 2003).

En definitiva, podríamos por tanto hablar de dos reservorios de taquicininas en el pulmón: uno constitutivo y otro migrante. Aunque no se conoce exactamente cómo ocurre la comunicación bidireccional entre ambos reservorios, estudios recientes muestran un papel activo de SP y NK1R en la interacción entre los sistemas nervioso e inmune (Brogden et al, 2005).

4.2. COMUNICACIÓN BIDIRECCIONAL: SISTEMA INMUNE – SISTEMA NERVIOSO

4.2.1. Activación de las fibras nerviosas sensoriales

En el asma bronquial atópico, el estímulo inicial que lleva a la respuesta inflamatoria, es la entrada en las vías aéreas de un antígeno capaz de desencadenar una respuesta del tipo Th2, favoreciendo una diferenciación de células T CD4⁺ sin diferenciar a células Th2. Este tipo de respuesta favorece la producción de Inmunoglobulina (Ig) E, que es la forma característica de la reacción alérgica (Janeway et al, 2001), y los antígenos que la inducen son llamados alérgenos. La activación de los mastocitos por las IgE, causa su desgranulación y la liberación de multitud de mediadores pro-inflamatorios que desencadenarán el reclutamiento y la activación de otras células inmunes como los eosinófilos (ver figura 7A) (Chung & Barnes, 1999; Abbas et al, 2000; Janeway et al, 2001). Además, diferentes mediadores liberados durante el inicio de la respuesta inflamatoria por mastocitos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos, pueden primar e incluso activar las fibras nerviosas C, induciendo así la liberación de neuropéptidos. Estos mediadores incluyen la histamina, la serotonina, el factor de crecimiento nervioso (NGF), la proteína catiónica de eosinófilos (ECP), la tripsina, la triptasa, y diversas citoquinas (Steinhoff et al, 2000; Kraneveld & Nijkamp, 2001) (ver figura 7A). A su vez, los neuropéptidos liberados por las fibras C, y especialmente SP, pueden primar y activar las células inflamatorias afectando a múltiples rutas de síntesis de nuevos mediadores inflamatorios, contribuyendo así a la propagación de la respuesta inflamatoria (Kraneveld & Nijkamp, 2001).

4.2.2. Efecto inmunomodulador de las taquicininas

Además de ser potentes broncoconstrictores y agentes vasoactivos, las taquicininas también han demostrado tener un importante papel en el desarrollo del proceso inflamatorio, actuando directamente sobre los actores principales del mismo: las células inmunes.

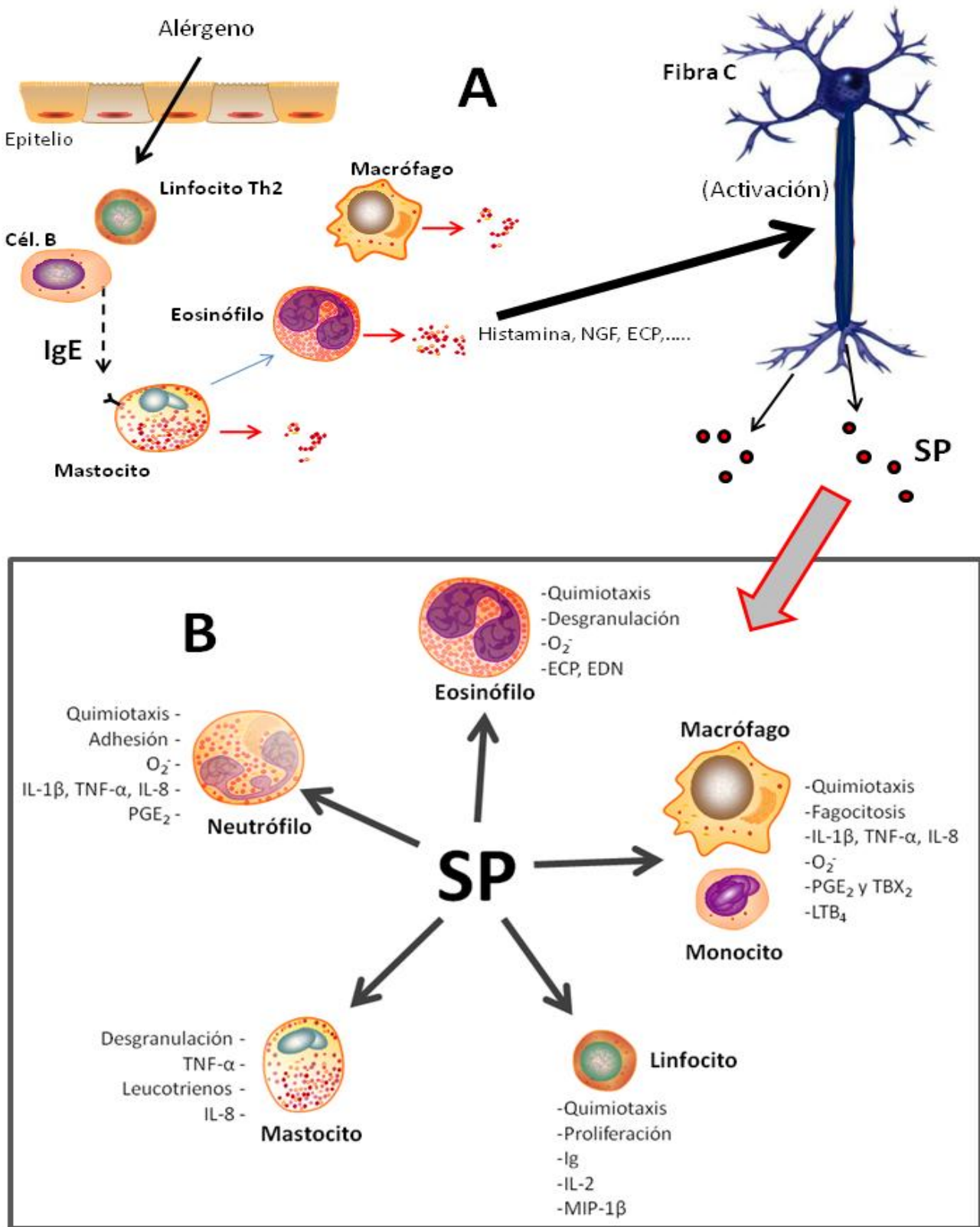


Figura 7.- Esquema de la comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el nervioso en la respuesta inflamatoria, mostrando el papel inmunomodulador de SP sobre las células inmunes. La entrada de alérgenos en las vías aéreas desencadena la desgranulación de las células inflamatorias, cuyos mediadores pueden activar las fibras nerviosas sensoriales e inducir la liberación de SP (A). Por su parte, el neuropéptido liberado, modulará la respuesta inflamatoria de las células inmunes (B).

Las células inflamatorias, como ya hemos visto, constituyen un reservorio adicional de taquicinas, habiéndose detectado la expresión de *TAC1* en eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos y células dendríticas (Aliakbari et al, 1987; Ho et al, 1997; Lai et al, 1998; Lambrecht et al, 1999). Pero además, la presencia de los receptores taquicinérgicos NK1 y NK2 en la superficie de diversas células inflamatorias (Iwamoto et al, 1993; Ho et al, 1997; Lai et al, 1998; Brunelleschi et al, 1998; Mapp et al, 2000) las convierte también en dianas de las taquicinas. De esta forma, estos neuropéptidos se convierten en reguladores elementales del eje neuro-inmune, ejerciendo un papel modulador sobre las diferentes células inmunes implicadas en los procesos inflamatorios, como el descrito en el asma (ver figura 7B).

Mastocitos. Diversos experimentos han demostrado la capacidad de SP de inducir la producción y secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Ansel et al, 1993) y de producir la desgranulación de mastocitos con la consiguiente liberación de histamina y serotonina al medio (Fewtrell et al, 1982; Heaney et al, 1995). También se ha visto que SP puede inducir la síntesis de leucotrienos en mastocitos de ratas (Le Filliatre et al, 2001), así como la liberación de interleucina(IL)-8 en mastocitos humanos (Castellani et al, 2008) (ver figura 7B). En la activación de los mastocitos mediada por SP, se han descrito tanto mecanismos dependientes de receptor (con concentraciones nanomolares de SP), como mecanismos independientes de receptor (con concentraciones micromolares de SP) en las que se produce una activación directa de las proteínas G (Mousli et al, 1990; Joos et al, 1997).

Neutrófilos. SP ejerce un efecto quimiotáctico sobre los neutrófilos, e induce tanto su activación como su adherencia al epitelio bronquial (Zimmerman et al, 1992; Iwamoto et al, 1993). Además, SP es capaz de estimular la producción de radicales superóxidos (Tanabe et al, 1996) y la liberación de IL-1 β , TNF- α , e IL-8 por parte de las células polimorfonucleares (PMN) (Serra et al, 1994; Kuo et al, 2000). Aunque el efecto de SP sobre los PMN parece estar mediado principalmente por NK1R (Tanabe et al, 1996), estudios recientes muestran además un efecto modulador de SP sobre la expresión de COX2 y la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂), que puede estar mediado por los tres receptores taquicinérgicos (Gallicchio et al, 2009). Otros estudios también han mostrado un papel de NK3R en la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos (Nénan et al, 2001) (ver figura 7B).

Eosinófilos. Tal y como sucede con los neutrófilos, SP es capaz de activar los eosinófilos causando su desgranulación (Iwamoto et al, 1993). Diferentes estudios con eosinófilos de humanos y cobayas, han identificado la liberación de ECP y también de aniones superóxido como consecuencia del efecto estimulador de SP (Iwamoto et al, 1993; Kroegel et al, 1990). En otro experimento llevado a cabo por El-Shazly e Ishikawa (1999), SP indujo la liberación de la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) cuando eosinófilos humanos fueron primados con Eotaxina. Respecto al efecto quimiotáctico de SP sobre los eosinófilos, Wiedermann y cols. (1993) encontraron quimiotaxis inducida directamente por SP. Otros autores, si bien no pudieron detectar una quimiotaxis directa de SP, sí que describieron un efecto potenciador de SP sobre la acción quimiotáctica del factor de activación de plaquetas (PAF), del leucotrieno B₄ (LTB₄), o de IL-5 (Numao & Agrawal, 1992; El-Shazly et al, 1996) (ver figura 7B).

Linfocitos. El efecto inmunomodulador de SP sobre los linfocitos es conocido desde mediados de los años 80 (Payan & Goetzl, 1985), y su espectro de acción es amplio. Su efecto quimiotáctico ha sido demostrado tanto para linfocitos T como para linfocitos B en sangre periférica en humanos (Schratzberger et al, 1997). Por otro lado, Covas y cols. (1994) demostraron que SP y NKA eran capaces de incrementar la proliferación de linfocitos inducida por fitohemaglutinina (PHA), concavalina A o forbol miristato acetato (PMA), y que en ausencia de estímulos adicionales, SP conservaba estas propiedades proliferativas. También se ha observado un papel de la recientemente descubierta HK-1 en la linfopoyesis de células -T y -B (Zhang et al, 2000; Zhang & Paige, 2003). Además de los efectos en la proliferación y quimiotaxis, también se ha descrito la activación de linfocitos mediada por SP. Así, SP induce la secreción de Inmunoglobulinas, especialmente de IgA, por parte de células B humanas (Bost & Pascual, 1992), mientras que en linfocitos T estimula la producción de IL-2 (Calvo et al, 1992). Además, se ha visto que SP incrementa la actividad “natural killer” de los linfocitos, así como la expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1 β) (Croitoru et al, 1990; Guo et al, 2002) (ver figura 7B).

Monocitos/Macrófagos. Como para la mayoría de células inmunes, SP ejerce un efecto quimiotáctico sobre monocitos (Schratzberger et al, 1997), pudiendo así atraer estas células hacia el foco de la inflamación. Una vez allí, los monocitos/macrófagos pueden contribuir a la propagación del proceso inflamatorio. En este sentido, SP estimula en monocitos y

macrófagos la secreción de citoquinas proinflamatoria como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Lotz et al, 1988; Ho et al, 1996). Además, experimentos en macrófagos de cobaya han mostrado que SP induce la producción de aniones superóxido y estimula la síntesis y liberación de metabolitos del ácido araquidónico (AA), como la PGE₂ y el tromboxano B₂ (TXB₂) (Murriss-Espin et al, 1995). En experimentos más recientes, se ha demostrado que SP también ha sido capaz de incrementar la producción de LTB₄ en macrófagos de ratas (Castellani et al, 2009). Por otro lado, en ratones se ha descrito que SP también incrementa la actividad fagocítica de los macrófagos (Bar-Shavit et al, 1980) (ver figura 7B).

Además de los efectos de las taquicininas sobre células inmunes en la respuesta inflamatoria, también se ha descrito su actividad sobre células estructurales de las vías aéreas. Así, por ejemplo, se ha visto que SP promueve la proliferación de las células del epitelio pulmonar y la liberación de citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-8 o TNF- α por parte de ellas (Kim et al, 1995; Veronesi et al, 1999). Por otro lado, SP y NKA también inducen la proliferación de fibroblastos y su migración al foco de infección (Harrison et al, Parenti et al, 1996), donde podrían contribuir a la remodelación de las vías aéreas.

En definitiva, las taquicininas actúan como puente de comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso, contribuyendo a la propagación y amplificación de la respuesta inflamatoria de las vías aéreas.

4.2.3. Los eosinófilos: modelo para el estudio de la interacción neuroinmune

Durante mucho tiempo los eosinófilos fueron considerados como células efectoras con la capacidad de liberar multitud de mediadores implicados en la defensa frente a parásitos como los helmintos, y en procesos de destrucción tisular. Sin embargo, el concepto de los eosinófilos como meras células efectoras está cambiando con el descubrimiento del elevado potencial de esta estirpe celular en la modulación de la respuesta inflamatoria (Jacobsen et al, 2007). En patologías inflamatorias de las vías aéreas, como el asma, su protagonismo es aún más notable, colaborando no sólo en la modulación de la inflamación, sino también en la hiperrespuesta bronquial y el remodelado de las vías aéreas (Trivedi & Lloyd, 2007). La prueba definitiva de su importancia en esta patología fue aportada por Lee y cols. (2004),

cuando demostraron que la ausencia de eosinófilos inducida en ratones transgénicos (“el ratón PHIL”) llevó a una abrogación de todas las características observadas en la inflamación alérgica de las vías aéreas.

El destacado papel de los eosinófilos en el desarrollo de la respuesta inflamatoria de las vías aéreas podría estar relacionado con la localización de los mismos en las inmediaciones de las fibras nerviosas durante el proceso inflamatorio. A este respecto, cada vez más estudios apuntan a una fuerte interacción entre eosinófilos y las células nerviosas que inervan los pulmones (Costello et al, 1997, Raap & Wardlaw, 2008). Estas interacciones son mediadas en gran medida por las neurotrofinas, producidas tanto por las fibras nerviosas como por los propios eosinófilos (Nockher & Renz, 2006; Raap & Wardlaw, 2008). Por otra parte, también se ha visto que estas interacciones implican a las proteínas granulares de eosinófilos (Kraneveld & Nijkamp, 2001; Raap & Wardlaw, 2008). De hecho, estudios *in vitro* muestran que la adhesión de eosinófilos a una línea celular nerviosa mediante la molécula de adhesión inter-celular 1 (ICAM-1), provoca la liberación de proteínas granulares por parte de los eosinófilos (Morgan et al, 2005). A su vez, como hemos visto anteriormente, proteínas granulares como ECP, son capaces de activar las fibras nerviosas (Kraneveld & Nijkamp, 2001). Una tercera vía de comunicación la constituyen las taquicininas, donde SP ha demostrado tener un papel en la quimiotaxis de los eosinófilos y en la liberación de ECP/EDN y aniones superóxido (Iwamoto et al, 1993; Kroegel et al, 1990; El-Shazly & Ishikawa, 1999). Sin embargo, teniendo en cuenta la importancia de los eosinófilos en la respuesta inflamatoria, parece escasa la cantidad de información de la que se dispone sobre el papel modulador de SP sobre estas células.

Los eosinófilos constituyen un interesante modelo para el estudio de las interacciones neuroinmunes, no sólo por su proximidad con las fibras nerviosas, sino también por su potencial de producción de una gran variedad de mediadores inflamatorios, susceptibles de ser regulados por las taquicininas. Los eosinófilos albergan múltiples gránulos en su citoplasma, especializados en la producción y/o almacenamiento de los diferentes mediadores inflamatorios (ver figura 8) (Giembycz & Lindsay, 1999). En los gránulos primarios, se encuentran los llamados cristales de Charcot-Leyden (CLC), mientras que en los gránulos secundarios o específicos, se almacenan diversas citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , quimioquinas como RANTES, y las proteínas granulares de eosinófilos EDN, ECP,

la proteína mayor básica (MBP) y la peroxidasa de eosinófilo (EPX). Por otro lado, se encuentran los gránulos pequeños que contienen enzimas como la catalasa o la propia ECP.

Estructuras cardinales del eosinófilo humano

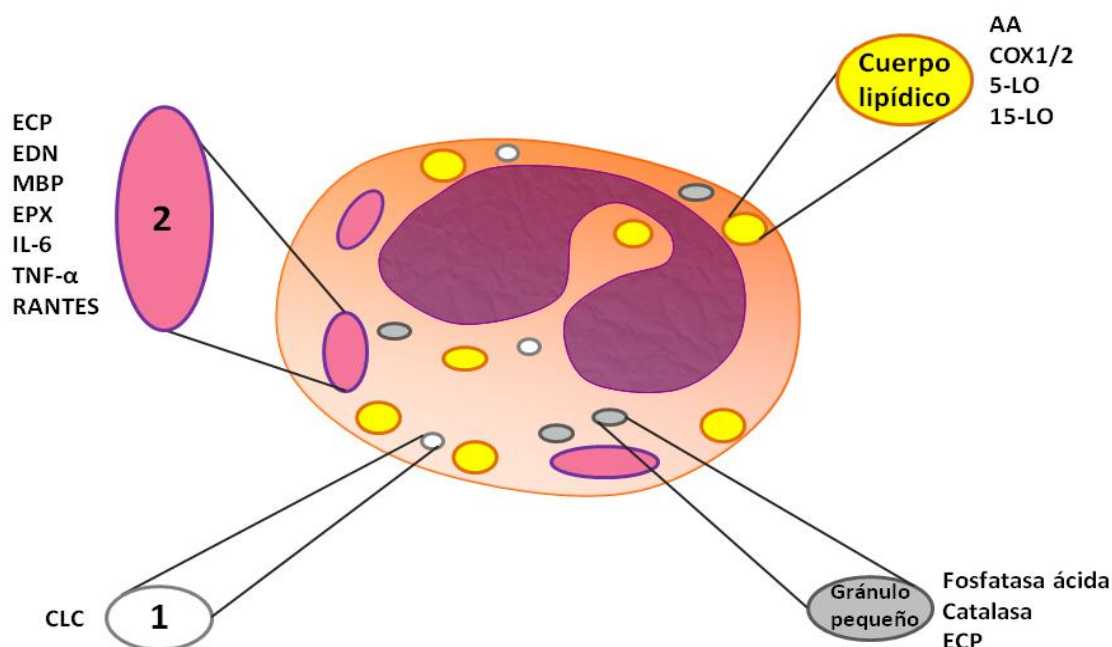


Figura 8.- Representación de los gránulos de los eosinófilos, indicándose algunos de los principales mediadores y enzimas contenidos en los mismos.

Finalmente, cabe destacar los llamados cuerpos lipídicos, donde se almacena AA, que deriva en la producción de diversos mediadores lipídicos entre los que se encuentran los tromboxanos, las prostaglandinas y los leucotrienos (ver figura 9). Entre las funciones de estos mediadores cabe destacar su capacidad de inducir la broncoconstricción y su poder quimiotáctico y activador sobre diversas células inflamatorias (Barnes et al, 1998; Giembycz & Lindsay, 1999). Las primeras enzimas responsables de la generación de productos metabólicos derivados del AA son las ciclo-oxigenasas (COX 1 y 2), que inician la ruta de formación de los tromboxanos y prostaglandinas, y la lipo-oxigenasa 5 (5-LO), que inicia la ruta de los leucotrienos. Además, en eosinófilos se ha visto que una tercera enzima, la lipo-

oxigenasa 15 (15-LO), es capaz de actuar sobre el AA libre, promoviendo la producción de las lipoxinas (Barnes et al, 1998; Giembycz & Lindsay, 1999).

Las dos ciclo-oxigenasas (COX1 y COX2) llevan a cabo la misma reacción de oxidación (insertan dos moléculas de O₂), y generan prostaglandina G₂ (PGG₂), que a su vez es reducida a prostaglandina H₂ (PGH₂) por una endoperoxidasa. A continuación, la PGH₂ sirve como sustrato a enzimas como las sintasas de las prostaglandinas E₂ (PGEs), F_{2α} (PGFs) ó D₂ (hPGDs), así como la sintasa del tromboxano A₂ (TXAs), generándose los productos correspondientes (Giembycz & Lindsay, 1999). Por otro lado, la carbonil reductasa 1 (CBR1) puede generar PGF_{2α} a partir de la PGE₂ (Miura et al, 2008) (ver figura 9).

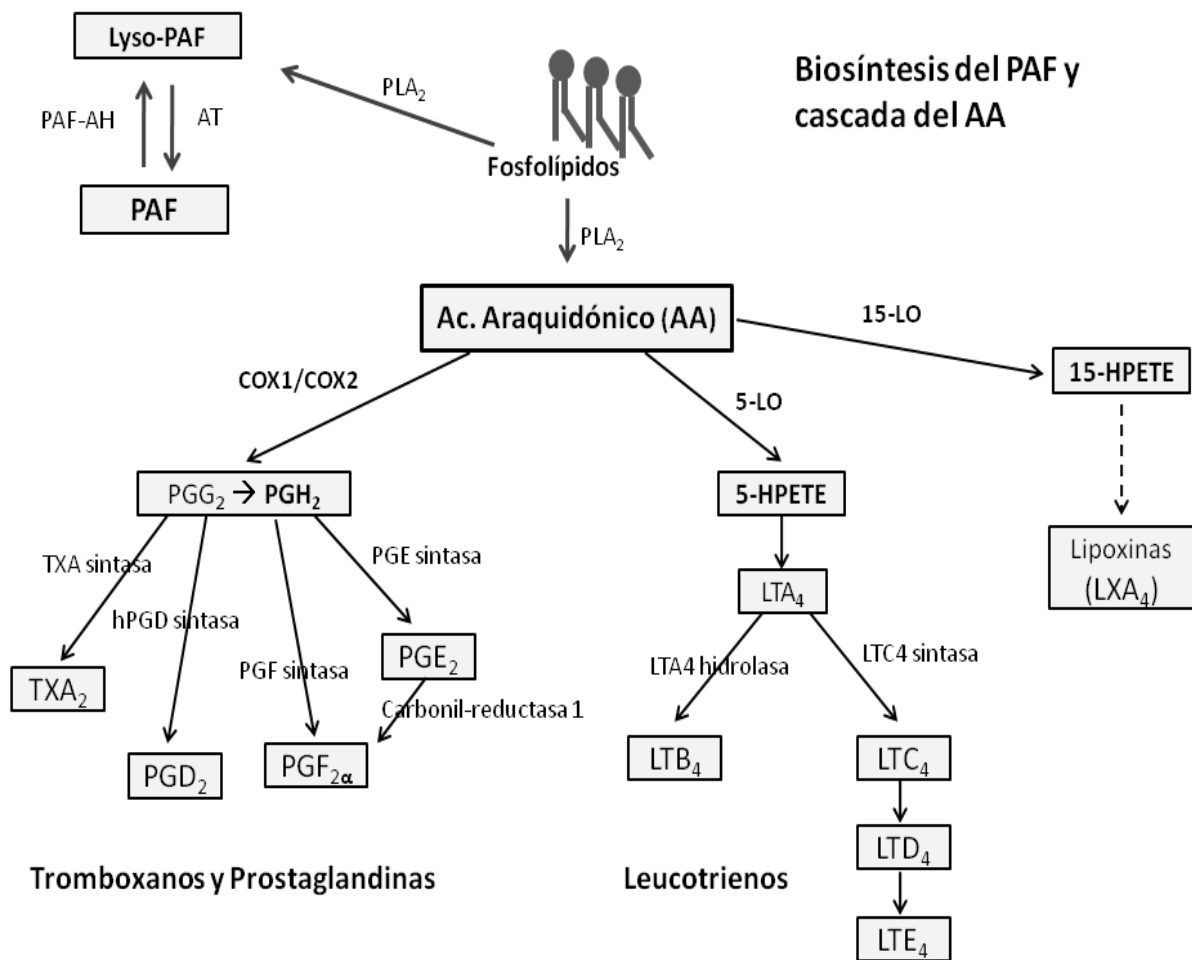


Figura 9.- Esquema de las rutas de biosíntesis de PAF y de los metabolitos del AA: tromboxanos, prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas, indicando las enzimas implicadas en su síntesis.

La ruta de la 5-LO comienza con una oxidación del AA (inserta una molécula de O₂) mediante un mecanismo que requiere una proteína adicional denominada FLAP. Esta primera oxidación genera el ácido 5-hidroperoxieico-satetraenoico (HPETE), que sirve de sustrato a la LTA₄-sintasa (LTA₄s) para producir LTA₄. Este leucotrieno puede ser entonces metabolizado por dos enzimas: la LTA₄-hidrolasa (LTA₄h), que genera el LTB₄, o la LTC₄-sintasa (LTC₄s), que genera el LTC₄ y los demás cisteinil-leucotrienos (CysLTs) (Barnes et al, 1998) (ver figura 9).

Finalmente, la tercera ruta metabólica importante en la cascada del AA en eosinófilos es la que implica a la 15-LO. Esta enzima compite con las ciclo-oxigenasas y la 5-LO en la utilización del AA como sustrato. Mientras las dos primeras inician la síntesis de eicosanoides pro-inflamatorios, como las prostaglandinas y los leucotrienos, la 15-LO genera el 15-HPETE, un producto intermedio a partir del cual se terminan formando mediadores bio-activos, que incluyen a las lipoxinas, de carácter anti-inflamatorio (Giembycz & Lindsay, 1999; Serhan & Savill, 2005).

Otro de los mediadores lipídicos producidos por los eosinófilos es el PAF, un potente broncoconstrictor, y cuya ruta de biosíntesis se inicia, al igual que para el AA, a partir de un fosfolípido de membrana. Mediante la acción de una fosfolipasa A₂ (PLA₂) o acetil-transferasa, se genera una forma inactiva de PAF, el lyso-PAF, que mediante la lyso-PAF:acetil-transferasa (AT), es transformado en PAF. El equilibrio entre la síntesis y catabolismo del PAF es mantenido mediante la acción de una acetil-hidrolasa (PAF-AH), que convierte al PAF en su forma inactiva (ver figura 9) (Barnes et al, 1998; Giembycz & Lindsay, 1999).

Por otro lado, los eosinófilos también expresan una gran cantidad de receptores tanto para mediadores lipídicos como para diferentes citoquinas y quimioquinas, que los convierten en diana de multitud de estímulos pro-inflamatorios (Barnes et al, 1998; Giembycz & Lindsay, 1999). La regulación de la gran cantidad de mediadores y receptores expresados por los eosinófilos constituye, sin duda, un aspecto clave en el desarrollo de patologías inflamatorias como el asma. Debido a su estrecha relación con las fibras nerviosas de las vías aéreas, y a las crecientes evidencias de su papel en la interacción neuroinmune, el estudio de un posible papel inmunomodulador de SP en la producción de los mediadores

inflamatorios por parte de los eosinófilos, se convirtió en uno más de los objetivos de este trabajo, y que se detallan a continuación.

OBJETIVOS



En este trabajo, hemos estudiado las taquicininas en las células inmunes, y su relación con el desarrollo de la patofisiología asmática, desde tres ángulos o enfoques diferentes.

La gran cantidad de información funcional relacionada con la implicación de los productos proteicos de *TAC1* (SP y NKA) en la respuesta inflamatoria y la maduración de las células inmunes, contrasta con el escaso conocimiento del que se dispone en relación a las funciones de los otros dos genes de las taquicininas (*TAC3* y *TAC4*) y sus péptidos (NKB, HK-1) en estas células.

Por otro lado, y a pesar de la contrastada implicación de las taquicininas en los diversos aspectos que definen la patología asmática, no existen datos de estudios de asociación entre variantes comunes de los genes *TAC1*, *TAC3* y *TAC4* y el asma.

Finalmente, un tercer aspecto de este trabajo se centró en la importancia de los eosinófilos en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en el asma, donde su estrecha relación con las fibras nerviosas sugiere un papel modulador de taquicininas como SP sobre la expresión de diferentes mediadores inflamatorios. Por todo ello, se fijaron los siguientes objetivos concretos:

- 1.-** Determinar el patrón de la expresión de los genes de taquicininas *TAC3* y *TAC4*, así como los de los receptores *TACR1*, *TACR2* y *TACR3*, en células inmunes humanas extraídas de sangre periférica.

- 2.-** Determinar mediante inmunocitoquímica la presencia de NKB en las distintas células inmunes extraídas de sangre periférica.

- 3.-** Determinar el efecto de la Budesonida, un glucocorticoide habitual en el tratamiento del asma, en la regulación de la expresión de las taquicininas en células sanguíneas.

4.- Determinar la posible asociación entre polimorfismos presentes en los genes *TAC1*, *TAC3* y *TAC4* con la susceptibilidad al asma.

5.- Determinar mediante cultivos *in vitro*, el posible papel regulador de SP sobre la expresión de mediadores y rutas metabólicas implicadas en procesos inflamatorios mediados por eosinófilos.

MATERIAL Y MÉTODOS



1. EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS EN SANGRE PERIFÉRICA

1.1. DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE TAC3 Y TAC4 EN LAS CÉLULAS INMUNES

1.1.1. AISLAMIENTO DE LAS ESTIRPES CELULARES

Las células inmunes fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica (10 ml) extraídas de siete individuos sanos (tres mujeres y cuatro varones), con edades comprendidas entre los 25 y los 40 años. Para confirmar que los individuos en estudio no presentaban sintomatología relacionada con el asma, los donantes fueron sometidos al cuestionario ECRHS II (European Community Respiratory Health Survey II, ver anexo I), elaborado por la Comisión Europea para determinar la Incidencia del Asma. Todos los donantes respondieron negativamente a las preguntas del mismo y firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

Las muestras de sangre periférica de los siete donantes fueron recogidas en tubos Vacutainer con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante (BD Vacutainer Systems, UK). A continuación, se procedió al aislamiento de las diferentes estirpes celulares. En todos los casos, tras la obtención de las distintas estirpes celulares aisladas, se procedió a su recuento y la determinación de su viabilidad. Para ello, se empleó una cámara *Neubauer*, que cuenta con un campo reticulado y permite el conteo de células en un microscopio. Esta técnica de recuento celular se combinó con el uso de un colorante de exclusión para determinar la viabilidad de las células. Así, previo al recuento, 45 μ l de suspensión celular fueron teñidos con 5 μ l del colorante *trypan blue* (0,4%) (Sigma-Aldrich, UK), lo que nos permitió diferenciar entre células muertas (de color azul) y células vivas (incoloras). Así mismo, se determinó la pureza obtenida en el aislamiento de cada estirpe celular mediante tinción May-Grünwald-Giemsa de las células fijadas, que permite diferenciar las células en función de sus propiedades químicas.

La separación de células polimorfonucleares y mononucleares se basó en técnicas de centrifugación en gradiente de densidad, para lo cual se usó el medio 1-Step-polymorph (Accurate Chemicals and Scientific Corp., USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se depositaron cuidadosamente 5 ml de sangre sobre una capa de 5 ml de 1-Step-polymorph en tubos de centrífuga de 12 ml y se centrifugaron a 500 g durante 35' a temperatura ambiente (t. a. = 20 °C). Tras la centrifugación, en el tubo se apreciaron 2 bandas de leucocitos y un pellet. La banda superior estaba compuesta por células mononucleares (linfocitos y monocitos), mientras que la banda inferior consistía de células polimorfonucleares. El pellet contenía el resto de fracciones celulares, y fue conservado en hielo para la posterior recuperación de eosinófilos (ver figura 10). Las fracciones celulares de las dos bandas de leucocitos fueron recuperadas por separado, diluídas 1:1 en NaCl 0,45%, y centrifugadas a 400 g durante 10' a 4 °C. Tras la centrifugación, se llevó a cabo una lisis de los eritrocitos contaminantes de ambas fracciones mediante incubación en hielo durante 5' con solución hipotónica (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, EDTA 0,1 mM). Tras centrifugar de nuevo (400 g, 4 °C, 10'), los neutrófilos y células mononucleares fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Para ambas fracciones se obtuvo una pureza >95% y >98%, respectivamente, y una viabilidad >98% en ambos casos.

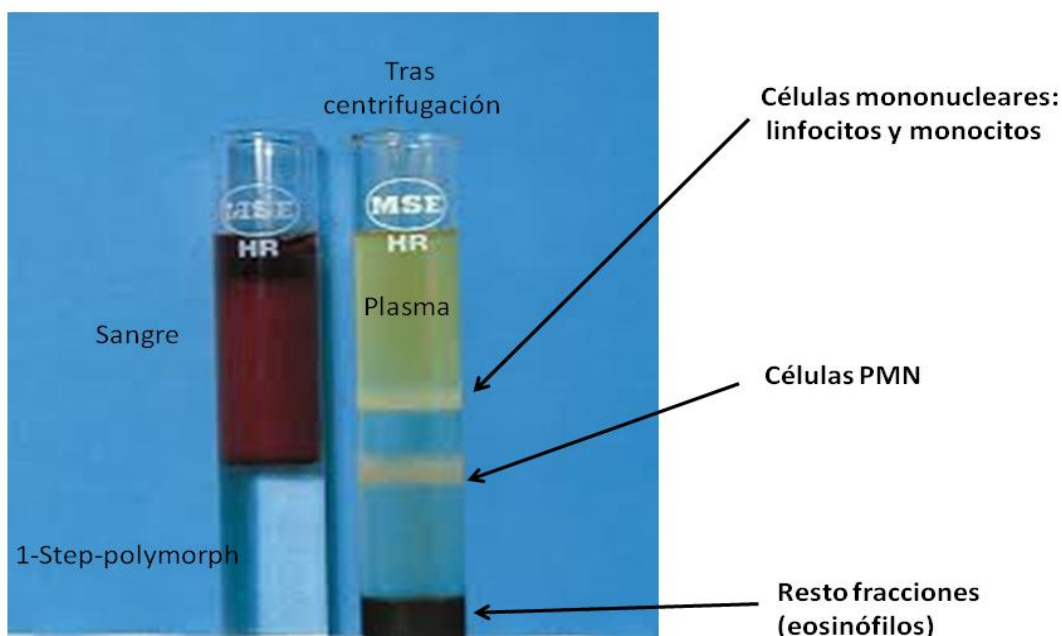


Figura 10.- Representación del proceso de separación de estirpes celulares sanguíneas mediante técnicas de centrifugación en gradiente de densidad.

Para aislar los linfocitos de los monocitos, la fracción de células mononucleares fue incubada durante 1 h a 37 °C con medio RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Austria) en frascos de cultivo T-75 (NUNC, Denmark) previamente cubiertos con gelatina al 2% (Sigma-Aldrich, UK). La capacidad de los monocitos de adherirse a la gelatina, permitió la recuperación de los linfocitos no adherentes del sobrenadante. Tras ser lavados tres veces con PBS, la pureza y la viabilidad fueron >95% y >98%, respectivamente. La fracción de linfocitos que se recupera mediante esta técnica, está constituida por un conjunto de diferentes tipos celulares, entre los cuales se incluyen las células B, las “natural killer” y las células T. A fin de obtener una población enriquecida en células T, parte de los linfocitos fueron estimulados con PHA (linfocitos-PHA), un mitógeno específico de este tipo celular (Dallman & Lamb, 2000). Para ello, 2×10^6 linfocitos fueron incubados durante 72 h a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5%, en medio de cultivo (RPMI-1640 con 10 % de suero bovino fetal (FBS)) suplementado con PHA (10 µg/ml).

Los monocitos adheridos fueron lavados en el propio frasco de cultivo entre 4 y 6 veces con RPMI-1640 para eliminar los linfocitos no-adherentes residuales. La pureza de la fracción celular aislada por este método, estimada por otros autores, oscila entre el 70 y el 97% (Ho et al, 1997; De Almeida et al, 2000). Posteriormente, y con el fin de evitar la posible muerte celular ocasionada durante los protocolos utilizados para desprender las células, la extracción del ARN se hizo a partir del mismo frasco de cultivo.

Los eosinófilos fueron recuperados del pellet resultante de la centrifugación de las muestras de sangre con 1-Step-polymorph. Para ello, utilizamos un kit de aislamiento de eosinófilos por selección negativa (Miltenyi Biotech S.L., Spain), en el que los eosinófilos son purificados gracias a la eliminación del resto de células sanguíneas. Para ello, al pellet de la célula se le añade un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina y específicos de marcadores de superficie de todas las estirpes celulares, excepto eosinófilos. Tras incubar, se añaden anticuerpos monoclonales anti-biotina conjugados con micropartículas magnéticas. Posteriormente, las células magnéticas marcadas son retenidas en una columna en contacto con un campo magnético y los eosinófilos sin marcar son eluidos a través de la columna y recuperados, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todo el proceso de aislamiento fue llevado a cabo en hielo para evitar la activación de los

eosinófilos durante el mismo. Las preparaciones obtenidas contenían >99% de eosinófilos, con una viabilidad >95%.

De esta forma se obtuvieron 5 fracciones celulares diferentes de cada uno de los siete donantes: neutrófilos, linfocitos, linfocitos-PHA, monocitos y eosinófilos.

1.1.2. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *TAC3*, *TAC4*, Y DE *TAC1R*, *TAC2R* Y *TAC3R*

1.1.2.1. Extracción de ARN total

El ARN total fue extraído de todas las estirpes celulares obtenidas de cada uno de los donantes. Para ello se tomaron 10×10^6 células polimorfonucleares, 5×10^6 linfocitos, y 2×10^6 linfocitos-PHA. El ARN de los monocitos fue extraído directamente desde los frascos, y los eosinófilos fueron agrupados en dos “pools” de células (uno a partir de 3 y otro de 4 individuos), a fin de tener suficientes células (aprox. 1×10^6 células) para su posterior procesamiento.

El ARN total se extrajo con el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen Ltd., UK) siguiendo las recomendaciones del fabricante. A continuación, el eluido resultante fue sometido a la digestión con DNasa I en presencia de RNAsin PLUS (Promega, USA) durante 30' a 37 °C a fin de eliminar las posibles trazas de ADN genómico. Tras limpiar con fenol-cloroformo, el ARN fue precipitado con 3 volúmenes de Etanol (EtOH) al 100% y 75 mM de Acetato Sódico (pH 5,5) a -80°C durante toda la noche (o.n.). Tras un lavado con EtOH al 75%, el ARN fue resuspendido en 30-40 µl de agua tratada con dietil-piro-carbonato (DEPC) para inactivar las posibles RNasas (agua-DEPC). La efectividad del tratamiento con DNasa I fue valorado mediante posterior Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de muestras no-retrotranscritas (RT-negativas). La integridad del ARN fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (Almeida et al, 2000), visualizándose dos bandas claras correspondientes a los ARN ribosómicos 28S y 18S (ver figura 11). Por último, se cuantificó el ARN usando un espectrofotómetro Smartspec Plus (Bio-Rad, USA), midiendo la absorbancia a 260 nm (A260). La pureza del ARN se dedujo de la relación A260/A280.

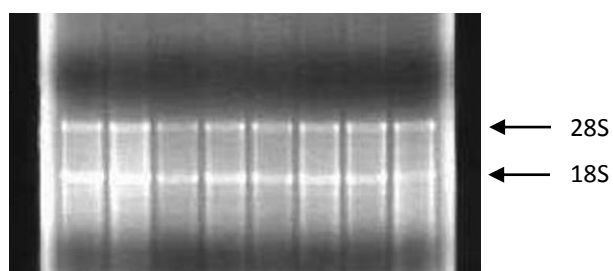


Figura 11.- Gel de electroforesis mostrando las dos bandas correspondientes a los ARNr 28S y 18S.

1.1.2.2. Transcripción reversa (RT)

Se utilizaron 1,5 μg de ARN como molde para generar el ADN complementario (ADNc) mediante la transcripción reversa. Para ello el ARN, en presencia de hexámeros, fue sometido a un primer paso de desnaturalización por calentamiento a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos y transferido rápidamente a hielo para evitar posibles estructuras secundarias. Posteriormente se añadió la mezcla de reacción para la síntesis de ADNc, que incluía inhibidores de RNAsas (RNAsin PLUS, Promega, USA), desoxinucleótidos (dNTPs) (Bioron GmbH, Germany), y la retrotranscriptasa del virus Moloney de la leucemia murina (M-MLV) (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras una incubación de una hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ y la inactivación de la enzima por calor (2' a 95 $^{\circ}\text{C}$), el ADNc obtenido fue diluido en 160 μl Tris-EDTA (TE) 0,5X (Flucka, Switzerland).

1.1.2.3. Diseño de cebadores

Para amplificar el ADNc de los diferentes genes en estudio se diseñaron cebadores específicos para cada gen o variante de procesamiento del mismo mediante las aplicaciones Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) y Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), importando la secuencia de ADNc correspondiente previamente obtenida en el buscador ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>). Siempre que fue posible, se diseñaron cebadores que solaparan exones para evitar la amplificación de posibles trazas de ADN genómico residual. Una vez obtenidas los cebadores que se ajustaron a nuestros parámetros de búsqueda, la secuencia de cada amplicón resultante fue caracterizada con la aplicación Mfold (Zuker,

2003) simulando las condiciones de amplificación reales, para detectar posibles estructuras secundarias en los lugares de unión de los cebadores.

Un total de 12 parejas de cebadores fueron diseñadas para el estudio de la expresión de los genes de las taquicininas *TAC3* y *TAC4* y de sus receptores *TAC1R*, *TAC2R* y *TAC3R* (ver tabla 2). En el diseño de los cebadores de *TAC4*, se tuvo en cuenta que los mismos fueran capaces de detectar las distintas variantes de procesamiento, dado que los productos codificados por el gen son diferentes entre sus variantes de procesamiento. Por tanto, se diseñaron dos parejas para las variantes del transcrito *TAC4 α* , así como los cebadores específicos de los transcritos *TAC4 β* , *TAC4 δ* y *TAC4 γ* . Para *TAC3* se diseñó una sola pareja de cebadores que amplifica todos los transcritos de este gen, mientras que para la detección de la expresión de *TAC1R*, *TAC2R* y *TAC3R*, se diseñaron dos parejas de cebadores para cada gen: una pareja externa y otra pareja interna (ver tabla 2). En la misma tabla se muestran además los cebadores utilizados para amplificar los genes constitutivos utilizados en este estudio.

Tabla2.- Secuencias de los cebadores directo y reverso diseñados para amplificar cada uno de los genes diana en estudio.

GENES	Cebador directo	Cebador reverso
<i>HRPT1</i>	GACCAGTCAACAGGGGACAT	AACACTTCGTGGGGTCCTTTTC
<i>PPP1CB</i>	AACCATGAGTGTGCTAGCATCA	CACCAGCATTGTCAAACCTCGCC
<i>PP1B</i>	ATGTAGGCCGGGTGATCTTT	TGAAGTTCTCATCGGGGAAG
<i>TAC3</i>	CCACAGGCACCATGAGGAT	TGTTGATTCCTTAGGAT
<i>α-TAC4v1</i>	TGTGGCCTTGGAGGAAGG	ACTGCTGCTTGACACTGAGA
<i>α-TAC4v2</i>	GCCAAGGAGAAAAAAGCAT	ACTGCTGCTTGACACTGAGA
<i>β-TAC4</i>	GGAAGCGAGTGGGAGCAT	ACTGCTGCTTGACACTGAGA
<i>δ-TAC4</i>	AGTGGGAGGCAGAGAGGAT	ACTGCTGCTTGACACTGAGA
<i>γ-TAC4</i>	AAGGAGAAAAAAGGCAGAGAG	ACTGCTGCTTGACACTGAGA
<i>TAC1R (ext)</i>	CTCCATGGCTGCATTCAATA	CACAGATGTGGTACACTTTCTCA
<i>TAC1R (int)</i>	ACGGCCTGTTCTACTGCAAG	GGCATGGTCTCTGTGGTTG
<i>TAC2R (ext)</i>	GCTCGCGGTGATGTTTGTAG	CCCAGCCATGAACAAAGTCT
<i>TAC2R (int)</i>	TACTTCATCCTGGGCAGCTT	ACTCTCGTGGAGAGGGAGGT
<i>TAC3R (ext)</i>	TTGCGGTGGACAGGTATATG	CAGCCAGCAGATAGCAAATG
<i>TAC3R (int)</i>	TGCCTCCCTCAGTGTCTTT	TTTGGCCTTTAGCTGCTCAT

1.1.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones del ADNc fueron realizadas en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, USA), utilizando una Start-Taq-polimerasa (BIOLINE, UK). Las reacciones fueron realizadas en un volumen total de 25 μ l, y conteniendo 4 μ l de ADNc, 2 mM de $MgCl_2$, 0.2 μ M de cada cebador, 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dAMP, dCTP, dGTP y dTTP), 1X del tampón de reacción (BIOLINE, UK) y 1U de la Start-Taq-polimerasa. Las condiciones térmicas de amplificación incluyeron un paso inicial de activación de la enzima de 95 °C durante 10', y posteriormente 35-40 ciclos con las siguientes etapas: 10'' a 95 °C (desnaturalización), 30'' a 60 °C (anillamiento), y 30'' a 72 °C (extensión). Finalmente siguió un paso de extensión final de 72 °C durante 5'. Posteriormente se comprobó la eficacia de la reacción y la especificidad del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,7% y tinción con bromuro de etidio.

En el caso de los receptores taquicinérgicos, y debido a su baja expresión, se realizó una PCR-anidada para detectar la expresión de *TAC1R*, *TAC2R* y *TAC3R*. Así, se usaron dos rondas de amplificación consecutivas: una primera PCR utilizando los cebadores externos de cada gen, y una segunda PCR con los cebadores internos y utilizando como molde 2 μ l del producto de la primera reacción. Las condiciones de amplificación en estos casos, fueron las mencionadas anteriormente.

1.1.2.5. Secuenciación

Para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados, se llevó a cabo la secuenciación de los productos de PCR. En primer lugar los fragmentos amplificados fueron purificados mediante el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos purificados fueron secuenciados con los primers directos utilizados en la amplificación, por el método de los didesoxinucleótidos, con el Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Las reacciones de secuenciación fueron purificadas mediante precipitación y corridas en un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems,

USA), y los electroferogramas obtenidos fueron leídos con el software MEGA3 (Kumar et al, 2004).

1.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE TAC3 Y TAC4 EN LINFOCITOS Y PHA-LINFOCITOS

1.2.1. PCR cuantitativa a Tiempo Real (qPCR)

Para el estudio de cuantificación de la expresión génica, el ADNc fue amplificado por PCR a Tiempo Real utilizando Quantace SensiMIX (SYBR + Fluorescein) (Quantace, Germany), que incluye al SYBRGreen como agente intercalante y la fluoresceína como referencia para la calibración. Tras la excitación del SYBRGreen intercalado ($\lambda=490$ nm), la emisión de fluorescencia ($\lambda=530$ nm) fue medida en cada ciclo utilizando un termociclador iCycler con el módulo de PCR a Tiempo Real “iQ Real Time PCR system” (Bio-Rad, USA).

Las reacciones para cada muestra se llevaron a cabo por triplicado utilizando placas de 96 pocillos (Axygen, USA), incluyéndose además un control negativo sin ADNc en cada experimento. Las reacciones fueron realizadas en un volumen total de 20 μ l, incluyendo 10 μ l de SensiMIX 2X y 0.2 μ M de cada cebador. Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de activación de la enzima a 95 °C durante 10', seguido de un ciclo de amplificación-detección a tiempo real de 3 pasos (15'' a 95 °C; 30'' a 60 °C; 30'' a 72 °C) que se repitieron 40-45 veces. Los valores de fluorescencia fueron tomados en el paso de extensión de cada uno de estos ciclos. Finalmente, se añadió un ciclo adicional de 60 pasos para determinar la curva de fusión de cada amplicón mediante un gradiente ascendente con incrementos de 0.5 °C desde 70 hasta 100 °C. Tanto este último ciclo, como la posterior electroforesis en gel de agarosa y tinción en bromuro de etidio a los que se sometió los productos de PCR, sirvieron para verificar la especificidad de la amplificación y la ausencia de dímeros de cebadores.

1.2.2. Cálculo de la expresión relativa

Los niveles expresión génica relativa fueron normalizados para la media geométrica de al menos dos genes constitutivos o de referencia (Vandesompele et al, 2002). Estos incluyeron: la hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (*HPRT1*), la peptidil-propil isomerasa B (*PPIB*), y la isoforma β de subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (*PPP1CB*) (ver tabla 2). La idoneidad de los genes de expresión constitutiva fue evaluada mediante el programa geNorm (Vandesompele et al, 2002), que calcula la medida de estabilidad (*M*) para todos los genes controles sometidos a estudio. Por otro lado, a partir de los datos crudos de fluorescencia, se calcularon los valores de eficiencia (*E*) de cada reacción individualmente mediante la aplicación *Data Analysis for Real-Time PCR* (DART-PCR; Peirson et al, 2003). De todas las eficiencias individuales se obtuvo el valor medio de *E* para cada experimento, utilizado posteriormente para el cálculo de la expresión relativa de los genes en estudio.

1.2.3. Análisis estadístico

Para todos los cálculos se utilizó la versión 3.05 de GraphPad InStat (GraphPad Software, USA). Tras comprobar que los datos obtenidos pasaron el test de normalidad siguiendo el método de Kolmogorov y Smirnov, los valores de Ct normalizados de linfocitos y linfocitos-PHA fueron comparados entre sí mediante un test-*t* de Student de dos colas. Los resultados se expresan como Media \pm ES (error estándar) de los siete individuos analizados.

1.3. DETECCIÓN DEL PÉPTIDO NKB EN LAS DIFERENTES ESTIRPES CELULARES MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA

1.3.1. Preparación y fijación de muestras

De cada una de las fracciones celulares aisladas, 50.000 - 100.000 células fueron lavadas en PBS, y resuspendidas en 20 μ l de buffer de fijación frío (2% formaldehído en PBS). 10 μ l de esta suspensión de células fueron colocados sobre portaobjetos cubiertos de lisina (Dako

Cytomation, Denmark) permitiendo la adhesión electrostática de las células durante 20' a 4 °C en una cámara húmeda. Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados tres veces con PBS para eliminar el exceso de formaldehído y finalmente guardados a -20 °C.

1.3.2. Tinción inmunocitoquímica

Para la tinción inmunocitoquímica de las células se usó el Immunohistochemistry Staining Detection System kit (Peninsula Laboratories Europe, UK), siguiendo las recomendaciones del fabricante e incluyendo un paso inicial de lavado de las células fijadas con PBS-0.1% Saponina durante 10'. A continuación, la actividad endógena de la peroxidasa fue inhibida mediante incubación de 30' con PBS-3% H₂O₂.

Para la detección de la proteína NKB, se usaron por separado 2 anticuerpos primarios específicos: el anticuerpo 1 (ab-1), un anticuerpo policlonal de conejo cuya diana es la secuencia completa de los 10 aminoácidos que componen NKB (Peninsula Laboratories Europe, UK); y el anticuerpo 2 (ab-2), un anticuerpo policlonal de cabra con afinidad por la región interna de NKB (Santa Cruz Technologies, Inc., Germany). Las preparaciones fueron bloqueadas durante 1 hora con una solución de suero de cabra (en el caso de ab-1), o con caseína al 0.5% (en el caso de ab-2), y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario o.n. a 4 °C. En el caso de ab-1, se utilizó como anticuerpo secundario una IgG biotinilada de cabra anti-conejo, seguido de una incubación a temperatura ambiente con el conjugado peroxidasa de rábano (HRP)-estreptavidina. Para el ab-2, el anticuerpo secundario fue una IgG de mono anti-cabra conjugada directamente con la peroxidasa de rábano (IgG-HRP). Los complejos antígeno-anticuerpo formados fueron visualizados mediante incubación con tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (DAB) en solución cromógena. Finalmente, las preparaciones fueron teñidas con hematoxilina, montadas y visualizadas en un microscopio Nikon-SE (Japan). Como control negativo se utilizó una preparación incubada únicamente con el anticuerpo secundario.

1.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL GLUCOCORTICOIDE BUDESONIDA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS TAQUICININAS EN SANGRE PERIFÉRICA

1.4.1. Muestras biológicas

Para determinar el efecto de la Budesonida (un glucocorticoide habitual en el tratamiento del asma) sobre la expresión génica de las taquicininas en las células inmunes, partimos de muestras de sangre periférica extraídas a 10 donantes adultos (6 hombres y 4 mujeres), con edades comprendidas entre los 25 y los 45 años. Todos los donantes respondieron negativamente a las preguntas del cuestionario ECRHS II y firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio.

Las muestras de sangre de los 10 donantes fueron recogidas en tubos Vacutainer (BD Vacutainer Systems, UK) y procesadas inmediatamente.

1.4.2. Ensayo de estimulación con Budesonida

Tras la extracción, la sangre total fue diluida 1:8 en medio RPMI-1640 precalentado. Los ensayos fueron llevados a cabo en placas de 6 pocillos (Nunc, USA), en los que se colocaron 10 ml de sangre diluida. A continuación, se añadió a cada pocillo el glucocorticoide, dejando siempre un pocillo control sin estimular. Las concentraciones finales de Budesonida en cada placa fueron de 10^{-10} M, 10^{-9} M y 10^{-8} M. Por último, las placas fueron incubadas a 37 °C en un incubador con una atmósfera del 5% de CO₂ durante 12 y 24 horas.

1.4.3. Detección de la expresión génica de las taquicininas

Previo a la extracción de ARN total, cada muestra fue sometida a una lisis hipotónica de los eritrocitos (ver apartado 1.1.1). Tras una centrifugación, el sedimento de leucocitos fue lisado en presencia de TriReagent (Sigma-Aldrich, UK) y el ARN extraído siguiendo las instrucciones del fabricante. Una ligera modificación del protocolo incluye la utilización de

columnas Phase Lock Gel (Eppendorf, Germany), cuya matriz inerte separa perfectamente la fase acuosa del ARN del resto de componentes, obteniendo preparaciones de ARN más limpias. Con el fin de eliminar posibles trazas de ADN presentes en la muestra, ésta fue tratada con DNasa I (ver apartado 1.1.2.1), y finalmente resuspendido en 40 µl de agua-DEPC. La integridad del ARN y la cuantificación del mismo fueron valoradas como se señaló en el apartado 1.1.2.1.

A partir de 2 µg de ARN de cada muestra/tratamiento, se obtuvo el ADNc siguiendo el método descrito en el punto 1.1.2.2. A continuación, y mediante PCR convencional se chequeó la expresión de *TAC1* y de los receptores taquicinérgicos *TAC1R*, *TAC2R* y *TAC3R*. Así mismo, en todas las muestras se estudió la expresión relativa de *TAC3* y *TAC4* mediante qPCR a Tiempo Real (tal y como se describe en el apartado 1.2.1). Como control positivo de este experimento, hemos analizado la expresión génica de la *IL-1β*, que se reduce en presencia de corticoides (Lee et al, 1988). Para la realización de estos análisis fue necesario el diseño de cebadores específicos para *IL-1β* (cebador directo: 5'-CGATGCACCTGTACGATCACA-3', cebador reverso: 5'-TCTTTCAACACGCAGGACA-3') y para *TAC* (cebador directo: 5'-GCTCGGAGGAACCAAGAGAA-3', y cebador reverso: 5'-CTCCGGCAGTTCCTCCTT-3'). En este último caso, los cebadores fueron diseñados para amplificar cualquiera de las cuatro variantes de procesamiento de *TAC1*.

1.4.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de la variación de la expresión génica, se realizó usando el programa informático *Relative Expression Software Tool* v 2.0.13 (REST2009; Pfaffl et al, 2002). Dicho programa utiliza un modelo matemático que tiene en cuenta las diferentes eficiencias de PCR obtenidas para los genes problema y los genes de referencia, permitiendo además la normalización con más de un gen constitutivo. El cálculo de la significación estadística de las diferencias de expresión relativas detectadas, se basa en un test no paramétrico de redistribución aleatoria de datos entre el grupo de muestras problema y el grupo de muestras control.

2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES COMUNES DE TAC1, TAC3 Y TAC4 CON EL ASMA

2.1. Participantes en el estudio

La población de estudio estaba compuesta por 102 pacientes adultos con asma atópica, diagnosticados según los criterios de la GINA y 100 adultos sanos que respondieron negativamente a todas las preguntas del cuestionario ECRHS II (ver anexo I). Las muestras fueron recolectadas en los servicios de Neumología del Hospital Universitario de Canarias, en el Hospital Universitario Virgen de La Candelaria, y en el Hospital General de La Palma. El estudio fue aprobado por el comité ético de la Universidad de La Laguna y todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

2.2. Extracción de ADN

En todos los casos se partió de sangre periférica extraída a cada uno de los participantes del estudio. De cada muestra, un volumen de 300 µl fue sometido a lisis hipotónica de eritrocitos (ver apartado 1.1.1). Tras la centrifugación, el pellet fue resuspendido en 300 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 30 mM, pH 8, EDTA 10 mM, SDS 10%) e incubado a 55 °C o.n. en presencia de proteinasa K a una concentración final de 80 µg/ml. Posteriormente, proteínas y restos celulares fueron eliminadas mediante dos extracciones con fenol-cloroformo. Por último, el ADN fue precipitado con un volumen de isopropanol, lavado con etanol al 70%, resuspendido en 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH=8,0) y almacenado a 4 °C.

2.3. Selección de polimorfismos

Para el estudio, se seleccionaron un total de 28 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) de los tres genes estudiados: 11 de *TAC1*, 9 de *TAC3* y 8 de *TAC4*. El objetivo de la selección de SNPs fue abarcar cada región génica con una cobertura de al menos un SNP cada 1-2 kb.

La selección se basó en los datos disponibles para la población CEU (residentes de Utah con ancestros del Norte y Oeste de Europa) de la fase II del proyecto HapMap. Para asegurar la selección de todos los tag-SNPs conocidos para cada gen, se utilizó el “tSNP_pairwise_Tagger” (disponible en el proyecto HapMap) fijando el umbral de correlación (r^2) en 0.8 y la frecuencia del alelo minoritario (MAF) >5%. La figura 12 muestra los SNPs seleccionados y su localización en los diferentes genes.

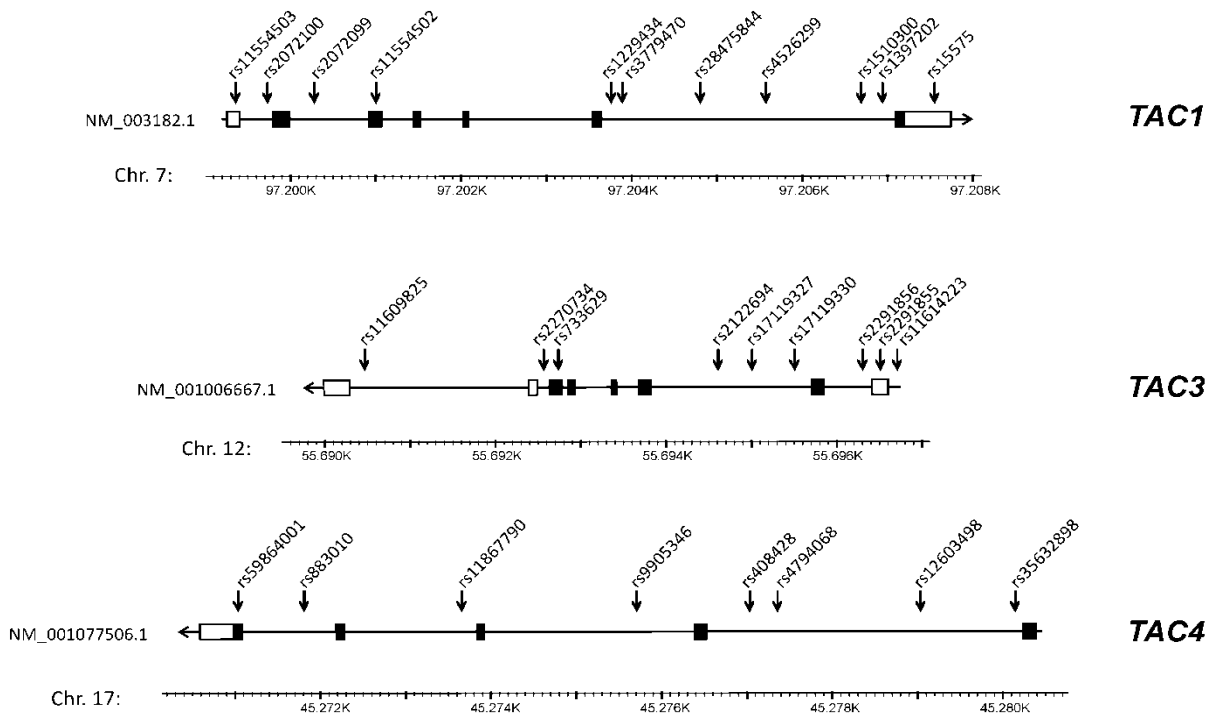


Figura 12.- Organización de los genes *TAC1*, *TAC3* y *TAC4* humanos y localización de los SNPs analizados. Las cajas indican exones y las líneas representan los intrones. Los polimorfismos están expresados según su identidad en la base de datos dbSNP.

2.4. Genotipado

Todos los SNPs fueron genotipados mediante el sistema SNaPshot (Applied Biosystems, USA) de genotipado múltiple. El método consiste en una PCR múltiple y una posterior extensión, también múltiple, de base única (SBE) (Sánchez et al, 2006). Para ambas reacciones se diseñaron cebadores específicos. En el caso de la PCR múltiple, se diseñaron dos cebadores que flanquearan a cada uno de los SNPs, mientras que para la reacción de SBE se diseñó un único cebador que anillara inmediatamente hasta la base contigua de cada SNP. A estos últimos cebadores se les añadieron colas de citocinas-timinas (CTs) en su

extremo 5' para generar productos de tamaños conocidos y diferenciables entre sí. Las reacciones de PCR múltiples fueron llevadas a cabo en un termociclador MyCycler (Bio-Rad, USA), con un paso inicial de desnaturalización de 10' a 95°C, 35 ciclos de amplificación (30'' a 95°C, 30'' a 60°C, 30'' a 65°C), y un paso de extensión final de 6' a 65°C. Los productos de PCR obtenidos, fueron purificados mediante incubación con 2U de Fosfatasa Alcalina de Camarón (SAP) y 0.5U de Exonucleasa I durante 40' a 37 °C. A continuación, los productos purificados fueron sometidos a una reacción de SBE múltiple, usando los cebadores específicos para cada SNP, y didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados (ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit).

Cebadores de PCR-Múltiple			
Ensayo	SNP	Cebador directo	Cebador reverso
1	rs11554503	ACTGAGCAGGCGAAAGAGC	GCTGAGTTTCTCTGGTTCCTC
	rs2072100	ATGAACCAAGATCAAAAACATAAGG	GGAGAAGAGGGTTGGAGAATCTT
	rs2072099	CCAGGAACTCCCTGCAGTA	AGGTCCTGGGGGATGAAAT
	rs11554502	GAGCCCTTTGAGCATCTTCTG	CATTAATCCAAAGAACTGCTGAGG
	rs1229434	GGCAGACACTGGTAAGAATGG	CCACAAATGGATTTATAGCTGG
	rs3779470	TTCAGTAAGGTTAAACACGGCTTAT	CCATTTAATCATTACCAACCTGAAT
	rs28475844	AAAAAGTTAACACAATCTGGGCTAC	GGAAATTTTGTATCAAAAGGTCAAT
	rs4526299	GATAAATCTAGATAGATGCCCTTCC	CAGAGTTTCTTACCTGGTCTTTGAA
	rs1510300	CAAAGCAGCCATAGACAATATGTAA	GCCAAATCTAGAATACCATTTGTTC
	rs1397202	GCACCAAGTATATGATGAATGATGA	GAATGTTATCTGCACATCTTCCAAT
	rs15575	GAAGGAACTCCTGACAGTCTTGT	CATGCTTCAGAGATACAAATACAGTG
	rs59864001	GTGTCCTCTGGGAAGTCTGTG	ACCATGGTTCATATAACCAAACCTCTC
	rs35632898	GGATCTTCTGCCTCTGCACT	GAGAGGAACAGACACTCAGCACT
2	rs11609825	GCTGAGGGTCAAGACTTGTCT	AGCAGGAGAGAAGGGGAGAG
	rs2270734	AGTCTCCCAACTCTGTCTTTGAAC	TCTGAATGTGAACTACACCCTGAT
	rs733629	ACAGGACCTTTCTTACCTTCAGTG	TATAAAGGTCTCTGCTCCTCTGTTC
	rs2122694	CCCTCTTGGTCAATGAATGAG	TAGGCACACCTATGTACTACCCTCT
	rs17119327	GGAGGAAGTCTTTTCAAGGTTTTG	AGAGGCAGTTAACTTCACACATTG
	rs17119330	CTGTATCTCTGCATGTCTTTGACAC	ACCAAGTCTCCCATCAATCAAC
	rs2291856	AGGAGGGAATAAAGCAGATGG	CCAAACACCAACCAGCTCTC
	rs2291855	GTCCTAGCCAGTTCCTTGATCCT	CTACCTGTGGAGCAGCTCTGT
	rs11614223	GTGGCTACTGTCTGCATCCTC	ATAAAGGCTCTGGGAGGGTCTA
	rs883010	TAGTCTTCAGAGATTTTCTGCCTTC	TGTGAACTGATAACTGCTTATGGTG
	rs11867790	GGGATAGGAATAGACAGTGATGGAT	CTAATTCCAGGCTTTAGACGTAAGG
	rs9905346	ACTAACTTAAACCTGTGTTCCCTGA	ACTGCTCTGTGTGCAGAGTATTTTC
	rs408428	GCTCTGTACCTAGGCTGGAGT	GTAGACACCTGTAATCCCAGCTACT
	rs4794068	AGAGCAGAACCAGTACTGTGAAGTC	GATGGAGAACTGAGATGTAAGGAG
	rs12603498	AACTAGTGCTGCTGGACTGTTTC	AAAGGAGAGTGAAAGGAGAGTAAGG

Tabla 3.- Secuencias de los cebadores diseñados para las PCR-Múltiples.

Cebadores usados en las reacciones de SBE			
Ensayo	Cebador	Secuencia	Tamaño
1	rs1510300snR	TCTAGAATACCATTTGTTCTTGATAA	26
	rs28475844snR	AATTATGAAACACTTAGAACTTTTCAATT	29
	rs4526299snR	ctctctctctTGAAGCCTGATATAAATTTTTGAGT	35
	rs15575snF	ctctctctctctctCTGACAGTCTTGTGCTTTT	35
	rs2072100snF	ctctctctctctctctCAAGATCAAAAACATAAGGACT	40
	rs1229434snR	tctctctctctctctGGATTTATAGCTGGTTAAGCTAATA	40
	rs1397202snF	ctctctctctctctctctctctCTGTGGTTAGATCATTTC	44
	rs3779470snF	ctctctctctctctctctACAGATCTATAGGAAAGAATATAGCA	44
	rs35632898snR	ctctctctctctctctctctctTAATTGTGGCCTTGGAGGTACTTT	48
	rs59864001snF	tctctctctctctctctctctctctCTGTGGTGGGGGCTTTT	48
	rs11554502snF	ctctctctctctctctctctctctctctctctGCAGAGAATCGCCCGG	52
	rs2072099snR	ctctctctctctctctctctctctctctctctCTGGGGGATGAAATCTTA	56
	rs11554503snR	ctGTCGCTCCGCACTCTC	60
2	rs2291856snR	CAGGTGCTTTGTGCTCAC	18
	rs11609825snF	tctctGAGGGTCAAGACTTGTTCTTT	26
	rs408428snF	ctctctctctctctCCTCCCAGGTTCAAGC	32
	rs11614223snF	ctctctctctctctGCCACCCTGGGATTGG	32
	rs2291855snR	tctctctctctctctctTGGAGCAGCTCTGTGCC	36
	rs733629snR	tctctctctctctctctTGTTCCCAGGGAAGACT	36
	rs4794068snR	tctctctctctctctctGACTTGTTCCAAGGTCACAC	40
	rs17119327snF	tctctctctctctTTCAAGGTTTTGAAATGACAGCAATTA	40
	rs12603498snR	ctctctctctctctctctctAAGGAGAGTAAGGATTAGACCC	44
	rs11867790snR	ctctctctctctctctctctTCCAGGCTTTAGACGTAAGG	44
	rs2122694snF	tctctctctctctctctctctCCTCTTGGTCAATGAATGAGA	48
	rs9905346snF	tctctctctctctctctctctctCTGAAGGCACTTTCAACTCAG	52
	rs2270734snF	ctctctctctctctctctctctCAACTCTGTCTTTGAACACTGC	52
	rs883010snR	tctctctctctctctctctctctAGAGTGATCTGCACTTATTTACAGT	56
	rs17119330snF	ctctctctctctctctctctctctctctctCACCTTGACATAAAAGGTGCC	60

Tabla 4.- Secuencias y tamaños de los cebadores utilizados para las reacciones SBE.

Las condiciones térmicas de esta reacción consistieron en 35 ciclos de 10'' a 96 °C, 5'' a 55 °C y 30'' a 60 °C. Finalmente, el exceso de ddNTPs fue eliminado del producto de SBE mediante incubación con 1U de SAP durante 40' a 37 °C. El producto final purificado fue sometido a electroforesis capilar en un ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

El proceso previamente descrito fue llevado a cabo en dos ensayos Multiplex (de 13 y 15 SNPs, respectivamente), a fin de abarcar el genotipado de los 28 SNPs. Las secuencias de los

cebadores utilizados para cada SNP, tanto en las PCRs múltiples como en las reacciones de SBE, se muestran en las tablas 3 y 4.

2.5. Análisis de datos

Los electroferogramas obtenidos del ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer, fueron analizados con el programa GeneScan (Applied Biosystems, USA), creándose una base de datos con los genotipos de cada SNP.

Aquellos SNPs que presentaron una MAF <5% fueron descartados para los análisis. Un test de Chi-cuadrado (χ^2) fue realizado para cada SNP con el fin de comprobar que la población se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg para todos ellos. A continuación se calculó el desequilibrio de ligamiento (LD) entre los SNPs genotipados usando el programa Haploview 2.05 (Barrett et al, 2005).

Basándonos en métodos de regresión logística, se estudió la asociación entre el asma y los genotipos de cada locus bajo 5 modelos de herencia diferentes (codominante, dominante, recesivo, sobredominante and log-aditivo), utilizando para ello el programa SNPStats (Solé et al, 2006; <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). En todos los casos se calcularon los odds ratios (OR) y sus intervalos de confianza del 95% (CI), así como el criterio informativo de Akaike (AIC) para determinar el modelo genético que mejor se ajustaba a los datos.

Por otra parte, se estimaron las frecuencias haplotípicas bajo el algoritmo de maximización de las expectativas (EM) y posteriormente se estudió su posible asociación con el asma mediante el programa haplo.stats (<http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/biostat/schaid.cfm>). Para el análisis de la asociación, el haplotipo más común fue seleccionado como categoría de referencia, mientras que los haplotipos raros, con una frecuencia inferior a 0.01, fueron agrupados. Por defecto, se asumió un modelo de herencia log-aditivo y el nivel de significación de todos los test se fijó en 0.05.

3. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR EOSINOFÍLICA EOL-1

La línea celular elegida para la realización de los estudios *in vitro*, fue la línea eosinofílica humana EoL-1, establecida en 1984 a partir de un paciente de 33 años con leucemia mieloide aguda. Esta línea celular ha sido utilizada en numerosos estudios, en los que ha sido probada como modelo válido para el estudio de los eosinófilos (Saito et al, 1985; Mayumi, 1992; Wong et al, 1999).

3.1. TÉCNICAS DE CULTIVO: EXPANSIÓN, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN

Para la expansión del cultivo, se siguió la metodología recomendada por la empresa distribuidora de esta línea celular, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Las células fueron crecidas en botellas de cultivo de 75 cm² de superficie (T-75) con medio RPMI-1640 suplementado con FBS (10%), y con penicilina y estreptomycin (Sigma-Aldrich, UK) como antibióticos. Para mantener la densidad del cultivo recomendada de 0,5 – 2 x 10⁶ células/ml, cada 3-4 días se realizaron pases del cultivo, cambiando por completo el medio y cultivando de nuevo a una densidad de 0,5 x 10⁶ células/ml. Para el cambio de medio, las células en suspensión fueron centrifugadas en tubos Falcon-50 a 300 g durante 5'. Tras eliminar el medio de cultivo anterior, el pellet de células fue resuspendido en medio de cultivo nuevo atemperado, para posteriormente proceder al recuento celular y a la expansión en nuevos frascos de cultivo.

Las células se criopreservaron para su posterior empleo y su mantenimiento en el tiempo. Para congelar las células, éstas fueron contadas, centrifugadas a 300 g durante 5' a 4 °C, y posteriormente lavadas con PBS frío. El pellet resultante fue resuspendido en medio de congelación (RPMI-1640 suplementado con FBS (20%) y un 10% de dimetil sulfóxido (DMSO)) a una densidad celular de 0,5-1 x 10⁶ células/ml y por último repartido en tubos de criopreservación de 2 ml. Tanto el medio de congelación como los tubos de criopreservación fueron mantenidos a 4 °C, a fin de evitar los efectos citotóxicos del DMSO a temperaturas superiores. Una vez resuspendidas las células en los tubos de criopreservación, éstos fueron almacenados en un contenedor de congelación gradual MrFrosty (Nalgene, USA), que fue

depositado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. A continuación, los viales fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células conservadas en nitrógeno líquido, los tubos de criopreservación fueron calentados durante unos minutos en un baño de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con leve agitación. Una vez descongelado el medio, se volcó directamente el contenido de los viales en un tubo Falcon-15 ml y se añadió medio de cultivo precalentado hasta el tope del tubo. Tras una centrifugación a 300 g durante 5', el sobrenadante fue descartado, y el pellet resuspendido en un medio de cultivo fresco y sembrado en frascos de cultivo.

3.2. DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR EoL-1

La línea celular EoL-1 es una línea eosinofílica mielóide sin diferenciar, que sin embargo puede ser diferenciada a eosinófilos maduros por medio de diferentes estímulos (Mayumi, 1992). Recientemente, Wong y cols. (1999) han realizado una exhaustiva caracterización de la diferenciación de la línea celular EoL-1 inducida por dibutiril-AMP-cíclico (dbAMPc), detectando numerosos marcadores de eosinófilos funcionalmente maduros. Por ello, este método de diferenciación es ideal para generar eosinófilos maduros, que nos sirven de modelo en nuestro estudio.

El protocolo de diferenciación se basó en la incubación de la línea celular EoL-1 con 0.1mM dbAMPc durante 9 días. Durante este periodo de incubación, el medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días reajustando el número de células en cultivo a $0,5 \times 10^6$ células/ml. Una de las características durante el periodo de diferenciación de las células, es que éstas dejan de crecer en suspensión y comienzan a adherirse al soporte plástico en el que crecen. Debido a ello, en cada cambio de cultivo, se recurrió a la tripsinización para despegar las células del frasco de cultivo. Tras lavar los frascos con PBS atemperado, las células fueron incubadas con 5 ml de Tripsina-EDTA (0,25%; Sigma-Aldrich, UK) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5-10' para despegar las células del frasco de cultivo. Por último, se procedió a inactivar la tripsina mediante la adición de 2 volúmenes de medio de cultivo suplementado con 10% FBS.

A fin de estudiar la expresión génica de las taquicininas y los receptores taquicinérgicos durante la diferenciación celular, se tomaron muestras de células (3×10^6 células) en los días

0 (sin diferenciar), 1, 3, 5, 7 y 9 del proceso de diferenciación. Tras centrifugar las células, y lavarlas con PBS, el pellet de cada muestra fue sometido a extracción de ARN total. A continuación se procedió a la detección de la expresión génica de las taquicinas y sus receptores siguiendo los pasos descritos en el apartado 1.1.2. La cuantificación relativa de la expresión y los análisis estadísticos fueron llevados a cabo siguiendo los procedimientos de los apartados 1.2.1. y 1.4.4., respectivamente.

3.3. ENSAYO DE ESTIMULACIÓN CON SP

El objetivo de este ensayo *in vitro* fue ampliar el conocimiento del papel inmunomodulador de SP sobre los eosinófilos, determinando el posible papel de SP en la regulación génica de las rutas de producción de diferentes mediadores del asma.

3.3.1. Condiciones de cultivo

Para este estudio, se partió de células EoL-1 diferenciadas, previamente lavadas con PBS y resuspendidas en medio RPMI-1640 a 1×10^6 células/ml en frascos de cultivo T-25. Los ensayos de estimulación con SP fueron llevados a cabo en placas de 6 pocillos de 3,5 cm de diámetro, en los que se sembraron 2×10^6 células. Las células fueron pre-incubadas a 37 °C durante 1 hora con 10^{-5} M de Fosforamidón (Sigma-Aldrich, UK), un inhibidor de NEP. Posteriormente se añadieron cantidades crecientes de SP (Sigma-Aldrich, UK) para obtener concentraciones finales de 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M y 10^{-6} M. En todos los casos se incluyó un pocillo control sin SP. Las células fueron entonces incubadas en un incubador de CO₂ a 37 °C durante 2, 4, 6, 12 y 24 horas. Este experimento fue llevado a cabo por cuadruplicado.

A fin de recrear mejor las condiciones *in vivo* de los eosinófilos en las vías aéreas, los ensayos fueron replicados en placas recubiertas con fibronectina (FN), una glicoproteína de la matriz extracelular. Previo a este nuevo ensayo, la superficie de los pocillos fue cubierta con FN en PBS, a una concentración final de 2 µg de FN/cm². Para permitir la adherencia de la FN al soporte plástico, las placas se incubaron a 4 °C o.n. Al día siguiente, se retiró el líquido y los lugares de unión inespecífica fueron bloqueados con 2% de albúmina bovina

(BSA) en PBS. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la incubación, se retiró nuevamente el líquido y se realizaron 3 lavados con medio RPMI-1640. Finalmente, se procedió al ensayo de estimulación con SP como se describió anteriormente.

En todos los casos, se determinó la viabilidad de las células tras los diferentes tiempos de incubación mediante tinción con *trypan blue*.

3.3.2. Estudio de la expresión génica de mediadores en el asma

Al término de los diferentes tiempos de incubación, las células fueron lavadas con PBS, y centrifugadas a 300 g durante 5'. A continuación, se procedió a la extracción del ARN total utilizando el Kit RNeasy Mini (Quiagen Ltd., UK) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El tratamiento con DNasa I se realizó como se describe en el punto 1.1.2.1. Posteriormente se llevó a cabo la RT-PCR, utilizando para ello la M-MLV Punto Mutante (RNasa H⁻) (Promega, USA), tal y como se describe en el apartado 1.1.2.2.

A partir del ADNc de cada muestra, se determinó la expresión, mediante PCR convencional, y la cuantificación relativa, mediante qPCR a tiempo real, de los genes seleccionados para el estudio. La elección de los mismos se realizó en base a los mediadores inflamatorios y receptores expresados en eosinófilos (Barnes et al, 1998; Giembycz & Lindsay, 1999). En la tabla 5 se muestran los genes elegidos y los cebadores diseñados para su análisis.

Gran parte del estudio se centró en el análisis de la expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en el metabolismo del AA. Así, de esta ruta se estudió la expresión de los genes de las lipooxigenasas 5 y 15 (ALOX5 y ALOX15), la proteína activante de 5-LO (FLAP), la leucotrieno C4 sintasa (LTC4s), la leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4h), las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX1 y COX2), la prostaglandina F₂ sintasa (PGFs ó AKR1C3), la prostaglandina E₂ sintasa (PGEs ó PTGES), la prostaglandina D₂ sintasa hematopoyética (hPGDs ó HPGDS), la tromboxano A₂ sintasa (TXAs ó TBXAS1), y la carbonil reductasa 1 (CBR1 ó prostaglandina 9-ketorreductasa). Por otro lado, se estudiaron los niveles de expresión de diferentes miembros de la familia de las fosfolipasas A₂, como son las de los

grupos IV-A (PLA2G4A citosólica Ca^{++} -dependiente, ó cPLA2), grupo VI (PLA2G6, citosólica Ca^{++} -independiente, ó iPLA2) y grupo II-A (PLA2G2A secretada, ó sPLA2). Además, se analizaron las expresiones génicas de las enzimas PAF-acetil-hidrolasa plasmática (PAFAH, ó PLA2G7) y PAF-acetil-hidrolasa 2 (PAFAH2 ó SD-PLA2), también pertenecientes a la familia de las fosfolipasas e implicadas en el metabolismo de PAF y la liberación de AA. También se incluyeron en el estudio a los genes de las citoquinas IL-5, IL-6, TNF- α , y el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), así como las quimioquinas IL-8 (ó CXCL8), proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MIP-1 α ó CCL3), proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β ó CCL4), y RANTES (ó CCL5). Por otro lado, se estudiaron los genes de las proteínas de los gránulos de los eosinófilos: EPX, MBP, ECP y EDN.

Además, se estudió la expresión génica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), de ICAM-1, y de los factores de transcripción STAT6 y NF κ B. También se incluyeron los genes de diversos receptores implicados en la respuesta inflamatoria mediada por eosinófilos como son los receptores de la PGE₂ (EP1, EP2, EP3 y EP4), los de la PGD₂ (D1 y D2 ó CRTH2), los de cisteinil-leucotrienos (CysLTR1 y CysLTR2), los de LTB₄ (LTB4R1 y LTB4R2), así como el receptor de PAF (PAFR) y el receptor de quimioquinas C-C tipo 3 (CCR3). Por último, también se estudió la expresión de las taquicininas (*TAC1*, *TAC3* y *TAC4*), así como sus receptores (*TAC1R*, *TAC2R* y *TAC3R*) utilizándose en estos casos los cebadores citados en la tabla 2 y el apartado 1.4.3.

En todos los casos, los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,7% y posterior tinción en bromuro de etidio. Por otro lado, los cálculos de la expresión relativa obtenida mediante qPCR, fueron llevados a cabo como se ha descrito previamente (ver apartado 1.2.2), y el análisis estadístico de su variación mediante el programa REST 2009 (Pfaffl et al, 2002) (ver apartado 1.4.4).

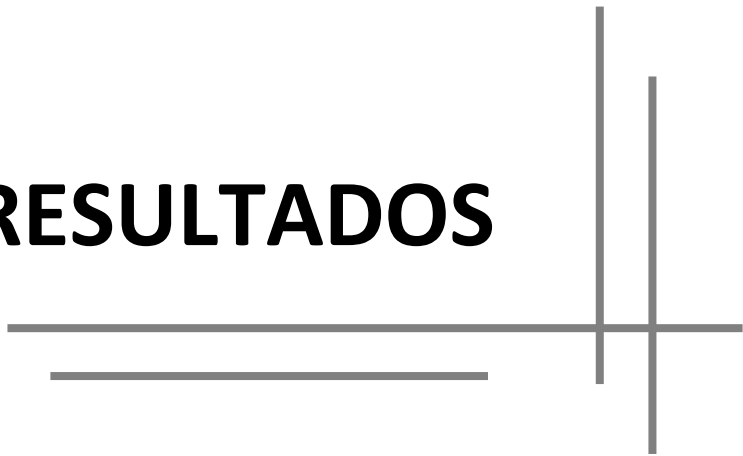
Tabla 5.- Secuencias de los cebadores directo y reverso diseñados para estudiar las rutas y los mediadores inflamatorios de los eosinófilos.

	GENES	Cebador directo	Cebador reverso
METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	<i>ALOX15</i>	ACCGAGGGTTTCCTGTCTCT	GAGAAGCCTGGTGGAAAGTTG
	<i>ALOX5</i>	AAGTTGGCCCGAGATGACC	CAAAGTCCACTCCTTTTTCACTATCA
	<i>FLAP</i>	GGCCATCGTCACCCTCATCAGCG	GCCAGCAACGGACATGAGGAACAGG
	<i>LTC4s</i>	AGCTCGCCTTCACACACAGC	TCACCTGGGCTCGGTAGACG
	<i>LTA4h</i>	GCCACATTTGCGGACGAT	TCTCTGGTCCTCCAAGCAGT
	<i>COX1</i>	TTCACCCACTTCCTGCTCAC	GGGGCAATCTTTAGGCACAG
	<i>COX2</i>	CTATGGAGAAAACCTGCTCAACAC	TCATCAGGCACAGGAGGAAG
	<i>PGFs</i>	CCAGTTGACTGCAGAGGACA	AAGTCGCTAACAGGACGGA
	<i>PGEs</i>	TGGCTATACCTGGGGACTTG	ACTGTTAGGGAGGGAGAGGG
	<i>hPGDs</i>	AACAAGCTGACTGGCCTGAAATCA	TCACATCTTGCTTTTTCTCTGCCCA
	<i>TXAs</i>	TGCCCAATAAGAACCAGAGAC	GCTTGCACCCAGTAGAGGAG
	<i>CBRI</i>	CTCCACCAGCTGGACATC	ATTCTGTGCACACATCTCGG
PAF	<i>cPLA2</i>	TGGCTCTGTGTGATCAGGAG	GAGCCAGAAAGACCAGCAAC
	<i>iPLA2</i>	ACGCAGTGGCTGGCCTGAAC	CAGCCCCGTTTCAGCAGCAT
	<i>sPLA2</i>	AAACGTCTGGAGAAACGTGG	AGGGTAGGGAGGGAGGGTAT
	<i>PAFAH</i>	TTGCATGTGCTTTTTCTGCCT	TTTGGGATCCAAAGGGTGTG
	<i>PAFAH2</i>	GGCACCCATGAGCTCCTATC	CCCCAGTCCCCTCTACTGC
CITOQUINAS/ QUIMIOQUINAS	<i>IL-5</i>	GGGAATAGGCACACTGGAGA	ATCTTTGGCTGCAACAAACC
	<i>IL-6</i>	AGGAGACTTGCCCTGGTGAAA	CAGGGGTGGTTATTGCATCT
	<i>TNF-α</i>	TCAGCCTCTTCTCCTTCCTGA	CAGCTTGAGGGTTTGCTACA
	<i>TGF-β1</i>	CGTCTGCTGAGGCTCAAGTT	GAACCCGTTGATGTCCACTT
	<i>IL-8</i>	AGACAGCAGAGCACACAAGC	AATTTCTGTGTTGGCGCAGT
	<i>MIP-1α</i>	TGCTCAGAATCATGCAGGTC	TTTCTGGACCCACTCCTCAC
	<i>MIP-1β</i>	GCTGCTCAGAGACAGGAAGTCTT	ACAGGAAGTGCAGGAGAGGAGT
	<i>RANTES</i>	CCATATTCTCGGACACCAC	GAAGCCTCCCAAGCTAGGAC
PROT. GRANUL.	<i>ECP</i>	CAGTTCTCACAGGAGCCACA	ATTGTTAATTGCCCGCATTG
	<i>EPX</i>	TGGAACACCTGACAACATTGA	GGCTCTGAAGATGTCCCTTG
	<i>MBP</i>	CCTGGTTTCCATCCACAACCT	CTGGGACCAGCTCAGTAGGA
	<i>EDN</i>	CTGAACCCCGAACAACCAG	GCATCGCCGTTGATAATTG
NO	<i>iNOS</i>	AGCCAGGCCACCTCTATGTT	TTCTTCGCCTCGTAAGGAAA
Adhesión	<i>ICAM-1</i>	CAGAGGTTGAACCCACAGT	TCTGAGACCTCTGGCTTCGT
FACT. TRANS.	<i>STAT6</i>	GCGGCTCTATGTCGACTTTC	ATGCTCTCAAGGGTGCTGAT
	<i>NFκB</i>	CTGATGTGCACCCGACAAGTGG	GTTGATGGTGCTCAGGGATGAC
RECEPTORES	<i>EP1</i>	TTGTCCGGTATCATGGTGGTG	GCAAGAGGCGAAGCAGTT
	<i>EP2</i>	CCACCTCATTCTCCTGGCTA	ACAACAGAGGACTGAACGCA
	<i>EP3</i>	GATCACCATGCTGCTCACTG	AAAACAGTCATGGTCAGCCC
	<i>EP4</i>	GAAAGCTGGCAACTCTGACC	CCGGGAGTGGACATGATAGT
	<i>DP1</i>	CTCTGCCCGTAATTTATCGC	CACCGGCTCCTGTACCTAAG
	<i>DP2</i>	AATCCTGTGCTCCCTCTGTG	CCACCACGAAGAGGATGACT
	<i>CysLTR1</i>	AGCCCCACAAGACAATCAA	AGGAGAGGGTCAAAGCAACAA
	<i>CysLTR2</i>	GCAACCATCCATCTCCGATC	CCAGGAAACGCACAACACTC
	<i>LTB4R1</i>	GTCTGCGGAGTCAGCATGTA	CAGGCTCATGTTCTGTTTTCC
	<i>LTB4R2</i>	GAGGTGGGAGGAGGTAGGAG	AAGCTGAAGTGGGGCAGTAA
	<i>PAFr</i>	GGGGTCATTGCTAATGGCTA	GAAGGCCACAGAGCAGTAGG
	<i>CCR3</i>	CTACTCCACTGCTGCATGA	TGGTCTTCCCTTTTAGGCA

3.3.3. Detección de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el sobrenadante

Para la detección de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en los sobrenadantes de los cultivos, se utilizó el kit Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ EIA (Cayman Chemical, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este kit se basa en un inmunoensayo de competición, en el que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ de la muestra compite con una $\text{PGF}_{2\alpha}$ conjugada a acetilcolinesterasa (AChE), por la unión a una cantidad limitada de anticuerpos específicos de conejo anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$. La cantidad de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de la muestra puede ser variable, mientras que la concentración de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ conjugada a AChE se mantiene constante, por lo que la cantidad de $\text{PGF}_{2\alpha}$ -AChE que se une a los anticuerpos específicos, será inversamente proporcional a la concentración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de la muestra de cada pocillo. La unión de los complejos formados con los anticuerpos específicos, a IgG anti-conejo anclados en el fondo de los pocillos, permite el lavado de los mismos y el posterior revelado mediante la adición del sustrato de la AChE (Reactivo de Ellman). La reacción enzimática resultante se traduce en una coloración amarilla con elevada absorbancia a 412 nm. La intensidad del color fue determinada mediante espectrofotometría (Multiplate Reader 680; Bio-Rad, USA), y el cálculo de las concentraciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de las diferentes muestras fue obtenido por interpolación con la recta patrón construida a partir de cantidades conocidas de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

RESULTADOS



1. EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS EN SANGRE PERIFÉRICA

1.1. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES TAQUICINÉRGICOS

Debido a los bajos niveles de expresión del receptor NK1 en células inmunes, para su detección se emplearon dos rondas consecutivas de amplificación por PCR (PCR anidada). De esta forma, y en consonancia con estudios previos (Lai et al, 1998; Ho et al, 1997), se detectó la expresión de *TAC1R* en monocitos, linfocitos y PHA-linfocitos. Así mismo, el transcrito para el receptor NK2 fue detectado tanto en linfocitos, PHA-linfocitos como en monocitos, tras una única ronda de amplificación con los cebadores externos diseñados para *TAC2R*. Para incrementar la sensibilidad en la detección del transcrito en aquellas muestras con una posible expresión más baja de este gen, se llevó a cabo una segunda ronda de amplificación con los cebadores internos correspondientes. Aún así, no se observó señal ni en las muestras de neutrófilos ni en las de eosinófilos. Finalmente, y a pesar de su clara expresión en las muestras de células de líquido amniótico utilizadas como control positivo, no se detectó la expresión del receptor NK3 en ninguna de las estirpes celulares analizadas.

1.2. DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *TAC3* Y *TAC4*

Mediante el empleo de la técnica de RT-PCR, detectamos la expresión de *TAC3* en los linfocitos, los PHA-linfocitos y los monocitos de los siete donantes (ver figura 13), pero no en PMNs ni en eosinófilos. Por otro lado, se utilizaron cebadores específicos para amplificar cada uno de los transcritos alternativos descritos para el gen *TAC4*. De ellos, se detectó la expresión del transcrito *TAC4δ*, obteniéndose una banda correspondiente al tamaño predicho para el amplicón (223pb) en las muestras de PMNs, linfocitos y PHA-linfocitos de todos los individuos analizados, así como en los dos *pools* de eosinófilos. Además, también se detectó la banda correspondiente a la amplificación de *TAC4γ* (229 pb) en todas las muestras de PMNs, en los dos *pools* de eosinófilos, y en 2 y 3 muestras de linfocitos y PHA-linfocitos respectivamente (ver figura 13). Sin embargo, en ninguna de las estirpes celulares

analizadas se observó la presencia de los transcritos de *TAC4α* o *TAC4β*. Como control de las reacciones de RT-PCR se utilizó la amplificación del gen de expresión constitutiva *PPIB*, que ha sido descrito como gen de referencia apropiado para estudios de expresión génica en muestras de sangre periférica (Pachot et al, 2004). Finalmente, se verificó la identidad de las amplificaciones obtenidas en nuestro estudio para los transcritos de *TAC3*, *TAC4δ* y *TAC4γ*, mediante su secuenciación y posterior alineamiento con las secuencias de ARNm para cada gen depositadas en el GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) con los números de acceso NM_001059, NM_001077505.1, y NM_001077504.1, respectivamente.

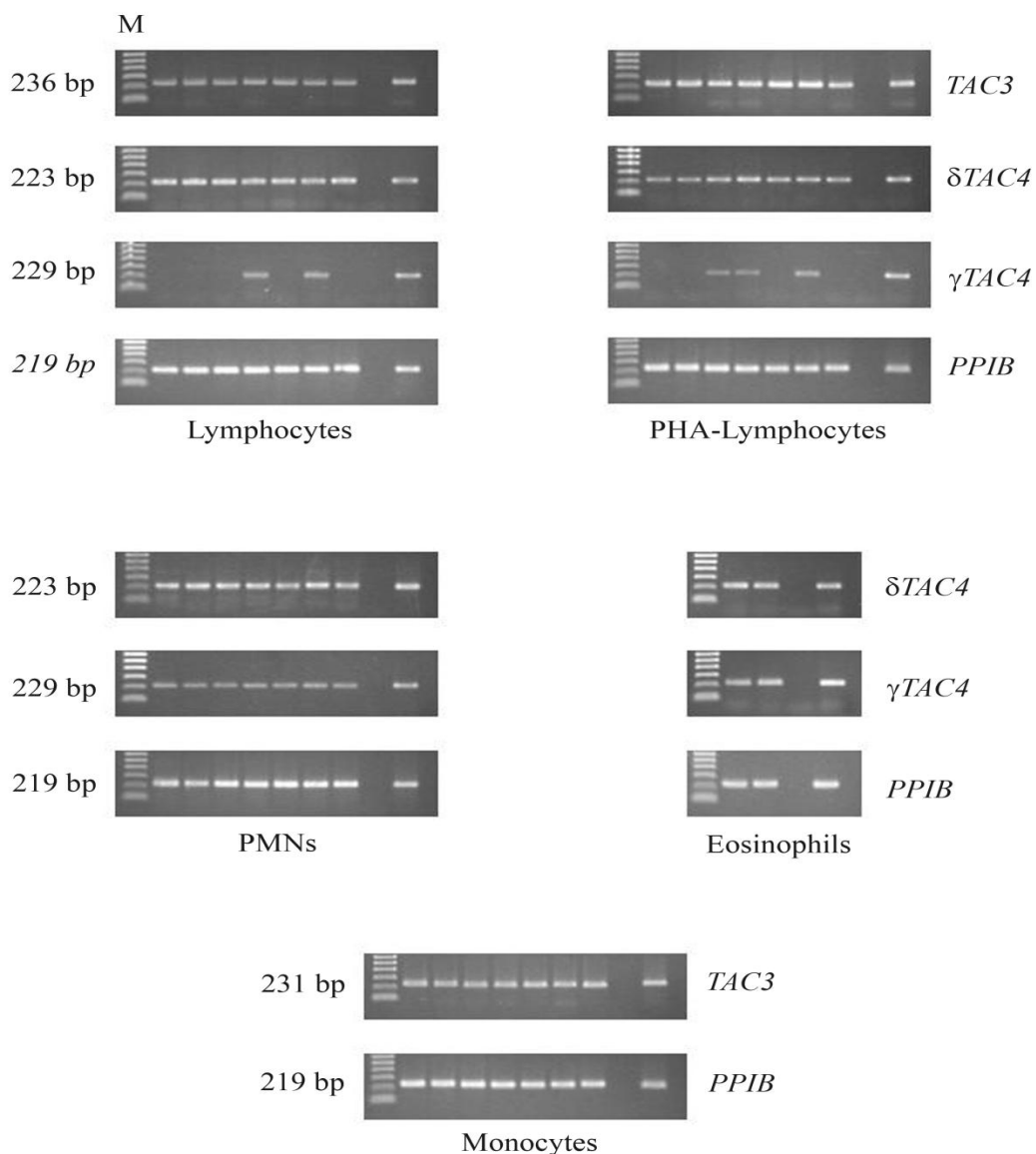


Figura 13.- Geles de agarosa mostrando la expresión del ARNm de *TAC3*, *TAC4δ*, *TAC4γ* y el control *PPIB* en los siete donantes y las dos muestras de eosinófilos. Las últimas dos líneas de cada gel corresponden a los controles negativos y positivos (glándula adrenal), respectivamente. *M*, peso molecular estándar de 100 pb.

A continuación, comparamos la expresión relativa de *TAC3* y *TAC4δ* entre los linfocitos obtenidos de las muestras de sangre periférica (PBL) y los PHA-linfocitos mediante qPCR a Tiempo Real. En primer lugar, se estudió la estabilidad de los diferentes genes de referencia (*HPRT1*, *PP1B* y *PPP1CB*) en las muestras analizadas. Mediante la aplicación geNorm, incluida en el programa qBASE, se calculó la medida de la estabilidad de la expresión (M) y el coeficiente de variación (CV) para los tres genes constitutivos en PBLs y PHA-linfocitos (Vandesompele et al, 2002). Basándonos en los resultados obtenidos, *HPRT1* fue descartado del análisis (CV=48%, M=0.8), y *PP1B* y *PPP1CB* fueron usados como los genes de referencia para comparar expresiones relativas (CV_{medio}=17,82%, M=0.514).

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos de la comparación de las expresiones relativas de *TAC3* y *TAC4δ* entre PBLs y PHA-linfocitos. Se observa un incremento significativo de la expresión de *TAC3* (p=0.0019) en PHA-linfocitos (3.03±0.51) respecto a PBLs (0.42±0.11). Por el contrario, los PHA-linfocitos mostraron una regulación a la baja (p=0.0175) de *TAC4δ* (0.51±0.17) comparado con su expresión en linfocitos sin estimular (1.27±0.13).

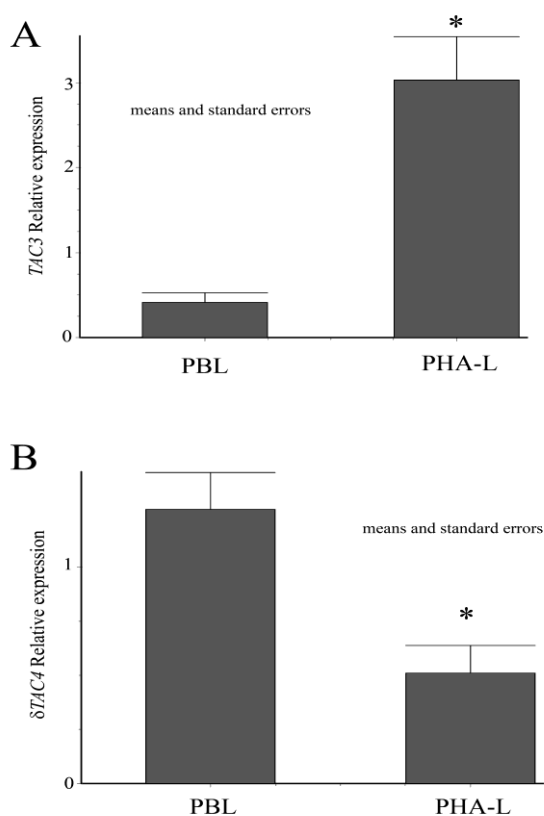


Figura 14.- Comparación entre las expresiones relativas de *TAC3* (A) y *TAC4δ* (B) entre linfocitos extraídos de sangre periférica (PBL) y linfocitos estimulados con PHA (PHA-L) de siete donantes. Los resultados están expresados como la Media±ES de las siete muestras. Diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre PBL y PHA-L están señaladas con asterisco (*).

1.3. DETECCIÓN DEL PÉPTIDO NKB

Para la detección del péptido NKB en las preparaciones fijadas de las diferentes fracciones celulares, se utilizaron de forma independiente dos anticuerpos específicos diferentes obteniéndose resultados similares para ambos (ver figura 15 A y B). En el caso de los PMNs, todas las células fueron inmunorreactivas, aunque con intensidad variable. En la mayoría de las células se observó una ligera tinción marrón en el citoplasma, pero algunos PMNs mostraron una coloración muy intensa. Por el contrario, los eosinófilos presentaron una tinción uniforme en las preparaciones, con una fuerte señal marrón en los gránulos de dichas células. En linfocitos, y a pesar del gran núcleo, también se observó tinción en el citoplasma. De la misma manera, también en monocitos se detectó la presencia de NKB (ver figura 15 A y B).

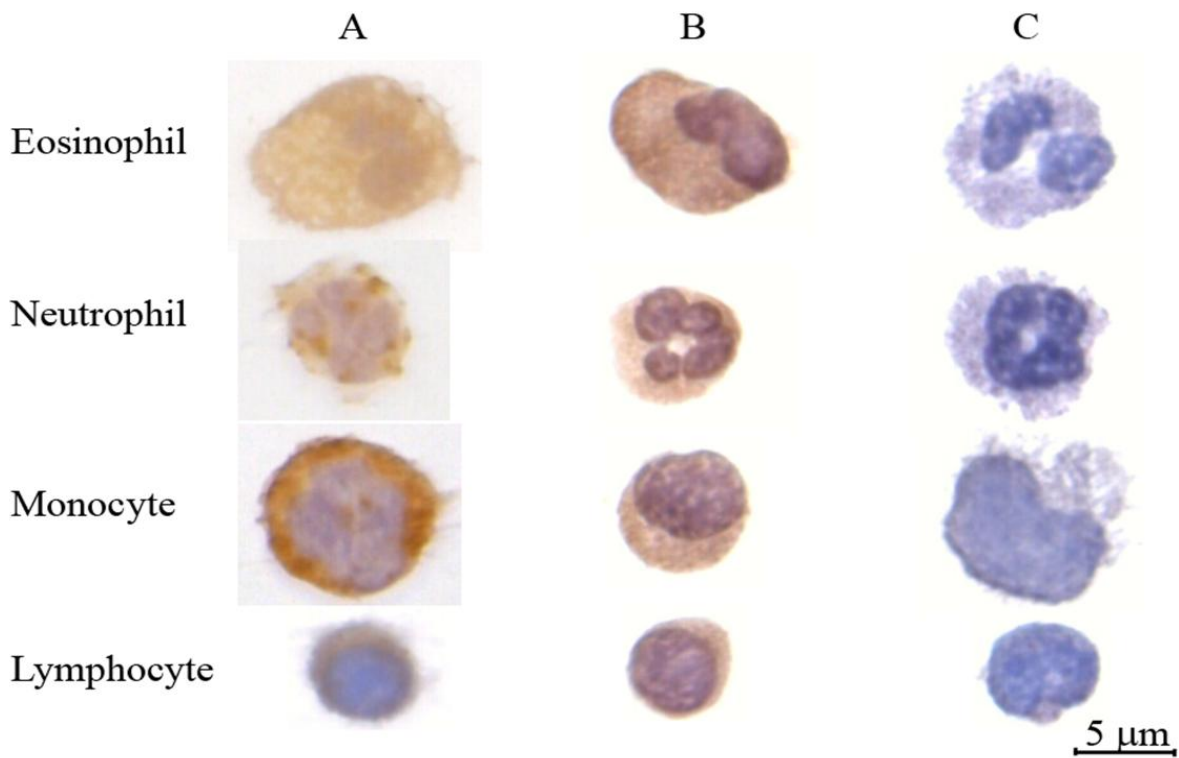


Figura 15.- Tinción inmunológica de NKB en eosinófilos, neutrófilos, monocitos y linfocitos usando dos anticuerpos policlonales diferentes, ab-1 (A) y ab-2 (B). También se muestran los controles negativos que han sido procesados sin anticuerpo primario (C).

Comparando las diferentes estirpes celulares, en PMNs y eosinófilos la señal observada fue más intensa que en las células mononucleares. En este sentido, y para evitar una tinción de fondo excesiva o inespecífica, el proceso de revelado fue monitorizado bajo un microscopio. En el caso de los PMNs y eosinófilos, la reacción fue parada 20-30'' después de añadir el sustrato cromógeno, mientras que el revelado de las células mononucleares se extendió por un tiempo de 1'. En los portaobjetos control-negativos no se detectó señal positiva para ninguna de los tipos celulares analizados.

1.4. EFECTO DE LA BUDESONIDA EN LA EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS EN SANGRE PERIFÉRICA

El posible efecto de la Budesonida sobre la expresión génica de las taquicinininas y sus receptores, fue evaluado inicialmente mediante la amplificación por PCR de los mismos. Como molde se utilizaron las muestras de ADNc obtenidas de los cultivos *in vitro* de las células sanguíneas sin tratar y tratadas con diferentes concentraciones de Budesonida de los 10 individuos donantes. Todas las muestras, tratadas y no tratadas, amplificaron para *TAC3*, *TAC4δ*, *TAC4γ* y *NK2R*. Además, se detectó la presencia de transcritos correspondientes a *TAC1* en 3 de las muestras tratadas con la máxima concentración de Budesonida utilizada (10nM). Sin embargo, no se detectó la expresión de *TAC4α₁*, *TAC4α₂*, *TAC4β*, ni de los receptores *NK1* y *NK3* en ninguna de las muestras analizadas.

La técnica de PCR cuantitativa a Tiempo Real nos permitió además cuantificar la expresión de los genes susceptibles de ser evaluados bajo los diferentes tratamientos con el glucocorticoide. La expresión de *TAC4γ* y *NK2R* resultó ser demasiado baja para una correcta cuantificación mediante esta técnica, encontrándose fuera de su límite de detección. Sin embargo, los niveles de expresión relativa de *TAC3* y *TAC4δ* pudieron ser medidos tanto en las muestras no tratadas como en las tratadas con diferentes tiempos y concentraciones de Budesonida. Como se ha explicado previamente, mediante el programa geNorm se analizó la idoneidad de los genes constitutivos, obteniéndose unos valores de estabilidad adecuados para la utilización de *PPIB* y *HPRT1* como genes de referencia para este estudio ($CV_{\text{medio}}=16,14\%$, $M=0.46$).

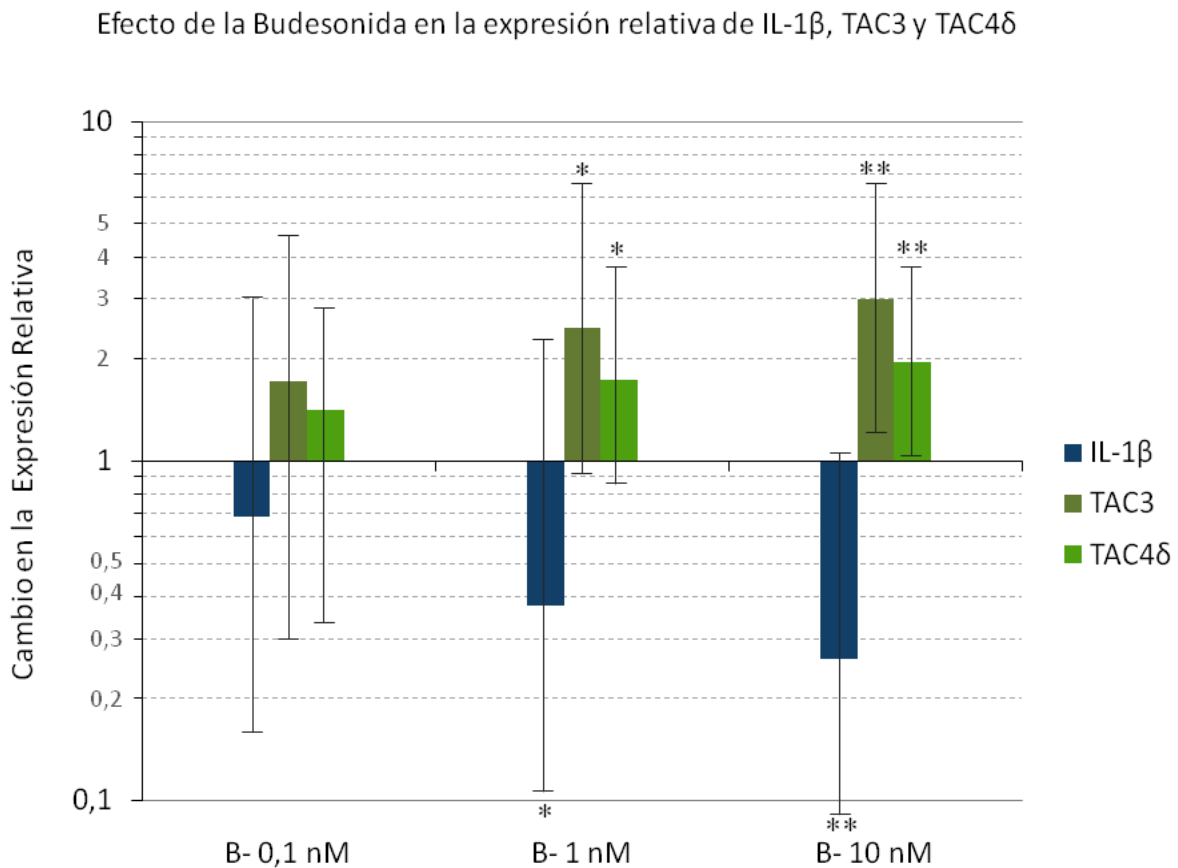


Figura 16.- Representación gráfica de la expresión relativa de *IL-1 β* , *TAC3* y *TAC4 δ* en muestras de sangre total tras 24 h de cultivo con diferentes concentraciones de Budesonida (B- 0,1 nM, B- 1 nM y B- 10nM). Las barras muestran los cambios medios de expresión respecto a la condición control (sin tratamiento), y se representan en escala logarítmica para efectos de visualización. Las líneas muestran el error estándar correspondiente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

En la figura 16 se muestra gráficamente el efecto del tratamiento con Budesonida sobre la expresión relativa de *TAC3* y *TAC4 δ* en las células sanguíneas obtenidas de 10 donantes, y cultivadas durante 24 horas. Así mismo, se muestran los cambios de expresión de *IL-1 β* , que fue utilizada como control positivo para este experimento al haberse demostrado que sus niveles de transcripción se ven alterados por los corticoides (Lee et al, 1988). Tal y como esperábamos, tomando como referencia la expresión control de las muestras sin tratamiento, los niveles de expresión génica de *IL-1 β* disminuyeron significativamente 2,6 veces (Expresión Relativa (ER)=0,376x; $p < 0,05$) y 3,8 veces (ER=0,262x; $p < 0,01$) tras 24 horas

de incubación con 1 nM y 10 nM de Budesonida, respectivamente (ver figura 16). A tiempos menores (12 horas) de incubación con el glucocorticoide, no se observaron diferencias de expresión significativas ni para *IL-1 β* ni para los genes de taquicinas estudiados. Sin embargo, al igual que en el caso de *IL-1 β* , tras 24 horas de tratamiento de las células sanguíneas, el análisis de la expresión relativa de *TAC3* y *TAC4 δ* , mostró que el tratamiento con Budesonida también afecta a la expresión de estos genes. En ambos casos se observó tanto un incremento de la expresión génica, como un efecto dosis-respuesta. En el caso de *TAC3*, la expresión obtenida fue 2,47 veces mayor ($p < 0,05$) bajo el tratamiento de Budesonida 1 nM respecto a su expresión en las muestras no tratadas, y 3 veces mayor ($p < 0,01$) cuando el tratamiento fue con una concentración de 10 nM de Budesonida. Aunque en menor medida, *TAC4 δ* también sufrió un incremento en su expresión tanto a 1 nM (ER=1,728x; $p < 0,05$) como a 10 nM de Budesonida (ER=1,961x; $p < 0,01$) (ver figura 16).

2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES COMUNES DE TAC1, TAC3 Y TAC4 CON EL ASMA

Para el estudio de asociación de las variantes comunes de los genes de taquicinas con la susceptibilidad al asma, se analizaron un total de 202 individuos, de los cuales 102 fueron pacientes con asma y otros 100 fueron individuos sanos que constituyeron el grupo control. De los 28 SNPs genotipados en los tres genes, 12 SNPs resultaron ser monomórficos en nuestra población. Para los restantes 16 SNPs, se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas en los 102 pacientes y 100 controles sanos en estudio (ver tabla 6). La distribución genotípica de todos los SNPs se ajustó al equilibrio de Hardy y Weinberg, en ambos grupos de población. De los 16 SNPs polimórficos, sólo dos, aquellos que presentaron un MAF inferior al 5%, fueron descartados de los análisis posteriores. Respecto al desequilibrio de ligamiento (LD) encontrado entre los distintos SNPs de cada gen, cabe destacar el fuerte LD ($r^2 > 0.9$) observado entre pares de marcadores del gen *TAC1* (incluyendo SNP2, SNP4, SNP5, SNP6, y SNP7) y del gen *TAC3* (SNP10, SNP12 y SNP13).

Tras aplicar los métodos de regresión logística para el análisis de asociación, bajo cinco modelos de herencia diferentes, dos de los SNPs analizados mostraron asociación significativa con el asma (ver Tabla 7). Se observan diferencias nominalmente significativas en la distribución genotípica del SNP14 (rs2291855) del gen *TAC3*, siendo la frecuencia del heterocigoto C/T significativamente superior en individuos sanos (24%) que en el grupo asmático (13%; OR=0.46, 95% CI=0.22-0.97; p=0.038). Entre los polimorfismos de *TAC4*, la frecuencia genotípica A/G del SNP16 (rs4794068) fue superior en asmáticos (39.2%) que en controles (25%), lo cual resultó en que, bajo un modelo de herencia sobredominante, este SNP mostrara una asociación significativa con el riesgo de asma (OR=1.94, 95% CI=1.06-3.54; p=0.03; AIC=279.3). Por el contrario, ninguno de los SNPs del gen *TAC1* analizados mostró asociación con la patología.

Tabla 6.- Frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs polimórficos de *TAC1*, *TAC3* y *TAC4* estudiados en casos (n=102) y controles (n=100).

SNP	dbSNP ID	Localización		Frec.Alélica(%)		Frec. Genotípica(%)			HWE <i>P</i>
<i>TAC1</i>									
1	rs2072100	Intrón Chr7:97199720	Casos	A	G	AA	AG	GG	0.48
			Control	49	51	27	43	29	
2	rs2072099	Intrón Chr7:97200271	Casos	C	A	CC	CA	AA	0.15
			Control	78	22	60	37	3	
3	rs1229434	Intrón Chr7:97203778	Casos	A	G	AA	AG	GG	0.78
			Control	57.5	42.5	32	51	17	
4	rs3779470	Intrón Chr7:97203867	Casos	C	T	CC	CT	TT	0.15
			Control	78	22	60	37	3	
5	rs28475844	Intrón Chr7:97204803	Casos	A	T	AA	AT	TT	0.15
			Control	22	78	3	37	60	
6	rs4526299	Intrón Chr7:97205565	Casos	C	T	CC	CT	TT	0.21
			Control	78	22	60	37	3	
7	rs1510300	Intrón Chr7:97206685	Casos	G	C	GG	GC	CC	0.12
			Control	23	77	3	40	57	
8	rs1397202	Intrón Chr7:97206943	Casos	A	G	AA	AG	GG	0.46
			Control	84	16	71.5	24.5	4	
<i>TAC3</i>									
9	rs11609825	Intrón Chr12:55690465	Casos	G	C	GG	CG	CC	1.0
			Control	4	96	-	9	91	
10	rs733629	Exón Chr12:55692711	Casos	C	T	CC	CT	TT	0.62
			Control	6	94	-	13	87	
11	rs2122694	Intrón Chr12:55694600	Casos	A	G	AA	AG	GG	1.0
			Control	2	98	-	4	96	
12	rs17119327	Intrón Chr12:55695007	Casos	A	G	AA	AG	GG	0.62
			Control	3	97	-	6	94	
13	rs17119330	Intrón Chr12:55695506	Casos	A	G	AA	AG	GG	0.37
			Control	6	94	-	13	87	
14	rs2291855	5' UTR Chr12:55696458	Casos	C	T	CC	CT	TT	0.38
			Control	7	93	-	14	86	
<i>TAC4</i>									
15	rs883010	Intrón Chr17:45271796	Casos	A	C	AA	AC	CC	0.07
			Control	89	11	79	20	1	
16	rs4794068	Intrón Chr17:45277340	Casos	A	G	AA	AG	GG	1.0
			Control	22	78	2	39	59	

Además de estos resultados obtenidos del análisis de los SNPs individuales, se infirieron los haplotipos de los genes estudiados y se llevó a cabo un análisis de asociación incluyendo las combinaciones haplotípicas de todos los *loci* polimórficos para cada gen. Para el gen *TAC1*, se obtuvieron 6 haplotipos con una frecuencia superior al 1%, mientras que para los genes *TAC3* y *TAC4* se obtuvieron 4 y 3 haplotipos, respectivamente. En la tabla 8 se muestra la distribución haplotípica estimada, así como los OR y p-valores obtenidos en el análisis de asociación llevado a cabo para cada haplotipo. Además, se realizó un test adicional para determinar las diferencias haplotípicas globales, complementando así el análisis de las frecuencias de haplotipos individuales. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los genes estudiados cuando se compararon las frecuencias haplotípicas de los grupos asmático y control.

Tabla 7.- Análisis mediante regresión logística de la asociación de los SNPs con el asma (n=202). Se muestran los dos SNPs de los genes *TAC3* y *TAC4* que mostraron asociación significativa con el asma bajo alguno de los modelos de herencia.

SNP/Modelo	Genotipo	Casos	Controles	OR (95% CI)	P-valor	AIC
SNP 14 (rs2291855)	-					
	C/C	89 (87.2%)	76 (76%)	1.00	0.038*	279.7
C/T	13 (12.8%)	24 (24%)	0.46 (0.22-0.97)			
SNP 16 (rs4794068)	Codominante				0.062	280.4
	G/G	60 (58.8%)	70 (70%)	1.00		
	G/A	40 (39.2%)	25 (25%)	1.87 (1.02-3.43)		
	A/A	2 (2%)	5 (5%)	0.47 (0.09-2.49)		
Dominante	G/G	60 (58.8%)	70 (70%)	1.00	0.097	281.3
	G/A-A/A	42 (41.2%)	30 (30%)	1.63 (0.91-2.92)		
Recesivo	G/G-G/A	100 (98%)	95 (95%)	1.00	0.23	282.6
	A/A	2 (2%)	5 (5%)	0.38 (0.07-2.01)		
Sobredominante	G/G-A/A	62 (60.8%)	75 (75%)	1.00	0.03*	279.3
	G/A	40 (39.2%)	25 (25%)	1.94 (1.06-3.54)		
Log-aditivo	---	---	---	1.31 (0.79-2.16)	0.3	282.9

Tabla 8.- Haplotipos estimados y análisis de su asociación con el asma.

Gen/haplotipo	Secuencia	Controles	Casos	Total	OR (95% CI)	P-valor
TAC1/ SNP1-8	GCGCTCCA	0.245	0.308	0.273	1.00	---
	ACACTCCA	0.295	0.250	0.270	1.47 (0.87 - 2.47)	0.15
	AAATATGA	0.215	0.216	0.215	1.20 (0.66 - 2.21)	0.55
	GCGCTCCG	0.175	0.152	0.167	1.32 (0.72 - 2.44)	0.37
	GCACTCCA	0.030	0.045	0.039	0.71 (0.23 - 2.20)	0.55
	ACACTCGA	0.020	---	0.017	1.75 (0.36 - 8.43)	0.49
	Raro	0.025	0.029	0.019	1.38 (0.35 - 5.46)	0.65
P-valor de la asociación global de haplotipos: 0.77						
TAC3 / SNP9-14	CTGGGC	0.824	0.874	0.846	1.00	---
	CCGAAT	0.095	0.058	0.079	1.68 (0.78 - 3.64)	0.19
	GTGGGC	0.035	0.042	0.040	0.87 (0.31 - 2.44)	0.79
	CTAGGC	0.020	0.016	0.020	1.08 (0.26 - 4.48)	0.92
	Raro	0.026	0.010	0.015	5.74 (0.66 - 50.36)	0.12
P-valor de la asociación global de haplotipos: 0.30						
TAC4/ SNP15-16	AG	0.715	0.676	0.696	1.00	---
	AA	0.175	0.216	0.195	0.76 (0.46 - 1.27)	0.30
	CG	0.110	0.108	0.109	0.97 (0.53 - 1.76)	0.92
P-valor de la asociación global de haplotipos: 0.58						

3. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR EOSINOFÍLICA EoL-1

3.1. EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS TAQUICININAS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

Durante el periodo de diferenciación celular de EoL-1 inducida por dbAMPc, se extrajeron muestras de ARN de las células en diferentes momentos del proceso a fin de estudiar la expresión génica de las taquicininas a lo largo del mismo. En primer lugar se determinó la expresión de las diferentes taquicininas y sus receptores mediante PCR convencional y detección posterior en gel de agarosa, obteniéndose bandas correspondientes a los transcritos de *TAC3*, *TAC4 δ* , *TAC4 γ* y *NK2R* tanto en las células EoL-1 sin diferenciar (día 0), como a lo largo del proceso de diferenciación (1 día, 3 días, 5 días, 7 días y 9 días). Sin embargo, no se detectó la expresión de *TAC1*, *TAC4 α_1* , *TAC4 α_2* , *TAC4 β* , *NK1R* ni *NK3R* en ninguna de las muestras de la línea celular eosinofílica. De los tres genes de taquicininas que se expresaron en EoL-1, la banda de amplificación correspondiente al transcrito *TAC4 γ* pudo ser detectada únicamente tras 40-45 ciclos de PCR, de forma que su expresión resultó demasiado baja para una correcta cuantificación mediante PCR a Tiempo Real. Sin embargo, la expresión del resto de genes y/o transcritos (*TAC3*, *TAC4 δ* y *NK2R*) pudo ser evaluada a lo largo del proceso de diferenciación de EoL-1. La expresión de los genes estudiados fue normalizada con la media geométrica de dos genes de referencia, *PPIB* y *HPRT1* ($CV_{\text{medio}}=15,83\%$, $M=0.45$). En la figura 17 se muestra los cambios de la expresión génica relativa de *TAC3*, *TAC4 δ* y *NK2R* a lo largo de los 9 días de incubación con dbAMPc, tomando como referencia su expresión en las células EoL-1 sin diferenciar.

Los resultados obtenidos muestran una evolución dispar en la expresión de los genes estudiados, observándose un incremento en la expresión de *TAC3* en las primeras etapas del proceso, y una inhibición de la expresión génica del receptor *NK2* hacia las etapas finales de la diferenciación celular. En ambos casos, los cambios de expresión observados son altamente significativos. En el caso de *TAC3*, tras 24 horas de estimulación con dbAMPc la expresión incrementa 2,438 veces respecto a las células sin diferenciar ($p<0,001$), manteniéndose esta expresión elevada a los 3 días ($ER=2,47x$; $p<0,001$) y a los 5 días ($2,197x$;

$p < 0,001$). A partir de este punto, la expresión de *TAC3* decrece lentamente hasta volver a niveles de expresión cercanos a los observados en las células sin diferenciar.

Expresión relativa de *TAC3*, *TAC4δ* y *NK2R* a lo largo de la diferenciación de EoL-1

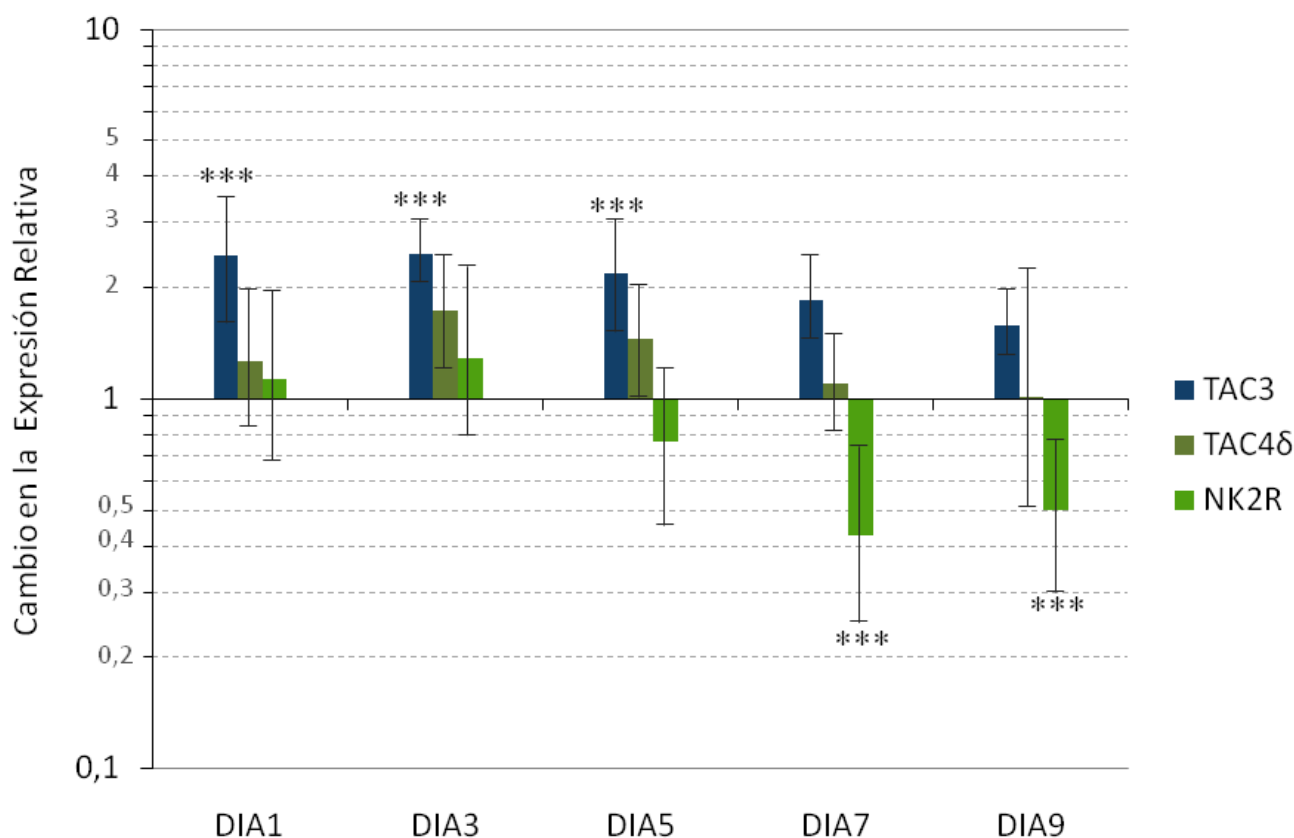


Figura 17.- Representación gráfica de la variación en la expresión relativa de *TAC3*, *TAC4δ* y *NK2R* a lo largo del proceso de diferenciación de la línea celular EoL-1 inducido por dbAMPc. Las barras muestran los cambios medios de expresión respecto a la condición control (sin diferenciar), y se representan en escala logarítmica para efectos de visualización. Las líneas muestran el error estándar correspondiente. *** $p < 0,001$

Por el contrario, la expresión relativa de *NK2R* permanece inalterada durante las primeras etapas de la diferenciación celular, decreciendo hacia el final del proceso. Tras 7 y 9 días de estimulación con el agente diferenciador, la expresión génica de *NK2R* disminuyó significativamente hasta la mitad de su expresión en células no diferenciadas ($ER=0,427x$; $p < 0,001$ y $ER=0,5x$; $p < 0,001$, respectivamente). Por otro lado, la expresión de *TAC4δ* varió

poco a lo largo de la diferenciación, observándose únicamente un ligero incremento a los 3 días del proceso.

3.2. EFECTO INMUNOMODULADOR DE SP EN LA LÍNEA CELULAR EOSINOFÍLICA EoL-1

Mediante cultivo *in vitro* de células EoL-1 diferenciadas, se estudió el papel de SP en la regulación génica de diversas rutas de producción de diferentes mediadores lipídicos importantes en el proceso inflamatorio del asma, como son el metabolismo del AA y del PAF. Además, se estudió la expresión de diferentes citoquinas y quimioquinas, así como de diversos receptores, factores de transcripción y enzimas relacionadas con la respuesta inflamatoria mediada por eosinófilos. Los experimentos de cultivos *in vitro* realizados a tal efecto, fueron replicados paralelamente bajo dos condiciones diferentes: en placas sin tratar, y en placas tratadas con FN. En todos los casos, se obtuvo una viabilidad celular >95% en todos los puntos experimentales analizados.

De los 51 genes estudiados (ver tablas 2 y 5), la expresión de los receptores DP1 y DP2, de *sPLA2*, *hPGDs*, *iNOS*, o de *TAC1*, NK1R y NK3R, no fue detectada en ninguno de los puntos experimentales. Por otro lado, se obtuvieron niveles de expresión muy bajos para IL-5, EP4 y NK2R en todos los puntos del experimento, saliéndose del límite de cuantificación por qPCR y haciendo inviable la cuantificación relativa de su expresión. La expresión relativa de los 39 genes restantes fue estudiada normalizando los valores de expresión obtenidos de cada amplificación con la media geométrica de los genes de referencia *PPIB* y *HPRT1*, cuya estabilidad fue evaluada mediante el programa geNorm, obteniendo valores adecuados para su uso como genes de referencia tanto en los cultivos con FN ($CV_{\text{medio}}=17,01\%$ y $M=0,49$), como en aquellos sin tratamiento de FN ($CV_{\text{medio}}=12,39\%$ y $M=0,35$).

Tras el análisis de las expresiones relativas normalizadas de todos los genes en estudio, únicamente 12 genes manifestaron cambios significativos en su expresión como respuesta a SP en alguno de los puntos experimentales: *ALOX-15*, *ALOX-5*, *FLAP*, *LTC4s*, *LTA4h*, *COX1*, *COX2*, *TXAs*, *PGFs*, *PGEs*, *PAFAH*, y *CCR3*. De ellos, 11 genes codifican para enzimas/proteínas implicadas en rutas de síntesis de mediadores lipídicos, mientras que uno (*CCR3*) codifica para un receptor acoplado a proteína G que es diana de diversas quimioquinas como la

Eotaxina o RANTES. A continuación se muestran en detalle los cambios de expresión observados en dichos genes en los cultivos *in vitro* realizados en este estudio.

3.2.1. MODULACIÓN DEL METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO POR SP

La gran mayoría de los genes que mostraron cambios en sus niveles de expresión como respuesta al tratamiento con SP, pertenecen al grupo de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo del AA. En esta ruta podemos diferenciar las enzimas implicadas en la formación de las lipoxinas (15-LO), los leucotrienos (5-LO, FLAP, LTC4s, LTA4h), y las prostaglandinas y tromboxanos (COX1, COX2, TXAs, PGFs, PGEs). En todos los casos, el efecto de SP sobre su expresión génica fue visible únicamente a concentraciones de 0,1 y 1 μ M y tras tiempos de incubación de 12 y 24 horas, no observándose cambios de expresión significativos a concentraciones de SP o tiempos menores. En la figura 18 se muestran los cambios de expresión observados tras la incubación con SP, mientras que en la figura 19 se muestra el efecto de SP sobre células incubadas sobre pcillos cubiertos de FN. A continuación se detallan los resultados obtenidos en cada uno de estos escenarios ensayados.

En los ensayos sin FN, tras 12 horas de incubación con 0,1 μ M SP se observan incrementos significativos en la expresión de *ALOX-5* (ER=3,531x, $p<0,05$), *COX1* (ER=2,328x, $p<0,05$), *TXAs* (ER=1,435x, $p<0,05$), y *PGFs* (ER=1,832x, $p<0,05$), mientras que *ALOX-15* sufre una caída en sus niveles de expresión (ER=0,491x, $p<0,05$). Cuando la concentración de SP se elevó a 1 μ M, se observan incrementos aún mayores en los niveles de expresión de *ALOX-5* (ER=10,69x, $p<0,05$) *COX1* (ER=4,483x, $p<0,05$), *TXAs* (ER=1,74x, $p<0,05$), y *PGFs* (ER=3,371x, $p<0,05$), mientras que la expresión de *ALOX-15* disminuye hasta 5 veces (ER=0,204x, $p<0,05$). Adicionalmente, a esta concentración de SP, se detecta un ligero incremento en la expresión de *FLAP* (ER=1,482x, $p<0,05$) y una disminución de la expresión de *LTC4s* (ER=0,481x, $p<0,05$) (ver figura 18 A). Cuando el cultivo en presencia de SP se prolongó hasta las 24 horas, con 0,1 μ M SP se obtuvieron incrementos significativos en la expresión de *ALOX-5* (ER=2,072x, $p<0,05$), *FLAP* (ER=1,464x, $p<0,05$), *LTA4h* (ER=1,311x, $p<0,05$), *COX1* (ER=1,671x, $p<0,001$) y

Efecto de SP sobre genes de la ruta metabólica del AA

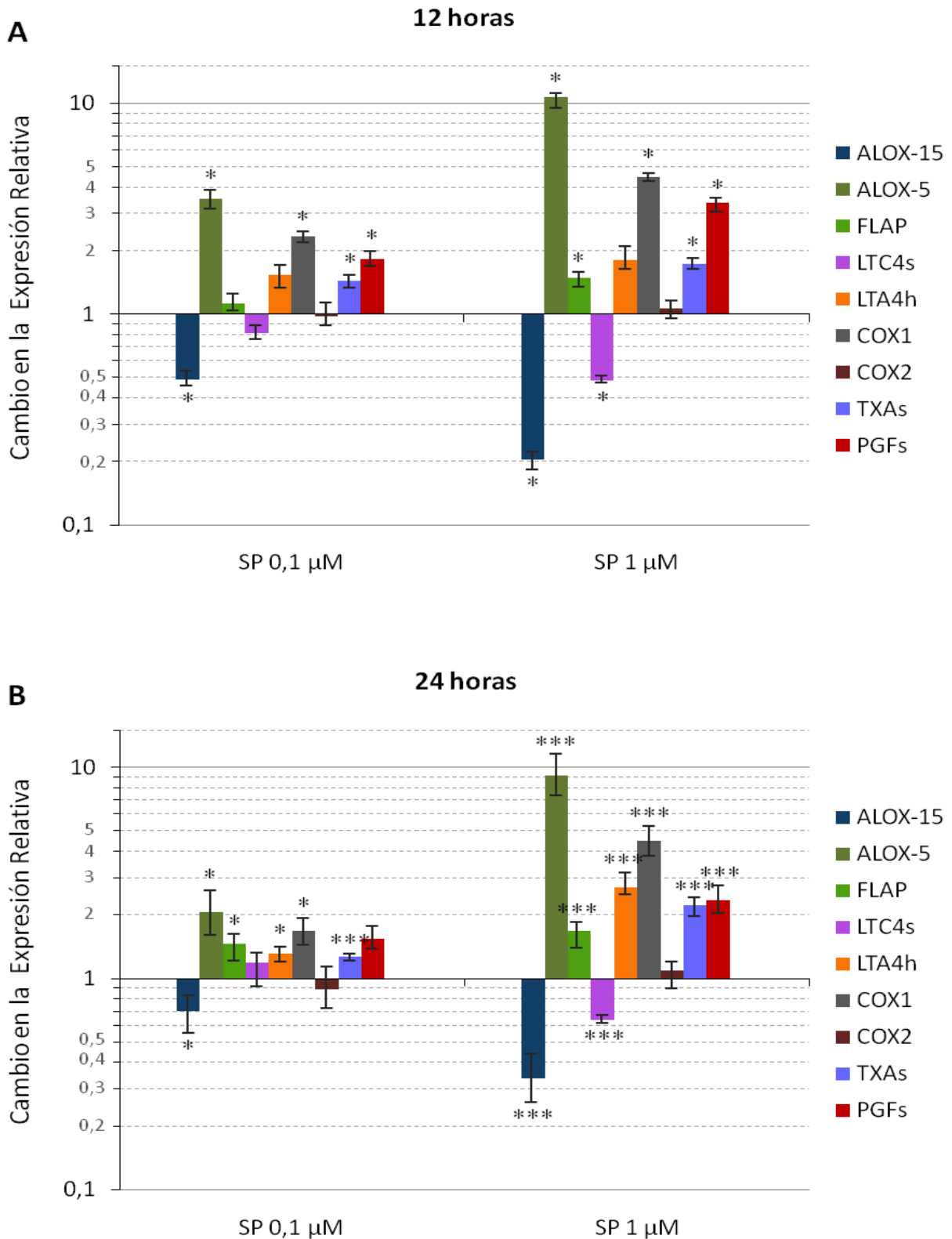


Figura 18.- Cambios en la expresión de los genes de enzimas implicadas en el metabolismo del AA tras 12 h (A) y 24 h (B) de incubación con 0,1 y 1 μM de SP. Las barras muestran los cambios medios de expresión respecto a la condición control (sin SP), y las líneas muestran el error estándar correspondiente. * p<0,05; *** p<0,001

Efecto de SP sobre genes de la ruta metabólica del AA en células EoL-1 cultivadas en presencia de FN

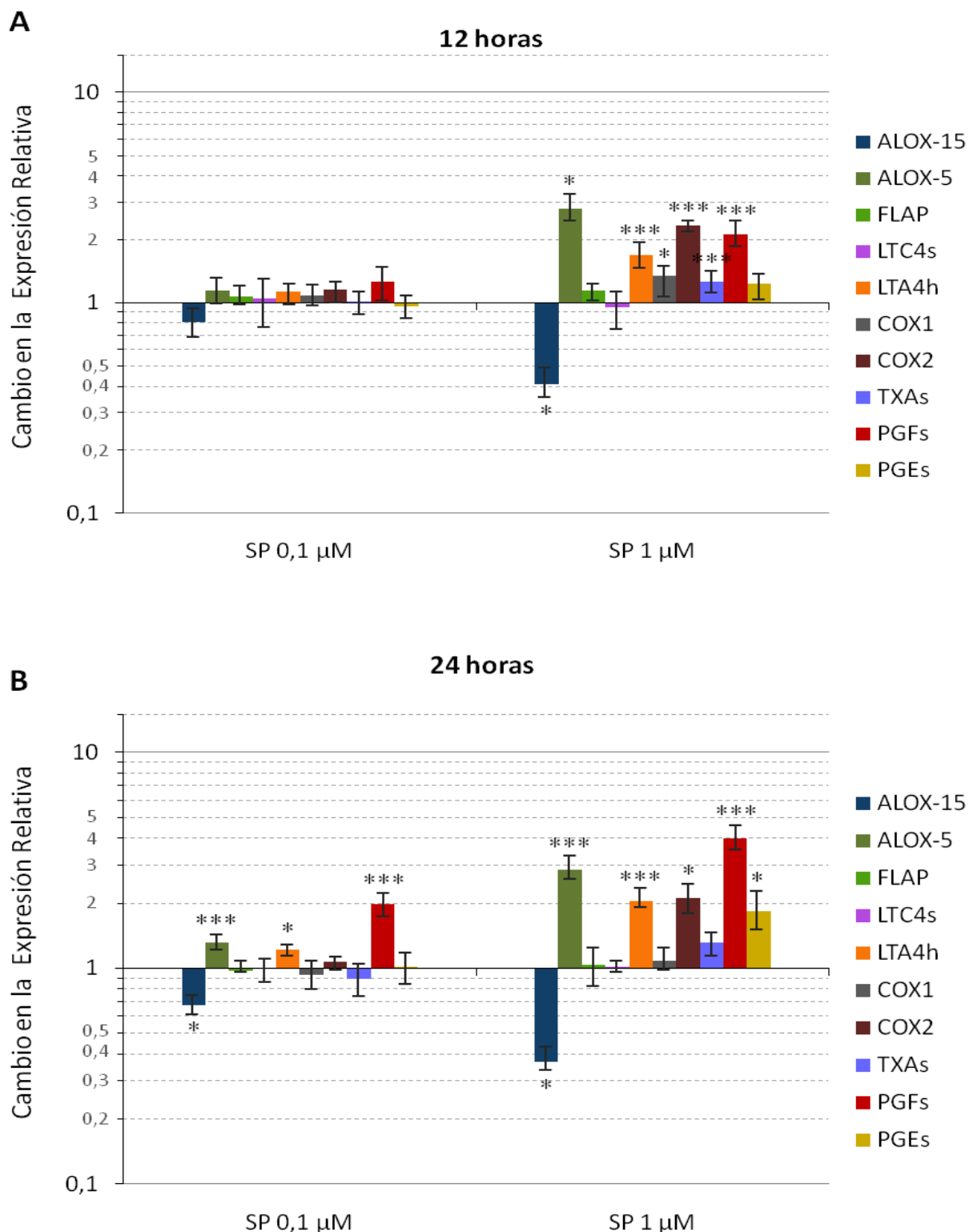


Figura 19.- Cambios en la expresión de los genes de enzimas implicadas en el metabolismo del AA tras 12 h (A) y 24 h (B) de incubación con 0,1 y 1 μM de SP, en ensayos realizados en placas tratadas con FN. Las barras muestran los cambios medios de expresión respecto a la condición control (FN, sin SP), y las líneas muestran el error estándar correspondiente. * p<0,05; *** p<0,001

TXAs (ER=1,262x, $p<0,001$), y disminución de los niveles de expresión de *ALOX-15* (ER=0,698x, $p<0,05$). El efecto de SP a concentraciones de 1 μM fue similar al observado a las 12 horas, con incrementos altamente significativos en la expresión relativa de *ALOX-5* (ER=9,188x, $p<0,001$), *FLAP* (ER=1,674x, $p<0,001$), *LTA4h* (ER=2,696x, $p<0,001$), *COX1* (ER=4,467x, $p<0,001$), *TXAs* (ER=2,217x, $p<0,001$) y *PGFs* (ER=2,347x, $p<0,001$), caídas altamente significativas en los niveles de expresión de *ALOX-15* (ER=0,336x, $p<0,001$) y *LTC4s* (ER=0,634x, $p<0,001$) (ver figura 18 B).

Cabe destacar, que en cultivos con placas no tratadas con FN, la expresión de *PGEs* no pudo ser cuantificada al encontrarse fuera del límite de cuantificación. Sin embargo, su expresión sí pudo ser cuantificada en los ensayos llevados a cabo en presencia de FN.

Los ensayos con células EoL-1 fueron llevados a cabo en placas tratadas con FN a fin de recrear de forma más realista las condiciones fisiológicas durante la respuesta inflamatoria de las vías aéreas. Bajo estas condiciones, tras 12 horas de incubación con 1 μM SP, se observan incrementos significativos en las expresiones de *ALOX-5* (ER=2,792x, $p<0,05$), *LTA4h* (ER=1,681x, $p<0,001$), *COX1* (ER=1,337x, $p<0,05$), *COX2* (ER=2,317x, $p<0,001$), *TXAs* (ER=1,258x, $p<0,001$) y *PGFs* (ER=2,121x, $p<0,001$), y una disminución en los niveles de expresión de *ALOX-15* (ER=0,41x, $p<0,05$) (ver figura 19 A). Tras 24 horas de incubación y con 0,1 μM SP, se observan ligeros incrementos en las expresiones relativas de *ALOX-5* (ER=1,318x, $p<0,001$), *LTA4h* (ER=1,224x, $p<0,05$), y sobre todo de *PGFs* (ER=1,971x, $p<0,001$). Al aumentar la cantidad de SP utilizada en el ensayo (1 μM), los cambios en las expresiones relativas son más drásticos, observándose incrementos altamente significativos para *ALOX-5* (ER=2,863x, $p<0,001$), *LTA4h* (ER=2,052x, $p<0,001$) y *PGFs* (ER=3,992x, $p<0,001$), y significativos en el caso de *COX2* (ER=2,109x, $p<0,05$) y *PGEs* (ER=1,827x, $p<0,05$), y una disminución significativa en la expresión de *ALOX-15* (ER=0,368x, $p<0,05$) (ver figura 19 B).

3.2.1.1. Detección de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en el sobrenadante de los cultivos

En los ensayos realizados con FN, el efecto de SP sobre la expresión génica de la *PGFs* fue especialmente evidente. Por ello, con el objetivo de averiguar si este incremento en la expresión también se correspondía con un aumento en la producción y liberación de la

PGF_{2α}, se llevaron a cabo inmunoensayos enzimáticos para su detección en los sobrenadantes de los cultivos. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran valores de PGF_{2α} inferiores al límite de detección de la técnica empleada (<10 pg/ml). El correcto funcionamiento del kit comercial utilizado para la detección de PGF_{2α}, fue comprobado mediante el uso de los controles internos del fabricante (Cayman Chemical, USA), que dieron resultados positivos, validando por tanto el procedimiento empleado.

3.2.2. EFECTO DE SP SOBRE EXPRESIÓN DE *CCR3* Y *PAFAH*

Además de los cambios de expresión observados en los genes de enzimas implicadas en la ruta metabólica del AA, también se observaron cambios en la expresión de *CCR3* y *PAFAH* tras la incubación de las células EoL-1 con SP. También en este caso, el efecto de la taquicinina fue perceptible únicamente con concentraciones de SP de 0,1 y 1 μM y tiempos de incubación de 12 y 24 horas.

Tras 12 horas de estimulación con SP, se observan incrementos en la expresión génica del receptor *CCR3* tanto con 0,1 μM de SP (ER=1,639x, p<0,05) como con 1 μM de SP (ER=2,485x, p<0,05). También se observa una disminución en la expresión de *PAFAH* (ER=0,547) que sin embargo no es estadísticamente significativa (p=0,069) (ver figura 20 A). Tras 24 horas de incubación con SP, únicamente se observan cambios de expresión en ambos genes cuando la concentración de SP empleada es de 1 μM. En este caso se produce un incremento altamente significativo en la expresión relativa de *CCR3* (ER=2,376x, p<0,001), y una disminución, también altamente significativa, en los niveles de expresión de *PAFAH* (ER=0,669x, p<0,001) (ver figura 20 B).

Sin embargo, cuando el ensayo con SP se realiza en placas tratadas con FN, no se observan los efectos de SP obtenidos anteriormente. Apenas hay cambios en la expresión de ambos genes, siendo significativa únicamente una ligera disminución en los niveles de expresión de *PAFAH* (ER=0,886, p<0,05) cuando las células son expuestas a 0,1 μM SP durante 24 horas (ver figura 20 C y D).

Efecto de SP sobre la expresión relativa de *CCR3* Y *PFAFH*

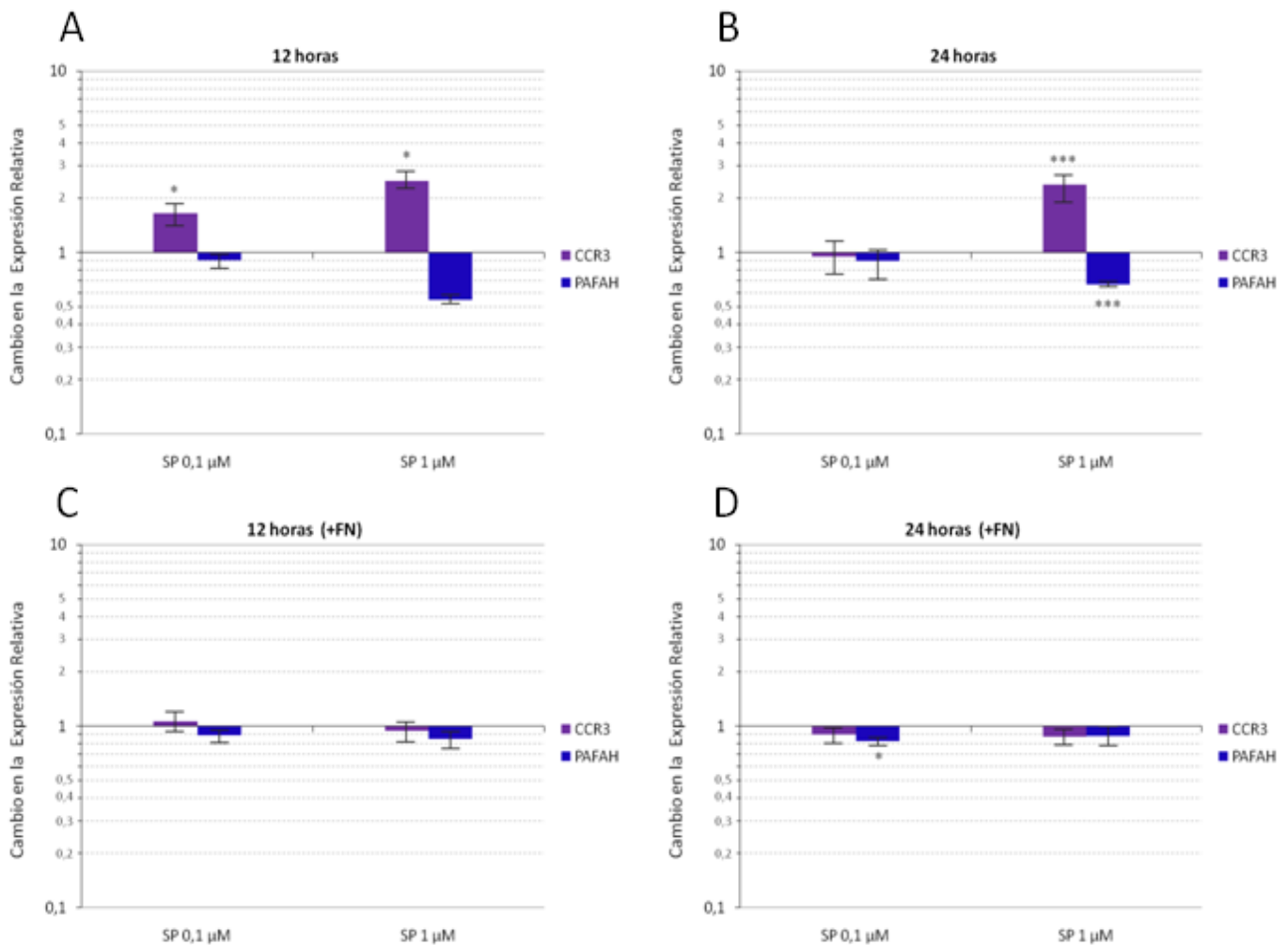


Figura 20.- Cambios en la expresión relativa de *CCR3* y *PFAFH* tras 12 h y 24 h de incubación con 0,1 y 1 μM de SP, en placas sin FN (**A** y **B**) o con FN (**C** y **D**). Las barras muestran los cambios medios de expresión respecto a la condición control (sin SP), y las líneas muestran el error estándar correspondiente. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

3.2.3. EL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON FIBRONECTINA

En los resultados hasta ahora expuestos hemos observado el efecto de SP sobre la expresión de diferentes genes implicados en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, también hemos comprobado cómo el efecto de la incubación de las células EoL-1 con SP variaba en función del tipo de soporte utilizado en los ensayos: placas tratadas o no tratadas

con FN. Debido a la importancia que tiene la FN en la activación y primado de células inmunes (Anwar et al, 1993, 1994; Neeley et al, 1994; Higashimoto et al, 1999), en este estudio también se analizó el efecto de la FN en aquellos genes para los que se obtuvieron cambios en las respuestas frente a SP, con la salvedad de *PGEs* dada su baja expresión en las placas no tratadas con FN. Para los demás genes, *CCR3*, *PAFAH* y aquellos implicados en la ruta metabólica del AA, se compararon las expresiones relativas obtenidas en las muestras control (sin SP) de las placas con FN, frente a las expresiones obtenidas de las muestras control (sin SP) de placas sin tratar. Para la normalización de las expresiones obtenidas se escogieron los genes de referencia *PPIB* y *HPRT1*, cuya estabilidad fue medida con la aplicación geNorm, obteniéndose valores de $CV_{\text{medio}}=20,38\%$ y $M=0,58$.

En la figura 21 se muestran los cambios en la expresión observados en las células EoL-1 cultivados en placas tratadas con FN frente a aquellas que crecieron en placas no tratadas. Los resultados obtenidos de la comparación, muestran un claro efecto de la FN sobre la expresión génica de todos los genes analizados tras 12 ó 24 horas de incubación. Comparados con las muestras control en placas sin FN, las células que crecieron durante 12 horas sobre soportes tratados, presentaron incrementos significativos en los niveles de expresión de *FLAP* (ER=2,163x, $p<0,001$), *COX1* (ER=1,435x, $p<0,001$), *COX2* (ER=7,468x, $p<0,001$), *TXAs* (ER=1,635x, $p<0,05$), *CCR3* (ER=2,618x, $p<0,001$) y *PAFAH* (ER=4,711x, $p<0,001$), y una disminución clara de la expresión relativa de *LTC4s* (ER=0,047x) pese a no llegar a la significación estadística ($p=0,065$) (ver figura 21 A).

Tras 24 horas de incubación en placas tratadas, los aumentos de expresión fueron significativos para *ALOX-15* (ER=2,025x, $p<0,05$), *ALOX-5* (ER=3,195x, $p<0,05$), *FLAP* (ER=4,437x, $p<0,05$), *LTA4h* (ER=1,961x, $p<0,05$), *COX1* (ER=4,49x, $p<0,05$), *COX2* (ER=14,609x, $p<0,05$), *TXAs* (ER=2,968x, $p<0,05$) y *PAFAH* (ER=4,844x, $p<0,05$). Asimismo, se observa un incremento de la expresión de *CCR3* (ER=5,775x) que, sin embargo, no es estadísticamente significativo ($p=0,095$). Además, se observan disminuciones significativas en los niveles de expresión de *LTC4s* (ER=0,048x, $p<0,001$) y *PGFs* (ER=0,553x, $p<0,05$) (ver figura 21 B).

Efecto de la FN en la expresión génica

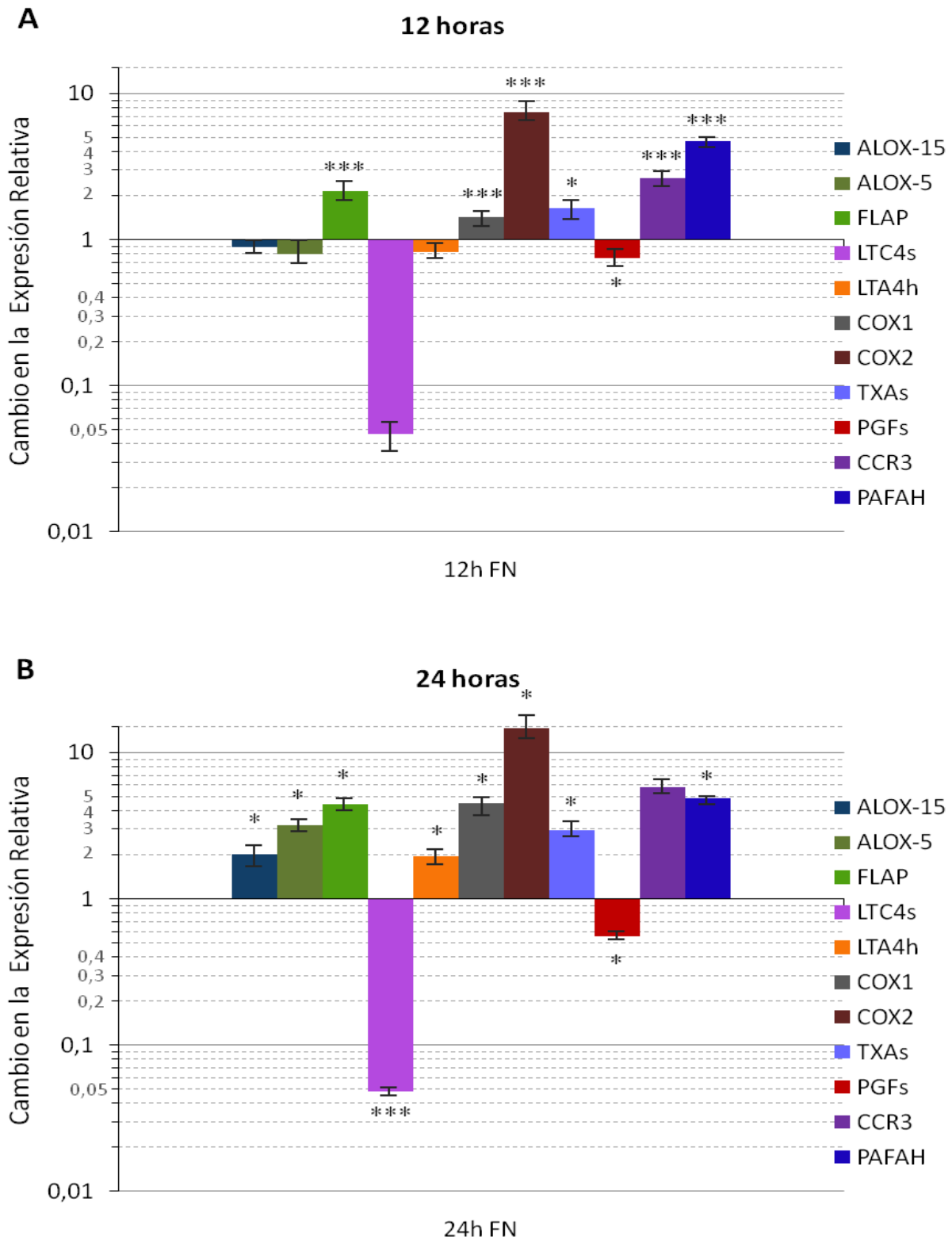


Figura 21.- Cambios en la expresión relativa de *ALOX-15*, *ALOX-5*, *FLAP*, *LTC4s*, *LTA4h*, *COX1*, *COX2*, *TXAs*, *PGFs*, *CCR3* y *PAFAH*, tras la incubación de células EoL-1 durante 12 h (A) y 24 h (B) sobre placas tratadas con FN. Las barras muestran los cambios medios de expresión respecto a la condición control (sin FN), y las líneas muestran el error estándar correspondiente. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Los resultados detallados obtenidos mediante el programa REST 2009 en todos los estudios anteriores, incluyendo los errores estándar, intervalos de confianza (95%), y los p-valores, están listados en el anexo II.

DISCUSIÓN



1. EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS EN CÉLULAS INMUNES, REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN MEDIADA POR BUDESONIDA Y ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

La respuesta inflamatoria involucra el reconocimiento del antígeno, activación de las células inflamatorias, liberación de citoquinas y extravasación y migración de células inmunomoduladoras. Numerosos estudios apoyan el papel de SP en la regulación de múltiples pasos en este proceso y se ha sugerido que su disfunción pueda estar asociada a la patofisiología de una variedad de enfermedades crónicas como el asma, la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis (Zhang et al, 2006). Sin embargo, poco se conoce el papel que otros miembros de la familia de las taquicininas, como NKB o la HK-1/endocininas, pueden tener en el proceso inflamatorio, pese a que varios estudios muestran que antagonistas de NK3R, el receptor preferido de NKB, tienen efecto anti-inflamatorio (Daoui et al, 1997, 1998, 2001; Nénan et al, 2001; Hay et al, 2002; Mukaiyama et al, 2004) en las vías aéreas de diferentes organismos. Similarmente, agonistas del receptor NK3 tienen efecto pro-inflamatorio (Daoui et al, 2000, 2001). Además, Pinto y cols. (2004) han demostrado que el receptor NK3 se expresa en el epitelio bronquial así como en venas y arterias pulmonares. Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado fibras inmunoreactivas para NKB en pulmón aunque sí se ha observado la presencia de ARNm de NKB mediante RT-PCR. Desde hace varios años se considera que las células inflamatorias e inmunes pueden ser consideradas una fuente adicional de taquicininas, cuya liberación podría contribuir tanto para activar de manera autocrina o paracrina aquellas células que expresen los receptores taquicinérgicos, como para modular la respuesta nerviosa. En este sentido, estudios previos demuestran la presencia de SP en linfocitos, monocitos, macrófagos y eosinófilos, estando prácticamente ausente en neutrófilos (Aliakbari et al, 1987). Por el contrario, no se conoce la distribución de NKB y las recientemente descubiertas HK-1/endocininas en las diferentes células del sistema inmune humano. Por tanto, el primer objetivo de este trabajo consistió en determinar el patrón de expresión de estas taquicininas y sus receptores en las células inmunes. En este sentido, hemos observado que el ARNm de TAC3, el gen que codifica NKB, se expresa de manera constitutiva en células inmunes

humanas del linaje mieloide (monocitos) y del linaje linfoide (linfocitos), donde también por inmunoreactividad se detecta el péptido NKB. Curiosamente, en los PMNs y eosinófilos no se detectó la presencia del ARNm de *TAC3*, aunque sí se observó inmunoreactividad para la proteína. Este hecho podría explicarse por un proceso de regulación negativa en la expresión del gen a lo largo de la diferenciación celular. De hecho, se han descrito ejemplos de este fenómeno en diferentes tipos de células inmunes. Así, en eosinófilos se ha observado una regulación por disminución de la expresión de los ARNm de *EPX* y *MBP* durante la maduración de esta célula, de tal modo que no se detecta la presencia de ARNm de estos genes en eosinófilos maduros de sangre periférica, pero sí las proteínas que estos codifican (Gruart et al, 1992). Así mismo, en neutrófilos se observa actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en etapas maduras de la célula, mientras que el ARNm correspondiente no se detecta (Koeffler et al, 1985). En el caso de las taquicininas, también existen ejemplos de regulación decreciente durante la diferenciación celular. Este es el caso de la expresión de transcritos de *TAC4*, alta en células B inmaduras, y baja o casi nula en células B maduras (Metwali et al, 2004). Un problema relacionado con la técnica de detección mediante inmunocitoquímica es la posible generación de falsos positivos, es decir, muestras que carecen del péptido pero aun así muestran inmunoreactividad cruzada con otros péptidos afines. En este sentido, 3 hechos sugieren que nuestros resultados para la detección de NKB son reales: 1) El uso de dos anticuerpos policlonales distintos, generados en cabra y en conejo, proporcionan el mismo resultado, inmunoreactividad en todas las células analizadas; 2) uno de los anticuerpos policlonales anti-NKB usados fue diseñado para la secuencia completa de este decapeptido, siendo mínima la reactividad cruzada esperada frente a NKA y SP (0.1% y 0.2%, respectivamente) y 3) en neutrófilos apenas hay SP detectable (Aliakbari et al, 1987), sin embargo todos los neutrófilos de todas las muestras mostraron inmunoreactividad frente a NKB, con una señal muy intensa en algunas de estas células.

La presencia de ARNm de *TAC3*, así como de la proteína NKB en las células inmunes sugiere la posibilidad de que, como ocurre con otras taquicininas, NKB juegue un papel en la regulación de las funciones de estas células.

Respecto a la HK-1/endocininas, en este estudio hemos demostrado que el ARNm de *TAC4* se expresa de manera constitutiva en diferentes tipos de células inmunes. De los 4

posibles transcritos del gen *TAC4* (α , β , γ y δ), la variante δ se expresó en todos los PMNs, linfocitos, PHA-linfocitos (fundamentalmente linfocitos T), y en los dos *pools* de eosinófilos. Además, el transcrito γ estuvo presente en los PMNs de todos los donantes, en los dos *pools* de eosinófilos, así como en 2 y 3 muestras de linfocitos y PHA-linfocitos, respectivamente. En cualquier caso, ambos transcritos codifican el péptido HK-1 o su forma extendida EKB. La alta homología entre los péptidos HK-1 y SP, y por tanto la dificultad de diseñar un anticuerpo frente a un epítipo específico de alguno de los péptidos, nos impidió la detección de HK-1 mediante tinción inmunológica en las células inmunes en estudio. En un trabajo reciente, Jones y cols. (2008), diseñaron un anticuerpo frente a EKA/B y confirmaron la traducción de las endocinas en plaquetas humanas. Otros autores, sin embargo, no lograron detectar el péptido HK-1 en monocitos, macrófagos (Berger et al, 2007), o células B de ratones utilizando inmunoensayos comerciales (Nelson & Bost, 2005). Esto sugiere que HK-1 podría estar expresando a niveles muy bajos y que su traducción esté muy regulada, activándose sólo en determinadas condiciones, aún por determinar (Nelson & Bost, 2005; Berger et al, 2007).

En concordancia con estudios previos (Ho et al, 1997; Lai et al, 1998; Kang et al, 2004), hemos detectado la expresión génica de los receptores NK1 y NK2 en linfocitos y monocitos. Sin embargo, no hemos podido detectar el ARNm de *TAC1R* o *TAC2R* en eosinófilos ni neutrófilos, ni la expresión de *TAC3R* en ninguna de las estirpes celulares analizadas. Recientemente, y en contraste con nuestros resultados, Gallicchio y cols. (2009) detectaron la expresión del ARNm de los 3 receptores taquicinérgicos en neutrófilos. Sin embargo, a pesar de recrear tanto las condiciones de amplificación utilizados por estos autores, así como el empleo de los mismos cebadores específicos, la expresión del ARNm correspondiente a los receptores taquicinérgicos no se detectó en las muestras de PMNs aisladas en nuestro estudio (datos no mostrados). Las diferencias en los resultados obtenidos no parecen ser inherentes a la técnica de amplificación, dado que en todos los casos se obtuvo una clara señal de amplificación de los receptores en las muestras que se emplearon como control positivo (células del líquido amniótico y de útero). Una posible explicación podría radicar en la inducción o no de la expresión de los receptores según el método de extracción y aislamiento de la estirpe celular empleado. Así, por ejemplo, Gallicchio y cols. (2009) emplearon heparina como agente anticoagulante en contraposición

con el EDTA utilizado en nuestro estudio, pudiendo afectar esta elección a la funcionalidad de las células (Freitas et al, 2008). Por otro lado, también se ha demostrado que diferentes métodos de aislamiento de neutrófilos pueden afectar a la función de estas células (Venaille et al, 1994). Así, en el caso de Gallicchio y cols. (2009), el aislamiento de los neutrófilos se llevó a cabo mediante técnicas de sedimentación con Dextrano, un método por el cual los neutrófilos pueden ser activados (Berends et al, 1994). Por tanto, la expresión de los receptores taquicinérgicos en neutrófilos podría estar inducida o regulada según el método de extracción o aislamiento celular empleado. Por otro lado, la expresión de *TAC3R* también ha sido documentada en linfocitos, aunque en este caso, únicamente se observa tras la activación de co-cultivos de células T y B con IL-5 y TGF- β 1 (Braun et al, 1999). Este hecho indica que, también en este tipo celular, la expresión de los receptores taquicinérgicos podría estar regulada por determinadas señales de activación de las células.

Además de determinar el patrón de expresión del ARNm de las taquicininas y sus receptores en las células inmunes, en el presente estudio se evaluó el efecto de un glucocorticoide habitual en el tratamiento del asma, la Budesonida, en la expresión de los genes de las taquicininas. Se ha sugerido que los glucocorticoides podrían atenuar la inflamación neurogénica en las vías aéreas, entre otras formas, mediante la regulación de la expresión del receptor NK1 (Ihara & Nakanishi, 1990; O'Connor et al, 2004), o de NEP (van der Velden et al, 1998). Además, en otros tejidos se ha demostrado que el glucocorticoide Dexametasona es capaz de regular tanto la expresión de SP (Beaudry et al, 2007) como la actividad mediada por esta taquicinina (Bacci et al, 1993; Castellani et al, 2009). Nuestros resultados con Budesonida en sangre total, muestran un incremento en la expresión relativa de *TAC3* y *TAC4 δ* tras 24 horas de cultivo *in vitro* en presencia del glucocorticoide. Este efecto es además dosis-dependiente, observándose un incremento mayor en la expresión de estos genes con concentraciones de 10 nM de Budesonida. Además, en tres de los 10 donantes se indujo la expresión de *TAC1*. En el caso de *TAC1* y *TAC3*, cuyos productos proteicos SP, NKA y NKB, tienen un papel activo en la inflamación, tal como broncoconstricción, secreción de moco, permeabilización vascular y edema (Joos et al, 2000; Daoui et al, 2000; Grant et al, 2002), parece lógico pensar que la Budesonida supone un efecto secundario no deseado. De hecho, en estudios con ratones, ya se ha descrito cómo el incremento de la expresión de SP en respuesta a un tratamiento tópico con glucocorticoide,

resultó en un aumento de síntomas típicos de la respuesta inflamatoria (Bae et al, 2004). Este efecto de los glucocorticoides en la expresión de *TAC1* ha sido definido como parte de los efectos “aberrantes” observados como consecuencia de su uso, y que podría estar relacionado con la resistencia a los glucocorticoides observados en algunos individuos, o incluso con la exacerbación de enfermedades alérgicas como el asma o la dermatitis, inducidas en algunos casos por la administración de glucocorticoides (Sher et al, 1994; Adcock et al, 1995; Clayton et al, 1995). Por otra parte, el papel de la HK-1, el producto proteico de *TAC4*, aún no está totalmente definido en la respuesta inflamatoria y el asma. Sin embargo, estudios en ratas demuestran que HK-1 también posee un papel hemodinámico similar a SP, provocando una marcada vasodilatación (Page, 2004). Además, se podría hipotetizar sobre su papel contráctil observado en la musculatura lisa de útero (Pennefather et al, 2006, Patak et al, 2008) y en el colon (Kong et al, 2009), y su efecto en la supervivencia y diferenciación de células inmunes (Zhang et al, 2000; Zhang & Paige, 2003; Janelsins et al, 2009). Sin embargo, también se ha observado que HK-1 puede desempeñar un papel inmunomodulador, incrementando la producción de INF- γ y amplificando la respuesta Th1 (Weinstock, 2004; Metwali et al, 2004), hecho que podría modular la respuesta inflamatoria en el asma.

Aquellos factores que influyan en la regulación de la expresión génica de las taquicinas podrían contribuir de manera importante en su actividad biológica y fisiopatológica. Por ejemplo en el experimento con Budesonida se observó una elevada variabilidad en la expresión de *TAC3* y *TAC4* entre las muestras de los diferentes donantes tras la exposición al glucocorticoide. En este sentido nuestro siguiente objetivo consistió en averiguar si variantes genéticas o polimorfismos en los genes *TAC1*, *TAC3* o *TAC4* podrían estar asociados con la susceptibilidad al asma. Para ello realizamos un estudio de asociación caso-control en individuos asmáticos y sanos de la población canaria. Los resultados obtenidos en este estudio muestran la posible asociación de dos SNPs con el asma: rs2291855 en el gen *TAC3* confiriendo protección frente al asma, y rs4794068 en *TAC4*, asociado a un mayor riesgo de asma. En ambos casos se observa heterosis molecular, que implica un efecto mediado por los heterocigotos. Aunque pueda parecer poco intuitivo, este modelo de acción es muy común en humanos, y ha sido demostrado en numerosos estudios de asociación (Comings & MacMurray, 2000; Thakkestian et al, 2005; Frank et al, 2006).

Los genes *TAC3* y *TAC4* están localizados en los cromosomas 12q13.3 y 17q21.33, respectivamente. Estudios con búsquedas en el genoma completo en diferentes poblaciones, han mostrado que estas regiones presentan tanto asociación como ligamiento con el asma bronquial y otros fenotipos relacionados (Shao et al, 2004; Moffatt et al, 2007; Bouzigon et al, 2008; Bisgaard et al, 2009). El SNP rs2291855 del gen *TAC3* está localizado en el promotor proximal del gen, en la región no codificante 5' del exón I, encontrándose cerca de un elemento-silenciador-restrictivo-de-neuronas (NSRF/REST), implicado en regular la transcripción de *TAC3* (Gillies et al, 2009). Por otro lado, rs4794068 está localizado en un intrón de *TAC4*, y por tanto, la influencia que este SNP pueda tener en la expresión del gen no está clara. No obstante, numerosos estudios han demostrado efectos de polimorfismos intrónicos en el procesamiento del ARN de diversos genes (Uitterlinden et al, 1998; Horikawa et al, 2000; Shima et al, 2006). A este respecto, cabe mencionar que el SNP rs4794068 está localizado en un lugar de reconocimiento del factor de unión a CTC (CTCF) (**CGGGAAGAGG**, <http://www.essex.ac.uk/bs/molonc/spa.html>), y se ha demostrado que la unión de CTCF a dianas intrónicas puede regular la expresión génica (Arnold et al, 2000). En conclusión, este estudio preliminar muestra por vez primera, una posible asociación entre el asma y dos polimorfismos de *TAC3* y *TAC4*.

En resumen, todos estos datos sugieren que las células inmunes pueden ser un reservorio móvil de taquicinas, que no sólo sintetizan y almacenan SP, sino que también contienen en sus gránulos NKB y posiblemente HK-1. Además, es factible que la expresión de estas dos taquicinas se vea a su vez regulada por la presencia de ciertas variantes genéticas que pueden conferir protección o riesgo frente al proceso inflamatorio y que además pueden ser responsables, al menos en parte, de las diferentes susceptibilidades de los individuos al tratamiento con corticoides.

2. EXPRESIÓN DE LAS TAQUICININAS Y SUS RECEPTORES DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DE ESTIRPES LINFOIDES Y MIELOIDES

Las taquicininas y sus receptores han mostrado tener un importante papel regulador en la diferenciación de las células sanguíneas a diferentes niveles de la maduración y en los tres linajes celulares: eritroide, mieloide y linfoide (Liu et al, 2007; Klassert et al, 2010). En este estudio hemos podido analizar la expresión de las taquicininas y sus receptores en el proceso de diferenciación de linfocitos T y de eosinófilos. En el primer caso, la utilización del mitógeno PHA, aparte de inducir la proliferación específica de linfocitos T, es capaz de promover la diferenciación de las células T funcionales (Duarte et al, 2002). En el caso de eosinófilos, para estudiar su diferenciación hemos partido de la línea celular EoL-1 procedente de un paciente con leucemia mieloide aguda, que se caracteriza por la presencia de precursores eosinofílicos inmaduros. En las primeras etapas del periodo de diferenciación de los mismos, se observó un incremento significativo en la expresión de *TAC3*, llegando a duplicarse su expresión con respecto a las células EoL-1 inmaduras. Curiosamente, los resultados obtenidos durante la maduración de linfocitos T inducida por PHA, también mostraron un incremento significativo en la expresión de *TAC3*. Es más, este incremento en la expresión de *TAC3* observado durante los procesos de diferenciación de las líneas mieloide y linfoide, respectivamente, también se ha descrito para la línea eritroide, tanto en ratones como en humanos (Pal et al, 2004). En eritrocitos de ratón, la transcripción de *NKB* durante la eritropoyesis es activada por *GATA-1*, un factor de transcripción clave en la hematopoyesis (Pal et al, 2004). A la hora de explicar el sentido biológico de la expresión de *NKB* durante la diferenciación celular, los autores se inclinan por una función paracrina del *NKB* formado, más que autocrina, dada la ausencia de receptores específicos *NK3* en la superficie de las células eritroides. El modelo propuesto por estos autores se basa en que la diferenciación de los precursores eritroides provoca un aumento y liberación de *NKB* que actuaría paracrinamente sobre las células endoteliales que expresan el receptor *NK3*. La unión *NKB-NK3* en estas células regula la movilización de las células eritroides desde la médula hacia la periferia. Este modelo de activación de *TAC3* durante la eritropoyesis, podría

ser extrapolable a otras células sanguíneas, sobre todo en el caso de los eosinófilos, para cuyo desarrollo se ha demostrado que GATA-1 es esencial (Hirasawa et al, 2002).

Cuando comparamos los niveles de transcripción entre linfocitos y PHA-linfocitos, observamos una regulación a la baja significativa del ARNm de *TAC4* en todos los individuos analizados. Comportamientos similares de *TAC4* durante la diferenciación han sido citados previamente en la maduración de las células B con agentes diferenciadores como LPS o IFN- γ (Zhang et al, 2000) o sin ellos (Nelson & Bost, 2005) en la diferenciación celular de monocitos, macrófagos y células dendríticas de ratón (Nelson et al, 2004; Berger et al, 2007).

Por otro lado, se ha observado que HK-1 es capaz de incrementar la proliferación de células precursoras de linfocitos T y de elevar el número de timocitos en cultivos de timos fetales (Zhang & Paige, 2003). Todo ello parece indicar que HK-1 podría estar actuando como señal proliferativa de las células T y B inmaduras, y que la disminución observada en la expresión de *TAC4* podría estar asociada a la progresión de estas células a estadios más maduros.

Finalmente, se observa una disminución en la expresión génica del receptor taquicinérgico NK2 durante la diferenciación de las células EoL-1, que llega a ser casi indetectable en las etapas finales de la diferenciación celular. Existen contrastadas evidencias de la implicación de los receptores taquicinérgicos en la hematopoyesis, donde NK1R y NK2R muestran funciones opuestas de activación e inhibición, respectivamente (Klassert et al, 2010). En la línea celular progenitora de células sanguíneas K562, se ha observado que la activación de NK2R conduce al arresto del ciclo celular al suprimirse los activadores de dicho ciclo, Cdk2 y Ciclina A, y activarse los inhibidores del ciclo celular p53, p21 y Smad4 (Ricardo et al, 2008), por lo que el control de la expresión de NK2 en las células inmaduras de la médula ósea podría representar un aspecto importante en la regulación de la hematopoyesis. En un estudio reciente, Bandari y cols. (2003) demostraron que la estimulación de fibroblastos de la médula ósea con GM-CSF o IL-3, condujo a una disminución drástica del ARNm de NK2R. Además, los autores tras clonar el promotor del receptor NK2, identificaron una posible región represora que podría estar implicada en la caída de la expresión de NK2R observada tras la activación con las citoquinas (Bandari et al, 2003). Precisamente estas citoquinas, GM-CSF e IL-3, implicadas en la regulación de NK2R,

son importantes estimuladores de la hematopoyesis, incluyendo la producción y diferenciación de eosinófilos (Clutterbuck et al, 1989; Metcalf, 2008). Por tanto, la disminución en la expresión de NK2R parece obedecer a señales específicas que conducen a la proliferación y maduración celular.

Nuestros datos no sólo confirman una disminución de la expresión de *TAC4* en linfocitos T durante la diferenciación, sino que demuestran por primera vez que *TAC3* podría ser importante en la maduración de linfocitos T y eosinófilos, al igual que ocurre con los eritrocitos. Por otro lado, en la diferenciación de los eosinófilos observamos una disminución de la expresión del receptor NK2R que podría estar relacionada con la proliferación y maduración celular.

Durante la hematopoyesis es fundamental que exista una correcta regulación de todos aquellos factores relacionados con la proliferación y maduración de las distintas estirpes celulares, ya que un defecto en este proceso puede dar lugar a la aparición de células sanguíneas inmaduras, generando graves enfermedades como son las leucemias agudas. En relación con ello, se ha observado que en niños diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda del linaje B y pertenecientes a un grupo de bajo riesgo, la expresión de SP en blastocitos antes del comienzo del tratamiento resultó en un pronóstico desfavorable. Estos niños tuvieron mayor número de recaídas cuando se compararon con otros niños, también del grupo de bajo riesgo, pero que no expresaban SP (Nowicki & Miskowiak, 2003). Por otro lado, se ha observado que las células similares a los linfocitos derivadas de pacientes con leucemia aguda no linfoblástica, leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica crónica de tipo B, presentan una fuerte inmunoreactividad para SP, al contrario que los linfocitos normales, que generalmente son negativos o presentan escasa señal (De Giorgio et al, 1998). Además, la expresión de SP en estos tipos de leucemia también indicó un pronóstico desfavorable. Dada la importancia de las taquicininas y sus receptores en la regulación de la hematopoyesis (Greco et al, 2004), sería interesante averiguar si otras taquicininas menos estudiadas, como *TAC3* y *TAC4*, que muestran un patrón de expresión diferencial durante la maduración de células de linaje linfóide y mieloide, también podrían estar involucradas en la patofisiología de la hematopoyesis.

3. ESTUDIOS EN CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR EOSINOFÍLICA EoL-1

Los eosinófilos están involucrados en muchas enfermedades inflamatorias crónicas que afectan a sistemas orgánicos que generalmente están expuestos a antígenos, como el tracto respiratorio y la piel (Coppi et al, 2007). De hecho, se considera que la eosinofilia en las vías aéreas es uno de los sucesos centrales en la patogénesis del asma (Lintomen et al, 2008). Su relevancia en la modulación de la respuesta inflamatoria y la remodelación de las vías aéreas se explica en parte por la gran cantidad de compuestos pro-inflamatorios liberados por esta estirpe celular (Barnes et al, 1998; Giembycz & Lindsay, 1999). Por otro lado, los eosinófilos también expresan una gran cantidad de receptores, incluido NK1R, por lo cual los eosinófilos son, además, diana de multitud de estímulos pro-inflamatorios (Barnes et al, 1998; Giembycz & Lindsay, 1999). Por todo ello, los eosinófilos fueron elegidos como nuestro modelo celular para estudiar el posible papel de SP en la regulación de las rutas de producción de diferentes mediadores y receptores relevantes en la propagación de la inflamación. Sin embargo, debido a la baja proporción de eosinófilos en sangre periférica y, por tanto, la dificultad de disponer de las cantidades de células necesarias para la realización de los estudios *in vitro* planteados, se optó por trabajar con la línea eosinofílica humana EoL-1. Al tratarse de una línea mieloide inmadura, se procedió a su diferenciación mediante dbAMPc (Wong et al, 1999) a fin de disponer de células maduras, y de un modelo válido para el estudio de los eosinófilos en la respuesta inmune (Saito et al, 1985; Mayumi, 1992; Wong et al, 1999).

Nuestro primer objetivo fue determinar el papel de SP en los eosinófilos utilizando placas de cultivo, tal y como se ha descrito en trabajos previos (Iwamoto et al, 1993; Numao & Agrawal 1992; Wiedermann et al, 1993; El-Shazly et al, 1996). Frente al rango de concentraciones y tiempos testados, los cambios de expresión más marcados fueron detectados a la concentración más alta empleada (1 μ M) y tras 24 horas de incubación. En estas condiciones los cambios más llamativos los podemos resumir en: 1) Aumento de la expresión génica de enzimas involucradas en la ruta de las ciclo-oxigenasas, incluyendo COX1 (4,47x) TXAs (2,22x) y PGFs (2,35x); 2) Cambios de expresión en la ruta de síntesis de

leucotrienos, con incrementos para *ALOX-5* (9,19x) y *FLAP* (1,67x), y con un sesgo hacia la ruta de producción de LTB_4 , ya que hay una clara inducción de la expresión de *LTA4h* (2,7x), mientras que *LTC4s* es inhibida (0,63x); 3) Regulación a la baja de la expresión de *ALOX-15* (0,34x); 4) Disminución en la expresión de *PAFAH* (0,67x), y 5) Activación de la expresión génica del receptor de quimioquinas *CCR3* (2,38x).

Atendiendo al emplazamiento de estas células *in vivo*, los eosinófilos maduros pueden encontrarse tanto en la circulación sanguínea, como en diferentes tejidos, entre los que se encuentran los pulmones (Giembycz & Lindsay, 1999). Tras su infiltración a través del endotelio vascular, los eosinófilos pueden establecerse en los tejidos adhiriéndose a componentes de la matriz extracelular como la FN. Esta unión está mediada por integrinas, como *VLA-4*, y puede tener como consecuencia cambios funcionales en los eosinófilos, como su activación o primado, e incluso su desgranulación (Anwar et al, 1993, 1994; Neeley et al, 1994; Higashimoto et al, 1999). Por ello, los estudios *in vitro* de estimulación con SP se llevaron a cabo, paralelamente a los anteriormente descritos, en placas pre-tratadas con FN, a fin de recrear las condiciones observadas en los tejidos *in vivo*. Además, dada la importancia de esta glicoproteína en la activación celular, también se estudió el efecto de la propia FN sobre aquellos genes sensibles al tratamiento con SP. Los resultados mostraron un efecto importante de la FN en la regulación de la expresión génica tanto en el caso de la cascada del AA, como para *CCR3* y *PAFAH*. Curiosamente, por separado, SP y FN tienen efectos similares sobre numerosos genes. Sin embargo, también se observan efectos de FN que antagonizan con los obtenidos para SP. Este antagonismo se observó: en la ruta de PAF, donde FN estimuló la expresión de *PAFAH*; en la ruta de las ciclo-oxigenasas, donde FN indujo la expresión de *COX2*, y redujo la expresión de *PGFs*; y en la ruta de la 15-LO, donde la expresión de *ALOX-15* incrementó tras 24 horas de incubación con FN.

Cuando SP se probó en las células previamente primadas con FN, las concentraciones y tiempos en las que se observaron los cambios más significativos en la expresión de los genes fueron los mismos que en los ensayos con SP en cultivos no tratados, es decir, tras 24 horas con concentraciones de SP de 1 μ M. En estas condiciones, el tratamiento con SP en presencia de FN mostró varios resultados muy interesantes: 1) El efecto de SP prevaleció sobre el efecto antagónico de FN en 2 genes, manteniéndose una regulación a la baja de *ALOX-15*, y un incremento de *PGFs*; 2) SP contribuyó a aumentar aún más la expresión de

genes previamente activados por FN, como es el caso de *ALOX-5* y *LTA4h*; 3) SP, que por sí sólo induce la expresión de *COX1*, pero no de *COX2*, en presencia de FN induce aún más la expresión de *COX2* y no tiene efecto sobre la expresión de *COX1*; y 4) la FN prima el efecto activador de SP sobre *PGEs*, cuya expresión fue nula en ausencia de la glicoproteína.

Siempre que la mayor expresión del ARNm observada se traduzca en una mayor producción de las enzimas correspondientes, cabría pensar que el efecto de SP tras 12 ó 24 horas de incubación con eosinófilos previamente primados con FN podría inducir un incremento en la generación y liberación de los metabolitos terminales PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, TXA_2 y LTB_4 , y una disminución en las lipoxinas. Nuestro análisis se centró en la regulación de las enzimas de esta ruta a nivel de la expresión de su ARNm, y por tanto, representa un modelo de regulación de esta ruta a este nivel. Sin embargo, existen evidencias que soportan la hipótesis de que esta regulación es funcional, traduciéndose en una mayor producción de los eicosanoides citados. Por un lado, la regulación sesgada de la ruta de la 5-LO, podría explicar, al menos en parte, los incrementos en la liberación de LTB_4 que efectivamente han sido encontrados por diferentes autores en otras células inmunes, como macrófagos y mastocitos, en respuesta a SP (Okabe et al, 2006; Castellani et al, 2009). Por otro lado, en células endoteliales y PMN, Gallicchio y cols. (2006; 2009) observaron que SP era capaz de inducir una mayor producción y liberación de PGE_2 , y que este incremento se correlacionaba, además, con un aumento en la expresión de la enzima *COX2*. Los mismos resultados fueron obtenidos por Koon y cols. (2006) trabajando con células epiteliales de colon. Así mismo, en astrocitos, SP es capaz de inducir la formación de PGE_2 y TXB_2 , el producto estable del metabolito TXA_2 (Hartung et al, 1988).

Mientras que la producción de PGE_2 , tromboxanos y LTB_4 por parte de las enzimas correspondientes, ha sido ampliamente documentada en eosinófilos (Giembycz & Lindsay, 1999), el papel funcional de la PGFs en la síntesis de $PGF_{2\alpha}$ es menos claro en esta estirpe celular, y son escasos los estudios que han investigado esta función en eosinófilos. Teniendo en cuenta que la expresión génica de la PGFs fue incrementada hasta 4 veces por SP, nuestro siguiente objetivo consistió en detectar la presencia de $PGF_{2\alpha}$ en el sobrenadante del cultivo de las células EoL-1. Sin embargo, utilizando un kit comercial no fuimos capaces de detectar $PGF_{2\alpha}$ en el sobrenadante de los cultivos de EoL-1 tratados con FN y estimulados con SP. Esto se podría explicar por el hecho de que además del producto $PGF_{2\alpha}$, la PGFs puede

formar un esteroisómero de esta prostaglandina, la 11-epi-PGF_{2α}, utilizando como sustrato la PGD₂ (Watanabe et al, 1987) (ver figura 22). En experimentos realizados por Parsons & Roberts en los años 80, se llegó a la conclusión de que el producto principal generado por la PGFs en eosinófilos, podría ser precisamente la forma isomérica de la prostaglandina (Parsons & Roberts, 1988). De hecho, se comprobó que los eosinófilos eran capaces de producir formas isoméricas de la PGF_{2α} a partir de PGD₂ exógena. Dado que los eosinófilos se acumulan en las inmediaciones de mastocitos durante los procesos inflamatorios, esta actividad estereoespecífica de la PGFs podría suponer una nueva forma de interacción funcional entre eosinófilos y mastocitos productores de PGD₂ (Parsons & Roberts, 1988). La ausencia de PGF_{2α} en los sobrenadantes de nuestro estudio, apoyaría la tesis de que en eosinófilos la función de la PGFs podría estar sesgada hacia la transformación de PGD₂ en 11-epi-PGF_{2α}. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales con aporte exógeno de PGD₂ para confirmar esta hipótesis en nuestro modelo de regulación por SP.

La liberación de TXA₂, PGE₂, PGF_{2α}/11-epi-PGF_{2α} y LTB₄ podría estar vinculada a algunos de los efectos observados en la respuesta asmática mediada por SP. Así por ejemplo, PGF_{2α} es un potente broncoconstrictor tanto *in vitro* como *in vivo* (Barnes et al, 1998), observándose la misma actividad también para la forma isomérica 11-epi-PGF_{2α} (Beasley et al, 1987). Los tromboxanos, además de causar broncoconstricción, en modelos animales han demostrado su capacidad de inducir la hiperrespuesta y exudación de plasma en las vías aéreas (Barnes et al, 1998). Por otro lado, la PGE₂ puede promover la respuesta Th2, inhibiendo la producción de citoquinas como IL-2 e INF-α (Hilkens et al, 1995), pero también puede desempeñar un papel regulador y anti-inflamatorio en el asma (Pavord et al, 1993; Barnes et al, 1998). Esta dualidad también se observa en su efecto sobre la musculatura lisa de las vías aéreas, donde PGE₂ causa broncodilatación cuando es inhalada por individuos sanos, pero puede causar broncoconstricción en individuos asmáticos (Barnes et al, 1998). PGE₂ también causa vasodilatación, por lo que se ha sugerido su implicación en la formación de edemas (Barnes et al, 1998). Además, tanto PGE₂ como PGF_{2α}, tienen la capacidad de activar las fibras C que inervan las vías aéreas, pudiendo servir de retroalimentación positiva en la inflamación neurogénica, al inducir mayor liberación de SP por parte de las fibras nerviosas (Bergren, 2005). Por otro lado, LTB₄ representa un importante estímulo en la propagación de la respuesta inflamatoria mediada por SP. De

hecho, LTB_4 es un potente quimioatrayente de neutrófilos y eosinófilos, y estudios recientes con ratones muestran también su implicación en la producción de IL-13 por parte de linfocitos T y el reclutamiento de células T $CD8^+$ en la respuesta inflamatoria alérgica (Ford-Hutchinson et al, 1980; Miyahara et al, 2006).

Finalmente, cabe destacar la tercera ruta metabólica importante en la cascada del AA en eosinófilos, que implica a la 15-LO. Esta enzima, que compite con las ciclo-oxigenasas y la 5-LO en la utilización del AA como sustrato, da lugar a mediadores bio-activos, que incluyen a las lipoxinas (Giembycz & Lindsay, 1999) (ver figura 22). En los últimos años, diferentes grupos han estudiado las lipoxinas en los procesos inflamatorios, demostrando su función anti-inflamatoria, inhibiendo la activación y acumulación de neutrófilos y eosinófilos y reduciendo la permeabilidad vascular (Takano et al, 1998; Bonnans et al, 2002; Takai et al, 2004; Vachier et al, 2005; Bannenberg & Serhan, 2010). De hecho, se ha relacionado la expresión de las lipoxinas con la terminación del proceso inflamatorio (Serhan & Savill, 2005; Bannenberg & Serhan, 2010). Nuevas evidencias muestran cómo eventos tempranos del proceso inflamatorio, activan un “programa coordinado” de terminación de la inflamación, y que comienza a orquestarse mediante un cambio en la producción local de eicosanoides y otros mediadores lipídicos (Levy et al, 2001; Serhan & Savill, 2005). Para ello, tras un periodo de síntesis y liberación de leucotrienos y prostaglandinas durante el proceso inflamatorio mediado por los granulocitos, éstos promueven un cambio en la producción de eicosanoides, empezando a generar lipoxinas, lo cual supone el inicio de la secuencia de terminación del proceso inflamatorio (Levy et al, 2001; Serhan & Savill, 2005). En estudios con neutrófilos, se ha observado que el cambio en la producción de eicosanoides puede ser promovido, al menos en parte, por la propia producción inicial de prostaglandinas. Se ha demostrado que PGE_2 y PGD_2 , que son liberados en las primeras etapas de la inflamación, pueden convertirse en los iniciadores de la subsiguiente ruta anti-inflamatoria, aumentando la producción de Lipoxina A (LXA_4) (Levy et al, 2001). Cabe destacar que la iniciación de esta ruta de síntesis de LXA_4 implica una regulación a nivel transcripcional de la 15-LO, observándose un incremento del ARNm de *ALOX-15* (Levy et al, 2001). Así mismo, los bajos niveles de LXA_4 observados en el BAL de pacientes con asma severa, también se corresponden con una disminución en la expresión génica de *ALOX-15* (Planagumà et al, 2008).

En nuestro estudio *in vitro* con células eosinófilas, observamos que la FN aumenta la expresión de *ALOX-15* hasta el doble tras 24 horas de incubación. Dado que a tiempos menores (12 h) la FN promueve la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de prostaglandinas, como la PGEs, la inducción de *ALOX-15* a las 24 h podría ser consecuencia de un efecto autocrino/paracrino de PGE₂ previamente liberada, y suponer el inicio de ese cambio en la producción de eicosanoides (Levy et al, 2001). Sin embargo, en presencia de SP este efecto sobre *ALOX-15* se revierte totalmente y la transcripción se ve significativamente inhibida tanto a las 12 como a las 24 horas de incubación. A la luz de estos datos, podemos sugerir un nuevo efecto de SP no descrito previamente, consistente en prolongar el proceso inflamatorio, evitando o retrasando la secuencia de terminación iniciada por las lipoxinas.

Modelo de regulación transcripcional de la Cascada del AA por SP

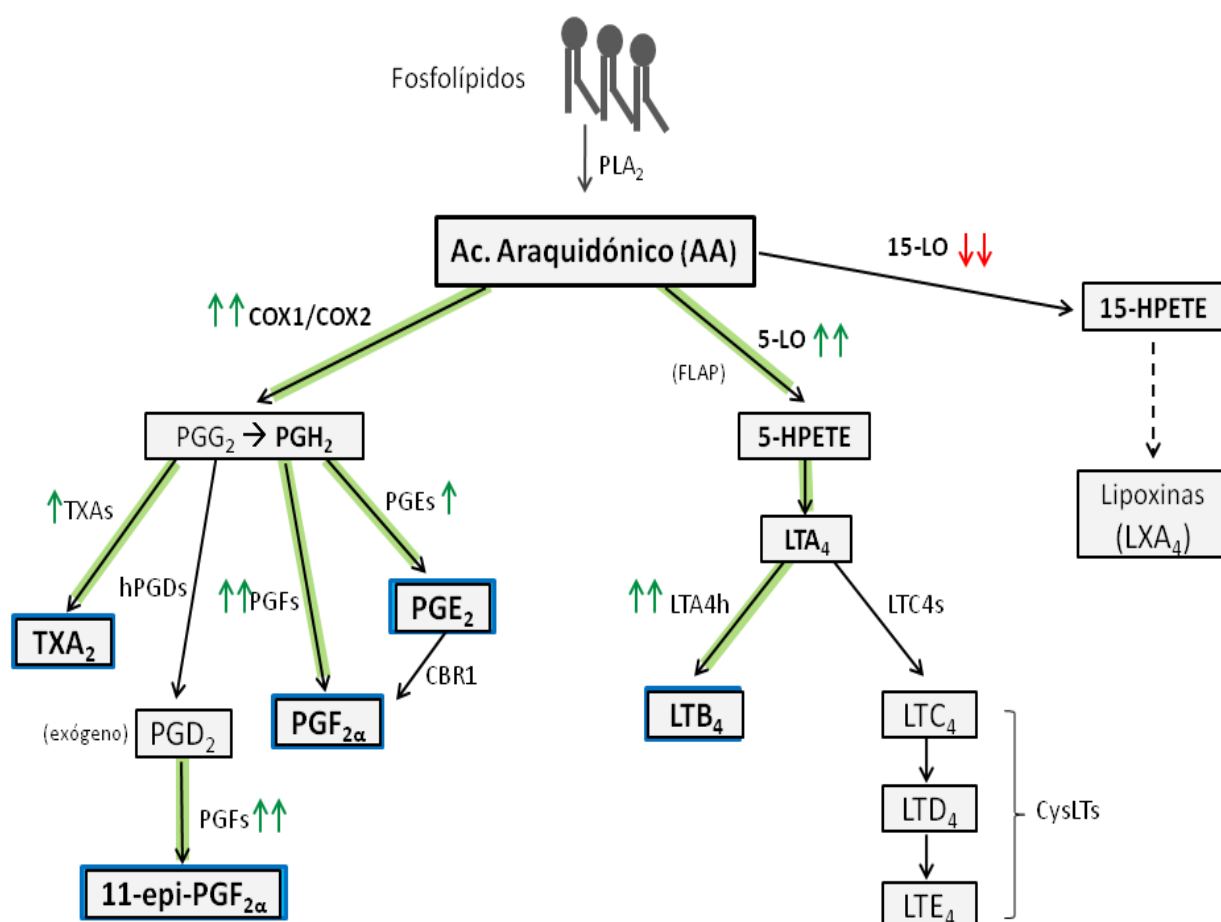


Figura 22.- Representación de la ruta metabólica del AA en eosinófilos, y su regulación por SP a nivel de la transcripción de las enzimas implicadas en células cultivadas con FN. Las flechas verdes y rojas, representan incrementos e inhibiciones en la expresión, respectivamente.

En definitiva, en este estudio proponemos un modelo de regulación a nivel transcripcional de la cascada del AA en eosinófilos, según el cual SP primaría las rutas de producción de prostaglandinas y leucotrienos, favoreciendo especialmente una posible formación y liberación de PGE_2 , $PGF_{2\alpha}/11\text{-epi-PGF}_{2\alpha}$, TXA_2 y LTB_4 (ver figura 22). Paralelamente, se mantiene inhibida la ruta anti-inflamatoria de la 15-LO tras tiempos de incubación elevados (12 y 24 h), lo que podría contribuir a la prolongación de la respuesta inflamatoria.

Además de los genes que codifican las enzimas implicadas en la cascada del AA, también se observaron cambios en la expresión de otros dos genes en respuesta a SP: *PAFAH* y *CCR3*. *PAFAH* codifica para la acetil-hidrolasa de PAF plasmática (pPAF-AH), una enzima de la familia de las PLA_2 , que participa en la regulación de la ruta del PAF (ver figura 23).

Regulación de la Biosíntesis del PAF

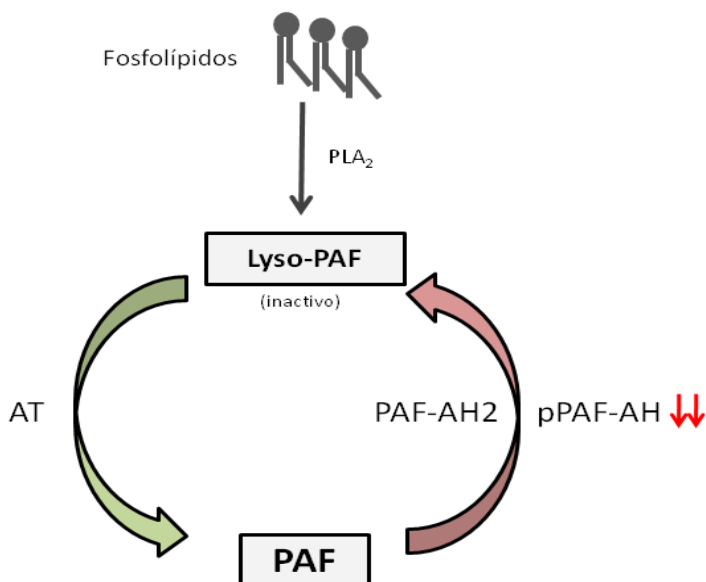


Figura 23.- Representación de la ruta de síntesis y catabolismo del PAF. Las flechas rojas indican el efecto de SP en la transcripción del ARNm de pPAF-AH.

PAF tiene múltiples funciones en el desarrollo del asma, entre las que destacan su actividad broncoconstrictora, el incremento de la permeabilidad vascular, la estimulación de secreciones mucosas, y la quimiotaxis y activación de células inflamatorias (Barnes et al, 1998). En los experimentos *in vitro* en placas no tratadas con FN se observó una disminución en la expresión de *PAFAH* que fue altamente significativa tras 24 horas de incubación con 1 μ M de SP. Curiosamente, en enfermedades inflamatorias como el asma, se ha descrito una menor actividad y concentración de la enzima pPAF-AH, el producto de *PAFAH*, tanto en plasma como en BAL (Tsukioka et al, 1996; Triggiani et al, 1997; Karasawa et al, 2003). Estudios con modelos animales, han demostrado que los cambios en la actividad de pPAF-AH en plasma, se corresponden también con cambios a nivel de la transcripción de *PAFAH*, lo que sugiere una regulación de su expresión a este nivel (Memon et al, 1999). Por tanto, hipotéticamente, la disminución del ARNm de *PAFAH* en respuesta a SP podría explicar, al menos en parte, los bajos niveles de expresión de esta enzima en individuos asmáticos. Más aún, parece lógico pensar, que una menor expresión o actividad de pPAF-AH podría implicar una acumulación de PAF (Karasawa et al, 2003), amplificando y propagando así la respuesta inflamatoria en el asma. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos parecen biológicamente plausibles, los efectos observados en respuesta a SP únicamente se sostienen en los ensayos sin FN. En los experimentos con placas tratadas con la glucoproteína, cuyas condiciones se asemejan más a los parámetros fisiológicos reales de los tejidos, el efecto de SP sobre *PAFAH* no pudo ser validado, por lo que su sentido biológico es discutible. Por tanto, los resultados obtenidos son sólo indicativos de un posible papel de SP, que podría ser funcional bajo ciertas condiciones aún por determinar.

Por otro lado, SP también provocó cambios en la expresión de *CCR3*, observándose un incremento significativo de la misma tras 12 y 24 horas de incubación con la taquicinina. Sin embargo, también en este caso debemos tener en cuenta que este efecto fue observado únicamente en ausencia de FN, por lo que su relevancia biológica es discutible. La proteína codificada por *CCR3* es uno de los principales receptores de quimioquinas α o CC, siendo responsable de más del 95 % de las respuestas inducidas, en eosinófilos, por la Eotaxina, RANTES, y las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP) 2, 3 y 4 (Heath et al, 1997; Gjembycz & Lindsay, 1999). Todas estas quimioquinas tienen principalmente una función quimiotáctica sobre los eosinófilos, aunque también pueden desempeñar otros papeles en la

respuesta inflamatoria. Eotaxina, RANTES y MCP-4 pueden activar la NADPH oxidasa, promover la adherencia a fibronectina o al endotelio, y estimular la liberación de otros mediadores, como la IL-8 (Giembycz & Lindsay, 1999). Es más, en un proceso que implica la participación de CCR3, El-Shazly y cols. (1999), han demostrado un nuevo modelo de cooperación entre la Eotaxina y SP, mediante el cual la Eotaxina ejerce un efecto de primado sobre el eosinófilo, permitiendo la liberación de EDN inducida por SP. En nuestro estudio, observamos que además SP induce la expresión del ARNm de *CCR3*, por lo que sería posible que también SP pueda primar o amplificar algunas de las funciones de la Eotaxina bajo ciertas condiciones. Si además tenemos en cuenta que en un estudio reciente se demostró la capacidad de SP de incrementar también la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1 y CXCR2 en neutrófilos de ratón (Sun et al, 2007), nuestros resultados podrían aportar aún más indicios del papel de SP en el reclutamiento de células inmunes hacia el foco de procesos inflamatorios.

La mayoría de los efectos biológicos atribuidos a las taquicinas están mediados por los receptores taquicinérgicos. Estos están acoplados a proteínas G, y su estimulación induce una cascada de señalización celular que termina en el núcleo de la célula. Para la interacción entre las taquicinas y sus receptores es necesario el extremo carboxilo terminal del neuropéptido. Sin embargo, se ha visto que el extremo amino terminal catiónico de SP puede directamente interactuar con el extremo carboxilo de las proteínas G y activarlas directamente, pasando por alto al receptor taquicinérgico (Sun et al, 2007). Estudios funcionales sobre eosinófilos aislados de sangre periférica sugieren que estas células expresan receptores de taquicinas. Así, se ha observado que SP *per se* es quimiotáctico para eosinófilos humanos. El hecho de que en estos experimentos el efecto quimiotáctico de SP se produzca utilizando el fragmento carboxilo terminal, y no con el fragmento amino terminal sugiere que puede ser un mecanismo mediado por receptor (Wiedermann et al, 1993). En otra serie de experimentos, Numao y Agrawal (1992) usando eosinófilos aislados de asmáticos no observan un efecto directo de SP sobre la quimiotaxis, pero sí una respuesta aumentada a la quimiotaxis inducida por PAF o LTB₄ cuando las células son pre-incubadas con SP. Además este aumento lo observan para el extremo C-terminal, pero no para el extremo N-terminal de SP, y no se observa tampoco cuando se utiliza el antagonista del receptor de SP [D-pro2, D-Trp7,9]SP. Similarmente, un efecto sinérgico sobre la

quimiotaxis de los eosinófilos humanos se observa cuando PAF o IL-5 se añaden al medio tras previa incubación con SP, efecto que es eliminado utilizando el antagonista específico de NK1, FK888 (El-Shazly et al, 1996). La mayoría de estos efectos ocurren a concentraciones de SP en torno a 0,1-100 nM (Wiedermann et al, 1993; El-Shazly et al, 1996). Sin embargo, SP a concentración de 1 μ M induce la liberación de ECP y a 10 μ M induce la generación de radicales de oxígeno libre en eosinófilos humanos. Este efecto ocurre utilizando la porción C-terminal pero no la N-terminal de SP, por lo que podría ser un efecto de SP también mediado por receptor (Iwamoto et al, 1993). En el caso de la línea celular EoL-1, el análisis por citometría de flujo demuestra que el 90% de las células expresan tanto el receptor NK1 como NK2 (Zheng et al, 2009). En estas células SP estimula la síntesis y liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) a concentración de 1 μ M, y dos antagonistas específicos del receptor NK1 (CP96345 y CP99994) inhiben la síntesis de CRH inducida por SP (Zheng et al, 2009). Estos datos sugieren que SP en eosinófilos, y a concentraciones en torno a 1 μ M, podría ejercer un efecto mediado por receptor, provocando la síntesis y liberación de sustancias, y promoviendo la quimiotaxis a concentraciones más bajas. Efectos similares se han observado en otras células también de linaje granulocítico y fuertemente implicadas en la inflamación. Así por ejemplo, SP a concentraciones micromolares activa los PMNs y provoca la producción y liberación de quimioquinas (Sun et al, 2007). Esta activación también está mediada por receptor, puesto que dos antagonistas de NK1 (CP96,345 y L703,606) bloquean el efecto de SP. Además, en estas concentraciones, SP prima los PMNs frente a diferentes estímulos provocando varias respuestas celulares, entre las que se incluyen el incremento de Ca^{++} citosólico, la respuesta oxidativa, y la formación de peróxido de hidrogeno y óxido nítrico (Dianzani et al, 2001; Sun et al, 2007). En el caso de los mastocitos, tanto en piel como en pulmón humanos, las concentraciones de SP necesarias para inducir su desgranulación son de 25-50 μ M (Heaney et al, 1995). Además, se ha visto que en mastocitos humanos, SP a concentración 1-10 μ M aumenta el ARNm del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y también su producto, efecto que se ve inhibido pre-incubando las células con un antagonista específico de NK1R (L-733,060), sugiriendo que también pueda estar mediado por receptor (Theoharides et al, 2010). El hecho de que en estas células el receptor responda a concentraciones micromolares del neuropéptido indica que presenta una afinidad significativamente menor que la nanomolar observada para el

receptor NK1 en otros tipos celulares (Dianzani et al, 2001). La forma corta del receptor NK1 une SP con una afinidad menor que la forma larga y provoca una respuesta electrofisiológica menor en oocitos de *Xenopus* (Fong et al, 1992). Por tanto, sería plausible que la isoforma corta del receptor NK1 esté presente en los granulocitos y sea distinta a la que existe en otras células, como neuronas, células secretoras y células musculares, y podría explicar por qué concentraciones micromolares de SP son necesarias para activar estas células (Dianzani et al, 2001). No obstante, hay que tener presente que en los granulocitos se ha descrito un mecanismo de acción de las taquicinas independiente de los receptores taquicinérgicos, como la liberación de histamina en mastocitos peritoneales de rata (Cocchiara et al, 1997) y la liberación de EPX en eosinófilos de cobayas (Kroegel et al, 1990).

El efecto de SP en diferentes tipos celulares ocurre con concentraciones que se sitúan en el rango entre 10^{-10} - 10^{-14} M, que por otro lado son las concentraciones fisiológicas normales para este péptido en plasma y tejidos humanos (Skrabanek et al, 1976; Pearse et al, 1977). Así pues, la pregunta final que cabría hacerse es ¿tiene algún significado biológico el efecto de SP observado en EoL-1 a concentraciones micromolares? Interesantemente, diversos autores han sugerido que las concentraciones de SP pueden ser localmente elevadas, alcanzando rangos micromolares bajo determinadas condiciones (Wozniak et al, 1989; Cuesta et al, 2002; Goto et al, 2006). Estas condiciones se podrían alcanzar en tejidos inervados inflamados. De hecho, en la enfermedad inflamatoria reumatoide, el nivel de SP en el fluido sinovial puede llegar a alcanzar $0,2 \mu\text{M}$ y dado que SP se libera de los terminales nerviosos dentro de la membrana sinovial, concentraciones considerablemente más altas que $0,2 \mu\text{M}$ deben ocurrir en estas membranas sinoviales inflamadas, lugar donde se encuentran los granulocitos (MacDonald et al, 1989). Es más, estudios sobre la localización de los eosinófilos en las vías aéreas han revelado su estrecha asociación a fibras nerviosas (Costello et al, 1997), donde las concentraciones de SP podrían ser elevadas. De hecho, en animales sensibilizados con antígeno, la máxima densidad de eosinófilos en el pulmón se observó en las inmediaciones de las fibras nerviosas (Costello et al, 1997). Además, se ha demostrado que los eosinófilos activados liberan mediadores que a su vez estimulan la liberación de neuropéptidos de las neuronas sensoriales (Kranefeld & Nijkamp, 2001), contribuyendo a aumentar la concentración de éstos en el tejido. Aparte de la liberación de

SP desde los terminales nerviosos, podría existir también un aporte adicional de taquicininas proveniente de las células inmunes presentes en el foco de la inflamación.

En conclusión, parece que las concentraciones efectivas de SP en eosinófilos son similares a aquellas necesarias para la activación de PMNs y mastocitos. Estas células poseen importantes funciones tanto en la modulación de la respuesta inflamatoria, como en su aspecto efector, induciendo daño tisular. Estas funciones son ejercidas gracias a la liberación de proteínas tóxicas de sus gránulos, especies reactivas de oxígeno, y mediadores lipídicos, como los metabolitos de la cascada del AA. Por ello es necesario que su activación no ocurra en condiciones fisiológicas normales y el requerimiento de altas concentraciones de SP necesarias para primar o activar estas células podría prevenir una activación espuria inducida por los nervios sensoriales (Serra et al, 1994).

CONCLUSIONES



1. Se ha determinado por primera vez la expresión de los genes *TAC3* y *TAC4* en células inmunes humanas extraídas de sangre periférica, demostrando la presencia del ARNm correspondiente a *TAC3* en linfocitos y monocitos, y del ARNm de los transcritos γ y δ de *TAC4* en PMN, eosinófilos y linfocitos.
2. Mediante inmunocitoquímica se demostró la presencia de NKB, el producto proteico de *TAC3*, en linfocitos, monocitos, PMNs y eosinófilos.
3. La Budesonida, glucocorticoide habitual en el tratamiento del asma, incrementa la expresión de los genes de taquicininas *TAC3* y *TAC4*, e igualmente puede inducir la expresión de *TAC1*.
4. El estudio de asociación de variantes comunes de los genes de taquicininas *TAC1*, *TAC3* y *TAC4* con el asma, permitió la detección de dos polimorfismos asociados con la patología: rs2291855 en el gen *TAC3* confirmando protección frente al asma, y rs4794068 en *TAC4*, asociado a un mayor riesgo de asma.
5. Hemos descrito por primera vez que durante el proceso de diferenciación celular *in vitro* tanto en células de estirpe linfoide, como los linfocitos T, como en células de origen mieloide, representadas por la línea celular eosinófila EoL-1, se observan cambios en la expresión génica de *TAC3*, *TAC4 δ* y *NK2R*. En ambos casos, se observa un incremento en la expresión de *TAC3*, mientras que la expresión génica de *TAC4 δ* y de *NK2R* fue disminuyendo a lo largo de los procesos de maduración y diferenciación de linfocitos T y eosinófilos, respectivamente. Estos resultados sugieren un papel funcional de las taquicininas codificadas por estos genes en los procesos de diferenciación y proliferación de las células inmunes.

6. SP muestra un importante efecto inmunomodulador sobre las células EoL-1 diferenciadas y primadas con FN, incrementando la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en las rutas de síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Esta modulación por parte de SP refuerza la importancia de la interacción neuroinmune que implica a los eosinófilos, y que puede contribuir a la propagación de la respuesta inflamatoria en patologías como el asma.

7. SP actúa sobre las células EoL-1 diferenciadas y primadas con FN provocando un efecto novedoso no descrito previamente en ningún tipo celular, consistente en inhibir la ruta de síntesis de lipoxinas mediante una regulación a la baja de la expresión de *ALOX-15*. Dada la importancia de la 15-LO y las lipoxinas en la terminación de los procesos inflamatorios, el modelo de regulación propuesto sugiere un papel de SP no sólo en la propagación y amplificación de la respuesta inflamatoria, sino también en su prolongación en el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA



A

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: W.B. Saunders. 2000, 4th ed.
- Adcock IM, Lane SJ, Brown CR, Peters MJ, Lee TH, Barnes PJ. Differences binding of glucocorticoid receptor to DNA in steroid-resistant asthma. *J. Immunol.* 1995, 154:3500-3505.
- Advenier C, Joos G, Molimard, M, Lagente V, Pauwels R. Role of tachykinins as contractile agonists of human airways in asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 1999, 29:579-584.
- Aliakbari J, Sreedharan SP, Turck CW, Goetzl EJ. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 148:1440-1445.
- Almeida TA, Pérez JA, Pinto FM. Size-fractionation of RNA by hot agarose electrophoresis. *Biotechniques.* 2000, 28(3):414-416.
- Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, et al. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 2004, 11(15):2045-2081.
- Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance-P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J. Immunol.* 1993, 150:4478-4485.
- Anwar AR, Moqbel R, Walsh GM, Kay AB, Wardlaw AJ. Adhesion to fibronectin prolongs eosinophil survival. *J. Exp. Med.* 1993, 177(3):839-843.
- Anwar AR, Walsh GM, Cromwell O, Kay AB, Wardlaw AJ. Adhesion to fibronectin primes eosinophils via alpha 4 beta 1 (VLA-4). *Immunology.* 1994, 82(2):222-228.
- Arnold R, Mäueler W, Bassili G, Lutz M, Burke L, Epplen TJ, Renkawitz R. The insulator protein CTCF represses transcription on binding to the (gt)(22)(ga)(15) microsatellite in intron 2 of the HLA-DRB1(*)0401 gene. *Gene.* 2000, 253:209-214.

B

- Bacci E, Bertrand C, Geppetti P, Baker J, Nadel JA, Laitinen LA, Petersson G. Budesonide inhibits plasma extravasation induced by capsaicin and by substance P in the rat nasal mucosa. *Regul. Pept.* 1993, 49(2):159-166.

- Bae SJ, Lee JB, Takenaka M, Tanaka Y, Shimizu K, Katayama I. Topical glucocorticoid augments scratching behaviour in dinitrofluorobenzene-sensitized mice by the induction of substance P. *Exp. Dermatol.* 2004, 13(12):780-785.
- Baldwin JM. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 1993, 4:1693-1703.
- Bandari PS, Qian J, Oh HS, et al. Crosstalk between neurokinin receptors is relevant to hematopoietic regulation: cloning and characterization of neurokinin-2 promoter. *J. Neuroimmunol.* 2003, 138(1-2):65-75.
- Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010, 1801(12):1260-1273.
- Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* 1998, 50(4):515-96.
- Barnes PJ. Neural control of human airways in health and disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1986, 134(6):1289-314.
- Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1996, 42(1):3-10.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005, 21(2):263-265.
- Bar-Shavit Z, Goldman R, Stabinsky Y, Gottlieb P, Fridkin M, Teichberg VI, Blumberg S. Enhancement of phagocytosis—a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 94(4):1445-1451.
- Beasley CR, Robinson C, Featherstone RL, Varley JG, Hardy CC, Church MK, Holgate ST. 9 alpha,11 beta-prostaglandin F2, a novel metabolite of prostaglandin D2 is a potent contractile agonist of human and guinea pig airways. *J. Clin. Invest.* 1987, 79(3):978-983.
- Beaudry F, Girard C, Vachon P. Early dexamethasone treatment after implantation of a sciatic-nerve cuff decreases the concentration of substance P in the lumbar spinal cord of rats with neuropathic pain. *Can. J. Vet. Res.* 2007, 71(2):90-97.
- Belvisi MG. Sensory nerves and airway inflammation: role of A delta and C-fibres. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2003, 16(1):1-7.
- Berends C, Dijkhuizen B, de Monchy JG, Gerritsen J, Kauffman HF. Induction of low density and up-regulation of CD11b expression of neutrophils and eosinophils by dextran sedimentation and centrifugation. *J. Immunol. Methods.* 1994, 167(1-2):183-193.

- Berger A, Tran AH, Paige CJ. Co-regulated decrease of neurokinin-1 receptor and hemokinin-1 gene expression in monocytes and macrophages after activation with pro-inflammatory cytokines. *J. Neuroimmunol.* 2007, 187:83–93.
- Bergren DR. Prostaglandin involvement in lung C-fiber activation by substance P in guinea pigs. *J. Appl. Physiol.* 2006, 100(6):1918-1927.
- Bisgaard H, Bønnelykke K, Sleiman PM, Brasholt M, Chawes B, Kreiner-Møller E, Stage M, Kim C, Tavendale R, Baty F, Phipper CB, Palmer CN, Hakonarsson H. Chromosome 17q21 gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009, 179:179-185.
- Bonnans C, Vachier I, Chavis C, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Lipoxins are potential endogenous antiinflammatory mediators in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002, 165(11):1531-1535.
- Bost KL, Pascual DW. Substance P: A late-acting B lymphocyte differentiation cofactor. *Am. J. Physiol.* 1992, 262(3 Pt 1):C537-C545.
- Bouzigon E, Corda E, Aschard H, Dizier MH, Boland A, Bousquet J, Chateigner N, Gormand F, Just J, Le Moual N, Scheinmann P, Siroux V, Vervloet D, Zelenika D, Pin I, Kauffmann F, Lathrop M, Demenais F. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359:1985-1994.
- Braun A, Wiebe P, Pfeufer A, Gessner R, Renz H. Differential modulation of human immunoglobulin isotype production by the neuropeptides substance P, NKA and NKB. *J. Neuroimmunol.* 1999, 97:43-50.
- Brogden KA, Guthmiller JM, Salzet M, Zasloff M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat. Immunol.* 2005, 6(6):558-564.
- Brunelleschi S, Bordin G, Colangelo D, Viano I. Tachykinin receptors on human monocytes: their involvement in rheumatoid arthritis. *Neuropeptides* 1998, 32:215-223.

C

- Calvo CF, Chavanel G, Senik A. Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. *J. Immunol.* 1992, 148(11):3498-3504.

- Candenas ML, Cintado CG, Pennefather JN, Pereda MT, Loizaga JM, Maggi CA, Pinto FM. Identification of a tachykinin NK(2) receptor splice variant and its expression in human and rat tissues. *Life Sci.* 2002, 72(3):269-77.
- Candenas L, Lecci A, Pinto FM, Patak E, Maggi CA, Pennefather JN. Tachykinins and tachykinin receptors: effects in the genitourinary tract. *Life Sci.* 2005, 76(8):835-62.
- Canning BJ, Reynolds SM, Anukwu LU, Kajekar R, Myers AC. Endogenous neurokinins facilitate synaptic transmission in guinea pig airway parasympathetic ganglia. *Am. J. Physiol. Regul Integr. Comp. Physiol.* 2002, 283(2):320-330.
- Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, Basbaum AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 1998, 392(6674):390-394.
- Cardell LO, Uddman R, Edvinsson L. Low plasma concentrations of VIP and elevated levels of other neuropeptides during exacerbations of asthma. *Eur. Respir. J.* 1994, 7(12):2169-2173.
- Cascieri MA, Huang RR, Fong TM, Cheung AH, Sadowski S, Ber E, y cols. Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol. Pharmacol.* 1992, 41:1096-1099.
- Castellani ML, Ciampoli C, Felaco M, Tetè S, Conti CM, Salini V, De Amicis D, Orso C, Antinolfi PL, Caraffa A, Cerulli G, Boscolo P, Theoharides TC, Conti P, Kepuraj D. Neuropeptide substance P induces mRNA expression and secretion of CXCL8 chemokine, and HDC in human umbilical cord blood mast cells. *Clin. Invest. Med.* 2008, 31(6):362-372.
- Castellani ML, Conti P, Felaco M, Vecchiet J, Ciampoli C, Cerulli G, Boscolo P, Theoharides TC. Substance P upregulates LTB4 in rat adherent macrophages from granuloma induced by KMnO4. *Neurotox. Res.* 2009, 15(1):49-56.
- Chanez P, Springall D, Vignola AM, Moradoghi-Hattvani A, Polak JM, Godard P, Bousquet J. Bronchial mucosal immunoreactivity of sensory neuropeptides in severe airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998, 158:985-990.
- Chang MM, Leeman SE. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J. Biol. Chem.* 1970, 245(18):4784-4790.
- Chavolla-Calderón M, Bayer MK, Fontán JJ. Bone marrow transplantation reveals an essential synergy between neuronal and hemopoietic cell neurokinin production in pulmonary inflammation. *J. Clin. Invest.* 2003, 111:973-980.
- Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000, 106:713-722.

- Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999, 54(9):825-57.
- Clayton MH, Leung DYM, Surs W, Szefer SJ. Altered glucocorticoid receptor binding in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995, 96:421-423.
- Clutterbuck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ. Human interleukin- 5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: Comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood*. 1989, 73:1504-1509.
- Cocchiara R, Bongiovanni A, Albegiani G, Azzolina A, Lampiasi N, Di Blasi F, Geraci D. Inhibitory effect of neuraminidase on SP-induced histamine release and TNF-alpha mRNA in rat mast cells: evidence of a receptor-independent mechanism. *J Neuroimmunol.* 1997, 75(1-2):9-18.
- Coleridge JC, Coleridge HM. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1984, 99:1-110.
- Columbo M, Horowitz EM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Substance P activates the release of histamine from human skin mast cells through a pertussis toxin-sensitive and protein kinase C-dependent mechanism. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1996, 81(1):68-73.
- Comings DE, MacMurray JP. Molecular heterosis: a review. *Mol. Genet. Metab.* 2000, 71:19-31.
- Coppi LC, Thomazzi SM, de Ayrizono ML, Coy CS, Fagundes WJ, Goes JR, Franchi GC Jr, Nowill AE, Montes CG, Antunes E, Ferraz JG. Comparative study of eosinophil chemotaxis, adhesion, and degranulation in vitro in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007, 13(2):211-218.
- Corcoran KE, Rameshwar P. Nuclear factor-kappaB accounts for the repressor effects of high stromal cell-derived factor-1alpha levels on Tac1 expression in nontumorigenic breast cells. *Mol. Cancer Res.* 2007, 5(4):373-381.
- Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD. Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. *Am. J. Physiol.* 1997, 273(1):93-103.
- Covas MJ, Pinto LA, Victorino RMM. Disturbed immunoregulatory properties of the neuropeptide substance P on lymphocyte proliferation in HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* 1994, 96:384-388.
- Croitoru K, Ernst PB, Bienenstock J, Padol I, Stanis AM. Selective modulation of the natural killer activity of murine intestinal intraepithelial leucocytes by the neuropeptide substance P. *Immunology.* 1990, 71(2):196-201.

- Cuesta MC, Quintero L, Pons H, Suarez-Roca H. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem Int.* 2002, 40(4):301-306.

D

- Dallman MJ, Lamb JR. Haematopoietic and lymphoid cell culture. Cambridge University Press, 2000, pp. 71–89.
- Daoui S, Cui YY, Lagente V, Emonds-Alt X, Advenier C. A tachykinin NK3 receptor antagonist, SR 142801 (osanetant), prevents substance P-induced bronchial hyperreactivity in guinea-pigs. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 1997, 10(5-6):261-270.
- Daoui S, Cognon C, Naline E, Edmonds-Alt X. Involvement of tachykinin NK3 receptors in citric acid-induced cough and bronchial responses in guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998, 158:42-48.
- Daoui S, Naline E, Lagente V, Emonds-Alt X, Advenier C. Neurokinin B- and specific tachykinin NK(3) receptor agonists-induced airway hyperresponsiveness in the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 2000, 130(1):49-56.
- Daoui S, Ahnaou A, Naline E, Emonds-Alt X, Lagente V, Advenier C. Tachykinin NK(3) receptor agonists induced microvascular leakage hypersensitivity in the guinea-pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 2001, 433(2-3):199-207.
- De Almeida MC, Silva AC, Barral A, Barral Netto M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000, 95(2):221-223.
- De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, Laird JM, Belmonte C, Cervero F, Hunt SP. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature.* 1998, 392(6674):394-397.
- De Giorgio R, Tazzari PL, Barbara G, et al. Detection of substance P immunoreactivity in human peripheral leukocytes. *J. Neuroimmunol.* 1998, 82:175-181.
- De Swert KO, Joos GF. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur. J. Pharmacol.* 2006, 533(1-3):171-181.
- Debeljuk L, Lasaga M. Modulation of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and the pineal gland by neurokinin A, neuropeptide K and neuropeptide gamma. *Peptides.* 1999, 20(2):285-299.

- Dianza C, Lombardi G, Collino M, Ferrara C, Cassone MC, Fantozzi R. Priming effects of substance P on calcium changes evoked by interleukin-8 in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2001, 69(6):1013-1018.
- Duarte RF, Chen FE, Lowdell MW, Potter MN, Lamana ML, Prentice HG, Madrigal JA. Functional impairment of human T-lymphocytes following PHA-induced expansion and retroviral transduction: implications for gene therapy. *Gene Ther.* 2002, 9:1359-1368.

E

- Eipper BA, Stoffers DA, Mains RE. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu. Rev. Neurosci.* 1992, 15:57-85.
- El-Shazly AE, Masuyama K, Eura M, Ishikawa T. Immunoregulatory effect of substance P in human eosinophil migratory function. *Immunol. Invest.* 1996, 25:191-201.
- El-Shazly A, Ishikawa T. Novel co-operation between eotaxin and substance-P in inducing eosinophil-derived neurotoxin release. *Mediators. Inflamm.* 1999, 8(3):177-179.

F

- Fewtrell CMS, Foreman JC, Jordan CC, Oehme P, Renner H, Stewart JM. The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat. *J. Physiol.* 1982, 330:393-411.
- Finney MJB, Karlsson JA, Persson CGA. Effects of bronchoconstrictors and bronchodilators on a novel human small airway preparation. *Br. J. Pharmacol.* 1985, 85:29-36.
- Fong TM, Anderson SA, Yu H, Huang RR, Strader CD. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Mol. Pharmacol.* 1992, Jan, 41(1):24-30.
- Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclearleukocytes. *Nature.* 1980, 286:264-265.
- Frank B, Meyer P, Boettger MB, Hemminki K, Stapelmann H, Gast A, Schmitt C, Kumar R, Sergi C, Burwinkel B. ARLTS1 variants and melanoma risk. *Int. J. Cancer.* 2006, 119:1736-1737.

- Freitas M, Porto G, Lima JL, Fernandes E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin. Biochem.* 2008, 41(7-8):570-575.

G

- Gallicchio M, Rosa AC, Benetti E, Collino M, Dianzani C, Fantozzi R. Substance P-induced cyclooxygenase-2 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 2006, 147(6):681-689.
- Gallicchio M, Benetti E, Rosa AC, Fantozzi R. Tachykinin receptor modulation of cyclooxygenase-2 expression in human polymorphonuclear leucocytes. *Br. J. Pharmacol.* 2009, 156(3):486-496.
- Gerard NP, Eddy RL Jr, Shows TB, Gerard C. The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. *J. Biol. Chem.* 1990, 265:20455-20462.
- Gerard NP, Garraway LA, Eddy RL Jr, Shows TB, Iijima H, Paquet JL, Gerard C. Human substance P receptor (NK-1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry.* 1991, 30(44):10640-10646.
- Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the eosinophil. *Pharmacol. Rev.* 1999, 51(2):213-340.
- Gillies S, Haddley K, Vasiliou S, Bubb VJ, Quinn JP. The human neurokinin B gene, TAC3, and its promoter are regulated by Neuron Restrictive Silencing Factor (NRSF) transcription factor family. *Neuropeptides.* 2009, 43:333-340.
- Goto T, Nakao K, Gunjigake KK, Kido MA, Kobayashi S, Tanaka T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides.* 2007, 41(1):25-31.
- Grant AD, Akhtar R, Gerard NP, Brain SD. Neurokinin B induces oedema formation in mouse lung via tachykinin receptor-independent mechanisms. *J. Physiol.* 2002, 543:1007-1014.
- Greco SJ, Corcoran KE, Cho CJ, Rameshwar P. Tachykinins in the emerging immune system: relevance to bone marrow homeostasis and maintenance of hematopoietic stem cells. *Front Biosci.* 2004, 9:1782-1793.
- Griebel G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders? *Pharmacol Ther.* 1999, 82(1):1-61.

- Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy*. 2004, 59(11):1139-1152.
- Gruart V, Truong MJ, Lumas J, Zandecki M, Kusnierz JP, Prin L, Vinatier D, Capron A, Capron M. Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. *Blood*. 1992, 79:2592-2597.
- Guo CJ, Lai JP, Luo HM, Douglas SD, Ho WZ. Substance P upregulates macrophage inflammatory protein-1beta expression in human T lymphocytes. *J. Neuroimmunol*. 2002, 131(1-2):160-167.

H

- Hall AK, Barnes PJ, Meldrum LA, MacLagan J. Facilitation by tachykinins of neurotransmission in guinea-pig pulmonary parasympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol*. 1989, 97:274-280.
- Harrison NK, Dawes KE, Kwon OJ, Barnes PJ, Laurent GJ, Chung KF. Effects of neuropeptides on human lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *Am. J. Physiol*. 1995, 12:L278-L283.
- Hartung HP, Heininger K, Schäfer B, Toyka KV. Substance P and astrocytes: stimulation of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *FASEB J*. 1988, 2(1):48-51.
- Hay DW, Giardina GA, Griswold DE, Underwood DC, Kotzer CJ, Bush B, Potts W, Sandhu P, Lundberg D, Foley JJ, Schmidt DB, Martin LD, Kilian D, Legos JJ, Barone FC, Luttmann MA, Grugni M, Raveglia LF, Sarau HM. Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. III. SB 235375, a low central nervous system-penetrant, potent and selective neurokinin-3 receptor antagonist, inhibits citric acid-induced cough and airways hyper-reactivity in guinea pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2002, 300(1):314-323.
- Heaney LG, Cross LJM, Stanford CF, Ennis M. Substance-P induces histamine-release from human pulmonary mast-cells. *Clin. Exp. Allergy*. 1995, 25:179-186.
- Heaney LG, Cross LJ, McGarvey LP, Buchanan KD, Ennis M, Shaw C. Neurokinin A is the predominant tachykinin in human bronchoalveolar lavage fluid in normal and asthmatic subjects. *Thorax*. 1998, May, 53(5):357-62.
- Heath H, Qin SX, Rao P, Wu LJ, Larosa G, Kassam N, Ponath PD and Mackay CR. Chemokine receptor usage by human eosinophils—The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. *J. Clin. Invest*. 1997, 99:178-184.

- Higashimoto I, Chihara J, Kawabata M, Nakajima S, Osame M. Adhesion to fibronectin regulates expression of intercellular adhesion molecule-1 on eosinophilic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999, 120(Sup1):34-37.
- Hilkens CM, Vermeulen H, van Neerven RJ, Snijdwint FG, Wierenga EA and Kapsenberg ML. Differential modulation of T helper type 1 (Th1) and T helper type 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. *Eur. J. Immunol.* 1995, 25:59-63.
- Hirasawa R, Shimizu R, Takahashi S, Osawa M, Takayanagi S, Kato Y, Onodera M, Minegishi N, Yamamoto M, Fukao K, Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J. Exp. Med.* 2002, 195(11):1379-1386.
- Ho WZ, Kaufman D, Uvaydova M, Douglas SD. Substance P augments interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha release by human cord blood monocytes and macrophages. *J. Neuroimmunol.* 1996, 71(1-2):73-80.
- Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J. Immunol.* 1997, 159:5654-5660.
- Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience.* 1988, 24:739-768.
- Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 2000, 26:163-175.
- Howarth PH, Springall DR, Redington AE, Djukanovic R, Holgate ST, Polak JM. Neuropeptide-containing nerves in endobronchial biopsies from asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995, 13:288-296.

I

- Ihara H, Nakanishi S. Selective inhibition of expression of the substance P receptor mRNA in pancreatic acinar AR42J cells by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 1990, 265(36):22441-22445.
- Ingi T, Kitajima Y, Minamitake Y, Nakanishi S. Characterization of ligand-binding properties and selectivities of three rat tachykinin receptors by transfection and functional expression of their cloned cDNAs in mammalian cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991, 259:968-975.

- Iwamoto I, Nagawa N, Yamazaki H, Kimura A, Tomioka H, Yoshida S. Mechanism for substance-P-induced activation of human neutrophils and eosinophils. *Regul. Pept.* 1993, 46:228-330.

J

- Jacobsen E A, Taranova A G, Lee N A, Lee J J. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1313–1320.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1967, 31(1):138-151.
- Janelsins BM, Mathers AR, Tkacheva OA, Erdos G, Shufesky WJ, Morelli AE, Larregina AT. Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood.* 2009, 113(13):3017-3026.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. *New York: Garland Publishing.* 2001, 5th ed.
- Jeurissen F, Kavelaars A, Korstjens M, Broeke D, Franklin RA, Gelfand EW, Heijnen CJ. Monocytes express a non-neurokinin substance P receptor that is functionally coupled to MAP kinase. *J. Immunol.* 1994, Mar 15, 152(6):2987-2994.
- Jones S, Tucker KL, Sage T, Kaiser WJ, Barrett NE, Lowry PJ, Zimmer A, Hunt SP, Emerson M, Gibbins JM. Peripheral tachykinins and the neurokinin receptor NK1 are required for platelet thrombus formation. *Blood.* 2008, 111:605-612.
- Joos GF, Lefebvre RA, Bullock G, Pauwels RA. Role of 5-hydroxytryptamine and mast cells in the tachykinin-induced contraction of rat trachea in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 1997, 338:259-268.
- Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Role of tachykinins in asthma. *Allergy.* 2000, 55:321-337.
- Julia V, Morteau O, Buéno L. Involvement of neurokinin 1 and 2 receptors in viscerosensitive response to rectal distension in rats. *Gastroenterology.* 1994, 107(1):94-102.

K

- Kamp EH, Beck DR, Gebhart GF. Combinations of neurokinin receptor antagonists reduce visceral hyperalgesia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 299(1):105-113.

- Kang, HS, Trzaska KA, Corcoran K, Chang VT, Rameshwar P. Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2004, 52:338-347.
- Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1983, 114(2):533-540.
- Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog. Lipid Res.* 2003, 42(2):93-114.
- Kavelaars A, Broeke D, Jeurissen F, Kardux J, Meijer A, Franklin R, Gelfand EW, Heijnen CJ. Activation of human monocytes via a non-neurokinin substance P receptor that is coupled to Gi protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *J. Immunol.* 1994, Oct 15, 153(8):3691-3699.
- Khan S, Liu Y-C, Khawaja AM, Manzini S, Rogers DF. Effect of the long-acting tachykinin NK1 receptor antagonist MEN 11467 on tracheal mucus secretion in allergic ferrets. *Br. J. Pharmacol.* 2001, 132:189-196.
- Kim JS, Rabe KF, Magnussen H, Green JM, White SR. Migration and proliferation of guinea pig and human airway epithelial cells in response to tachykinins. *Am. J. Physiol.* 1995, 269(1 Pt 1):L119-L126.
- Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata E. Novel Neuropeptides, Neurokinin α and β , Isolated from Porcine Spinal Cord. *Proc. Jpn. Acad.* 1983, 59:101-104.
- Klassert TE, Patel SA, Rameshwar P. Tachykinins and Neurokinin Receptors in Bone Marrow Functions: Neural-Hematopoietic Link. *J. Receptor Ligand Channel Res.* 2010, Apr 1, 3:51-61.
- Koeffler HP, Ranyard J, Pertcheck M. Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood.* 1985, 65:484-491.
- Kong ZQ, Han M, Yang WL, Zhao YL, Fu CY, Tao Y, Chen Q, Wang R. In vitro characterization of the effects of rat/mouse hemokinin-1 on mouse colonic contractile activity: a comparison with substance P. *Neuropeptides.* 2009, 43(3):213-220.
- Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Rhee SH, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P stimulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 expression through JAK-STAT activation in human colonic epithelial cells. *J. Immunol.* 2006, 176(8):5050-5059.
- Kotani H, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 1986, (18):7074-7078.
- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snavely D, Wyatt-Knowles E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swain CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti F,

- Scolnick EM, Cascieri MA, Chicchi GG, Sadowski S, Williams AR, Hewson L, Smith D, Carlson EJ, Hargreaves RJ, Rupniak NM. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*. 1998, 281(5383):1640-1645.
- Kraneveld AD, Nijkamp FP. Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma. *Int Immunopharmacol*. 2001, 1(9-10):1629-1650.
 - Krause JE, Blount P, Sachais BS. The tachykinin receptors. *Buck, S.H. Ed, Humana Press: Totowa*. 1994, pp: 165-218.
 - Krause JE, Bu JY, Takeda Y, et al. Structure, expression and second messenger-mediated regulation of the human and rat substance P receptors and their genes. *Regul Pept*. 1993, 46(1-2):59-66.
 - Kroegel C, Giembycz MA, Barnes PJ. Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Differential effects of substance P, melittin, and FMET-Leu-Phe. *J. Immunol*. 1990, 145(8):2581-2587.
 - Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004, 5(2):150-163.
 - Kuo HP, Lin HC, Hwang KH, Wang CH, Lu LC. Lipopolysaccharide enhances substance P-mediated neutrophil adherence to epithelial cells and cytokine release. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000, 162(5):1891-1897.
 - Kurtz MM, Wang R, Clements M, Cascieri M, Austin C, Cunningham B, Chicchi G, Liu Q. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene*. 2002, 296:205-212.

L

- Lai JP, Douglas SD, Rappaport E, Wu JM, Ho WZ. Identification of a delta isoform of preprotachykinin mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes. *J. Neuroimmunol*. 1998, 91:121-128.
- Lambrecht BN, Germonpré PR, Everaert EG, Carro-Muino I, De Veerman M, de Felipe C, Hunt SP, Thielemans K, Joos GF, Pauwels RA. Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. *Eur. J. Immunol*. 1999, 29(12):3815-3825.

- Le Filliatre G, Sayah S, Latournerie V, Renaud JF, Finet M, Hanf R. Cyclo-oxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. *Br. J. Pharmacol.* 2001, Apr, 132(7):1581-1589.
- Lecci A, Altamura M, Capriati A, Maggi CA. Tachykinin receptors and gastrointestinal motility: focus on humans. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2008 Aug;12 Suppl 1:69-80
- Lee JJ, Dimina D, Macias MP, et al. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science.* 2004, 305:1773-1776.
- Lee SW, Tsou AP, Chan H, Thomas J, Petrie K, Eugui EM, Allison AC. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988, 85(4):1204-1208.
- Lembeck F, Holzer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1979, Dec, 310(2):175-83.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* 2001, 2(7):612-619.
- Linnik MD, Moskowitz MA. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides.* 1989, 10: 957-962.
- Lintomen L, Franchi G, Nowill A, Condino-Neto A, de Nucci G, Zanesco A, Antunes E. Human eosinophil adhesion and degranulation stimulated with eotaxin and RANTES in vitro: lack of interaction with nitric oxide. *BMC Pulm. Med.* 2008, 12;8:13.
- Liu H, Sankar R, Shin DH, Mazarati AM, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced substance P expression during development. *Neuroscience.* 2000, 101(2):297-304.
- Liu K, Castillo MD, Murthy RG, Patel N, Rameshwar P. Tachykinins and hematopoiesis. *Clin. Chim. Acta.* 2007, 385(1-2):28-34.
- Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science.* 1988, 241(4870):1218-1221.
- Lundberg JM, Saria A. Capsaicin-induced desensitization of airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. *Nature.* 1983, 302(5905):251-253.
- Lundberg JM, Saria A. Capsaicin-sensitive vagal neurons involved in control of vascular permeability in rat trachea. *Acta. Physiol. Scand.* 1982, 115(4):521-523.

M

- MacDonald MR, Takeda J, Rice CM, Krause JE. Multiple tachykinins are produced and secreted upon post-translational processing of the three substance P precursor proteins, alpha-, beta-, and gamma-preprotachykinin. Expression of the preprotachykinins in AtT-20 cells infected with vaccinia virus recombinants. *J Biol Chem.* 1989, 264(26):15578-15592.
- Maggi CA, Meli A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 1988, 19:1-43.
- Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmacol.* 1995, 26:911-944.
- Maghni K, Michoud MC, Alles M, Rubin A, Govindaraju V, Meloche C, Martin JG. Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003, 28:103-110.
- Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science.* 1997, 278(5336):275-279.
- Mantyh PW. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J. Clin. Psychiatry.* 2002, 63(Sup11):6-10.
- Mapp CE, Miotto D, Braccioni F, Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Krause JE, Karpitskiy V, Boyd N, Geppetti P, Fabbri LM. The distribution of neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors in human central airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, 161:207-215.
- Margolis KG, Gershon MD. Neuropeptides and inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2009, 25(6):503-11.
- Martling CR, Theodorsson-Norheim E, Lundberg JM. Occurrence and effects of multiple tachykinins; substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Life Sci.* 1987, 40:1633-1643.
- Marvizon JC, Wang X, Lao LJ, Song B. Effect of peptidases on the ability of exogenous and endogenous neurokinins to produce neurokinin 1 receptor internalization in the rat spinal cord. *Br. J. Pharmacol.* 2003, 140(8):1389-1398.
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. Global Initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: executive summary of the *GINA Dissemination Committee report.* *Allergy.* 2004, 59(5):469-478.

- Massi M, Panocka I, De Caro G. The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals. *Peptides*. 2000, 21(11):1597-1609.
- Mayumi M. EoL-1, a human eosinophilic cell line. *Leuk. Lymphoma*. 1992, 7(3):243-250.
- Mazzone SB. Sensory regulation of the cough reflex. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2004, 17:361-368.
- Memon RA, Fuller J, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. In vivo regulation of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase during the acute phase response. *Am. J. Physiol.* 1999, 277(1):94-103.
- Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008, 111(2):485-491.
- Metwali A, Blum AM, Elliott DE, Setiawan T, Weinstock JV. Cutting edge: hemokinin has substance P-like function and expression in inflammation. *J. Immunol.* 2004, 172:6528-6532.
- Minneman KP. Splice variants of G protein-coupled receptors. *Mol. Interv.* 2001, 1(2):108-116.
- Miura T, Nishinaka T, Terada T. Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Mol. Cell. Biochem.* 2008, 315(1-2):113-121.
- Miyahara N, Miyahara S, Takeda K, Gelfand EW. Role of the LTB₄/BLT1 pathway in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Allergol. Int.* 2006, 55(2):91-97.
- Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SA, Wong KC, Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, von Mutius E, Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WO. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*. 2007, 448:470-473.
- Morgan RK, Costello RW, Durcan N, Kingham PJ, Gleich GJ, McLean WG, Walsh MT. Diverse effects of eosinophil cationic granule proteins on IMR-32 nerve cell signaling and survival. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005, 33(2):169-177.
- Mousli M, Bueb JL, Bronner C, Rouot B, Landry Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990, 11(9):358-362.
- Mukaiyama O, Morimoto K, Nosaka E, Takahashi S, Yamashita M. Involvement of enhanced neurokinin NK3 receptor expression in the severe asthma guinea pig model. *Eur. J. Pharmacol.* 2004, 498(1-3):287-294.

- Murris-Espin M, Pinelli E, Pipy B, Leophonte P, Didier A. Substance P and alveolar macrophages: Effects on oxidative metabolism and eicosanoid production. *Allergy*. 1995, 50(4):334-339.
- Murthy RG, Greco SJ, Taborga M, Patel N, Rameshwar P. Tac1 regulation by RNA-binding protein and miRNA in bone marrow stroma: Implication for hematopoietic activity. *Brain Behav. Immun*. 2008, 22(4):442-450.

N

- Nakanishi S. Mammalian Tachykinin Receptors. *Annu.. Rev. Neurosci*. 1991, 14:123-136.
- Nawa H, Doteuchi M, Igano K, Inouye K, Nakanishi S. Substance K. A novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci*. 1984, 34(12):1153-1160.
- Neeley SP, Hamann KJ, Dowling TL, McAllister KT, White SR, Leff AR. Augmentation of stimulated eosinophil degranulation by VLA-4 (CD49d)-mediated adhesion to fibronectin. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 1994, 11(2):206-213.
- Nelson DA, Bost KL. Quantification of hemokinin-1 peptide production and secretion from mouse B cells. *Cell. Immunol*. 2005, 237:115-122.
- Nelson DA, Marriott I, Bost KL. Expression of hemokinin 1 mRNA by murine dendritic cells. *J. Neuroimmunol*. 2004, 155:94-102.
- Nénan S, Germain N, Lagente V, Emonds-Alt X, Advenier C, Boichot E. Inhibition of inflammatory cell recruitment by the tachykinin NK(3)-receptor antagonist, SR 142801, in a murine model of asthma. *Eur. J. Pharmacol*. 2001, 421:201-205.
- Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature*. 1996, 384:360-364.
- Nieber K, Baumgarten CR, Rathsack R, Furkert J, Oehme P, Kunkel G. Substance P and beta-endorphin-like immunoreactivity in lavage fluids of subjects with and without allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 1992, 90(4 Pt 1):646-52.
- Nockher W A, Renz H. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J Allergy Clin Immunol* 2006: 117:583–589.
- Nowicki M, Miskowiak B. Substance P—a potent risk factor in childhood lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2003, 6:1096–1099.

- Numao T, Agrawal DK. Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. *J. Immunol.* 1992, 149:3309-3315.

O

- O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cell Physiol.* 2004, 201(2):167-180.
- Okabe T, Hide M, Hiragun T, Morita E, Koro O, Yamamoto S. Bone marrow derived mast cell acquire responsiveness to substance P with Ca(2+) signals and release of leukotriene B(4) via mitogen-activated protein kinase. *J. Neuroimmunol.* 2006, 181(1-2):1-12.

P

- Pachot A, Blond JL, Mouglin B, Miossec P. Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. *J. Biotechnol.* 2004, 114(1-2):121-124.
- Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Manyonda IT, Lowry PJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature.* 2000, 405:797-800.
- Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, et al. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100:6245-6250.
- Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol. Life Sci.* 2004, 61(13):1652-1663.
- Page NM, Morrish DW, Weston-Bell NJ. Differential mRNA splicing and precursor processing of neurokinin B in neuroendocrine tissues. *Peptides.* 2009, 30(8):1508-1513.
- Page NM. New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides.* 2005, 26(8):1356-1368.
- Pal S, Nemeth MJ, Bodine D, Miller JL, Svaren J, Thein SL, Lowry PJ, Bresnick EH. Neurokinin-B transcription in erythroid cells: direct activation by the hematopoietic transcription factor GATA-1. *J. Biol. Chem.* 2004, 279:31348-31356.

- Palanche T, Ilien B, Zoffmann S, et al. The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J. Biol. Chem.* 2001, 276(37):34853-34861.
- Parenti A, Amerini S, Ledda F, Maggi CA, Ziche M. The tachykinin NK1 receptor mediates the migration promoting effect of substance P on human skin fibroblasts in culture. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1996, 353:475-481.
- Parsons WG, Roberts LJ. Transformation of prostaglandin D2 to isomeric prostaglandin F2 compounds by human eosinophils. A potential mast cell-eosinophil interaction. *J. Immunol.* 1988, 141(7):2413-2419.
- Patacchini R, Maggi CA. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 2001, 429(1-3):13-21.
- Patak E, Pennefather JN, Gozali M, Candenias L, Kerr K, Exintaris B, Ziccone S, Potteck H, Chetty N, Page NM, Pinto F. Functional characterisation of hemokinin-1 in mouse uterus. *Eur. J. Pharmacol.* 2008, 601(1-3):148-153.
- Patel HJ, Ramkissoon SH, Patel PS, Rameshwar P. Transformation of breast cells by truncated neurokinin-1 receptor is secondary to activation by preprotachykinin-A peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102(48):17436-17441.
- Pavord ID, Wong CS, Williams J and Tattersfield AE. Effect of inhaled prostaglandin E2 on allergen-induced asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993, 148:87-90.
- Payan DG, Goetzl EJ. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J. Immunol.* 1985, 135(2 Suppl):783-786.
- Pearse AGE, Polak JM, Bloom SR. The newer gut hormones. *Gastroenterology.* 1977, 72(4):746-761.
- Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31(14):e73.
- Pennefather JN, Lecci A, Candenias ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 2004, 74(12):1445-63.
- Pennefather JN, Patak E, Ziccone S, Lilley A, Pinto FM, Page NM, Story ME, Grover S, Candenias ML. Regulation of the stimulant actions of neurokinin a and human hemokinin-1 on the human uterus: a comparison with histamine. *Biol. Reprod.* 2006, 75(3):334-341.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30(9):e36.

- Phillips JE, Hey JA, Corboz, MR. Tachykinin NK(3) and NK(1) receptor activation elicits secretion from porcine airway submucosal glands. *Br. J. Pharmacol.* 2003, 138:254-260.
- Pinto FM, Almeida TA, Hernández M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinins receptors in different human tissues. *Europ. J. Pharmacol.* 2004, 494:233-239.

Q

- Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides.* 1997, 31(6):537-563.

R

- Raap U, Wardlaw AJ. A new paradigm of eosinophil granulocytes: neuroimmune interactions. *Exp. Dermatol.* 2008, 17(9):731-738.
- Rameshwar P, Ganea D, Gascón P. In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood.* 1993, 81(2):391-398.
- Rameshwar P, Gascon P. Induction of negative hematopoietic regulators by neurokinin-A in bone marrow stroma. *Blood.* 1996, 88(1):98-106.
- Ramkissoon SH, Patel HJ, Taborga M, Rameshwar P. G protein-coupled receptors in haematopoietic disruption. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2006, 6(2):109-120.
- Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol. Rev.* 1994, 46:551-599.
- Ricardo M, Trzaska KA, Rameshwar P. Neurokinin-A inhibits cell cycle activators in K562 cells and activates Smad 4 through a noncanonical pathway: a novel method in neural-hematopoietic axis. *J. Neuroimmunol.* 2008, 204(1-2):85-91.
- Rioux L, Joyce JN. Substance P receptors are differentially affected in Parkinson's and Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Park Dis. Dement Sect.* 1993, 6(3):199-210.

S

- Saito H, Bourinbaier A, Ginsburg M, Minato K, Ceresi E, Yamada K, Machover D, Bréard J, Mathé G. Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood*. 1985, 66(6):1233-1240.
- Sánchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*. 2006, 27(9):1713-1724.
- Schratzberger P, Reinisch N, Prodingner WM, Kahler CM, Sitte BA, Bellmann R, Fischer-Colbrrie R, Winkler H, Wiedermann CJ. Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol*. 1997, 158(8):3895-3901.
- Seidah NG, Prat A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem*. 2002, 38:79-94.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol*. 2005, 6(12):1191-1197.
- Serra MC, Calzetti F, Ceska M, Cassatella MA. Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology*. 1994, 82:63-69.
- Shao C, Suzuki Y, Kamada F, Kanno K, Tamari M, Hasegawa K, Aoki Y, Kure S, Yang X, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Karahashi M, Saito S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y. Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet*. 2004, 49:115-122.
- Sher ER, Leung DYM, Surs W, Kam JC, Zieg G, Kamada AK, Szeffler SJ. Steroid resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J. Clin. Invest*. 1994, 93:33-39.
- Shima Y, Teruya K, Ohta H. Association between intronic SNP in urate-anion exchanger gene, SLC22A12, and serum uric acid levels in Japanese. *Life Sci*. 2006, 79:2234-2237.
- Shimizu Y, Matsuyama H, Shiina T, Takewaki T, Furness JB. Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol. Life Sci*. 2008, 65(2):295-311.
- Skrabanek P, Cannon D, Legge D, Powell D. Circulating immunoreactive substance P in man. *Br. J. Med. Sci*. 1976, 145(12):399-408.

- Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006, 22(15):1928-1929.
- Springer J, Groneberg DA, Pregla R, Fischer A. Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. *Regul. Pept.* 2005, 124:195-201.
- Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat. Med.* 2000, 6(2):151-158.
- Stumm R, Culmsee C, Schafer MK, Kriegstein J, Weihe E. Adaptive plasticity in tachykinin and tachykinin receptor expression after focal cerebral ischemia is differentially linked to gabaergic and glutamatergic cerebrocortical circuits and cerebrovenular endothelium. *J. Neurosci.* 2001, 21(3):798-811.
- Sun J, Ramnath RD, Bhatia M. Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007, 293(2):696-704.

T

- Takahashi K, Tanaka A, Hara M, Nakanishi S. The primary structure and gene organization of human substance P and neuromedin K receptors. *Eur. J. Biochem.* 1992, Mar 15, 204(3):1025-1033.
- Takai D, Nagase T, Shimizu T. New therapeutic key for cystic fibrosis: a role for lipoxins. *Nat. Immunol.* 2004, 5(4):357-358.
- Takano T, Clish CB, Gronert K, Petasis N, Serhan CN. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *J. Clin. Invest.* 1998, 101(4):819-826.
- Tanabe T, Otani H, Bao L, et al. Intracellular signaling pathway of substance P-induced superoxide production in human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 1996, 299:187-195.
- Tanaka DT, Grunstein MM. Mechanisms of substance P-induced contraction of rabbit airway smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* 1984, 57:1551-1557.
- Thakkestian A, McEvoy M, Minelli C, Gibson P, Hancox B, Duffy D, Thompson J, Hall I, Kaufman J, Leung TF, Helms PJ, Hakonarson H, Halpi E, Navon R, Attia J. Systematic review and meta-

analysis of the association between β 2-adrenoceptor polymorphisms and asthma: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 2005, 162:201-211.

- Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, Tagen M, Vasiadi M, Angelidou A, Alysandratos KD, Kalogeromitros D, Asadi S, Stavrianeas N, Peterson E, Leeman S, Conti P. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(9):4448-4453.
- Tomaki M, Ichinose M, Miura M, Hirayama Y, Yamauchi H, Nakajima N, Shirato K. Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995, 151(3 Pt 1):613-617.
- Triggiani M, De Marino V, Sofia M, Faraone S, Ambrosio G, Carratu L, et al. Characterization of plateletactivating factor acetylhydrolase in human bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997, 156:84-100.
- Trivedi SG, Lloyd CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, 64(10):1269-1289.
- Tsukioka K, Matsuzaki M, Nakamura M, Kayahara H, Nakagawa T. Increased plasma level of platelet-activating factor (PAF) and decreased serum PAF acetylhydrolase (PAFAH) activity in adults with bronchial asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1996, 6:22-29.
- Tuluc F, Lai JP, Kilpatrick LE, Evans DL, Douglas SD. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. *Trends Immunol.* 2009, 30(6):271-276.

U

- Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan FE, Grant SF, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Ralston SH. Relation of alleles of the collagen type I alpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 1998, 338:1016-1021.

V

- Vachier I, Bonnans C, Chavis C, Farce M, Godard P, Bousquet J, Chanez P. Severe asthma is associated with a loss of LX4, an endogenous anti-inflammatory compound. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 115(1):55-60.

- Valant C, Maillet E, Bourguignon JJ, et al. Allosteric functional switch of neurokinin A-mediated signaling at the neurokinin NK2 receptor: structural exploration. *J. Med. Chem.* 2009, 52(19):5999-6011.
- van der Velden VH, Naber BA, van der Spoel P, Hoogsteden HC, Versnel MA. Cytokines and glucocorticoids modulate human bronchial epithelial cell peptidases. *Cytokine.* 1998, 10(1):55-65.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, 3(7): r1-r11.
- Vauquelin G, Van Liefde I. G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2005, 19(1):45-56.
- Venaille TJ, Misso NL, Phillips MJ, Robinson BW, Thompson PJ. Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1994, 54(5):385-391.
- Vercelli D. Genetic polymorphism in allergy and asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 2003, 15:609-613.
- Veronesi B, Carter JD, Devlin RB, Simon SA, Oortgiesen M. Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptides.* 1999, 33(6):447-456.
- Vink R, Nimmo AJ, Cernak I. An overview of new and novel pharmacotherapies for use in traumatic brain injury. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2001, 28(11):919-921.
- Von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol (Lond).* 1931, 72(1):74-87.

W

- Watanabe K, Iguchi Y, Iguchi S, Arai Y, Hayaishi O, Roberts LJ 2nd. Stereospecific conversion of prostaglandin D2 to 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F2 and prostaglandin H2 to prostaglandin F2 alpha by PGF synthetase. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 1987, 17A:44-66.
- Weinstock JV. The role of substance P, hemokinin and their receptor in governing mucosal inflammation and granulomatous responses. *Front. Biosci.* 2004, 9:1936-1943.

- Wiedermann FJ, Kahler CM, Reinisch N, Wiedermann CJ. Induction of normal human eosinophil migration in vitro by substance-P. *Acta Haematol.* 1993, 89:213-215.
- Williams R, Zou X, Hoyle GW. Tachykinin-1 receptor stimulates proinflammatory gene expression in lung epithelial cells through activation of NF-kappaB via a G(q)-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2007, 292(2):430-437.
- Woehler A, Ponimaskin EG. G protein--mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2009, 2(3):237-248.
- Wong CK, Ho CY, Lam CW, Zhang JP, Hjelm NM. Differentiation of a human eosinophilic leukemic cell line, EoL-1: characterization by the expression of cytokine receptors, adhesion molecules, CD95 and eosinophilic cationic protein (ECP). *Immunol. Lett.* 1999, 68(2-3):317-323.
- Wozniak A, McLennan G, Betts WH, Murphy GA, Scicchitano R. Activation of human neutrophils by substance P: effect on FMLP-stimulated oxidative and arachidonic acid metabolism and on antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunology.* 1989, 68(3):359-64.

Y

- Yoshihara S, Chan B, Yamawaki I, Geppetti P, Ricciardolo FLM, Massion PP, Nadel JA. Plasma extravasation in the rat trachea induced by cold air is mediated by tachykinin release from sensory nerves. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995, 151:1011-1017.

Z

- Zhang Y, Berger A, Milne CD, Paige CJ. Tachykinins in the immune system. *Curr. Drug Targets.* 2006, 7:1011-1020.
- Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat. Immunol.* 2000, 1:392-397.
- Zhang Y, Paige CJ. T-cell developmental blockage by tachykinins antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. *Blood.* 2003, 102(6):2165-2172.

- Zheng PY, Feng BS, Oluwole C, Struiksma S, Chen X, Li P, Tang SG, Yang PC. Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine. *Gut*. 2009, 58(11):1473-1479.
- Zimmermann BJ, Anderson DC, Granger DN. Neuropeptides promote neutrophil adherence to endothelial cell monolayers. *Am. J. Physiol*. 1992, 263:678-682.
- Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003, 31:3406-3415.

ANEXOS



ANEXO I

**THE EUROPEAN COMMUNITY
RESPIRATORY HEALTH
SURVEY II****ECRHS II****SCREENING QUESTIONNAIRE**

Para responder al cuestionario, marca la opción adecuada, si estás inseguro de la respuesta, por favor marca "No".

1. ¿Has tenido silbidos o pitos en tu pecho alguna vez en los últimos 12 meses?

SI NO

Si la respuesta es NO, salta a la pregunta 2, si es "SI":

1.1 ¿Has tenido falta de aire cuando estaban presentes los silbidos o pitidos?

SI NO

1.2 ¿Has tenido estos silbidos o pitidos en el pecho cuando no tenías un resfriado?

SI NO

2. ¿Te has levantado por la noche con una sensación de opresión o tirantez en el pecho alguna vez en los últimos 12 meses?

SI NO

3. ¿Te has tenido que levantar por la noche por un ataque de falta de aire alguna vez en los últimos 12 meses?

SI NO

4. ¿Te has tenido que levantar por la noche por un ataque de tos alguna vez en los últimos 12 meses?

SI NO

5. ¿Has tenido un ataque de asma en los últimos 12 meses?

SI NO

6. ¿Estás actualmente tomando alguna medicación (incluyendo inhaladores, aerosoles o pastillas) para el asma?

SI NO

7. ¿Tienes alguna alergia nasal, incluyendo rinitis?

SI NO

8. ¿Cuál es tú fecha de nacimiento? Incluye día/mes/año _____

9. ¿Qué fecha es hoy? Incluye día/mes/año _____

ANEXO II

(Resultados Análisis REST_2009)

ENSAYO DE ESTIMULACIÓN CON BUDESONIDA

0,1 nM

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
PPIB	REF	0,996	1,035				
HPRT	REF	1	0,966				
IL-1 β	TRG	0,952	0,685	0,167 - 3,059	0,067 - 6,979	0,394	
TAC3	TRG	0,786	1,718	0,703 - 4,450	0,251 - 14,495	0,153	
TAC4 δ	TRG	0,816	1,414	0,689 - 2,896	0,346 - 3,495	0,122	

1 nM

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
PPIB	REF	0,996	1,024				
HPRT	REF	1	0,976				
IL-1 β	TRG	0,952	0,376	0,108 - 1,312	0,042 - 2,872	0,02	DOWN
TAC3	TRG	0,786	2,468	0,944 - 6,743	0,392 - 15,043	0,014	UP
TAC4 δ	TRG	0,816	1,728	0,877 - 3,699	0,413 - 4,553	0,034	UP

10 nM

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
PPIB	REF	0,996	0,973				
HPRT	REF	1	1,028				
IL-1 β	TRG	0,952	0,262	0,071 - 1,035	0,026 - 2,353	0,005	DOWN
TAC3	TRG	0,786	3,003	1,279 - 6,669	0,473 - 14,323	0,003	UP
TAC4 δ	TRG	0,816	1,961	1,008 - 3,808	0,526 - 5,166	0,008	UP

DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR EoL-1 (mediante dbAMPc)

1 día

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
HPRT	REF	0,932	0,901				
PPIB	REF	1	1,11				
TAC3	TRG	0,350	2,438	1,726 - 3,598	1,436 - 4,191	0,000	UP
TAC4δ	TRG	0,612	1,261	0,853 - 2,069	0,633 - 2,586	0,336	
NK2R	TRG	0,488	1,132	0,689 - 1,963	0,561 - 2,321	0,933	

3 días

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
HPRT	REF	0,932	0,837				
PPIB	REF	1	1,195				
TAC3	TRG	0,350	2,47	2,003 - 3,075	1,845 - 3,315	0,000	UP
TAC4δ	TRG	0,612	1,732	1,248 - 2,405	1,226 - 2,447	0,168	
NK2R	TRG	0,488	1,294	0,797 - 2,285	0,612 - 2,801	0,336	

5 días

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
HPRT	REF	0,932	0,738				
PPIB	REF	1	1,354				
TAC3	TRG	0,350	2,197	1,652 - 3,053	1,374 - 3,556	0,000	UP
TAC4δ	TRG	0,612	1,459	1,052 - 2,025	1,036 - 2,054	0,303	
NK2R	TRG	0,488	0,768	0,459 - 1,290	0,437 - 1,353	0,667	

7 días

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
HPRT	REF	0,932	0,691				
PPIB	REF	1	1,447				
TAC3	TRG	0,350	1,848	1,498 - 2,281	1,483 - 2,304	0,177	
TAC4δ	TRG	0,612	1,105	0,803 - 1,568	0,688 - 1,788	0,839	
NK2R	TRG	0,488	0,427	0,258 - 0,732	0,219 - 0,841	0,000	DOWN

9 días

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
HPRT	REF	0,932	0,821				
PPIB	REF	1	1,219				
TAC3	TRG	0,350	1,579	1,280 - 1,965	1,179 - 2,118	0,159	
TAC4δ	TRG	0,612	1,009	0,516 - 2,189	0,383 - 2,737	0,900	
NK2R	TRG	0,488	0,5	0,300 - 0,849	0,267 - 0,942	0,000	DOWN

ENSAYO DE ESTIMULACIÓN CON SP (sin FN)

12 horas SP 0,1 μ M

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,872	0,944				
PPIB	REF	1	1,059				
ALOX-15	TRG	0,760	0,491	0,460 - 0,528	0,443 - 0,539	0,032	DOWN
ALOX-5	TRG	0,799	3,531	3,187 - 3,930	3,084 - 4,026	0,045	UP
FLAP	TRG	0,980	1,126	1,040 - 1,218	0,992 - 1,286	0,145	
LTC4s	TRG	0,850	0,812	0,743 - 0,882	0,733 - 0,914	0,051	
LTA4h	TRG	1	1,54	1,404 - 1,678	1,348 - 1,781	0,096	
COX1	TRG	1	2,328	2,261 - 2,439	2,159 - 2,462	0,045	UP
COX2	TRG	0,571	0,97	0,868 - 1,111	0,802 - 1,170	0,617	
TXAs	TRG	0,978	1,435	1,382 - 1,483	1,368 - 1,527	0,032	UP
PGFs	TRG	0,858	1,832	1,651 - 1,964	1,607 - 2,008	0,045	UP
CCR3	TRG	0,738	1,639	1,446 - 1,887	1,349 - 1,989	0,029	UP
PAFAH	TRG	0,897	0,905	0,815 - 0,979	0,788 - 1,018	0,104	

12 horas SP 1 μ M

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,872	0,984				
PPIB	REF	1	1,016				
ALOX-15	TRG	0,760	0,204	0,186 - 0,220	0,181 - 0,235	0,029	DOWN
ALOX-5	TRG	0,799	10,69	9,564 - 11,707	9,279 - 12,372	0,026	UP
FLAP	TRG	0,980	1,482	1,360 - 1,608	1,337 - 1,657	0,026	UP
LTC4s	TRG	0,850	0,481	0,463 - 0,496	0,457 - 0,507	0,040	DOWN
LTA4h	TRG	1	1,808	1,616 - 2,077	1,462 - 2,158	0,076	
COX1	TRG	1	4,483	4,326 - 4,690	4,194 - 4,762	0,026	UP
COX2	TRG	0,571	1,066	0,925 - 1,238	0,843 - 1,332	0,438	
TXAs	TRG	0,978	1,74	1,662 - 1,829	1,625 - 1,884	0,049	UP
PGFs	TRG	0,858	3,371	3,043 - 3,614	2,957 - 3,690	0,026	UP
CCR3	TRG	0,738	2,485	2,230 - 2,795	2,132 - 2,993	0,026	UP
PAFAH	TRG	0,897	0,547	0,520 - 0,574	0,512 - 0,597	0,069	

24 horas SP 0,1 µM

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,872	1,058				
PPIB	REF	1	0,945				
ALOX-15	TRG	0,760	0,698	0,541 - 0,828	0,514 - 0,910	0,030	DOWN
ALOX-5	TRG	0,799	2,072	1,707 - 2,799	1,574 - 2,986	0,048	UP
FLAP	TRG	0,980	1,464	1,273 - 1,736	1,091 - 1,891	0,048	UP
LTC4s	TRG	0,850	1,19	0,904 - 1,400	0,885 - 1,419	0,359	
LTA4h	TRG	1	1,311	1,208 - 1,446	1,130 - 1,481	0,030	UP
COX1	TRG	1	1,671	1,468 - 1,922	1,359 - 2,101	0,000	UP
COX2	TRG	0,571	0,892	0,714 - 1,177	0,598 - 1,347	0,550	
TXAs	TRG	0,978	1,262	1,169 - 1,346	1,126 - 1,358	0,000	UP
PGFs	TRG	0,858	1,547	1,383 - 1,748	1,258 - 1,795	0,063	
CCR3	TRG	0,738	0,954	0,759 - 1,177	0,682 - 1,269	0,608	
PAFAH	TRG	0,897	0,899	0,706 - 1,043	0,676 - 1,080	0,604	

24 horas SP 1 µM

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,872	0,911				
PPIB	REF	1	1,098				
ALOX-15	TRG	0,760	0,336	0,261 - 0,438	0,247 - 0,450	0,000	DOWN
ALOX-5	TRG	0,799	9,188	7,278 - 13,341	6,534 - 14,228	0,000	UP
FLAP	TRG	0,980	1,674	1,411 - 1,886	1,365 - 2,007	0,000	UP
LTC4s	TRG	0,850	0,634	0,614 - 0,654	0,601 - 0,655	0,000	DOWN
LTA4h	TRG	1	2,696	2,397 - 3,180	2,218 - 3,309	0,000	UP
COX1	TRG	1	4,467	3,882 - 5,241	3,587 - 5,731	0,000	UP
COX2	TRG	0,571	1,086	0,882 - 1,299	0,819 - 1,465	0,421	
TXAs	TRG	0,978	2,217	1,996 - 2,443	1,924 - 2,508	0,000	UP
PGFs	TRG	0,858	2,347	2,017 - 2,829	1,781 - 3,064	0,000	UP
CCR3	TRG	0,738	2,376	1,906 - 2,765	1,807 - 2,814	0,000	UP
PAFAH	TRG	0,897	0,669	0,648 - 0,695	0,632 - 0,708	0,000	DOWN

ENSAYO DE ESTIMULACIÓN CON SP (con FN)

12 horas SP 0,1 μ M

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,899	0,987				
PIIB	REF	1	1,014				
ALOX-15	TRG	0,677	0,807	0,696 - 0,924	0,644 - 1,018	0,130	
ALOX-5	TRG	0,841	1,146	0,988 - 1,340	0,965 - 1,415	0,248	
FLAP	TRG	0,969	1,066	0,962 - 1,209	0,955 - 1,230	0,416	
LTC4s	TRG	0,641	1,046	0,752 - 1,323	0,683 - 1,768	0,843	
LTA4h	TRG	1	1,130	0,973 - 1,275	0,972 - 1,277	0,345	
COX1	TRG	1	1,086	0,951 - 1,245	0,892 - 1,292	0,499	
COX2	TRG	0,871	1,151	1,006 - 1,268	0,965 - 1,373	0,224	
TXAs	TRG	0,987	1,004	0,883 - 1,142	0,857 - 1,230	0,905	
PGFs	TRG	0,862	1,262	1,063 - 1,559	0,961 - 1,661	0,112	
PGEs	TRG	0,270	0,960	0,816 - 1,081	0,774 - 1,247	0,724	
CCR3	TRG	0,840	1,058	0,920 - 1,189	0,854 - 1,221	0,612	
PAFAH	TRG	0,970	0,890	0,808 - 0,959	0,783 - 1,037	0,184	

12 horas SP 1 μ M

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,899	0,994				
PIIB	REF	1	1,006				
ALOX-15	TRG	0,677	0,410	0,342 - 0,486	0,323 - 0,565	0,047	DOWN
ALOX-5	TRG	0,841	2,792	2,395 - 3,208	2,284 - 3,568	0,026	UP
FLAP	TRG	0,969	1,144	1,007 - 1,263	0,958 - 1,429	0,107	
LTC4s	TRG	0,641	0,954	0,731 - 1,159	0,691 - 1,509	0,987	
LTA4h	TRG	1	1,681	1,428 - 1,938	1,336 - 2,147	0,000	UP
COX1	TRG	1	1,337	1,166 - 1,524	1,096 - 1,596	0,049	UP
COX2	TRG	0,871	2,317	2,224 - 2,474	2,192 - 2,507	0,000	UP
TXAs	TRG	0,987	1,258	1,100 - 1,423	1,056 - 1,565	0,000	UP
PGFs	TRG	0,862	2,121	1,791 - 2,438	1,719 - 2,843	0,000	UP
PGEs	TRG	0,270	1,228	1,047 - 1,378	0,993 - 1,587	0,136	
CCR3	TRG	0,840	0,946	0,809 - 1,073	0,762 - 1,121	0,580	
PAFAH	TRG	0,970	0,849	0,756 - 0,927	0,727 - 1,030	0,175	

24 horas SP 0,1 µM

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,899	1,17				
PPIB	REF	1	0,854				
ALOX-15	TRG	0,677	0,672	0,605 - 0,743	0,565 - 0,782	0,031	DOWN
ALOX-5	TRG	0,841	1,318	1,239 - 1,438	1,180 - 1,482	0,000	UP
FLAP	TRG	0,969	0,974	0,930 - 1,041	0,867 - 1,056	0,522	
LTC4s	TRG	0,641	0,995	0,847 - 1,136	0,801 - 1,178	0,980	
LTA4h	TRG	1	1,224	1,148 - 1,294	1,108 - 1,347	0,029	UP
COX1	TRG	1	0,931	0,781 - 1,135	0,710 - 1,220	0,437	
COX2	TRG	0,871	1,07	0,947 - 1,195	0,890 - 1,316	0,468	
TXAs	TRG	0,987	0,895	0,726 - 1,062	0,678 - 1,090	0,323	
PGFs	TRG	0,862	1,971	1,813 - 2,190	1,703 - 2,284	0,000	UP
PGEs	TRG	0,270	1,003	0,830 - 1,267	0,724 - 1,382	0,981	
CCR3	TRG	0,840	0,896	0,800 - 0,983	0,781 - 1,089	0,129	
PAFAH	TRG	0,970	0,823	0,784 - 0,876	0,745 - 0,890	0,031	DOWN

24 horas SP 1 µM

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,899	0,95				
PPIB	REF	1	1,053				
ALOX-15	TRG	0,677	0,368	0,325 - 0,413	0,306 - 0,442	0,025	DOWN
ALOX-5	TRG	0,841	2,863	2,566 - 3,154	2,434 - 3,461	0,000	UP
FLAP	TRG	0,969	1,041	0,809 - 1,346	0,755 - 1,398	0,694	
LTC4s	TRG	0,641	1,001	0,937 - 1,066	0,917 - 1,122	0,899	
LTA4h	TRG	1	2,052	1,913 - 2,238	1,776 - 2,287	0,000	UP
COX1	TRG	1	1,086	0,956 - 1,303	0,820 - 1,356	0,466	
COX2	TRG	0,871	2,109	1,807 - 2,411	1,665 - 2,676	0,033	UP
TXAs	TRG	0,987	1,316	1,200 - 1,485	1,122 - 1,524	0,061	
PGFs	TRG	0,862	3,992	3,479 - 4,518	3,195 - 4,570	0,000	UP
PGEs	TRG	0,270	1,827	1,575 - 2,201	1,418 - 2,399	0,012	UP
CCR3	TRG	0,840	0,875	0,767 - 0,950	0,750 - 1,090	0,196	
PAFAH	TRG	0,970	0,886	0,786 - 0,995	0,747 - 1,039	0,275	

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FIBRONECTINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

12 horas FN

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,885	0,896				
PPIB	REF	1	1,116				
ALOX-15	TRG	0,718	0,887	0,801 - 0,992	0,739 - 1,030	0,210	
ALOX-5	TRG	0,820	0,795	0,691 - 0,938	0,600 - 1,022	0,195	
FLAP	TRG	0,974	2,163	1,921 - 2,412	1,774 - 2,617	0,000	UP
LTC4s	TRG	0,745	0,047	0,036 - 0,057	0,034 - 0,060	0,065	
LTA4h	TRG	1	0,828	0,733 - 0,945	0,677 - 1,025	0,165	
COX1	TRG	1	1,435	1,261 - 1,696	1,187 - 1,762	0,000	UP
COX2	TRG	0,721	7,468	6,638 - 8,951	6,159 - 9,351	0,000	UP
TXAs	TRG	0,982	1,635	1,417 - 1,881	1,382 - 1,898	0,014	UP
PGFs	TRG	0,860	0,751	0,663 - 0,890	0,565 - 0,933	0,047	DOWN
CCR3	TRG	0,789	2,618	2,261 - 2,954	2,226 - 3,372	0,000	UP
PAFAH	TRG	0,933	4,711	4,379 - 5,067	4,195 - 5,175	0,000	UP

24 horas FN

Gene	Type	Reaction		Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
		Efficiency	Expression				
HPRT	REF	0,885	0,585				
PPIB	REF	1	1,709				
ALOX-15	TRG	0,718	2,025	1,762 - 2,246	1,694 - 2,565	0,031	UP
ALOX-5	TRG	0,820	3,195	2,947 - 3,435	2,823 - 3,546	0,031	UP
FLAP	TRG	0,974	4,437	4,040 - 4,832	3,912 - 5,181	0,031	UP
LTC4s	TRG	0,745	0,048	0,044 - 0,051	0,043 - 0,052	0,000	DOWN
LTA4h	TRG	1	1,961	1,786 - 2,145	1,699 - 2,304	0,021	UP
COX1	TRG	1	4,490	3,750 - 5,038	3,625 - 6,102	0,031	UP
COX2	TRG	0,721	14,61	13,354 - 16,468	11,989 - 17,182	0,050	UP
TXAs	TRG	0,982	2,968	2,711 - 3,230	2,658 - 3,427	0,031	UP
PGFs	TRG	0,860	0,553	0,510 - 0,599	0,485 - 0,630	0,031	DOWN
CCR3	TRG	0,789	5,775	5,225 - 6,725	4,535 - 6,933	0,095	
PAFAH	TRG	0,933	4,844	4,626 - 5,006	4,566 - 5,232	0,050	UP

ARTÍCULOS



Differential expression of neurokinin B and hemokinin-1 in human immune cells

Tilman E. Klassert^a, Francisco Pinto^b, Mariano Hernández^a, M. Luz Candenas^b,
María Concepción Hernández^c, Juan Abreu^c, Teresa A. Almeida^{a,*}

^a Instituto de Enfermedades Tropicales y Salud Pública, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, 38271 La Laguna, Canarias, Spain

^b Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Avda. Americo Vespucio 49, 41092 Sevilla, Spain

^c Departamento de Neumología, Hospital Universitario de Canarias, Ofra s/n-Carretera La Cuesta, 38071 La Laguna, Canarias, Spain

Received 26 November 2007; received in revised form 8 February 2008; accepted 11 February 2008

Abstract

The tachykinins are a group of related peptides that are mainly synthesized in the central and peripheral nervous system, but are also present in peripheral non-neuronal cells. In humans, substance P (SP) is the most extensively studied tachykinin and is present, along with the NK-1 receptor, in several inflammatory and immune cells. The release of SP under the appropriate stimulus may act as a paracrine or autocrine signal that may help to initiate and/or propagate inflammation. In the present study we have determined the expression pattern of NKB and HK-1 mRNA in human lymphocytes, monocytes, neutrophils and eosinophils. In addition, we have detected for the first time the presence of NKB protein in these cellular types. These findings reinforce the suggestion that tachykinins play a central role in the pathophysiology of the inflammatory process. © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Tachykinins; Neurokinin B; Hemokinin-1; Human immune cells

1. Introduction

Substance P (SP), neurokinin A (NKA), neurokinin B (NKB) and the recently identified hemokinin-1 (HK-1) are members of a family of structurally related peptides known as tachykinins (Kang et al., 2004; Zhang et al., 2006). They all share a common C-terminal region: FXGLM-NH₂, where X denotes an aromatic or branched aliphatic amino acid residue. The mammalian tachykinins are derived from three distinct genes: *TAC1* encodes for SP, NKA and two additionally extended forms of NKA (NPK and NPγ), *TAC3* encodes for NKB, and *TAC4* encodes for HK-1 (Kang et al., 2004; Zhang et al., 2006; Almeida et al., 2004). A more detailed analysis of the *TAC4* gene in humans showed that it is spliced into four alternative transcripts (α-, β-, γ- and δ) that give rise to four different peptides which have been named endokinins (Page et

al., 2003). Endokinin A (EKA) and endokinin B (EKB) are N-terminally extended forms of HK-1, while endokinin C (EKC) and endokinin D (EKD) are tachykinin-related peptides with a different C-terminal signature motif (FQGLL-NH₂) (Page et al., 2003). Tachykinins exert most of their actions by interaction with specific membrane receptors. The presently known tachykinin receptors are named NK-1, NK-2 and NK-3, and in humans are encoded by the *TACR1*, *TACR2* and *TACR3* genes, respectively (Nakanishi, 1991; Gerard et al., 1993). SP, HK-1, EKA and EKB bind preferentially to the NK-1 receptor, NKA to the NK-2 receptor and NKB to the NK-3 receptor. However, the naturally occurring tachykinins are not highly selective and can act as full agonists on the three receptors (Pennefather et al., 2004; Almeida et al., 2004). Non-NK receptor-mediated effects of NKB and SP have also been reported (Grant et al., 2002; Lorenz et al., 1998).

Initially, tachykinins were considered as a group of neuropeptides because of their widespread distribution in the central and the peripheral nervous system. However, this

* Corresponding author. Tel.: +34 922 316502x6116; fax: +34 922 318411.

E-mail addresses: tacosalm@ull.es, tacosalm@gmail.com (T.A. Almeida).

terminology has been repeatedly challenged since tachykinins are also expressed in a variety of non-neuronal cells, such as human endothelial cells, inflammatory and immune cells, and even in the placenta, a tissue totally devoid of nerves (Page et al., 2000; Kang et al., 2004; Pennefather et al., 2004; Nelson et al., 2004). Moreover, HK-1 and the endokinins are predominantly expressed outside neural systems (Zhang et al., 2006). An overwhelming amount of functional data demonstrates the involvement of tachykinins, particularly SP, in the pathophysiology of inflammatory disease (O'Connor et al., 2004; De Swert and Joos, 2006). SP-induced release of inflammatory mediators such as cytokines, oxygen radicals, arachidonic acid derivatives and histamine potentiates tissue injury and stimulates further leukocyte recruitment, thereby amplifying the inflammatory response (Kang et al., 2004; O'Connor et al., 2004; De Swert and Joos, 2006). Moreover, SP promotes vasodilatation, leukocyte chemotaxis, and leukocyte/endothelial cell adhesion, which ensures the extravasation, migration and subsequent accumulation of leukocytes at sites of injury (De Swert and Joos, 2006; Zhang et al., 2006). Among human inflammatory cells, *TAC1* mRNA has been detected in lymphocytes (Lai et al., 1998) and monocytes/macrophages (Ho et al., 1997) obtained from peripheral blood samples. SP protein was also detected in the culture supernatants of these cells. In addition, immunoreactivity for SP has been observed in eosinophils and neutrophils (Aliakbari et al., 1987). Functional tachykinin NK-1 receptor is also expressed in macrophages, lymphocytes, neutrophils, dendritic cells and mast cells (De Swert and Joos, 2006; Zhang et al., 2006). An attractive hypothesis proposes that inflammatory cells use *TAC1* gene-encoded tachykinins as a paracrine or autocrine signalling mechanism to propagate inflammation beyond the limited topographic spread of the C-fibers and intrinsic neurons (Chavolla-Calderón et al., 2003). In fact, it has been shown that airways tachykinin input due to immune cells is essential for the progression of the inflammation (Chavolla-Calderón et al., 2003). This reveals a surprising and essential synergy between sensory C-fibers and hematopoietic cells in tachykinin-mediated inflammation (Kang et al., 2004).

There are no studies about the expression pattern of NKB and HK-1 in inflammatory and immune cells in humans. In rats, HK-1 is expressed in hematopoietic cells and it seems to play an important role in T and B lymphopoiesis (Zhang and Paige, 2003; Zhang et al., 2000). Expression of HK-1 has also been observed in murine monocyte and macrophage cells lines, and stimulation of these cells with proinflammatory cytokines decreases HK-1 and NK-1 receptor mRNA (Berger et al., 2007). Moreover, a decrease of *TAC4* and *TACR1* mRNA also occurs during monocytic differentiation. The authors conclude that HK-1 and the NK-1 receptor may play a role in the developing immune system (Berger et al., 2007). Nelson et al. (2004) showed *TAC4* mRNA expression in mouse bone marrow-derived macrophages and dendritic cells, and that maturation of dendritic cells resulted in significant reduction of *TAC4* mRNA expression. The scenario is simpler for NKB, where only the expression of *TAC3* mRNA in mice erythroid cells has been detected (Pal et al., 2004).

In humans, expression of β - and γ *TAC4* has been detected in bone marrow (Page et al., 2003). The predicted proteins encoded by these transcripts include HK-1, EKB and EKD. The analysis of the expression pattern of the *TAC3* gene in different human tissues also shows a clear amplification in human bone marrow (Pinto et al., 2004).

In the present study, we have analyzed the mRNA expression of *TAC3* and *TAC4* in polymorphonuclear cells (PMNs), lymphocytes, monocytes and eosinophils isolated from human peripheral blood samples as well as in T-lymphocytes obtained after stimulation with phytohaemagglutinin (PHA). Using quantitative PCR (Q-PCR) we have compared the expression of *TAC3* and δ *TAC4* in lymphocytes and PHA-stimulated lymphocytes from seven healthy volunteers. In addition, we analyzed the presence of the NKB protein by immunocytochemistry.

2. Material and methods

2.1. Isolation of neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils

Blood samples from seven healthy adult donors who answered negatively to a screening questionnaire for respiratory symptoms (The European Community Respiratory Health Survey, ECRHS II) were obtained after informed consent. These include three females and four males (25–40 years of age).

In all cases, cells were stained with trypan blue to assess viability before counting on a hemocytometer. Cell yield for each sample was determined by staining slide fixed cells with May Grünwald–Giemsa and counting a minimum of 300 cells for each cellular fraction. Polymorphonuclear cells and mononuclear cells were isolated by using a gradient material, 1-Step Polymorphs (Accurate Chemicals and Scientific Corp., Westbury, NY), following the procedure recommended by the manufacturer. In brief, 20 ml of whole blood was collected in vacutainer tubes containing EDTA (Becton Dickinson, Oxford, UK). 5 ml of blood was carefully layered over 5 ml of 1-Step polymorphs in a 12 ml centrifuge tube. After centrifugation (500 \times g, 20 °C, 35 min), two leukocyte bands and a pellet of cells were visible. The top band consisted of mononuclear cells and the lower band of polymorphonuclear cells. The pelleted cells were kept on ice for further eosinophil isolation. Cellular fractions from the two bands were recovered separately and diluted 1:1 with NaCl 0.45%, centrifuged at 400 \times g, 4 °C, 10' and a hypotonic lysis was performed to remove contaminating erythrocytes. Neutrophils and mononuclear cells were pelleted again (400 \times g, 4 °C, 10') and washed once with sterile phosphate buffer saline (PBS). We obtained a viability of >98% in both cell fractions. The yields of polymorphonuclear and mononuclear fractions were >95% and >98%, respectively. To further isolate lymphocytes from monocytes, the mononuclear fraction was incubated with RPMI-1640 in a 2% gelatin-coated flask for 1 h at 37 °C. Non-adherent lymphocytes were collected from the supernatant of gelatin-coated flask and washed three times with PBS. Yield and viability was >95% and >98%,

respectively. Lymphocytes constitute a pool of different cellular types, including B cells, natural killer and T cells. In order to obtain a population of enriched T cells, we stimulated lymphocytes with PHA (PHA-lymphocytes), which is a specific mitogen of this cellular type (Dallman and Lamb, 2000). For that purpose, 2×10^6 lymphocytes were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FBS and supplemented with PHA during 72 h at 37 °C in a 5% CO₂ incubator.

We extracted total RNA directly from the monocytes attached to the flask to avoid cell death resulting from the detaching process. Before that, 4–6 rinses with RPMI-1640 were done to wash residual non-adherent lymphocytes. The yield of monocytes using gelatin-coated flask has been estimated by others and range between 70 and 97% (Ho et al., 1997; De Almeida et al., 2000).

Eosinophils were purified from the pelleted cells after 1-Step polymorph gradient centrifugation. For that purpose, we used an eosinophil isolation kit that couples negative selection with a cocktail of biotin-conjugated monoclonal antibodies and magnetic cell sorting system (Miltenyi Biotech S.L., Madrid, SP). The isolation procedure was performed on ice to avoid eosinophil activation during isolation. The preparations were more than 99% eosinophils and viability was consistently >95%.

2.2. Detection of *TAC3* and *TAC4* mRNA by RT-PCR

Total RNA was isolated from the following cell types for each donor: 10×10^6 polymorphonuclear cells, 5×10^6 lymphocytes and 2×10^6 lymphocytes stimulated with PHA during 72 h. We pooled eosinophils from 3 and 4 donors respectively to obtain approximately 1×10^6 cells. Monocyte RNA was extracted directly from the gelatin-coated flask.

We performed RNA isolation using Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen Ltd., West Sussex, UK). Residual genomic DNA was removed by incubating the RNA samples with RNase free DNaseI and RNasin (Promega, Madison, USA). The effectiveness of the DNase treatment was assessed in RT-negative samples. First-strand cDNA was synthesized from 1.5 µg of

RNA using Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase and random hexamers according to manufacturer's instructions (first-strand cDNA synthesis kit, Amersham Biosciences). The resulting cDNA samples were amplified by PCR using specific oligonucleotide primers designed with the analysis software Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000). The specificity of the primers was tested using a BLAST analysis against the genomic NCBI database. The structure of the primers used is shown in Table 1. The complete nucleotide sequences of the genes of interest were characterized using Mfold (Zuker, 2003) to take into account possible secondary structures at the primer binding sites which might influence the PCR efficiency. PCR mixes contained 0.2 µM primers, 1 U Taq DNA polymerase (Qiagen Ltd., West Sussex, UK), 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs and cDNA in 25 µl. PCR reactions included an initial 95 °C denaturation step for 10 min, and then 40 cycles of the following cycling conditions: 10 s at 94 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C. The PCR products were separated by gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized under UV transilluminator. Amplicon sizes were verified by comparison with a DNA molecular weight marker. To verify the identity of *TAC3* and *TAC4* PCR fragments, DNA sequencing was performed as previously described (Pintado et al., 2003).

2.3. Detection of *TACR1*, *TACR2* and *TACR3* mRNA by RT-PCR

We used RT-nested PCR for *TACR1*, *TACR2* and *TACR3* mRNA detection. Thus, an outer primer pair and an inner primer pair were used in two consecutive rounds of PCR (Table 1). In brief, 2 µl of the PCR products amplified with the outer primer pair was subjected to a second run of PCR (nested) using the inner primer pair. The cycling conditions were the same as mentioned above and the cycle numbers were 40 for each PCR reaction.

2.4. Quantitative Real-Time PCR

A Biorad MyiQ Real-Time PCR detection system apparatus (Foster City, CA) was used to perform the quantitative

Table 1

Sequence of forward and reverse primers of indicated target genes and the size expected for each PCR-amplified product

Human gene	Symbol	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)
Neurokinin B	<i>TAC3</i>	CCACAGGCACCATGAGGAT	TGTTGATTCCTTAGGAT	236
Hemokinin-1 transcript α variant 1	<i>α-TAC4v1</i>	TGTGGCCTTGGAGGAAGG	ACTGCTGCTTGACACTGAGA	415
Hemokinin-1 transcript α variant 2	<i>α-TAC4v2</i>	GCCAAGGAGAAAAAAGCAT	ACTGCTGCTTGACACTGAGA	292
Hemokinin-1 transcript β	<i>β-TAC4</i>	GGAAGCGAGTGGGAGCAT	ACTGCTGCTTGACACTGAGA	290
Hemokinin-1 transcript δ	<i>δ-TAC4</i>	AGTGGGAGGCAGAGAGGAT	ACTGCTGCTTGACACTGAGA	223
Hemokinin-1 transcript γ	<i>γ-TAC4</i>	AAGGAGAAAAAAGGCAGAGAG	ACTGCTGCTTGACACTGAGA	229
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	<i>HRPT1</i>	GACCAGTCAACAGGGGACAT	AACACTTCGTGGGGTCCTTTTC	173
PPI β-isoform	<i>PPP1CB</i>	AACCATGAGTGTGCTAGCATCA	CACCAGCATTGTCAAACCTCGCC	472
Peptidylpropyl isomerase B	<i>PP1B</i>	ATGTAGGCGGGTGATCTTT	TGAAGTTCTCATCGGGGAAG	219
NK-1 receptor outer primers	<i>NK1R</i>	CTCCATGGCTGCATTCATA	CACAGATGTGGTACACTTTCTCA	362
NK-1 receptor inner primers	<i>NK1R</i>	ACGGCCTGTTCTACTGCAAG	GGCATGGTCTCTGTGGTTG	226
NK-2 receptor outer primers	<i>NK2R</i>	GCTCGGGTGATGTTTGTAG	CCCAGCCATGAACAAAGTCT	457
NK-2 receptor inner primers	<i>NK2R</i>	TACTTCATCTGGGCAGCTT	ACTCTCGTGGAGAGGGAGGT	239
NK-3 receptor outer primers	<i>NK3R</i>	TTGCGGTGGACAGGTATATG	CAGCCAGCAGATAGCAAATG	404
NK-3 receptor inner primers	<i>NK3R</i>	TGCCTTCCCTCAGTGTCTTT	TTTGGCCTTAGCTGCTCAT	241

expression study. Each sample was analyzed in triplicate in a total reaction volume of 20 μ l consisting of a 30-fold dilution of each cDNA, 10 μ l of 2 \times FastStart SYBR Green Master mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 0.2 μ M primers and 1/250,000 diluted fluorescein (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The cycling conditions were 95 $^{\circ}$ C for 10 min followed by 40–45 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s, 60 $^{\circ}$ C for 30 s and 72 $^{\circ}$ C for 30 s. For each experiment, a non-template reaction was included as negative control. The specificity of the PCR reactions was confirmed by melting curves analysis of the products as well as by size verification of the amplicon in a conventional agarose gel.

The relative gene expression levels were normalized to the geometric mean of at least 2 housekeeping genes (Vandesompele et al., 2002). These included: hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 (*HPRT1*), peptidylpropyl isomerase B (*PPIB*) and protein phosphatase 1 catalytic subunit beta-isoform (*PPP1CB*) (Table 1). The individual efficiency values (*E*) were calculated by the DART (Data Analysis for Real-Time PCR) program which determines *E* from the raw fluorescence data (Peirson et al., 2003). The average *E* value obtained from all individual efficiencies was used to calculate relative expression as previously recommended (Peirson et al., 2003).

2.5. Immunocytochemistry

2.5.1. Sample preparation and fixation

Cells from the different fractions were washed with PBS and 50,000–100,000 cells were resuspended in 20 μ l of ice-cold fixation buffer (2% formaldehyde in PBS). 10 μ l of the cell suspension was added to a lysine-coated microscopic slide (Dako Denmark A/S, Glostrup, DK) and allowed to adhere electrostatically for 20 min at 4 $^{\circ}$ C in a humidified chamber to prevent the cells from drying out. Slides were then washed three times with PBS to remove free formaldehyde. At this point, slides can be stored at –20 $^{\circ}$ C.

2.5.2. Immunostaining

We used the immunohistochemistry staining detection system kit (Peninsula Laboratories Europe, St. Helens, UK) following the manufacturer's instructions. We only included one initial step where fixed cells were washed with PBS-0.1% Saponin for 10 min. After that, endogenous peroxidase activity was inhibited by 30-minute incubation in PBS containing 3% H₂O₂. We used separately two specific NKB primary antibodies to detect NKB protein: antibody 1 (ab-1) is a rabbit polyclonal antibody against the complete 10 amino acids sequence of the NKB peptide (Peninsula Laboratories Europe, St. Helens, UK), and antibody 2 (ab-2) is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping within an internal region of neurokinin B (Santa Cruz Technologies, Inc., Heidelberg, Germany). The slides were blocked with goat serum blocking solution (ab-1) or 0.5% casein in TBS (ab-2) during 1 h and after that incubated with primary antibody overnight at 4 $^{\circ}$ C. In the case of ab-1, a biotinylated goat anti-rabbit IgG was used as secondary antibody followed by incubation with HRP-streptavidin at room temperature. For

the ab-2, a donkey antigoat IgG-HRP was used as secondary antibody. Antigen–antibody complexes were visualized by incubation in DAB chromogen substrate (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride). Finally, the sections were briefly stained with hematoxylin, mounted and visualized. Secondary antibody alone, without primary antibody, was used as negative control.

2.6. Statistical analysis

All the calculations were done using GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95, (GraphPad Software, San Diego California USA). Normalized Ct values from lymphocytes and PHA-lymphocytes were compared using a two-tailed paired Student's *t*-test after testing that our data passed the normality test using the method of Kolmogorov and Smirnov. Results are expressed as mean \pm SEM of the seven samples.

3. Results

3.1. Detection of *TACR1*, *TACR2* and *TACR3* mRNA

Since NK-1 receptor mRNA is expressed at very low level in immune cells, we used two rounds of amplification (nested PCR) to detect these transcripts. In agreement with previous studies (Lai et al., 1998; Ho et al., 1997), the NK-1 receptor was detected in monocytes, lymphocytes and PHA-lymphocytes (data not shown). The transcript for the NK-2 receptor was also detected in lymphocytes, PHA-lymphocytes and monocytes after one-round PCR. To increase sensibility and detect NK-2 receptor mRNA in samples with putative low expression levels, we also carried out nested PCR. However, no signal was observed either in neutrophil or eosinophil samples (data not shown). Finally, in spite of a clear amplification in the cDNA from amniotic liquid cells, we failed to detect the NK-3 receptor in any of the samples analyzed.

3.2. Detection of *TAC3* and *TAC4* mRNA

By using RT-PCR, we detected a clear expression of *TAC3* mRNA in lymphocytes, PHA-lymphocytes and monocytes from the seven donors (Fig. 1). We failed to detect the *TAC3* transcript in PMNs and eosinophils. We used specific primers to amplify each of the four alternative transcripts described for the *TAC4* gene. We observed the presence of single transcripts corresponding to the size predicted for δ *TAC4* (223 bp) in PMNs, lymphocytes and PHA-lymphocytes in all individuals and the two pooled eosinophils samples. In addition, γ *TAC4* mRNA (229 bp) was present in all PMN samples, the two pooled eosinophils, and in 2 and 3 samples from lymphocytes and PHA-lymphocytes, respectively (Fig. 1). However, α *TAC4* and β *TAC4* mRNAs were not detected. The amplification of the housekeeping gene *PPIB* served as a control of the RT-PCR reactions (Fig. 1).

Next, we compared the relative expression of *TAC3* and δ *TAC4* between lymphocytes obtained from peripheral blood samples (PBL) and PHA-lymphocytes using quantitative PCR. We first tested which housekeeping genes are stably expressed

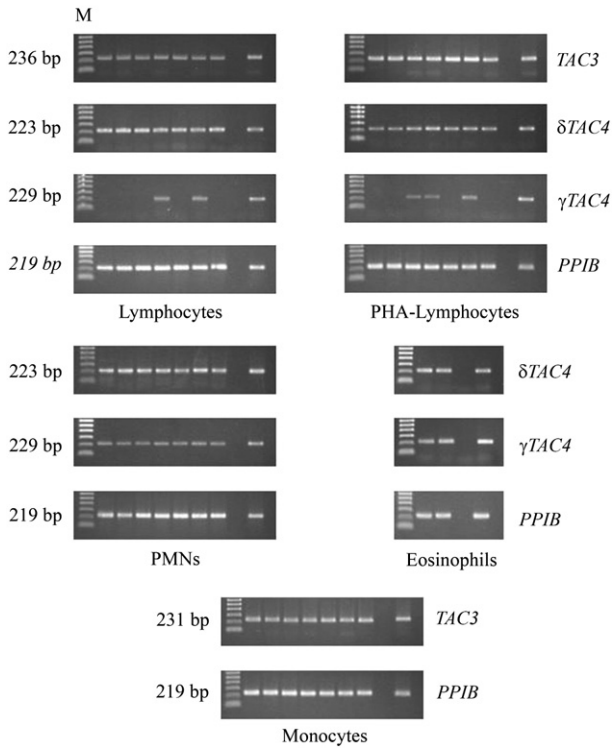


Fig. 1. Agarose gel showing expression of $\delta TAC4$, $\gamma TAC4$, $TAC3$ and the control $PPIB$ mRNA in the seven donors and the two pooled eosinophil samples. Last two lanes correspond to negative and positive (adrenal gland) controls, respectively. *M*, 100 pb molecular weight standard.

among the samples analyzed. Using geNorm implemented in the qBase program, the expression stability measure (*M*) and coefficient of variation (*CV*) for the three housekeeping genes were calculated for PBL and PHA-lymphocytes (Vandesompele et al., 2002). On this basis, *HPRT1* was discarded from the analysis (*CV*=48%, *M*=0.8) and *PPIB* and *PPP1CB* were used as housekeeping genes to compare relative expression ($CV_{\text{mean}}=17.82\%$, $M_{\text{mean}}=0.514$). Furthermore, serial half-dilutions of cDNA were amplified to ensure that conditions for PCR were within the linear range of amplification. Both *TAC3* and $\delta TAC4$ fulfilled this requirement.

Fig. 2 shows the results for the relative expression between PBL and PHA-lymphocytes for *TAC3* and $\delta TAC4$ mRNAs. Interestingly, *TAC3* expression was significantly up-regulated ($p=0.0019$) in PHA-lymphocytes (3.03 ± 0.51) compared to PBL (0.42 ± 0.11). On the contrary, all the PHA-lymphocytes samples showed a significant down-regulation ($p=0.0175$) of $\delta TAC4$ mRNA (0.51 ± 0.17) when compared with unstimulated lymphocytes (1.27 ± 0.13).

3.3. Detection of the NKB protein

We used two specific antibodies separately to detect NKB peptide in fixed preparations of the different cellular fractions. In the case of PMN, all cells showed a positive immunostaining but with variable intensities. Most of the cells presented a light brown staining in the cytoplasm, but some of them showed a very intense colour development (Fig. 3A and B). On

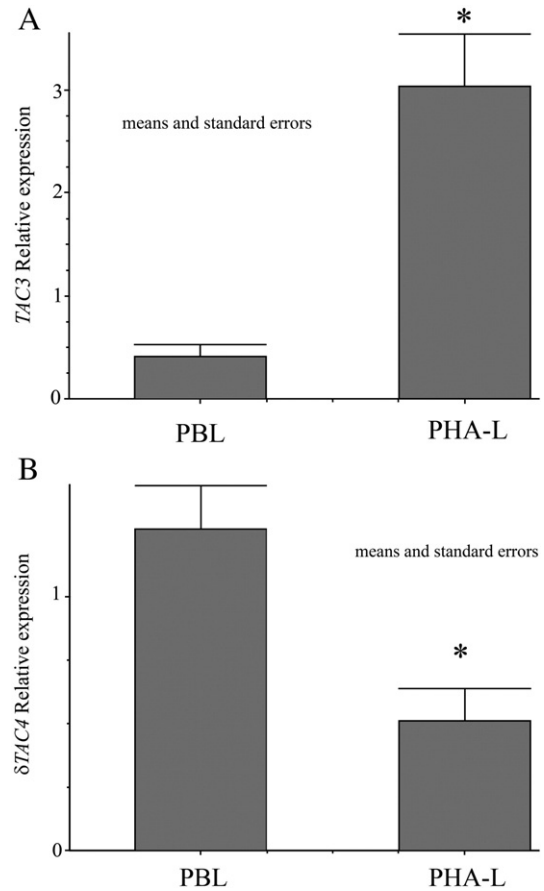


Fig. 2. Comparison between the relative expression of *TAC3* (A) and $\delta TAC4$ mRNA (B) in peripheral blood lymphocytes (PBL) and PHA-stimulated lymphocytes (PHA-L) for each donor. Results are expressed as mean \pm SEM of the seven samples. Statistical significant difference ($p < 0.05$) between PBL and PHA treated samples are denoted by (*).

the contrary, most of the eosinophils stained rather uniformly across the slide preparation, with a strong brown signal observed in the granules of these cells. In spite of the big nucleus present in the lymphocytes, positive immunostaining

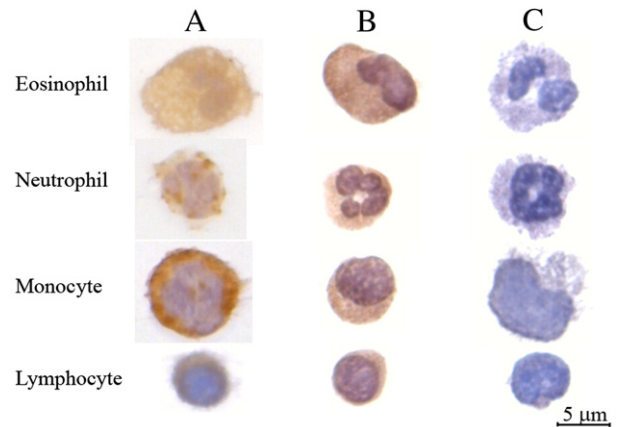


Fig. 3. NKB immunostaining of eosinophils, neutrophils, monocytes and lymphocytes using two different polyclonal antibodies, ab-1 (A) and ab-2 (B). Negative control cells that have been processed without primary antibody are also shown (C).

was also observed in the cytoplasm of these cells. In the same way, monocytes were also positive for the presence of NKB peptide (Fig. 3A and B). We observed that both PMN and eosinophils showed a more intense immunostaining than mononuclear cells. In this sense, to avoid excessive background and no specific staining, we monitored colour development under a microscope. In the case of PMNs and eosinophils, we stopped the reaction 20–30 s after substrate–chromogen mixture addition while the reaction lasted 1 min for mononuclear cells. Positive signal was not found in the negative control slides of the cell types analyzed (Fig. 3C).

4. Discussion

In the present study we have demonstrated for the first time the presence of *TAC3* and *TAC4* mRNA and NKB protein in human blood circulating immune cells. The cells analyzed in this study included polymorphonuclear cells, eosinophils, lymphocytes and monocytes. Although PMNs and eosinophils did not express detectable levels of *TAC3*, all cells analyzed showed immunoreactivity to two different NKB polyclonal antibodies. In addition, *TAC4* mRNA transcript was only absent from human monocytes.

Tachykinins mediate communication within the neural-immune-hematopoietic axis (Kang et al., 2004). Among them, SP has been extensively studied and shown to play an important role in the regulation of immune functions and inflammatory responses (Kang et al., 2004; Zhang et al., 2006). This peptide and the mRNA of the *TAC1* gene are widely expressed in neuronal and non-neuronal cells at both central and peripheral levels (Almeida et al., 2004). Conversely, the physiological role of NKB remains largely unknown. During many years, this peptide was thought to be present strictly in the central nervous system (Almeida et al., 2004; Pennefather et al., 2004). However, recent studies have shown the expression of *TAC3* mRNA in the periphery, in different types of reproductive and erythroid cells (Pintado et al., 2003; Pal et al., 2004; Pinto et al., 2004). The present study shows that the mRNA of *TAC3*, the gene encoding NKB, is constitutively expressed in human immune cells of the myeloid lineage (monocytes) and the lymphoid lineage (lymphocytes).

Immunoreactivity for NKB using separately two different primary antibodies was detected in all cells analyzed, even in PMN and eosinophils, where no transcription of the *TAC3* gene was observed. Examples of gene down-regulation during cell differentiation exist for different types of immune cells. In eosinophils, there is a decreased expression of eosinophil peroxidase (EPO) and major basic protein (MBP) mRNA during eosinophil maturation. In fact, there is absence of RNA encoding EPO or MBP in peripheral blood eosinophils whereas the proteins are still present (Gruart et al., 1992). In neutrophils, myeloperoxidase (MPO) enzyme activity is observed in the mature stage whereas no translatable mRNA is detected (Koeffler et al., 1985). In the case of tachykinins, there are also examples of gene down-regulation during cell differentiation. For instance, immature B cells express *TAC4* transcripts, whereas mature B cells express little or no *TAC4* mRNA

(Metwali et al., 2004). One of the NKB polyclonal antibodies used for immunocytochemistry was raised against the complete decapeptide sequence and, according to the manufacturer, only minor crossreactivity is detected against NKA and SP (0.1% and 0.2%, respectively). Moreover, different studies have shown that unstimulated leukocytes do not constitutively express, or express modest levels of *TAC1* mRNA (Ho et al., 1997; Nelson and Bost, 2005). Immunoreactivity for SP has been observed in eosinophils (Aliakbari et al., 1987), but is barely detectable in neutrophils (Aliakbari et al., 1987). In the present study and using two different primary antibodies, we observed immunoreactivity for NKB in all neutrophil cells analyzed, with some of them showing a strong signal development. However, it has to be taken into consideration that the signal observed, at least in some immune cells, may be due to unspecific background staining. The presence of *TAC3* mRNA and NKB protein in immune cells suggests that, as occurs with the other tachykinins, NKB plays a role in the regulation of immune cell functions.

Many of the effects of tachykinins on immune cells involve activation of the NK-1 receptor and have been attributed to SP (O'Connor et al., 2004). However, the recently identified HK-1, and its human extended forms, EKA and EKB, are preferentially expressed in peripheral cells of non-neuronal origin and, as SP, exhibit highest affinity for the NK-1 receptor (Page et al., 2003; Pennefather et al., 2004; Zhang et al., 2006). This suggests that HK-1 and EKA/B could mediate or at least contribute to some of the peripheral actions previously attributed to SP (Page et al., 2003; Zhang et al., 2000; Zhang and Paige, 2003). In this study, we have demonstrated that *TAC4* mRNA is constitutively expressed in different types of human immune cells. Among the α , β , γ and δ transcripts of the *TAC4* gene, the δ transcript is primarily present in PMNs, lymphocytes, PHA-lymphocytes and the two pooled eosinophil samples. In addition, the γ transcript is present in all PMNs donors, the two pooled eosinophil samples and in 2 and 3 lymphocyte and PHA-stimulated lymphocyte samples, respectively. In any case, both transcripts predict the HK-1 peptide or the elongated form EKB. The high homology between HK-1 and SP peptides and the small epitope size available to raise a specific antibody against human HK-1 prevented us from detecting the presence of the HK-1 peptide by immunostaining of the circulating immune cells under study. In a recent study, Jones et al. (2007) raised specific antibodies against EKA/B and provide confirmation of translation of endokinins in human platelets. Other authors have failed to detect the HK-1 peptide in murine monocytic, macrophage (Berger et al., 2007) or B cell lines by using commercially available immunoassays (Nelson and Bost, 2005). This suggests that HK-1 is expressed at very low levels and translated in a tightly regulated manner, which may only be active under certain yet unidentified conditions (Nelson and Bost, 2005; Berger et al., 2007). Further studies are needed to determinate the pattern of translation and the precise biological function of HK-1 in mammals.

The specific proliferation of T cells from a mix of different lymphocyte types is easily achieved by culturing lymphocytes in the presence of the potent mitogen PHA. Similarly to the pool

of unstimulated lymphocytes, T-lymphocytes expressed *TAC3* and *TAC4* mRNA. Surprisingly, when we compared the transcription level of lymphocytes versus PHA-lymphocytes, we observed that PHA significantly down-regulated *TAC4* mRNA in all cases. A similar effect was described in mice, where immature B cells contained *TAC4* transcript whereas mature B cells expressed little or no *TAC4* mRNA (Nelson and Bost, 2005). Furthermore, the treatment of a pre-B cell line with LPS or interferon- γ , agents that induce differentiation, led to a reduction of *TAC4* mRNA (Zhang et al., 2000). A decrease in the expression of the *TAC4* gene concomitant to cell maturation has also been observed in murine dendritic cells, monocytes and macrophages (Nelson et al., 2004; Berger et al., 2007). In addition, HK-1 enhances the proliferation of T cell precursors and increases the number of thymocytes in fetal thymus organ cultures (Zhang and Paige, 2003). Therefore, it seems that HK-1 may provide a proliferative signal for T and B cells at immature stages, and a decrease in *TAC4* mRNA expression is associated with development to more mature stages. In this sense, it has been shown that PHA has an effect on the differentiation of functional T cells subpopulation (Duarte et al., 2002), which may explain the observed decrease of *TAC4* mRNA in PHA-stimulated lymphocytes.

Contrary to observations with *TAC4* mRNA, the stimulation of lymphocytes with PHA significantly up-regulated *TAC3* mRNA from the seven donors. We have also found (unpublished observations), that PHA up-regulate the expression of *TAC1* mRNA, in agreement with previous studies (Zhang et al., 2006). Furthermore, it has been shown that SP stimulates proliferation of both T-lymphocytes and mitogen-induced T-lymphocytes (Payan et al., 1983). It would be interesting to know if NKB, like SP, may regulate the expression and activation of genes involved in T cell proliferation.

Very recently, Berger et al. (2007) found a co-regulated decrease of *TAC4* mRNA and *TACR1* mRNA and protein in monocytes and macrophages after activation with proinflammatory cytokines. In the present study, we also detect *TACR2* transcript in the lymphocytes, PHA-lymphocytes and monocytes. These results are in agreement with previous studies that detect NK-2 receptor protein in the surface of human T-lymphocytes (Mapp et al., 2000) and monocytes (Brunelleschi et al., 1998). Since NKA is the preferred ligand for NK-2 receptor, it would be interesting to know the role of this tachykinin in the immune cells. Finally, we failed to detect the NK-3 receptor mRNA in any of the samples analyzed. To our knowledge, no studies have been reported detecting the mRNA expression of this receptor in neutrophils, eosinophils and monocytes. However, it has been shown that co-cultured B- and T-lymphocytes could express tachykinin NK-3 receptor mRNA only after activation by interleukin-5 and transforming growth factor beta (Braun et al., 1999). This suggests that the expression of this receptor, at least in this immune cell type, is regulated by specific activating signals. Taken together, these data argue for a tight and coordinated regulation of the expression of all tachykinins and their receptors in immune cells. These findings reinforce the suggestion that tachykinins play a role in early immune cell maturation and differentiation.

In conclusion, we have demonstrated the presence of *TAC3* and *TAC4* mRNA and NKB protein in human lymphocytes, monocytes, eosinophils and polymorphonuclear cells. Similarly to the processing that takes place in neurons, immune cells may store the mature peptide in the granules of the cytoplasm until the required stimuli induce its secretion. Both immune cells and SP are highly involved in inflammatory processes such as arthritis, asthma and inflammatory Bowel disease (O'Connor et al., 2004). The finding that the immune cells analyzed in the present study may be a source of NKB and possibly of HK-1 peptides supports the notion that HK-1, but also NKB, may exert some of the biological actions attributed to SP in the inflammatory process. Further studies would help to establish the importance of the largely forgotten NKB tachykinin and the novel HK-1 peptide in the development of inflammatory diseases.

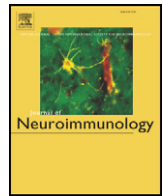
Acknowledgements

We want to thank Dr. Aixa Bello for her technical assistance in the immunocytochemistry. Also, we thank Dr. Enrique Martínez and Dr. Basilio Valladares for the extraction of blood samples. This work was funded by BFU2005-04495-C02-01 and 02 from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) and the FPU grant AP2005-4921 to T.E.K.

References

- Aliakbari, J., Sreedharan, S.P., Turck, C.W., Goetzl, E.J., 1987. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1440–1445.
- Almeida, T.A., Rojo, J., Nieto, P.M., Pinto, F.M., Hernández, M., Martín, J.D., Candelas, M.L., 2004. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 11, 2045–2081.
- Berger, A., Tran, A.H., Paige, C.J., 2007. Co-regulated decrease of neurokinin-1 receptor and hemokinin-1 gene expression in monocytes and macrophages after activation with pro-inflammatory cytokines. *J. Neuroimmunol.* 187, 83–93.
- Braun, A., Wiebe, P., Pfeufer, A., Gessner, R., Renz, H., 1999. Differential modulation of human immunoglobulin isotype production by the neuropeptides substance P, NKA and NKB. *J. Neuroimmunol.* 97, 43–50.
- Brunelleschi, S., Bordin, G., Colangelo, D., Viano, I., 1998. Tachykinin receptors on human monocytes: their involvement in rheumatoid arthritis. *Neuropeptides* 32, 215–223.
- Chavolla-Calderón, M., Bayer, M.K., Fontán, J.J., 2003. Bone marrow transplantation reveals an essential synergy between neuronal and hemopoietic cell neurokinin production in pulmonary inflammation. *J. Clin. Invest.* 111, 973–980.
- Dallman, M.J., Lamb, J.R., 2000. *Haematopoietic and lymphoid cell culture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 71–89.
- De Almeida, M.C., Silva, A.C., Barral, A., Netto, M.B., 2000. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 9, 221–223.
- De Swert, K.O., Joos, G.F., 2006. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 171–181.
- Duarte, R.F., Chen, F.E., Lowdell, M.W., Potter, M.N., Lamana, M.L., Prentice, H.G., Madrigal, J.A., 2002. Functional impairment of human T-lymphocytes following PHA-induced expansion and retroviral transduction: implications for gene therapy. *Gene Ther.* 9, 1359–1368.
- Gerard, N.P., Bao, L., Xiao-Ping, H., Gerard, C., 1993. Molecular aspects of the tachykinin receptors. *Regulatory Pept.* 43, 21–35.
- Grant, A.D., Akhtar, R., Gerard, N.P., Brain, S.D., 2002. Neurokinin B induces oedema formation in mouse lung via tachykinins receptor-independent mechanisms. *J. Physiol.* 543, 1007–1014.

- Gruart, V., Truong, M.J., Lumas, J., Zandecki, M., Kusnierz, J.P., Prin, L., Vinatier, D., Capron, A., Capron, M., 1992. Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. *Blood* 79, 2592–2597.
- Ho, W.Z., Lai, J.P., Zhu, X.H., Uvaydova, M., Douglas, S.D., 1997. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J. Immunol.* 159, 5654–5660.
- Jones, S., Tucker, K.L., Sage, T., Kaiser, W.J., Barrett, N.E., Lowry, P.J., Zimmer, A., Hunt, S.P., Emerson, M., Gibbins, J.M., 2008. Peripheral tachykinins and the neurokinin receptor NK1 are required for platelet thrombus formation. *Blood* 111, 605–612.
- Kang, H.S., Trzaska, K.A., Corcoran, K., Chang, V.T., Rameshwar, P., 2004. Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 52, 338–347.
- Koeffler, H.P., Ranyard, J., Pertcheck, M., 1985. Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood* 65, 484–491.
- Lai, J.P., Douglas, S.D., Ho, W.Z., 1998. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J. Neuroimmunol.* 86, 80–86.
- Lorenz, D., Wiesner, B., Zipper, J., Winkler, A., Krause, E., Beyermann, M., Lindau, M., Bienert, M., 1998. Mechanism of peptide-induced mast cell degranulation. Translocation and patch-clamp studies. *J. Gen. Physiol.* 112, 577–591.
- Mapp, C.E., Miotto, D., Braccioni, F., Saetta, M., Turato, G., Maestrelli, P., Krause, J.E., Karpitskiy, V., Boyd, N., Geppetti, P., Fabbri, L.M., 2000. The distribution of neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors in human central airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 207–215.
- Metwali, A., Blum, A.M., Elliott, D.E., Setiawan, T., Weinstock, J.V., 2004. Cutting edge: hemokinin has substance P-like function and expression in inflammation. *J. Immunol.* 172, 6528–6532.
- Nakanishi, S., 1991. Mammalian tachykinin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 123–136.
- Nelson, D.A., Bost, K.L., 2005. Quantification of hemokinin-1 peptide production and secretion from mouse B cells. *Cell. Immunol.* 237, 115–122.
- Nelson, D.A., Marriott, I., Bost, K.L., 2004. Expression of hemokinin 1 mRNA by murine dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* 155, 94–102.
- O'Connor, T.M., O'Connell, J., O'Brien, D.I., Goode, T., Bredin, C.P., Shanahan, F., 2004. The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cell. Physiol.* 201, 167–180.
- Page, N.M., Woods, R.J., Gardiner, S.M., Lomthaisong, K., Gladwell, R.T., Butlin, D.J., Manyonda, I.T., Lowry, P.J., 2000. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 405, 797–800.
- Page, N.M., Bell, N.J., Gardiner, S.M., Manyonda, I.T., Brayley, K.J., Strange, P.G., Lowry, P.J., 2003. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6245–6250.
- Pal, S., Nemeth, M.J., Bodine, D., Miller, J.L., Svaren, J., Thein, S.L., Lowry, P.J., Bresnick, E.H., 2004. Neurokinin-B transcription in erythroid cells: direct activation by the hematopoietic transcription factor GATA-1. *J. Biol. Chem.* 279, 31348–31356.
- Payan, D.G., Brewster, D.R., Goetzl, E.J., 1983. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. *J. Immunol.* 131, 1613–1615.
- Peirson, S.N., Butler, J.N., Foster, R.G., 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, e73.
- Pennefather, J.N., Lecci, A., Cadenas, M.L., Patak, E., Pinto, F.M., Maggi, C.A., 2004. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 74, 1445–1463.
- Pintado, C.O., Pinto, F.M., Pennefather, J.N., Hidalgo, A., Baamonde, A., Sanchez, T., Cadenas, M.L., 2003. A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol. Reprod.* 69, 940–946.
- Pinto, F.M., Almeida, T.A., Hernández, M., Devillier, P., Advenier, C., Cadenas, M.L., 2004. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur. J. Pharmacol.* 494, 233–239.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18, 1–11.
- Zhang, Y., Paige, C.J., 2003. T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. *Blood* 102, 2165–2172.
- Zhang, Y., Lu, L., Furlonger, C., Wu, G.E., Paige, C.J., 2000. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat. Immunol.* 1, 392–397.
- Zhang, Y., Berger, A., Milne, C.D., Paige, C.J., 2006. Tachykinins in the immune system. *Curr. Drug Targets* 7, 1011–1020.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.



Short communication

Common variants of the neuropeptide expressing tachykinin genes and susceptibility to asthma: A case–control study

Tilman E. Klassert^{a,*}, Juan J. Sánchez^b, Teresa A. Almeida^a, Luz Candenás^c, Francisco Pinto^c, Orlando Acosta^d, Mariano Hernández^a^a Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n, 38271 La Laguna, Canarias, Spain^b Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Campus de Ciencias de la Salud, 38320 La Laguna, Canarias, Spain^c Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Avda. Americo Vespucio 49, 41092 Sevilla, Spain^d Departamento de Neumología, Hospital Universitario NS de Candelaria, Carretera del Rosario s/n, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Canarias, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2010

Received in revised form 21 May 2010

Accepted 26 May 2010

Keywords:

Tachykinins

Asthma

Polymorphism

Association study

ABSTRACT

Since tachykinins appear to be involved in the pathogenesis of allergic asthma, we investigated a possible association between 28 single nucleotide polymorphisms of the tachykinin genes *TAC1*, *TAC3* and *TAC4*, and asthma susceptibility. A case–control study was conducted on 102 patients and 100 healthy subjects from the Canary Islands (Spain). A significant association with asthma was observed for two SNPs: rs2291855 in the *TAC3* gene conferring asthma protection (Odds ratio [OR]: 0.46; 95% Confidence Interval [CI]: 0.22–0.97; $P=0.038$), and rs4794068 in the *TAC4* gene associated with an increased risk for asthma (OR: 1.94; 95% CI: 1.06–3.54; $P=0.03$). The present study represents a preliminary step in elucidating the association between tachykinin gene polymorphisms and asthma susceptibility.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tachykinins are a family of related peptides implicated in many physiological and pathological processes (Patacchini and Maggi, 2001; Almeida et al., 2004; Greco et al., 2004). They derive from three distinct genes: *TAC1* encodes for substance P (SP) and neurokinin A (NKA), *TAC3* encodes for neurokinin B (NKB), and *TAC4* encodes for hemokinin-1 (HK-1) (Pennefather et al., 2004). Tachykinins exert most of their actions by interaction with three specific membrane receptors and although they can act as full agonists on the three receptors, SP and HK-1 show preference for NK1, NKA for NK2, and NKB for NK3 (Almeida et al., 2004; Pennefather et al., 2004). Several evidences support a role for the tachykinin peptides in bronchial asthma (Joos et al., 2000; Groneberg et al., 2006). In lung, tachykinin receptors are widely distributed among different cell types (Joos et al., 2000; Pinto et al., 2004), and coupling to them produce bronchoconstriction, vasodilatation, plasma protein extravasation and mucus secretion. Consequently, these peptides have been implicated in many aspects of asthma pathogenesis, including airway narrowing, inflammation, hyperresponsiveness, mucus hypersecretion and leukocyte recruitment (Joos et al., 2000; Daoui et al., 2000; Kraneveld and Nijkamp, 2001; Nénan et al., 2001; Grant et al., 2002; Feistritzer et al., 2003; Groneberg et al., 2006).

Sensory nerves are traditionally considered the main source of tachykinins in human airways, which are released from nerve terminals by mechanical and chemical stimuli (Belvisi, 2003). Several studies found increased levels of SP and NKA in bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after antigen challenge (Nieber et al., 1992; Heaney et al., 1998). In addition, plasma SP concentration was elevated in acute asthma exacerbations (Cardell et al., 1994). However, the high level of tachykinins in asthmatic patients does not correlate with an increased level of tachykinin-containing nerve fibers in the airway (Howarth et al., 1995; Chanez et al., 1998). In recent years, it has become clear that immune and inflammatory cells may form an additional source of tachykinins (Springer et al., 2005). Among human inflammatory cells, *TAC1* mRNA and SP protein have been detected in lymphocytes (Lai et al., 1998) and monocytes/macrophages (Ho et al., 1997). In addition, immunoreactivity for SP has been observed in eosinophils and neutrophils (Aliakbari et al., 1987). We have recently demonstrated NKB immunoreactivity in lymphocytes, monocytes, eosinophils and neutrophils as well as *TAC4* mRNA expression in all these cell types, except monocytes (Klassert et al., 2008). Thus, increased numbers of cells attracted to the inflamed airways may be responsible for the increased tachykinin levels observed in asthma patients. In fact, it has been shown that airway tachykinin input due to immune cells is essential for the progression of the inflammation (Chavolla-Calderón et al., 2003).

Despite the evidence that tachykinins play an important role in inflammatory disease, association studies of tachykinin genes with asthma susceptibility have not been reported so far. The aim of this

* Corresponding author. Tel.: +34 922 316502x6116; fax: +34 922 318490.
E-mail address: tilklass@ull.es (T.E. Klassert).

study was to test a possible association of common variants in the tachykinin genes *TAC1*, *TAC3* and *TAC4*, with asthma susceptibility.

2. Material and methods

2.1. Study participants

A case–control study was performed in the Canary Islands population (Spain), where asthma has a high prevalence (Torres-Galván et al., 2000). Our study population was composed of 102 adult atopic asthma patients diagnosed according to the criteria of the Global Initiative for Asthma (GINA). The control group consisted of 100 healthy ethnically matched adults which passed the European Community Respiratory Health Survey II (ECRHS II) screening questionnaire. All subjects gave written consent and the study was approved by the Institutional Review Boards.

2.2. Polymorphism selection and genotyping

We selected 28 single nucleotide polymorphisms (SNPs) from the tachykinin genes: 11 from *TAC1*, 9 from *TAC3* and 8 from *TAC4*. The goal of the SNP selection was to cover each gene region with at least one SNP per 1–2 kb. To ensure collection of known tag-SNPs, the selection was guided by the HapMap phase II data using the tSNP_pairwise_Tagger with an r^2 threshold of 0.8 and minor allele frequency (MAF) >5%, based on the data from CEU (CEPH residents of Utah with ancestry from northern and western Europe). Fig. 1 shows selected SNPs and their location in the tachykinin genes.

Genomic DNA was isolated from EDTA preserved whole blood by standard proteinase K digestion and phenol–chloroform methods (Sambrook et al., 1989). All SNPs were genotyped using the SNaPshot (Applied Biosystems) multiple simultaneous SNP genotyping system involving multiplex PCR and subsequent multiple single base extension (SBE) reactions. Two assays were carried out in order to

cover the 28 SNPs. Primers used in PCR reactions are listed on the Appendix. A detailed protocol for multiplex SNP genotyping system is available elsewhere (Sánchez et al., 2006). The purified SBE products were electrophoresed on an ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer and analyzed using GeneScan software (Applied Biosystems).

2.3. Statistical analysis

SNPs with Minor Allele Frequencies (MAF) <5% in this population were discarded from the analysis. Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for each SNP was tested by the Pearson chi-square procedure. Linkage disequilibrium (LD) among genotyped SNPs was obtained using the Haploview 2.05 program (Barrett et al., 2005).

Based on the logistic regression method, association of single locus genotypes with the outcome of asthma was tested under five inheritance models (codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive) using SNPStats software (Solé et al. 2006; <http://www.bioinfo.iconcologia.net/SNPStats>). Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated, and Akaike Information Criterion (AIC) was used to choose the genetic model that best fits the data.

Haplotype frequencies were estimated and tested for association using the expectation–maximization (EM) algorithm as implemented in the haplo.stats package (<http://www.mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/biostat/schaid.cfm>). The most common haplotypes were automatically selected as the reference category and rare haplotypes (frequency <0.01) were pooled together. A log-additive inheritance model was assumed by default. The significance level of all these tests was set to 0.05.

3. Results

In total, 102 patients with asthma and 100 controls were evaluated. Of the 28 SNPs genotyped in all three tachykinin genes, 12 SNPs were monomorphic in our population. To determine whether the

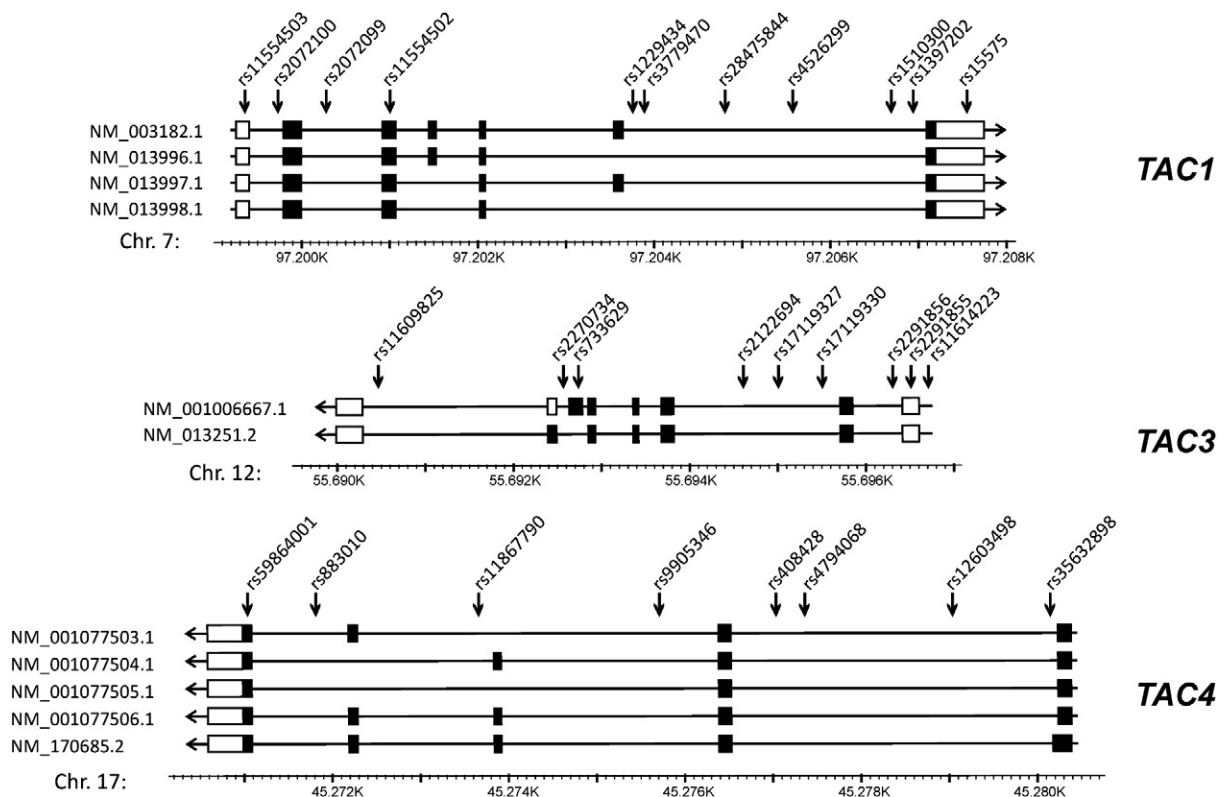


Fig. 1. Organization of the human tachykinin genes (*TAC1*, *TAC3* and *TAC4*) and location of analyzed SNPs. Different transcripts for each gene are shown. Boxes indicate exons, and lines indicate introns. Coding exons are marked by shaded blocks. Polymorphisms were expressed as their dbSNP ID.

remaining polymorphisms have an influence on disease susceptibility, the distribution of genotype and allele frequencies in the 202 patients and healthy controls was calculated (Table 1). Only 14 SNPs with MAF greater than or equal to 5% were retained for further analyses. The genotype distribution of all SNPs conformed to HWE in patients and controls. In relation to linkage disequilibrium, we found strong association LD ($r^2 \geq 0.9$) between pairs of markers in the *TAC1* gene (including SNP2, SNP4, SNP5, SNP6, and SNP7) and in the *TAC3* gene (SNP10, SNP12 and SNP13).

When logistic regression was used to carry out the association analysis and different models of inheritance were tested for the impact of the polymorphisms on disease, two SNPs showed association with asthma (Table 2). Nominal significance was observed for SNP14 (rs2291855) in the *TAC3* gene. The frequency of the heterozygote genotype C/T was significantly higher in healthy subjects (24%) compared with the asthma group (13%; OR = 0.46, 95% CI = 0.22–0.97;

$p = 0.038$). Among the *TAC4* polymorphisms, the A/G genotype frequency of SNP16 (rs4794068) was higher in asthmatics (39.2%) than in controls (25%). Under the overdominant model of inheritance, rs4794068 revealed to be significantly associated with an increased risk of asthma (OR = 1.94, 95% CI = 1.06–3.54; $p = 0.03$; AIC = 279.3). On the other hand, none of the *TAC1* polymorphisms showed association with asthma.

In addition to these results, haplotypes were inferred and association analysis was conducted with the complete polymorphic-loci haplotype for each tachykinin gene. We found 6 haplotypes with frequency greater than 1% in *TAC1*, 4 in *TAC3* and 3 in *TAC4*. Estimation of haplotype distribution, odd ratios and *P*-values for testing the significance of differences in individual haplotype frequencies between case and control groups are listed in Table 3. An additional test was performed to assess global haplotype frequency profile differences, rather than frequency differences for a specific haplotype. Nevertheless, for all three genes, haplotype frequencies were

Table 1

Allele and genotype frequencies of the polymorphic SNPs of *TAC1*, *TAC3* and *TAC4* genes studied in cases ($n = 102$) and controls ($n = 100$).

SNP	dbSNP ID	Location	Allele frequency(%)		Genotype frequency(%)			HWE <i>P</i>	
<i>TAC1</i>									
1	rs2072100	Intron Chr7:97199720	Cases	A 49	G 51	AA 27	AG 43	GG 29	0.48
			Controls	54	46	28	52	20	
2	rs2072099	Intron Chr7:97200271	Cases	C 78	A 22	CC 60	CA 37	AA 3	0.15
			Controls	78	22	58	39	3	
3	rs1229434	Intron Chr7:97203778	Cases	A 52	G 48	AA 29	AG 46	GG 25	0.78
			Controls	57.5	42.5	32	51	17	
4	rs3779470	Intron Chr7:97203867	Cases	C 78	T 22	CC 60	CT 37	TT 3	0.15
			Controls	77	23	57	40	3	
5	rs28475844	Intron Chr7:97204803	Cases	A 22	T 78	AA 3	AT 37	TT 60	0.15
			Controls	22	78	3	39	58	
6	rs4526299	Intron Chr7:97205565	Cases	C 78	T 22	CC 60	CT 37	TT 3	0.21
			Controls	78	22	59	38	3	
7	rs1510300	Intron Chr7:97206685	Cases	G 23	C 77	GG 3	GC 40	CC 57	0.12
			Controls	24	76	4	41	55	
8	rs1397202	Intron Chr7:97206943	Cases	A 84	G 16	AA 71.5	AG 24.5	GG 4	0.46
			Controls	81	19	66	30	4	
<i>TAC3</i>									
9	rs11609825	Intron Chr12:55690465	Cases	G 4	C 96	GG –	CG 9	CC 91	1.0
			Controls	4	96	–	8	92	
10	rs733629	Exon Chr12:55692711	Cases	C 6	T 94	CC –	CT 13	TT 87	0.62
			Controls	10	90	–	19	81	
11	rs2122694	Intron Chr12:55694600	Cases	A 2	G 98	AA –	AG 4	GG 96	1.0
			Controls	3	97	–	6	94	
12	rs17119327	Intron Chr12:55695007	Cases	A 6	G 94	AA –	AG 13	GG 87	0.62
			Controls	10	90	–	19	81	
13	rs17119330	Intron Chr12:55695506	Cases	A 7	G 93	AA –	AG 14	GG 86	0.37
			Controls	10	90	–	19	81	
14	rs2291855	5' UTR Chr12:55696458	Cases	C 94	T 6	CC 87	CT 13	TT –	0.38
			Controls	88	12	76	24	–	
<i>TAC4</i>									
15	rs883010	Intron Chr17:45271796	Cases	A 89	C 11	AA 79	AC 20	CC 1	0.07
			Controls	89	11	82	14	4	
16	rs4794068	Intron Chr17:45277340	Cases	A 22	G 78	AA 2	AG 39	GG 59	1.0
			Controls	18	82	5	25	70	

The reference ID, location within gene, allele and genotype frequencies, and *P*-values for Hardy–Weinberg proportions at a significance level of 0.05 are shown.

Table 2
Association analysis of SNPs with asthma ($n = 202$) using logistic regression.

Model	Genotype	Cases	Controls	OR (95% CI)	P-value	AIC	
SNP 14 (rs2291855)	C/C	89 (87.2%)	76 (76%)	1.00	0.038*	279.7	
	C/T	13 (12.8%)	24 (24%)	0.46 (0.22–0.97)			
SNP 16 (rs4794068)	Codominant	G/G	60 (58.8%)	70 (70%)	1.00	0.062	280.4
		G/A	40 (39.2%)	25 (25%)	1.87 (1.02–3.43)		
		A/A	2 (2%)	5 (5%)	0.47 (0.09–2.49)		
Dominant	G/G	60 (58.8%)	70 (70%)	1.00	0.097	281.3	
	G/A–A/A	42 (41.2%)	30 (30%)	1.63 (0.91–2.92)			
Recessive	G/G–G/A	100 (98%)	95 (95%)	1.00	0.23	282.6	
	A/A	2 (2%)	5 (5%)	0.38 (0.07–2.01)			
Overdominant	G/G–A/A	62 (60.8%)	75 (75%)	1.00	0.03*	279.3	
	G/A	40 (39.2%)	25 (25%)	1.94 (1.06–3.54)			
Log-additive	–	–	–	1.31 (0.79–2.16)	0.3	282.9	

OR, odds ratio; 95% CI confidence intervals; AIC, Akaike's information criterion.

* $P < 0.05$.

comparable in both groups and no significant differences between asthmatic patients and control subjects were found.

4. Discussion

Genome-wide screening for susceptibility loci suggests that the genetic basis of asthma involves multiple genes which are modulated by interacting environmental factors (Barnes, 1999). Several linkage and association studies have identified many candidate genes in asthma pathogenesis, and replicated associations between SNPs and asthma have been reported for more than 30 genes (Vercelli, 2003; Malerba and Pignatti, 2005; Flores et al., 2007; Rogers et al., 2009). In the present case–control association study, we have tested for the first time whether *TAC1*, *TAC3* and *TAC4* polymorphisms are associated with asthma susceptibility in the Canary Island population. Our results showed a possible association of two SNPs with asthma susceptibility: rs2291855 in the *TAC3* gene conferring asthma protection, and rs4794068 in *TAC4* associated with an increased risk of asthma. In both cases we observe molecular heterosis, a model which has been shown to be very common in humans and has been reported in several association studies (Comings and MacMurray, 2000).

TAC3 and *TAC4* are located on chromosomes 12q13.3 and 17q21.33, respectively. Genome-wide screenings have shown both association and linkage of these chromosome regions to bronchial asthma and related phenotypes in different populations (Shao et al., 2004; Moffatt

et al., 2007; Bouzigon et al., 2008; Bisgaard et al., 2009). The *TAC3* SNP rs2291855 is located within the *NKB* proximal promoter, in the 5'-untranslated exon I, close to a neuron-restrictive silencer element which has recently shown to regulate *TAC3* transcription (Gillies et al., 2009). On the other hand, rs4794068 is located on an intron and hence any possible influence of this polymorphism on *TAC4* gene expression remains to be elucidated. However, intron polymorphism affecting RNA processing and gene expression has been previously reported for other genes (Uitterlinden et al., 1998; Horikawa et al., 2000; Shima et al., 2006). Interestingly, rs4794068 is located in a potential CTCF-binding site (CGGGAAGAGG, <http://www.essex.ac.uk/bs/molonc/spa.html>) and regulation of gene expression by CTCF binding to intronic targets has been reported previously (Arnold et al., 2000). However, it should be noted that at this point we are not able to distinguish whether the associations found are due to these two SNPs themselves or to other nearby variants in LD with them.

The evidence supporting the involvement of tachykinins in asthma is mostly focused on the role of SP and NKA in neurogenic inflammation and airway responsiveness (Joos et al., 2000). In this study, we were unable to find any association between *TAC1* polymorphisms and the disease. Nevertheless, our findings that *TAC3* and *TAC4* polymorphisms might be associated with asthma are biologically plausible. *NKB*, the product of *TAC3*, has been shown to recruit inflammatory cells and evoke airway hyperresponsiveness and plasma extravasation in the lungs in different asthma models (Daoui et al., 2000; Nénan et al., 2001; Grant et al., 2002). On the other hand, the recently discovered HK-1 is a fully agonist of the NK1 receptor, which has been extensively linked with asthma in several studies (Adcock et al., 1993; Schuilting et al., 1999; Joos et al., 2000). Indeed, it has been suggested that HK-1 may exert some of the biological actions attributed to SP in the inflammatory process (Page et al., 2003). Therefore, it seems logical to think that an increased expression and release of these tachykinins by inflammatory cells could contribute in amplifying and propagating the inflammatory response.

In conclusion, this preliminary study shows a possible association of two SNPs of *TAC3* and *TAC4* with susceptibility to asthma. Certainly, further studies including larger sample sizes should be carried out to assess the relationship between *TAC3* and *TAC4* polymorphisms and this disease.

Acknowledgements

We want to thank, Dr. Roland Klassert and Beatriz Esquivel for their help in the extraction of blood samples, María Pino-Yáñez for her assistance, and Dr. Carlos Flores for critically reading the manuscript. This work was funded by BFU2005-04495-C02-01 and 02 from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) and the FPU grant AP2005-4921 to T.E.K.

Table 3
Estimated haplotype frequencies and association analysis with asthma.

Gene/haplotype	Sequence	Controls	Cases	Total	OR (95% CI)	P-value
TAC1/ SNP1–8	GCGCTCCA	0.245	0.308	0.273	1.00	–
	AACTTCCA	0.295	0.250	0.270	1.47 (0.87–2.47)	0.15
	AAATATGA	0.215	0.216	0.215	1.20 (0.66–2.21)	0.55
	GCGCTCCG	0.175	0.152	0.167	1.32 (0.72–2.44)	0.37
	GCACTCCA	0.030	0.045	0.039	0.71 (0.23–2.20)	0.55
	AACTTCCA	0.020	–	0.017	1.75 (0.36–8.43)	0.49
	Rare	0.025	0.029	0.019	1.38 (0.35–5.46)	0.65
Global haplotype association P-value: 0.77						
TAC3/ SNP9–14	CTGGGC	0.824	0.874	0.846	1.00	–
	CCGAAT	0.095	0.058	0.079	1.68 (0.78–3.64)	0.19
	GTGGGC	0.035	0.042	0.040	0.87 (0.31–2.44)	0.79
	CTAGGC	0.020	0.016	0.020	1.08 (0.26–4.48)	0.92
	Rare	0.026	0.010	0.015	5.74 (0.66–50.36)	0.12
Global haplotype association P-value: 0.30						
TAC4/ SNP15–16	AG	0.715	0.676	0.696	1.00	–
	AA	0.175	0.216	0.195	0.76 (0.46–1.27)	0.30
	CG	0.110	0.108	0.109	0.97 (0.53–1.76)	0.92
Global haplotype association P-value: 0.58						

OR, odds ratio; 95% CI confidence intervals.

Appendix A

Table of multiplex PCR primers used in this study				
Assay	L-primer	Sequence	H-primer	Sequence
1	rs11554503-L	ACTGAGCAGGCGAAAGAGC	rs11554503-H	GCTGAGTTTCTCTGGTTCCTC
1	rs2072100-L	ATGAACCAAGATCAAAAACATAAGG	rs2072100-H	GGAGAAGAGGGTTGGAGAATCTT
1	rs2072099-L	CCAGGAAGCTCCCTGCAGTA	rs2072099-H	AGGTCTGGGGGATGAAAT
1	rs11554502-L	GAGCCCTTTGAGCATCTTCG	rs11554502-H	CATTAATCAAAGAACTGCTGAGG
1	rs1229434-L	GGCAGACTGGTAAAGATGG	rs1229434-H	CCACAAATGGATTATAGCTGG
1	rs3779470-L	TTCAGTAAGGTTAAACACGGCTTAT	rs3779470-H	CCATTTAATCAATACCACTGAAT
1	rs28475844-L	AAAAAGTTAACACAATCTGGGCTAC	rs28475844-H	GGAAATTTTGTATCAAAGGTCAAT
1	rs4526299-L	GATAAATCTAGATAGATGCCCTTTCC	rs4526299-H	CAGAGTTTCTTACCTGGCTTTGAA
1	rs1510300-L	CAAAGCAGCCATAGACAATATGTAA	rs1510300-H	GCCAAATCTAGAATACCAATTTGTC
1	rs1397202-L	GCACCAAGTATATGATGAATGATGA	rs1397202-H	GAATGTTATCTGCACATCTTCCAAT
1	rs15575-L	GAAGGAACTCCTGACAGTCTGT	rs15575-H	CATGCTCAGAGATACAAATACAGT
1	rs59864001-L	GTGCTCTCTGGGAAGTCTGTG	rs59864001-H	ACCATGTTTCATATACAAACTCTC
1	rs35632898-L	GGATCTTCTGCCTCTGCACT	rs35632898-H	GAGAGGAAACAGACACTGCACT
2	rs11609825-L	GGTGAAGGTCAGACTTGTCT	rs11609825-H	AGCAGGAGAGAAGGGGAGAG
2	rs2270734-L	AGTCTCCCAACTCTGCTTTGAA	rs2270734-H	TCTGAATGTGAATACACCTGAT
2	rs733629-L	ACAGGACCTTTTACCTTCAGTG	rs733629-H	TATAAAGGTCTCTGCTCTCTGTT
2	rs2122694-L	CCCTCTGGTCAATGAATGAG	rs2122694-H	TAGGCACACCTATGTACTACCCTCT
2	rs17119327-L	GGAGGAAAGCTTTTCAAGGTTTGG	rs17119327-H	AGAGGCAGTAAACTCACACATTTG
2	rs17119330-L	CTGTATCTCTGCATGCTTTGACAC	rs17119330-H	ACCAAGTCTCCCATCAATCAAC
2	rs2291856-L	AGGAGGGAATAAAGCAGATGG	rs2291856-H	CCAAACCAACCAAGCTCTC
2	rs2291855-L	GTCTAGCCAGTTCCTTGATCCT	rs2291855-H	CTACCTGTGGAGCAGCTCTGT
2	rs11614223-L	GTGGTACTGTCTGCATCCTC	rs11614223-H	ATAAAGGCTCTGGGAGGGTCTA
2	rs883010-L	TAGTCTCAGAGATTTTCTGCCTTC	rs883010-H	TGTGAAGTATAACTGTTATGGTG
2	rs11867790-L	GGGATAGGAATAGACAGTATGGAT	rs11867790-H	CTAATTCAGGCTTTAGACGTAAGG
2	rs9905346-L	ACTAACTAAACCTGTGTTCCCTGA	rs9905346-H	ACTGCTGTGTGCAGAGTATTTTC
2	rs408428-L	GCTCTGACCTAGGCTGGAGT	rs408428-H	GTAGACACTGTAATCCAGCTACT
2	rs4794068-L	AGAGCAGAACAGTACTGTGAAGTC	rs4794068-H	GATGGAGAACTGAGATGTAAGGAG
2	rs12603498-L	AACTAGTCTGCTGACTGTTTC	rs12603498-H	AAAGGAGAGTAAAGGAGAGTAAGG

Table of SBE primers used in this study			
Assay	Primer	Sequence	Size
1	rs1510300snR	TCTAGAATACCATTGTTCTGTGAAA	26
1	rs28475844snR	AATTATGAAACACTTAGAACTTTTCAATT	29
1	rs4526299snR	ctctctctctTGAAGCCTGATATAAAATTTTGAGT	35
1	rs15575snF	ctctctctctctctCTGACAGTCTTGTGCTTTT	35
1	rs2072100snF	ctctctctctctctctCAAGATCAAAAACATAAAGGACT	40
1	rs1229434snR	tctctctctctctctGGATTTATAGCTGGTTAAGCTAATA	40
1	rs1397202snF	ctctctctctctctctctctCTGTGGTTAGATCATTTC	44
1	rs3779470snF	ctctctctctctctctACAGATCTATAGAAAGAATATAGCA	44
1	rs35632898snR	ctctctctctctctctctctctTAATTTGTCGCTTGGAGTACTTT	48
1	rs59864001snF	tctctctctctctctctctctctCTGTGGTGGGGGCTTTT	48
1	rs11554502snF	ctctctctctctctctctctctctctctctctGACAGAAATCGCCCCG	52
1	rs2072099snR	ctctctctctctctctctctctctctctctctCTGGGGATGAAATCTTA	56
1	rs11554503snR	ctGTCGCTCCGCACTCTC	60
2	rs2291856snR	CAGGTGCTTTGTGCTCAC	18
2	rs11609825snF	tctctGAGGTCAGACTTGTCTTTT	26
2	rs408428snF	ctctctctctctctCCTCCAGGTTCAAGC	32
2	rs11614223snF	ctctctctctctctctGCCACCTGGGATTTGG	32
2	rs2291855snR	tctctctctctctctctctctctctctctctctGAGCAGCTCTGTGCC	36
2	rs733629snR	tctctctctctctctctctctctctctctctctTGTCCAGGGGAAAGACT	36
2	rs4794068snR	tctctctctctctctctctctctctctctctctGACTGTCCAAGGTCACAC	40
2	rs17119327snF	tctctctctctctTTCAAGGTTTTGAAATGACAGCAATTA	40
2	rs12603498snR	ctAAGGAGAGTAAAGGATTAGACCC	44
2	rs11867790snR	ctTCCAGGCTTTAGACGTAAGG	44
2	rs2122694snF	tctctctctctctctctctctctctctctctctCCTCTTGGTCAATGAATGAGA	48
2	rs9905346snF	tctctctctctctctctctctctctctctctctCTGAAGGCACTTTCAACTCAG	52
2	rs2270734snF	ctctctctctctctctctctctctctctctctCAACTCTGCTTTGAACTGTC	52
2	rs883010snR	tctctctctctctctctctctctctctctctctAGAGTATGTCACCTTATTTACAGT	56
2	rs17119330snF	ctCACCTTGTACATAAAAGGTGCC	60

References

- Adcock, I.M., Peters, M., Gelder, C., Shirasaki, H., Brown, C.R., Barnes, P.J., 1993. Increased tachykinin receptor gene expression in asthmatic lung and its modulation by steroids. *J. Mol. Endocrinol.* 11, 1–7.
- Aliakbari, J., Sreedharan, S.P., Turck, C.W., Goetzl, E.J., 1987. Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1440–1445.
- Almeida, T.A., Rojo, J., Nieto, P.M., Pinto, F.M., Hernandez, M., Martín, J.D., Candenás, M.L., 2004. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 11, 2045–2081.
- Arnold, R., Mäueler, W., Bassili, G., Lutz, M., Burke, L., Epplen, T.J., Renkawitz, R., 2000. The insulator protein CTCF represses transcription on binding to the (gt)(22)(ga)(15) microsatellite in intron 2 of the HLA-DRB1(*)0401 gene. *Gene* 253, 209–214.
- Barnes, K.C., 1999. Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy. *Clin. Exp. Allergy* 29, 47–51.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265.
- Belvisi, M.G., 2003. Sensory nerves and airway inflammation: role of A delta and C-fibres. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 16, 1–7.
- Bisgaard, H., Bonnelykke, K., Sleiman, P.M., Brasholt, M., Chawes, B., Kreiner-Møller, E., Stage, M., Kim, C., Tavendale, R., Baty, F., Pipper, C.B., Palmer, C.N., Hakonarsson, H.,

2009. Chromosome 17q21 gene variants are associated with asthma and exacerbations but not atopy in early childhood. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 179–185.
- Bouzigon, E., Corda, E., Aschard, H., Dizier, M.H., Boland, A., Bousquet, J., Chateigner, N., Gormand, F., Just, J., Le Moual, N., Scheinmann, P., Siroux, V., Vervloet, D., Zelenika, D., Pin, I., Kauffmann, F., Lathrop, M., Demenais, F., 2008. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. *N Engl J. Med.* 359, 1985–1994.
- Cardell, L.O., Uddman, R., Edvinsson, L., 1994. Low plasma concentrations of VIP and elevated levels of other neuropeptides during exacerbations of asthma. *Eur. Respir. J.* 7, 2169–2173.
- Chanez, P., Springall, D., Vignola, A.M., Moradoghli-Hattvani, A., Polak, J.M., Godard, P., Bousquet, J., 1998. Bronchial mucosal immunoreactivity of sensory neuropeptides in severe airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 985–990.
- Chavolla-Calderón, M., Bayer, M.K., Fontán, J.J., 2003. Bone marrow transplantation reveals an essential synergy between neuronal and hemopoietic cell neurokinin production in pulmonary inflammation. *J. Clin. Invest.* 111, 973–980.
- Comings, D.E., MacMurray, J.P., 2000. Molecular heterosis: a review. *Mol. Genet. Metab.* 71, 19–31.
- Daoui, S., Naline, E., Lagente, V., Emonds-Alt, X., Advenier, C., 2000. Neurokinin B- and specific tachykinin NK(3) receptor agonists-induced airway hyperresponsiveness in the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 130, 49–56.
- Feistritz, C., Clausen, J., Sturn, D.H., Djanani, A., Günsilius, E., Wiedermann, C.J., Kähler, C.M., 2003. Natural killer cell functions mediated by the neuropeptide substance P. *Regul. Pept.* 116, 119–126.
- Flores, C., Ma, S.F., Maresso, K., Ober, C., Garcia, J.G., 2007. A variant of the myosin light chain kinase gene is associated with severe asthma in African Americans. *Genet. Epidemiol.* 31, 296–305.
- Gillies, S., Haddley, K., Vasilou, S., Bubb, V.J., Quinn, J.P., 2009. The human neurokinin B gene, TAC3, and its promoter are regulated by Neuron Restrictive Silencing Factor (NRSF) transcription factor family. *Neuropeptides* 43, 333–340.
- Grant, A.D., Akhtar, R., Gerard, N.P., Brain, S.D., 2002. Neurokinin B induces oedema formation in mouse lung via tachykinin receptor-independent mechanisms. *J. Physiol.* 543, 1007–1014.
- Greco, S.J., Corcoran, K.E., Cho, C.J., Rameshwar, P., 2004. Tachykinins in the emerging immune system: relevance to bone marrow homeostasis and maintenance of hematopoietic stem cells. *Front. Biosci.* 9, 1782–1793.
- Groneberg, D.A., Harrison, S., Dinh, Q.T., Geppetti, P., Fischer, A., 2006. Tachykinins in the respiratory tract. *Curr. Drug Targets* 7, 1005–1010.
- Heaney, L.G., Cross, L.J., McGarvey, L.P., Buchanan, K.D., Ennis, M., Shaw, C., 1998. Neurokinin A is the predominant tachykinin in human bronchoalveolar lavage fluid in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 53, 357–362.
- Ho, W.Z., Lai, J.P., Zhu, X.H., Uvaydova, M., Douglas, S.D., 1997. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J. Immunol.* 159, 5654–5660.
- Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N.J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., Lindner, T.H., Mashima, H., Schwarz, P.E., del Bosque-Plata, L., Horikawa, Y., Oda, Y., Yoshiuchi, I., Colilla, S., Polonsky, K.S., Wei, S., Concannon, P., Iwasaki, N., Schulze, J., Baier, L.J., Bogardus, C., Groop, L., Boerwinkle, E., Hanis, C.L., Bell, G.I., 2000. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 26, 163–175.
- Howarth, P.H., Springall, D.R., Redington, A.E., Djukanovic, R., Holgate, S.T., Polak, J.M., 1995. Neuropeptide-containing nerves in endobronchial biopsies from asthmatic and nonasthmatic subjects. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13, 288–296.
- Joos, G.F., Germonpré, P.R., Pauwels, R.A., 2000. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 55, 321–337.
- Klassert, T.E., Pinto, F., Hernández, M., Candenas, M.L., Hernández, M.C., Abreu, J., Almeida, T.A., 2008. Differential expression of neurokinin B and hemokinin-1 in human immune cells. *J. Neuroimmunol.* 196, 27–34.
- Kraneveld, A.D., Nijkamp, F.P., 2001. Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1629–1650.
- Lai, J.P., Douglas, S.D., Rappaport, E., Wu, J.M., Ho, W.Z., 1998. Identification of a delta isoform of preprotachykinin mRNA in human mononuclear phagocytes and lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 91, 121–128.
- Malerba, G., Pignatti, P.F., 2005. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J. Appl. Genet.* 46, 93–104.
- Moffatt, M.F., Kabesch, M., Liang, L., Dixon, A.L., Strachan, D., Heath, S., Depner, M., von Berg, A., Bufer, A., Rietschel, E., Heinzmann, A., Simma, B., Frischer, T., Willis-Owen, S.A., Wong, K.C., Illig, T., Vogelberg, C., Weiland, S.K., von Mutius, E., Abecasis, G.R., Farrall, M., Gut, I.G., Lathrop, G.M., Cookson, W.O., 2007. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 448, 470–473.
- Nénan, S., Germain, N., Lagente, V., Emonds-Alt, X., Advenier, C., Boichot, E., 2001. Inhibition of inflammatory cell recruitment by the tachykinin NK(3)-receptor antagonist, SR 142801, in a murine model of asthma. *Eur. J. Pharmacol.* 421, 201–205.
- Nieber, K., Baumgarten, C.R., Rathsack, R., Furkert, J., Oehme, P., Kunkel, G., 1992. Substance P and beta-endorphin-like immunoreactivity in lavage fluids of subjects with and without allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90, 646–652.
- Page, N.M., Bell, N.J., Gardiner, S.M., Manyonda, I.T., Brayley, K.J., Strange, P.G., Lowry, P.J., 2003. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 6245–6250.
- Patacchini, R., Maggi, C.A., 2001. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. Eur. J. Pharmacol.* 429, 13–21.
- Pennefather, J.N., Lecci, A., Candenas, M.L., Patak, E., Pinto, F.M., Maggi, C.A., 2004. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 74, 1445–1463.
- Pinto, F.M., Almeida, T.A., Hernandez, M., Devillier, P., Advenier, C., Candenas, M.L., 2004. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur. J. Pharmacol.* 494, 233–239.
- Rogers, A.J., Raby, B.A., Lasky-Su, J.A., Murphy, A., Lazarus, R., Klanderma, B.J., Sylvia, J.S., Ziniti, J.P., Lange, C., Celedón, J.C., Silverman, E.K., Weiss, S.T., 2009. Assessing the reproducibility of asthma candidate gene associations, using genome-wide data. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 1084–1090.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez, J.J., Phillips, C., Børsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila, M., Harrison, C.D., Musgrave-Brown, E., Salas, A., Syndercombe-Court, D., Schneider, P.M., Carracedo, A., Morling, N., 2006. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 27, 1713–1724.
- Schuilting, M., Zuidhof, A.B., Zaagsma, J., Meurs, H., 1999. Involvement of tachykinin NK1 receptor in the development of allergen-induced airway hyperreactivity and airway inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 423–430.
- Shao, C., Suzuki, Y., Kamada, F., Kanno, K., Tamari, M., Hasegawa, K., Aoki, Y., Kure, S., Yang, X., Endo, H., Takayanagi, R., Nakazawa, C., Morikawa, T., Morikawa, M., Miyabayashi, S., Chiba, Y., Karahashi, M., Saito, S., Tamura, G., Shirakawa, T., Matsubara, Y., 2004. Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet.* 49, 115–122.
- Shima, Y., Teruya, K., Ohta, H., 2006. Association between intronic SNP in urate-anion exchanger gene, SLC22A12, and serum uric acid levels in Japanese. *Life Sci.* 79, 2234–2237.
- Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Iniesta, R., Moreno, V., 2006. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22, 1928–1929.
- Springer, J., Groneberg, D.A., Pregla, R., Fischer, A., 2005. Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. *Regul. Pept.* 124, 195–201.
- Torres-Galván, M.J., Quiralte, J., Blanco, C., Castillo, R., Carrillo, T., Pérez-Aciego, P., Sánchez-García, F., 2000. Pocket 4 in the HLA-DRB1 antigen-binding groove: an association with atopy. *Allergy* 55, 398–401.
- Uitterlinden, A.G., Burger, H., Huang, Q., Yue, F., McGuigan, F.E., Grant, S.F., Hofman, A., van Leeuwen, J.P., Pols, H.A., Ralston, S.H., 1998. Relation of alleles of the collagen type I alpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J. Med.* 338, 1016–1021.
- Vercelli, D., 2003. Genetic polymorphism in allergy and asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 609–613.

Tachykinins and neurokinin receptors in bone marrow functions: neural-hematopoietic link

Tilman E Klassert^{1,2}
Shyam A Patel^{1,3}
Pranela Rameshwar¹

¹Department of Medicine – Division of Hematology/Oncology, New Jersey Medical School, ³Graduate School of Biomedical Sciences, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ, USA; ²Instituto de Enfermedades Tropicales y Salud Pública, University of La Laguna, Canary Islands, Spain

Abstract: After many decades of neuropeptide research, advances in the field of tachykinins have considerably increased and revealed their implications in several physiological processes. In this review we focus on the role of the tachykinins in the regulation of hematopoietic functions. Evidence has shown that neural control of this process is emerging as a significant category in hematopoietic modulation. In the context of this regulation, we discuss the existence of a complex network involving the neurokinin receptors, tachykinins and cytokines. This network is tightly regulated by each of its components.

Keywords: hematopoiesis, tachykinins, neurokinin receptor, crosstalk, regulation

Introduction

The adult immune system arises from a definitive number of hematopoietic stem cells in the bone marrow (BM). This process, termed hematopoiesis, is orchestrated through a complex series of events, in which soluble factors play a critical role.¹ These soluble factors include cytokines, chemokines, neurohormones and neuropeptides.^{2–6} These mediators have been shown to be involved in the interactions between the brain, BM, and immune system, and known as the neural–hematopoietic–immune axis.⁵ Neural control of hematopoiesis is emerging as a central category in hematopoietic regulation. Bidirectional crosstalk between the neurological mediators and hematopoiesis has been demonstrated by various studies and has been shown to serve as a regulatory mechanism.^{5,6} This crosstalk mainly occurs by the release of neuropeptides termed tachykinins from innervated fibers. These neuropeptides interact with specific receptors on BM resident cells and release other hematopoietic regulators such as cytokines, forming a complex network that regulates hematopoiesis.^{5,6} This review focuses on the role of tachykinins and their receptors in hematopoiesis and discusses how their crosstalk and regulation allows for maintenance of homeostasis in the BM.

Tachykinins

Tachykinins comprise of a family of structurally related and evolutionary conserved peptides characterized by the common carboxy-terminal sequence FXGLM-NH₂.⁷ Substance P (SP), Neurokinin A (NKA) and Neurokinin B (NKB) are the best known members of this family. Von Euler and Gaddum identified the first tachykinin, SP, in 1931.⁸ Forty years later, it was chemically characterized by Chang and Leeman.⁹ In the mid-1980s, NKA and NKB were identified by multiple groups,^{10–12} and since then, tachykinins have been extensively studied for their roles in many pathological and physiological processes, including hematopoiesis.¹³

Correspondence: Pranela Rameshwar
UMDNJ-New Jersey Medical School,
MSB, Rm. E-579, 185 South Orange Ave,
Newark, NJ 07103, USA
Tel +1 973 972 0625
Fax +1 973 972 8854
Email rameshwa@umdnj.edu

The three known genes that encode mammalian tachykinins are *TAC1*, *TAC3*, and *TAC4*, also termed as preprotachykinin A (*PPT-A*), -B (*PPT-B*), and -C (*PPT-C*), respectively.⁷ *TAC1* encodes SP, NKA, and the extended forms of NKA (NPK and NP γ). *TAC3* encodes for NKB, and the recently discovered *TAC4* gene encodes for the new tachykinin members, hemokinin-1 (HK-1), its N-terminally extended forms endokinin A (EKA), endokinin B (EKB), and the tachykinin-related peptides endokinin C (EKC), and endokinin D (EKD).^{7,14} Biosynthesis of the tachykinins includes posttranscriptional processing of these genes, leading to their different splice variants.¹⁵ Translation of these mRNAs and posttranslational processing ends with a peptide α -amidation and gives rise to the different tachykinins.^{16,17} The ultimate sequence is a deca- or undecapeptide for most of the tachykinins.^{15–17} Other smaller forms of each member of the tachykinin family can be generated by enzymatic degradation of endogenous enzymes. As an example, a 4-amino acid peptide (SP [1–4]) can be generated by digestion of SP with human BM-derived endopeptidase.¹⁸ This small peptide showed negative effects on hematopoietic regulation, which contrasted the stimulatory effect SP.^{5,18} This underscores the complex functions of tachykinins, which could occur in multiple tissues and organs.

Tachykinins are widely distributed within both the central and the peripheral nervous system.⁷ Despite the initial consideration of tachykinins as neuropeptides, tachykinins have been shown to be not merely restricted to nerves, as their expression has been identified in non-neural tissues including cells of the BM and mature blood cells.^{7,19,20} In fact, the recently discovered third tachykinin gene *TAC4* is predominantly expressed in nonneural tissues.²⁰ The tachykinins can be considered as soluble links between the nervous system and other organs. As an example, the tachykinins have been shown to mediate a link within the neural–immune–hematopoietic axis.^{5,21}

The wide distribution of the tachykinins has implicated this family of peptides with several other physiological and pathological processes. However, this review will focus on the tachykinins as hematopoietic modulators. Functional homeostasis by members of the tachykinins include processes of reproduction, blood pressure and nociception.^{15,22} The major tachykinin, SP, has been associated to varied pathological processes, such as its facilitating role in HIV-1 infection and hematological and nonhematological malignancies.^{15,23,24} Due to the presence of the tachykinins in the neural system, it is not a surprise that this family of peptides would be linked to neurological conditions, such as depression, anxiety,

Parkinson's disease and Alzheimer's diseases.^{25–27} The tachykinins have also been implicated in traumatic brain injury, ischemic encephalopathy and epileptic seizures.^{28–30} Most of the biological actions of tachykinins are exerted by their binding to the NK receptors.¹⁵

Neurokinin receptors

Neurokinin receptors belong to family 1 (rhodopsin-like) of G protein-coupled receptors (GPCRs), which play a key role in cell signaling.^{31,32} GPCRs are characterized by sharing the same structural motif, including seven hydrophobic transmembrane domains with three extracellular loops and three intracellular loops.^{32–34} GPCRs are able to recognize a variety of ligands and stimuli from the extracellular environment and transmit information to the interior of the cell by interacting with the G-proteins. By activation of second messengers, GPCRs regulate a highly interconnected network of chemical pathways.³⁵ The importance of these receptors becomes apparent since half of the commercially available drugs target the superfamily of GPCRs.¹⁵

Currently, three different NK receptors have been identified, named NK1, NK2 and NK3. Although naturally occurring tachykinins can act as full agonists on any of the NK receptors, SP and HK-1 exhibit preferential binding to the NK1 receptor, whereas NKA and NKB show more affinity to NK2 and NK3 receptors, respectively.^{15,34} Three different genes termed *TAC1R*, *TAC2R*, and *TAC3R* encode for the NK1, NK2, and NK3 receptors, respectively.^{31,34} These evolutionary conserved genes contain five exons interrupted by introns. Interestingly, the feature to retain introns is rather uncommon in the superfamily of GPCRs. Nevertheless, this characteristic of the neurokinin receptors permits the generation of functionally different splice variants, which have been observed for both NK1 and NK2 receptors.¹⁵ For example, two different *TAC1R* isoforms have been described differing in the length of their C-terminal tails, and thus in their functional properties.^{36,37} Recent studies have related the expression of these isoforms to innate immunity and HIV neuropathogenesis.^{38,39}

The tachykinin NK1 receptor is ubiquitously expressed in mammals and has been found in neurons, vascular endothelium, muscle, different immune cells, and BM, among others.^{7,19,35} The tachykinin NK2 receptor is mostly expressed in peripheral tissues with restricted expression in the central nervous system (CNS).³⁴ Finally, the tachykinin NK3 receptor is preferentially expressed in the CNS.³⁴ Regarding hematopoietic cells, NK1 and NK2 expression

has been established in mature immune cells, hematopoietic progenitors, mesenchymal stem cells (MSCs) and BM stroma.^{13,19}

Reports of tachykinin-mediated processes which seem to be NK receptor-independent,⁴⁰ and the recent identification of novel tachykinins²² have reopened the question about the existence of a fourth NK receptor. While attempts to find additional NK receptors have been unsuccessful, the question remains a focal point due to the identification of tachykinins that appear to interact with receptors other than those of the NK family; and crosstalk between NK receptor subtypes in human models of hematopoiesis.⁴¹

The intracellular signaling pathways following NK1 and NK2 activation are complex, similar to all GPCRs. Among the possible intracellular signaling pathways activated by GPCRs, NK1 and NK2 activation has been shown to evoke both calcium (Ca^{2+}) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) responses.⁴²⁻⁴⁴ The primary G-protein responsible for Ca^{2+} triggering pathways is $\text{G}\alpha_q$, whereas $\text{G}\alpha_s$ activates adenylate cyclases.⁴⁴ NK receptors can also bind $\text{G}\alpha_i$, which inhibits the adenylate cyclases.³⁵ Downstream mediators of the different NK-induced pathways include protein kinases A (PKA) and C (PKC), Ras, Raf-1, MAP/ERK kinase (MEK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and $\text{NF}\kappa\text{B}$.⁴⁴⁻⁴⁶ Recently, a new NK1 receptor signaling cascade via phosphoinositide-3 kinase (PI3K)-Akt has been demonstrated in studies with mouse dendritic cells.⁴⁷ Similar activation has been reported for human non-tumorigenic breast cells.⁴⁸ Nevertheless, classic NK1 receptor signaling mostly involves phospholipase C (PLC) as a second messenger producing inositol triphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG), with the downstream release of Ca^{2+} and PKC activation. These findings suggest that $\text{G}\alpha_q$ is the dominant G-protein subunit in NK1 activation.⁴⁶ Ca^{2+} response also seems to be the preferential pathway in NKA/NK2-receptor activation.⁴⁴ However, it should be noted that these studies were performed in cell lines, which are by definition, cells with a degree of transformation. These findings will need to be taken speculatively in studying primary cells, which might show tissue specificity. The intracellular signal transduction pathways of NK receptor signaling could be subjected to termination by a variety of GPCR kinases (GRKs) and second messenger-regulated kinases.⁴⁹ This could occur by the phosphorylation of the NK receptors and recruitment of the cytosolic scaffolding proteins arrestins to prevent additional interactions.⁵⁰ The recruitment of the arrestins could be linked to receptor recycling, although the method of recycling might be cell-specific.^{51,52}

The ability of NK receptors to activate different effector systems has been explained, at least in part, by the finding that GPCRs exist in equilibrium between different active conformations.^{15,53} In this multistate model of GPCR activation, both the extracellular microenvironment and also the ligand seem to condition the conformation adopted by the receptor and thus the activation of one or more pathways.¹⁵ This has been demonstrated for the NK1 receptor, after observing its different binding affinities to either SP or the nonnatural ligands NKA and Septide.⁵⁴ Similar evidence has been shown for the NK2 receptor, where the truncated form of NKA (NKA-(4-10)) evokes only a Ca^{2+} response whereas the binding of naturally occurring, full-length, NKA caused the accumulation of cAMP.⁴⁴ Despite the experimental studies with ligands, the limiting factor for functions could be the receptor. This is demonstrated by *in vitro* studies on hematopoiesis with human bone marrow cells. Stimulation with the tachykinins and in the presence, or absence of, receptor antagonists indicated that the receptor, and not the ligand limits the function of the particular ligand.^{5,6,55,56} If SP interacts with NK1 by *in vitro* studies, the outcome recapitulates hematopoietic stimulation.⁵⁵ Similar stimulation with NKA through NK2 resulted in the opposite outcome.⁵⁶

Hematopoiesis

Hematopoiesis is the process by which blood and immune cells are generated from hematopoietic stem cells (HSCs) by differentiation along multiple lineages.^{57,58} HSCs can self-renew and can show long-term repopulation of an animal's immune system. The HSCs are located in low O_2 regions of the BM, close to the endosteum.⁵⁹ Long-term reconstituting HSCs can give rise to short-term repopulating cells, which then yield common lymphoid progenitors (CLPs) and common myeloid progenitors (CMPs), with each being able to differentiate along multiple lineages to produce both immune and blood cells.⁶⁰ CLP gives rise to B cells, T cells, and natural killer cells whereas CMP produces erythrocytes, megakaryocytes, monocytes, basophils, neutrophils and eosinophils.^{13,58} The process of hematopoiesis is tightly regulated at several levels by a complex network of soluble factors, including cytokines and neuropeptides.¹³

The regulation of hematopoiesis involves functional support of HSCs by the BM niche.^{1,61} This niche could stimulate hematopoiesis as well as exert negative feedback to maintain homeostasis in BM. As an example, MSCs, can negatively regulate hematopoiesis via the generation of adipocytes.^{61,62} This role of MSCs is important when one considers that MSCs are located around the main blood

vessels of the marrow cavity where they are bypassed by cells entering and exiting the marrow.^{5,63} Another important role for MSCs is their ability to differentiate into two of the hematopoietic-supporting cells, stroma and osteoblasts.⁶⁴ These hematopoietic-supporting cells are located near the endosteal area of the bone in a relatively hypoxic microenvironment.^{1,65} Although *in vitro* studies have demonstrated a significant role of NK receptors and the tachykinins in the functions of stroma in hematopoietic regulation, further studies are required with *in vivo* models. These studies are particularly important because stromal cell interactions with HSCs are relevant to the functions of HSCs, such as migration and progenitor expansion versus hematopoietic reconstitution.^{66,67} It appears that there is heterogeneity among stromal cells in the BM and this is relevant to stromal interaction with the HSCs.⁶⁸ This finding is significant because it lends itself to future studies geared towards determining if subsets of stroma show varied expressions of NK receptors.

Hematopoiesis is regulated by soluble regulators such as cytokines, chemokines, and growth factors.¹ Cytokines are the prototypical regulators of hematopoiesis.² The hormone erythropoietin is also important to hematopoietic regulation, in particular in the erythroid phase.² Significant cytokines that are linked to the tachykinins include stimulatory interleukins (ILs) such as IL-1, IL-3, IL-6, IL-11 or the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α), and inhibitory factors such as macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and transforming growth factor- β (TGF- β), among others.^{2,5,69} Similarly, SP is linked to the receptor/ligand interaction between stem cell factor (SCF) and c-kit, which has trophic effects on hematopoiesis.⁷⁰ Cytokines are not only relevant to specific sites of hematopoiesis, but they are important across the cavity, where various maturational stages of hematopoietic progenitors can be located. Gradient changes of growth factors are significant to the outcome of hematopoiesis.^{71,72} Among the functions of cytokines is the role of matrix metalloprotease activity that regulates the decision of HSCs to retain cell cycle quiescence or to exit the cycling state.⁷³ The discussion in this section is not only relevant to hematopoietic homeostasis, but to hematopoietic failure pathologies, such as leukemias and myeloproliferative disorders. Appreciation of the relevance of cytokines and other factors requires studies on the tachykinins and neurokinins to enhance and understand BM functions.

The literature on BM innervation by the sympathetic and peptidergic fibers have led to deeper insights into the neural role of hematopoietic regulation.^{74,75} Since evidence has

shown that neuropeptides, neurotransmitters, neurotrophic factors and neurohormones are involved in hematopoiesis, neural control of this process is emerging as another category in hematopoietic regulation.^{3–5,75–78} Moreover, it has been shown that peptides of neural origin establish a network with classical regulators of hematopoiesis.⁶ This network connects the BM, brain, and the immunological system, and these regulators demonstrate intercellular crosstalk.

Tachykinins in the neural–hematopoietic–immune axis

The links among the brain, BM and immune system were established by anatomical studies.^{5,79,80} An understanding of these interorgan links is important to appreciate how the tachykinins could be involved in the loss of homeostasis, which could be due to BM-derived dysfunction or the movement of malignant cells in the BM. This section will link the varied dissected information on the tachykinins to hematopoiesis and immune functions⁸¹ (Figure 1). The BM receives innervations by substance P-secreting neurons, as well as other neurotransmitters.⁸² The nervous system may serve as the source of upsurge in hematopoiesis, which is then fine-tuned by cytokine signaling.⁵

A well-studied receptor/ligand interaction that is involved in the functions of HSCs is the chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1 or CXCL12), and its receptor, CXCR4.¹ CXCL12 also regulates inflammation, and disruption studies of CXCL12–CXCR4 by the antagonist AMD3100 have demonstrated that this ligand-receptor pair is important in the mobilization of HSCs from BM to the periphery.^{72,80,83,84} SDF-1 also contributes to cell migration, cell survival and angiogenesis.⁸⁵ An increase in CXCL12 could lead to hematological malignancies, as well as the metastasis of cancer cells to BM.^{72,85} If CXCL12 is relevant to BM functions, the question is how its biology can be facilitated by the tachykinins.

In vitro studies with cells from human BM aspirates strongly suggest that the neural-hematopoietic-immune axis could involve a crosstalk between CXCL12 and *TAC1* peptides.⁸⁰ Functions of CXCL12 on BM homeostasis are not limited to hematopoietic regulation, they are also involved in the pathology of BM. The role of CXCL12 appears to be secondary to the induction of *TAC1*, and this could lead to the entry of human breast cancer cells into BM.^{81,86} Both breast cancer cells and hematopoietic cells demonstrate constitutive expression of *TAC1*.⁸¹ The roles for *TAC1* in angiogenesis, metastasis and survival of cancer cells are significant for entry of human cancer cells to BM.⁸¹ While CXCL12 is discussed

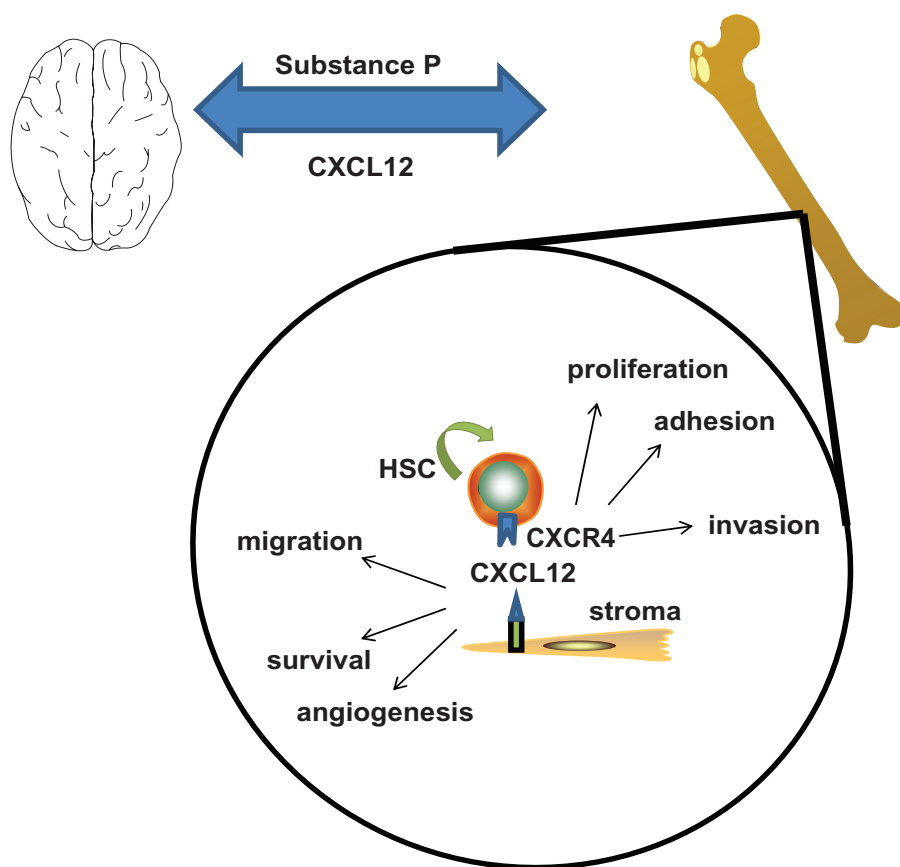


Figure 1 Neural control of hematopoiesis involves bidirectional interactions between the brain and bone marrow.

Notes: This connection with the immune system is referred to as neural-immune-hematopoietic axis. Hematopoietic stem cells (HSCs) interact with cells of the bone marrow (BM) microenvironment (eg, stroma) through CXCR4 and membrane-bound SDF-1 on cells of the microenvironment. Disruption of this interaction can cause the migration of self-renewing HSCs from the BM. Increased production of SDF-1 could be linked to hematological disorders due to its role in angiogenesis and cell survival.

in this section, expression of other cytokines may also be secondary to the expression of *TAC1* and *NK* receptors.⁸¹ The oncogenic properties of *TAC1* involve the loss of the tumor suppressor gene *REST*.⁸⁶

In addition to CXCL12, SP can mediate an increase in the production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in human BM mononuclear cells.^{73,87} This growth factor could be important in the mobilization of HSCs, and might act in concert with CXCL12.⁸⁷ In summary, this section describes a role for *TAC1* in BM functions during homeostasis, mobilization of HSCs and metastasis of breast cancer into BM; underscoring the emerging role of the tachykinins in BM functions.

Tachykinins and neurokinin receptors in hematopoiesis

Experimental studies with human BM aspirates from healthy subjects and patients with myeloproliferative disorders,

with or without fibrosis, showed relevance for NK1 and NK2 in BM homeostasis and during dysfunctions.^{5,13,18,88} The most reported tachykinins involved in hematopoiesis are SP and NKA.^{5,13} These *TAC1* peptides can be present in BM through two sources: release by the innervating nerve fibers; and the production in resident human BM cells such as endogenous stromal cells.^{89–91} The role of SP and NKA in hematopoiesis is mostly based on *in vitro* studies with human BM aspirates of healthy subjects.^{13,18} The findings, however, have been extrapolated to studies with patients' aspirates and peripheral blood, which indicated that substance P is important in the pathology of the BM.^{5,13,88} HK-1, a tachykinin from *TAC4*, has also been implicated in B- and T-cell human lymphopoiesis, again, by *in vitro* methods.^{13,92}

SP and NKA have been shown to regulate hematopoiesis at various stages of the hematopoietic hierarchy.¹³ These studies have been demonstrated with human and murine BM cells.^{5,75,93} Studies with a murine model on the lymphoid

lineage have demonstrated a role for SP in B-cell maturation.⁹³ In the erythro-myeloid lineage, SP mediates stimulatory effects on their progenitors.^{5,13} Contrary to SP, NKA exerts diverse effects on erythroid progenitors and inhibits proliferation of granulocytic-monocytic progenitors.^{13,56} Together, these findings indicate that the *TAC1* gene can regulate hematopoiesis not only through stimulatory effects, but also through its own negative feedback.^{6,41,56,94} This conclusion is supported by studies with human cells that correlate with the production of relevant cytokines.^{5,6} However, the significance of these studies require more in-depth analysis with molecular approaches as well as *in vivo* models with knockout and transgenic mice.

To date, the experimental studies on the role of the hematopoietic microenvironment indicate that BM stroma could be a critical cellular link in the crosstalk between the tachykinins and hematopoiesis.^{5,56} (Figure 2A). *In vitro* studies with stroma from human BM aspirates have shown that each tachykinin induces the production of specific cytokines.^{5,55,56} SP interacts with NK1 on the human stromal cells or human BM mononuclear cells to induce the production of stimulatory mediators such as IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α , SCF and GM-CSF.^{5,87,95-102} The proliferative effects observed by SP-NK1 coupling on hematopoietic cells are therefore partly explained by indirect production of cytokines and growth factors involved, among other processes, in cell-cycle transition.⁸² On the other hand, NKA may be relevant to cell cycle control via checkpoint regulation, potentially conferring protective effects on HSCs.¹⁰³ NKA induces the release, by stromal cells, of the inhibitory cytokines MIP-1 α and TGF- β .⁵⁶ Recently, a direct NK2-mediated regulation mechanism has also been described, by which NKA inhibits cell-cycle transition in the human hematopoietic progenitor cell line K562.¹⁰⁴ Although NK2 is expected to activate G-protein-linked pathways, the effect of NKA on K562 occurs through Smad proteins. This finding is highly suggestive that there could be intracellular crosstalk between NK2 and other activators. The interaction between NKA and NK2 leads to the activation of the cell cycle inhibitors, p53, p21 and Smad4, while suppressing the cell cycle activators Cdk2 and CyclinA.¹⁰⁴

Neurokinin receptor crosstalk in hematopoietic functions

The effects of NK1 and NK2 on hematopoiesis are divergent.^{6,41,94} NK1 mediates the production of cytokines linked to hematopoietic stimulation, whereas NK2 activation induces inhibitory mediators.^{5,56} Therefore, it seems

logical that the expression of either NK1 or NK2 could determine the outcome of hematopoietic functions. Indeed, co-expression of both receptors is not observed in most human BM resident cells, in particular the stromal cells.^{6,41} Moreover, the induction of one NK subtype correlates with a decrease of the other subtype, showing a “yin-yang” type of expression, at least in human stromal cells.⁸² This is relevant to hematopoietic functions since the stromal cells are critical in the support of hematopoiesis.

Neurokinin receptors have been shown to be able to regulate their own expression (Figure 2B). SP-NK1 interaction can induce *TAC1R* transcription, a process mediated by the activation and translocation to the nucleus of NF κ B.^{82,105} Cytokines induced by NK1 activation, such as IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF, can constitute an indirect stimulation method of NK1 receptor production.^{41,105} The regulatory region of NK1 indicated that binding sites for NF κ B and cAMP response element (CRE) are important in controlling the responses to cytokines in the induction of NK1.^{105,106} Recently, auto-regulation of the NK2 receptor was also noted. In both primary BM cells and progenitor cells, NK2 receptor activation by NKA leads to increased expression of its own mRNA.¹⁰³ In this case, *TAC2R* transcription seems to be mediated by p53 activation and its binding to the gene promoter.¹⁰³ The induction of the NK2 receptor by NKA is also regulated by autocrine production of TGF- β in stroma.⁴¹

The complex biology of the NK receptors is compounded by evidence of intracellular crosstalk between the subtypes within primary human BM stroma.⁴¹ Use of a specific NK2 receptor antagonist in an *in vitro* model of human hematopoiesis, resulted in enhanced hematopoietic response by SP.⁴¹ These studies indicated that in the absence of NK2, the balance in hematopoietic function by NK1 is altered. The enhancement of hematopoietic activity correlated with NK1 receptor upregulation at both protein and mRNA levels.⁴¹ On the other hand, blunting of the NK1 receptor resulted in the reduction of cell proliferation, and upregulation of the NK2 receptor at both protein and mRNA levels.⁴¹ These results indicated the existence of intracellular crosstalk between NK1 and NK2 and this crosstalk is highly relevant to hematopoietic balance. The molecular mechanisms underlying intracellular crosstalk between NK1 and NK2 are under investigation and might hold the key to several disorders linked to diseases.

GPCR signaling generally involves the activation of different secondary messengers, such as PKC and PKA that can mediate receptor crosstalk.¹⁰⁷ This could occur by converging and/or counteracting signaling pathways

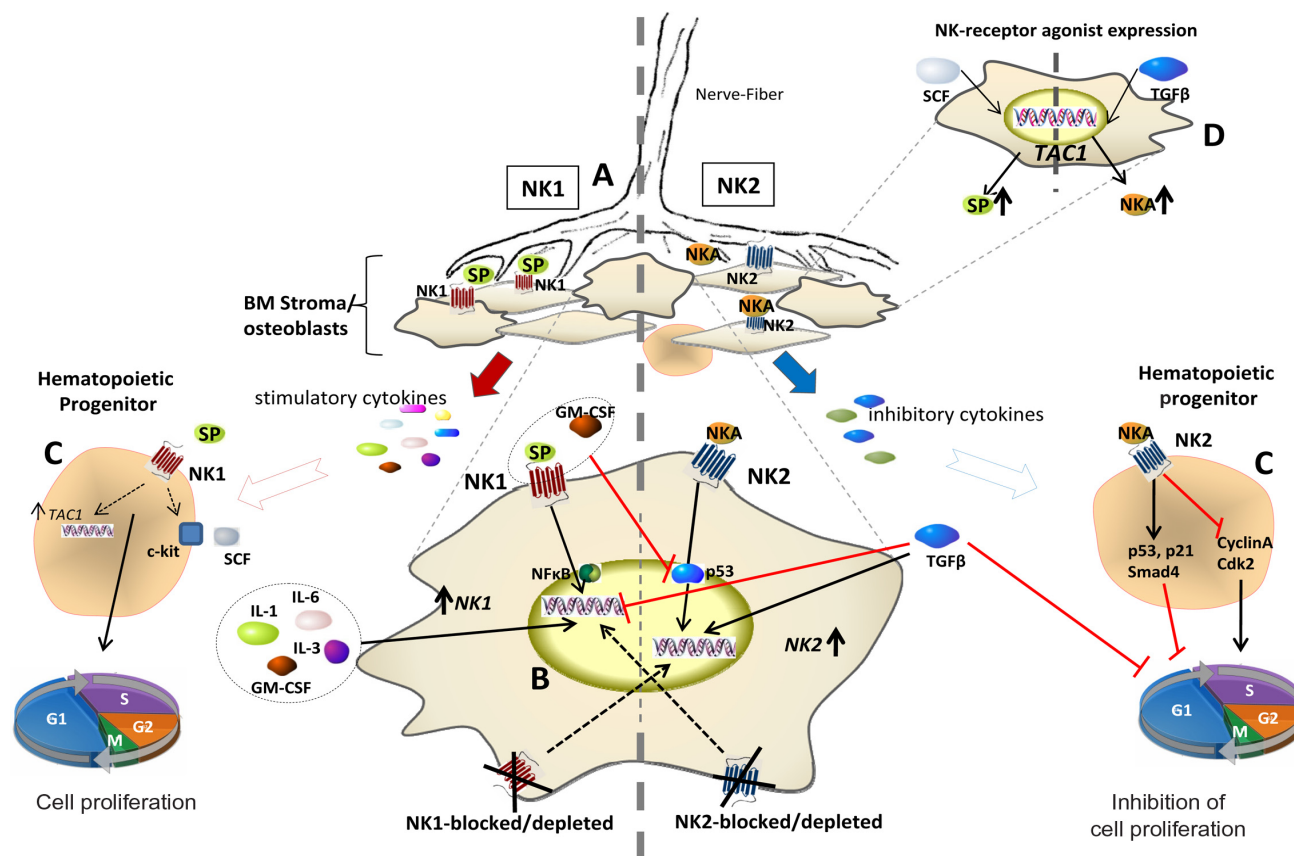


Figure 2 Illustration summarizes the involvement of NK receptors on hematopoietic regulation and the outcome of crosstalk between NK1 and NK2.

Notes: Left: shows the NK1-mediated stimulation; Right: NK2-mediated hematopoietic inhibition. Substance P (SP) interaction with NK1 leads to stroma-mediated production of stimulatory cytokines, and neurokinin-A (NKA) stimulation resulted in the release of inhibitory cytokines (A). Crosstalk between these receptors is partly explained by the expressions of NK1 and/or NK2, respectively. Expression of each gene is tightly regulated by SP, NKA and their induced cytokines (B). NK1 or NK2 expression causes hematopoietic stimulation or inhibition, respectively (C). The production of a particular TAC1 peptide depends on the ligand, SCF by SP and TGF-β by NKA (D). Black arrows depict upregulation; Red lines depict downregulation.

following receptor activation.^{108,109} As discussed above, several intracellular pathways can be activated by GPCRs. The activation of NK1 and NK2 mostly involve pathways that include Ca^{2+} and PKC.^{42,44} The activation of PKC leads to the downstream activation of ERK1/2 and NFκB.¹⁰⁹ In other studies, NK1 stimulation led to the activation of the PI3K-Akt pathway in dendritic cells.⁴⁷ This brings up a question of cell-specific signaling pathways in the activation of NK1 versus newly identified mechanisms from NK receptor activation. Similar pathways in activated macrophages suggest that the PI3K-Akt signaling pathway might be relevant to antigen presenting cells.¹⁰⁹ Furthermore, the importance the PI3K-Akt signaling pathway has been shown in NK1-mediated inflammatory responses, in macrophages, interacting with the PKC-ERK1/2-NFκB signaling pathway.¹⁰⁹

Beside NFκB, transcription factors binding CRE have also been shown to be implicated in NK1 regulation. These are downstream of the cAMP pathway, which is also linked to NK1 and NK2 activation.^{42,44,105} It has been suggested that

this pathway could also inhibit NK1 expression through the inducible cAMP early repressor (ICER).^{105,110} While it is important to map intracellular pathways that are activated by the NK receptors and to understand how these receptors are regulated, further insights will be gained by studies to decipher how these pathways interact with each other to regulate the biology of the NK subtypes within a milieu of factors such as inflammatory mediators.

Crosstalk between NK receptor subtypes can be partly explained by indirect cytokine-mediated regulation.^{5,82} We have already exposed how each receptor is able to induce its own expression by specific cytokines and transcription factors. Similarly, a particular NK receptor subtype can induce a specific cytokine to inhibit the expression of the other receptor subtype.^{41,103} These regulatory networks are important to functions. As an example, it has been demonstrated that SP and GM-CSF were able to negatively control the NKA-NK2-p53 induced stimulation of NK2 expression, with concomitant downregulation of p53 in a

human hematopoietic progenitor cell line.¹⁰³ On the other hand, TGF- β , an NK2-induced cytokine, can decrease the expression of NK1 in primary human BM stroma.⁴¹ Figure 2 shows the intricate interplay between tachykinins, cytokines and growth factors that leads to the expression of either NK1 or NK2 receptors, and thus, to either a stimulatory or an inhibitory effect on hematopoiesis. This interplay begins or terminates, depending on the context of the biological process, at the level of gene expression.

The regulation and crosstalk among the NK receptors is not limited to intracellular interactions, it also involves physical interactions at the cell membrane.¹¹¹ A discussion of how this occurs by other GPCRs could be extrapolated to NK receptor subtypes. For example, heterodimerization of the prostaglandin E₂ type-1 receptor (EP1R) and the β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) in airway smooth muscle cells can lead to uncoupling between β_2 AR and its G-protein to reduce the outcome of the natural ligand.¹¹¹ Further studies may explain whether GPCR dimerization plays a role in NK1 and NK2 intracellular crosstalk.

TAC1 peptides, SP and NKA, are the natural ligands which activate both the NK1 and the NK2 receptor.¹⁵ Thus, besides the regulation of the *TAC1R* and *TAC2R* genes, *TAC1* expression will also be a deciding factor in keeping the balance between NK1 and NK2 receptor mediated actions. At this level, CXCL12 has been shown to regulate *TAC1* expression and this effect is concentration-dependent, indicating that this chemokine exerts a fine control of *TAC1* expression.⁶³ The RE-1 silencer of transcription (REST) synergizes with NF κ B in *TAC1* repression in BM-derived MSCs.¹¹² Moreover, *TAC1* is known to give rise to different splice variants, a process which becomes a key factor for differential SP/NKA expression.^{24,34} It is unclear why a transcript that can produce both SP and NKA results in varying ratios of these two peptides. These are gaps in the biology of *TAC1* that need to be studied, since the level of SP and NKA are highly significant to the functional outcome of this gene.

The sequence coding for SP is localized on exon 3, which is present in all four *TAC1* transcripts (α , β , γ , and δ). Exon 6, which contains the sequence coding NKA, is present only in β - and γ -transcripts.³⁴ A possible model of *TAC1* regulation by miRNAs and RNA-binding proteins (RBPs) has been recently proposed in stromal cells.⁷⁹ Hematopoietic stimulatory cytokines, such as SCF and IL-11, and the inhibitory cytokine TGF- β were able to induce interaction between RBPs and *TAC1* mRNA. In both cases, specific *TAC1* miRNAs were degraded and downregulated; and the binding avidity of these RBPs to the RNA was

observed to be different in each case. Interestingly, the ratios of SP:NKA were different, with stimulatory cytokines leading to increased SP production and TGF- β , giving rise to higher levels of NKA (Figure 2D).⁷⁹ Since these studies were performed with BM stromal cells it is unclear if these findings can be extrapolated to other cell types without investigative studies.

The microenvironment in which the ligand-receptor interactions take place constitutes another level of signaling regulation. It houses a variety of extracellular matrix proteins, such as fibronectin, which are critical to HSC function and protection.^{5,88} Fibronectin can induce mobilization of SP to allow it to come into contact with HSCs. This phenomenon is relevant to BM homeostasis and hematopoiesis. Fibronectin also protects SP from degradation by endogenous endopeptidases.¹¹³ This has great importance since SP fragments derived from endopeptidase activity, such as SP(1–4), could exert hematopoietic regulation.¹⁸ Indeed, SP(1–4) has been shown to have inhibitory effects, and thus an opposite action to SP, on hematopoiesis.¹⁸

Taken together, this review discusses the existence of a complex network involving the neurokinin receptors, their ligands and cytokines. These parameters in this network are subjected to tight regulation, partly by receptor crosstalk at several levels. These NK receptor interactions may comprise: cytokine-mediated pathways; intracellular signaling; and molecular crosstalk. Regulation of this network has not only diverse physiological implications in the BM, but also pathological implications. Disruption of BM homeostasis has been linked to hematological disorders, such as BM fibrosis and leukemia.^{5,24} The current state of evidence warrants further research in this field.

Acknowledgment

This work was supported by the FM Kirby Foundation and the FPU grant AP2005-4921 to Tilman E. Klassert.

Disclosures

The authors report no conflicts of interest relevant to this research.

References

1. Patel N, Castillo M, Rameshwar P. An in vitro method to study the effects of hematopoietic regulators during immune and blood cell development. *Biol Proced Online*. 2007;(9):56–64.
2. Metcalf D. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 2008;111(2):485–491.
3. Van Hagen PM, Krenning EP, Kwekkeboom DJ, et al. Somatostatin and the immune and haematopoietic system: a review. *Eur J Clin Invest*. 1994;24(2):91–99.
4. Maestroni GJM. Adrenergic regulation of haematopoiesis. *Pharmacol Res*. 1995;32(5):249–252.

5. Greco SJ, Corcoran KE, Cho CJ, Rameshwar P. Tachykinins in the emerging immune system: relevance to bone marrow homeostasis and maintenance of hematopoietic stem cells. *Front Biosci.* 2004;(9):1782–1793.
6. Rameshwar P, Poddar A, Gascon P. Hematopoietic regulation mediated by interactions among the neurokinins and cytokines. *Leuk Lymphoma.* 1997;28(1–2):1–10.
7. Pinto FM, Almeida TA, Hernández M, Devillier P, Advenier C, Candenas, ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol.* 2004;494(2–3):233–239.
8. Von Euler US, Gaddum JH. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol (Lond).* 1931;72(1):74–87.
9. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino acid sequence of substance P. *Nature.* 1971;232(29):86–87.
10. Kimura S, Okada M, Sugita Y, Kanazawa I, Munekata E. Novel Neuropeptides, Neurokinin α and β , Isolated from Porcine Spinal Cord. *Proc Jpn Acad.* 1983;(59):101–104.
11. Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;114(2):533–540.
12. Nawa H, Doteuchi M, Igano K, Inouye K, Nakanishi S. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. *Life Sci.* 1984;34(12):1153–1160.
13. Liu K, Castillo MD, Murthy RG, Patel N, Rameshwar P. Tachykinins and hematopoiesis. *Clin Chim Acta.* 2007;385(1–2):28–34.
14. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(13):1652–1663.
15. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, et al. Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem.* 2004;11(15):2045–2081.
16. MacDonald MR, McCourt DW, Krause JE. Posttranslational processing of alpha-, beta-, and gamma-preprotachykinins. Cell-free translation and early posttranslational processing events. *J Biol Chem.* 1988;263(29):15176–15183.
17. Eipper BA, Stoffers DA, Mains RE. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Annu Rev Neurosci.* 1992;(15):57–85.
18. Joshi DD, Dang A, Yadav P, et al. Negative feedback on the effects of stem cell factor on hematopoiesis is partly mediated through neutral endopeptidase activity on substance P: a combined functional and proteomic study. *Blood.* 2001;98(9):2697–2706.
19. Klassert TE, Pinto F, Hernández M, et al. Differential expression of neurokinin B and hemokinin-1 in human immune cells. *J Neuroimmunol.* 2008;196(1–2):27–34.
20. Zhang Y, Berger A, Milne CD, Paige CJ. Tachykinins in the immune system. *Curr Drug Targets.* 2006;7(8):1011–1020.
21. Chavolla-Calderón M, Bayer MK, Fontán JJ. Bone marrow transplantation reveals an essential synergy between neuronal and hemopoietic cell neurokinin production in pulmonary inflammation. *J Clin Invest.* 2003;111(7):973–980.
22. Page NM, Bell NJ, Gardiner S, et al. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):6245–6250.
23. Ho WZ, Douglas SD. Substance P and neurokinin-1 receptor modulation of HIV. *J Neuroimmunol.* 2004;157(1–2):48–55.
24. Nowicki M, Ostalska-Nowicka D, Kondraciuk B, Miskowiak B. The significance of substance P in physiological and malignant haematopoiesis. *J Clin Pathol.* 2007;60(7):749–755.
25. Sudakov SK, Medvedeva OF, Rusakova IV, Terebilina NN, Goldberg SR. Differences in genetic predisposition to high anxiety in two inbred rat strains: role of substance P, diazepam binding inhibitor fragment and neuropeptide Y. *Psychopharmacol.* 2001;154(4):327–335.
26. Stockmeier CA, Shi X, Konick L, et al. Neurokinin-1 receptors are decreased in major depressive disorder. *Neuroreport.* 2002;13(9):1223–1227.
27. Rioux L, Joyce JN. Substance P receptors are differentially affected in Parkinson's and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1993;6(3):199–210.
28. Vink R, Nimmo AJ, Cernak I. An overview of new and novel pharmacotherapies for use in traumatic brain injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28(11):919–921.
29. Stumm R, Culmsee C, Schafer MK, Kriegstein J, Weihe E. Adaptive plasticity in tachykinin and tachykinin receptor expression after focal cerebral ischemia is differentially linked to gabaergic and glutamatergic cerebrocortical circuits and cerebrovenular endothelium. *J Neurosci.* 2001;21(3):798–811.
30. Liu H, Sankar R, Shin DH, Mazarati AM, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced substance P expression during development. *Neuroscience.* 2000;101(2):297–304.
31. Gerard NP, Bao L, Xiao-Ping H, Gerard C. Molecular aspects of the tachykinin receptors. *Regul Pept.* 1993;43(1–2):21–35.
32. Attwood TK. A compendium of specific motifs for diagnosing GPCR subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22(6):162–165.
33. Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *General Pharmacol.* 1995;26(5):911–944.
34. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 2004;74(12):1445–1463.
35. Ramkissoon SH, Patel HJ, Taborga M, Rameshwar P. G protein-coupled receptors in haematopoietic disruption. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(2):109–120.
36. Fong TM, Anderson SA, Yu H, Huang RRC, Strader CD. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Mol Pharmacol.* 1992;41(1):24–30.
37. Lai JP, Lai S, Tuluc F, et al. Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(34):12605–12610.
38. Tuluc F, Lai JP, Kilpatrick LE, Evans DL, Douglas SD. Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity. *Trends Immunol.* 2009;30(6):271–276.
39. Douglas SD, Lai JP, Tuluc F, Schwartz L, Kilpatrick LE. Neurokinin-1 receptor expression and function in human macrophages and brain: Perspective on the role in HIV neuropathogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1144(1):90–96.
40. Grant AD, Akhtar R, Gerard NP, Brain SD. Neurokinin B induces oedema formation in mouse lung via tachykinin receptor-independent mechanisms. *J Physiol.* 2002;543(3):1007–1114.
41. Bandari PS, Qian J, Oh HS, et al. Crosstalk between neurokinin receptors is relevant to hematopoietic regulation: cloning and characterization of neurokinin-2 promoter. *J Neuroimmunol.* 2003;138(1–2):65–75.
42. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides.* 1997;31(6):537–563.
43. Valant C, Maillet E, Bourguignon JJ, et al. Allosteric functional switch of neurokinin A-mediated signaling at the neurokinin NK2 receptor: structural exploration. *J Med Chem.* 2009;52(19):5999–6011.
44. Palanche T, Ilien B, Zoffmann S, et al. The neurokinin A receptor activates calcium and cAMP responses through distinct conformational states. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34853–34861.
45. Williams R, Zou X, Hoyle GW. Tachykinin-1 receptor stimulates proinflammatory gene expression in lung epithelial cells through activation of NF-kappaB via a G(q)-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(2):430–437.
46. Krause JE, Bu JY, Takeda Y, et al. Structure, expression and second messenger-mediated regulation of the human and rat substance P receptors and their genes. *Regul Pept.* 1993;46(1–2):59–66.
47. Janelins BM, Mathers AR, Tkacheva OA, et al. Proinflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood.* 2009;113(13):3017–3026.
48. Corcoran KE, Rameshwar P. Nuclear factor-kappaB accounts for the repressor effects of high stromal cell-derived factor-1alpha levels on Tac1 expression in nontumorigenic breast cells. *Mol Cancer Res.* 2007a;5(4):373–381.

49. Jorgensen R, Holliday ND, Hansen JL, et al. Characterization of G-protein coupled receptor kinase interaction with the neurokinin-1 receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol*. 2008;73(2):349–358.
50. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 3):455–465.
51. Bennett VJ, Perrine SA, Simmons MA. Neurokinin-1 receptor resensitization precedes receptor recycling. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(3):1347–1354.
52. Cottrell GS, Padilla B, Pikios S, et al. Ubiquitin-dependent down-regulation of the neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem*. 2006;281(38):27773–27783.
53. Vauquelin G, Van Liefde I. G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005;19(1):45–56.
54. Hastrup H, Schwartz TW. Septide and neurokinin A are high affinity ligands on the NK-1 receptor: evidence from homologous versus heterologous binding analysis. *FEBS Lett*. 1996;399(3):264–266.
55. Rameshwar P, Ganea D, Gascón P. In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood*. 1993;81(2):391–398.
56. Rameshwar P, Gascon P. Induction of negative hematopoietic regulators by neurokinin-A in bone marrow stroma. *Blood*. 1996;88(1):98–106.
57. Simmons PJ, Levesque JP, Zannettino AC. Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol*. 1997;10(3):485–505.
58. Zon LI. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood*. 1995;86(8):2876–2891.
59. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:759–806.
60. Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev*. 2007;21(23):3044–3060.
61. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259–263.
62. Sugimura R, Li L. Shifting in balance between osteogenesis and adipogenesis substantially influences hematopoiesis. *J Mol Cell Biol*. 2010;2(2):61–62.
63. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313–319.
64. Rodríguez JP, Astudillo P, Ríos S, Pino AM. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008;3(3):208–218.
65. Corcoran KE, Trzaska KA, Fernandes H, et al. Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow. *PLoS One*. 2008;3(6):e2563.
66. Matsuoka S, Tsuji K, Hisakawa H, et al. Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood*. 2001;98(1):6–12.
67. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81(11):2844–2853.
68. Müller-Sieburg CE, Deryugina E. The stromal cells' guide to the stem cell universe. *Stem Cells*. 1995;13(5):477–486.
69. Meunch MD, Schneider JG, Moore MAS. Interaction amongst colony stimulating factors, IL-1b, IL-6 and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 1992;20(3):339–349.
70. Grebien F, Kerenyi MA, Kovacic B, et al. Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood*. 2008;111(9):4511–4522.
71. North TE, de Bruijn MF, Stacy T, et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity*. 2002;16(5):661–672.
72. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106(6):1901–1910.
73. Corcoran KE, Patel N, Rameshwar P. Stromal derived growth factor-1alpha: another mediator in neural-emerging immune system through Tac1 expression in bone marrow stromal cells. *J Immunol*. 2007;178(4):2075–2082.
74. Tabarowski Z, Gibson-Berry K, Felten SY. Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. *Acta Histochem*. 1996;98(4):453–457.
75. Zhang Y, Paige CJ. T-cell developmental blockage by tachykinins antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. *Blood*. 2003;102(6):2165–2172.
76. Tsuda T, Wong D, Dolovich J, Bienenstock J, Marshall J, Denbury JA. Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation. *Blood*. 1991;77(5):971–979.
77. Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, et al. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nature Immunol*. 2002;3(5):477–482.
78. Bischoff SC, Dahinden CA. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood*. 1992;79(10):2662–2669.
79. Murthy RG, Greco SJ, Taborga M, Patel N, Rameshwar P. Tac1 regulation by RNA-binding protein and miRNA in bone marrow stroma: Implication for hematopoietic activity. *Brain Behav Immun*. 2008;22(4):442–450.
80. Corcoran KE, Malhotra A, Molina CA, Rameshwar P. Stromal-derived factor-1alpha induces a non-canonical pathway to activate the endocrine-linked Tac1 gene in non-tumorigenic breast cells. *J Mol Endocrinol*. 2008;40(3):113–123.
81. Singh D, Joshi DD, Hameed M, et al. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):388–393.
82. Kang HS, Trzaska KA, Corcoran K, Chang VT, Rameshwar P. Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004;52(5):338–347.
83. Perez LE, Alpdogan O, Shieh JH, et al. Increased plasma levels of stromal-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) enhance human thrombopoiesis and mobilize human colony-forming cells (CFC) in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2004;32(3):300–307.
84. Hattori K, Heissig B, Rafii S. The regulation of hematopoietic stem cell and progenitor mobilization by chemokine SDF-1. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(4):575–582.
85. Lapteva N, Yang AG, Sanders DE, Strube RW, Chen SY. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth *in vivo*. *Cancer Gene Ther*. 2005;12(1):84–89.
86. Reddy BY, Greco SJ, Patel PS, Trzaska KA, Rameshwar P. RE-1-silencing transcription factor shows tumor-suppressor functions and negatively regulates the oncogenic TAC1 in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4408–4413.
87. Rameshwar P, Ganea D, Gascon P. Induction of IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by substance P in bone marrow cells is partially mediated through the release of IL-1 and IL-6. *J Immunol*. 1994;152(8):4044–4054.
88. Rameshwar P, Joshi DD, Yadav P, et al. Mimicry between neurokinin-1 and fibronectin may explain the transport and stability of increased substance P-immunoreactivity in patients with bone marrow fibrosis. *Blood*. 2001;97(10):3025–3031.
89. Frasc C, Kravetz P, Mody DR, Heggeness MH. Substance P-containing nerves within the human vertebral body: an immunohistochemical study of the basivertebral nerve. *Spine J*. 2003;3(1):63–67.
90. Goto T, Tanaka T. Tachykinins and tachykinin receptors in the bone. *Microsc Res Tech*. 2002;58(1):91–97.
91. Rameshwar P, Gascon P. Neural regulation of hematopoiesis by the tachykinins. *Mol Biol Hemat*. 1996;5(5):463–470.
92. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, et al. Hemokinin is a hematopoietic specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol*. 2000;1(5):392–397.

93. Rameshwar P, Gascon P, Ganea D. Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol.* 1993;151(5):2484–2496.
94. Rameshwar P. Substance P: a regulatory neuropeptide for hematopoiesis and immune functions. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;85(2):129–133.
95. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science.* 1988;241(4870):1218–1221.
96. Laurenzi MA, Persson MAA, Dalgaard CJ, Haegerstrand A. The neuropeptide substance P stimulates production of interleukin I in human blood monocytes: Activated cells are preferentially influenced by the neuropeptide. *Scand J Immunol.* 1990;31(4):529–533.
97. Cozens PJ, Rowe FM. Substance P is a potent inducer of TNF and IL-1 secretion by macrophages. A potent role for TNF in the pathogenesis of asthma. *Immunobiology.* 1987;175:7–15.
98. Kimball ES, Persico FJ, Vaught JL. Substance P, neurokinin A, and neurokinin B induce generation of IL-1-like activity in P388D1 cells. Possible relevance to arthritic disease. *J Immunol.* 1988;141(10):3564–3569.
99. Wagner F, Fink R, Hart R, Dancygier H. Substance P enhances interferon- γ production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul Pept.* 1987;19(5–6):355–364.
100. Rameshwar P, Gascon P, Ganea D. Immunoregulatory effects of neuropeptides Stimulation of interleukin-2 production by Substance P. *J Neuroimmunol.* 1992;37(1–2):65–74.
101. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF- α gene expression in murine mast cells. *J Immunol.* 1993;150(10):4478–4485.
102. Rameshwar P, Gascon P. Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma: Potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. *Blood.* 1995;86(2):482–490.
103. Vishalakumar S, Patel H, Moharita AL, Harrison JS, Rameshwar P. The anti-proliferative effect of neurokinin-A on hematopoietic progenitor cells is partly mediated by p53 activating the 5' flanking region of neurokinin-2 receptor. *Cell Signal.* 2006;18(4):422–432.
104. Ricardo M, Trzaska KA, Rameshwar P. Neurokinin-A inhibits cell cycle activators in K562 cells and activates Smad 4 through a non-canonical pathway: a novel method in neural-hematopoietic axis. *J Neuroimmunol.* 2008;204(1–2):85–91.
105. Bandari PS, Qian J, Yehia G, et al. Differences in the expression of neurokinin receptor in neural and bone marrow mesenchymal cells: implications for neuronal expansion from bone marrow cells. *Neuropeptides.* 2001;36(1):13–21.
106. Simeonidis S, Castagliuolo I, Pan A, et al. Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF- κ B site on its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2957–2962.
107. Vazquez-Prado J, Casas-Gonzalez P, Garcia-Sainz JA. G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal.* 2003;15(6):549–557.
108. Yoshikawa T, Kanazawa H. Functional crosstalk between β_2 -adrenoreceptor and muscarinic acetylcholine receptor: implications for gene-gene interactions and bronchodilatory responses in patients with asthma and COPD. *Curr Pharmacogen Pers Med.* 2008;6(4):302–319.
109. Sun J, Ramnath RD, Tamizhselvi R, Bhatia M. Role of protein kinase C and phosphoinositide 3-kinase-Akt in substance P-induced proinflammatory pathways in mouse macrophages. *FASEB J.* 2009;23(4):997–1010.
110. Sassone-Corsi P. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;(11):355–377.
111. Barnes PJ. Receptor heterodimerization: a new level of cross-talk. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1210–1212.
112. Greco SJ, Smirnov SV, Murthy RG, Rameshwar P. Synergy between the RE-1 silencer of transcription and NF κ B in the repression of the neurotransmitter gene TAC1 in human mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2007;282(41):30039–30050.
113. Rameshwar P, Gascon P, Bandari PS, Joshi DD, Fernandes A, Dang A. Structural similarity between the bone marrow extracellular matrix protein and neurokinin 1 could be the limiting factor in the hematopoietic effects of substance P. *Can J Pharmacol Physiol.* 2002;80(5):475–481.

Journal of Receptor, Ligand and Channel Research

Publish your work in this journal

The Journal of Receptor, Ligand and Channel Research is an international, peer-reviewed, open access, online journal. The journal welcomes laboratory and clinical findings in the fields of biological receptors, ligands, channel and signal transduction research including: receptors and signalling; ligands; transporters, pores and channels; binding and activation; receptor

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/journal-of-receptor-ligand-and-channel-research-journal>

regulation; role of receptors in diseases and their treatment; molecular basis of membrane structure and functions; molecular models of membranes. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.