

# MEDICAMENTOS VIEJOS PARA ENFERMEDADES NUEVAS

ÁNGEL MARTÍN MUNICIO  
Real Academia de Ciencias

## INTRODUCCIÓN

Bajo este título se intenta desarrollar un tema que permite sacar a relucir una serie de innovaciones recientes de la moderna *biología molecular* y de su proyección sobre los mecanismos fundamentales de las enfermedades. Con esta idea, el *ácido acetilsalicílico* protagoniza estas innovaciones en cuanto a su intervención en el proceso biológico de la *inflamación*, uno de los fenómenos más universales de la fisiopatología, en la que participan de modo fundamental el mecanismo de *transducción de señales biológicas*, la *cascada de reacciones enzimáticas* que desde los fosfolípidos de membrana conduce al ácido araquidónico y a sus metabolitos derivados, y la *estructura de las membranas celulares* en las que tiene lugar la iniciación de las señales de múltiple naturaleza. Este conjunto de mecanismos de la moderna *biomedicina* está alcanzando una extraordinaria significación por lo que se refiere a su presencia en procesos del tipo de la *aterosclerosis*, de algunos tipos de *cáncer* o de *enfermedades neurodegenerativas*. Además, el *ácido acetilsalicílico* ha sido uno de los medicamentos no sólo clásicos, en cuanto a su empleo centenario como antidoloroso y antitérmico bajo la denominación comercial de *aspirina*, sino también antiguos, de amplia difusión, en cuanto al empleo de extractos vegetales poseedores de derivados del ácido salicílico.

## MEDICAMENTOS VIEJOS

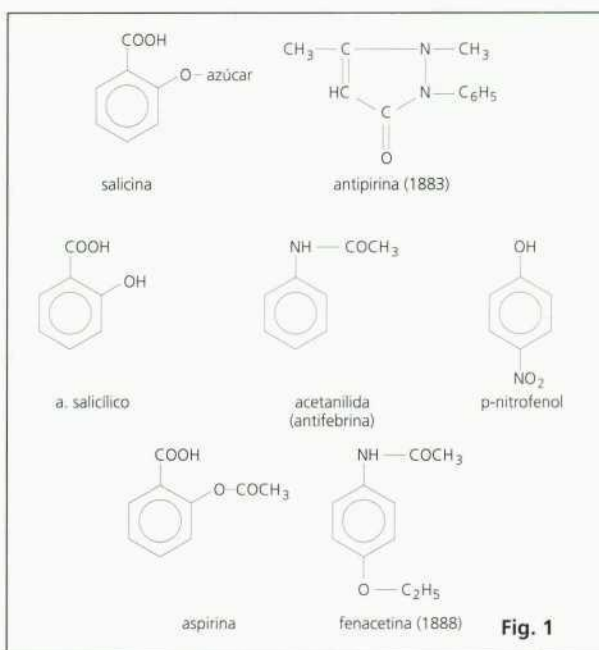
### La época antigua

La historia es tan vieja como la Antigüedad griega, cuando Hipócrates recomendaba una poción de la corteza del sauce *Salix alba* para el alivio del dolor y la fiebre. Usos que, después, fueron recomendados por Plinio, Dioscórides y Galeno, y, luego, a lo largo de muchos cientos de años, olvidados y redescubiertos de forma recurrente hasta que, mediado el siglo XVIII, el reverendo Edward Stone llevó a cabo con gran éxito un cierto «ensayo clínico» con cin-

cuenta pacientes, cuyos resultados comunicó a la Royal Society en 1763.

Hubo que aguardar, sin embargo, casi otro siglo, hasta que en 1828 los químicos orgánicos alemanes aislaron, en forma de cristales amarillos de sabor amargo, la sustancia responsable de tal actividad: la *salicina*. Se trataba de un glicosido del *ácido salicílico* cuya síntesis se llevó a cabo diez años más tarde por los químicos franceses. Y tanto el *ácido salicílico* (figura 1) como su derivado, la *salicina*, eran capaces de aliviar la fiebre y el dolor; a lo que en seguida se unieron sus propiedades antisépticas. Ambos compuestos se usaron para combatir las fiebres reumáticas, un síndrome muy común en el que una infección es capaz de inducir una condición semejante a la artritis. El *ácido acetilsalicílico* (figura 1) fue pronto objeto de una síntesis bruta por el francés Gerhardt, en 1853, y el alemán Kraut, en 1869.

En el siglo XVII se habían conocido las propiedades antipiréticas de la *quinina*, presente en la corteza de *cinco-*





na del Perú. Sin embargo, las dificultades de su empleo fueron mucho mayores que las del *ácido salicílico*, debido a sus múltiples efectos laterales y a las dificultades de su síntesis, añadidas a las limitaciones de su suministro y a la imposibilidad de trasplante del árbol a otras regiones. Otro remedio más reciente fue la *antipirina* (figura 1), descubierta por Ludwig Knorr en 1833, quien cedió sus derechos a la casa Hoechst. Y, en 1886, dos médicos alsacianos —Kahn y Hepp— prescribieron una fórmula con naftaleno para el tratamiento de los parásitos intestinales. La sustancia elaborada en la farmacia falló completamente en su intento de combatir los parásitos, pero tuvo gran éxito en la reducción de la fiebre de los pacientes. Al repetir la prescripción, la sustancia preparada cumplió con sus fines de eliminación de los parásitos, si bien la temperatura de los pacientes permaneció inalterada. Un análisis más minucioso de lo sucedido reveló el error de que la sustancia inicial, administrada por primera vez al hombre, se trataba de la *acetanilida* (figura 1), un derivado del alquitrán de hulla empleado en la industria de los colorantes. En aquella época, finales del siglo XIX, la *quinina* y el *ácido salicílico* eran profusamente utilizados como antipiréticos. La *acetanilida*, en manos de Kalle & Company, de Wiesbaden, recibió el nombre comercial de *antifebrina*, bajo cuya denominación, y no por su nombre genérico o químico, se llevó a cabo la difusión comercial. La *antifebrina* fue uno de los primeros medicamentos prescritos bajo una denominación comercial, aunque se dispusiera de la denominación genérica; lo que ya, desde entonces, ofrecía la particularidad del coste superior de los productos difundidos bajo una denominación comercial.

La casa Bayer, creada en 1863 por Friedrich Bayer y Johann Weskott, había preparado el primer colorante sintético, la *fucsina*. El primer asistente de Bayer fue su yerno Carl Rumpff, que emigró a los Estados Unidos a los veinticuatro años. A la muerte de Bayer, en 1880, Rumpff se convirtió en el guía científico de la compañía, que ya se había trasladado a la ciudad de Elberfeld. En los años anteriores a 1884, Duisberg —casado con una sobrina de Rumpff— se había aplicado a la síntesis de nuevos colorantes, por ejemplo la del Rojo Congo, mediante un procedimiento diferente al utilizado con anterioridad para obviar las dificultades legales de protección de patentes; y, a partir de 1884, llevó a cabo la dirección de los programas de investigación y patentes de la compañía. Uno de los primeros objetivos de su nuevo cargo fue transformar el campo de los colorantes y dirigir la mirada hacia los nuevos medicamentos, sobre todo cuando se estaba en el año de la invención y patente de la *antifebrina*. Por otro lado, la casa Bayer, productora de colorantes, originaba una gran cantidad de productos secundarios del tipo del *p-nitrofenol*, que guarda cierta analogía química con la *acetanilida*. Y con los 30.000 kilos de residuos de *p-nitrofenol*, la compañía Bayer logró, en 1888, la *acetofenetidina* como primer producto farmacéutico que, aprendiendo la lección de la antifebrina, recibió el nombre comercial de *fenacetina* (figura 1). Un año después, en 1889, una gran

epidemia de gripe invadió la mayor parte de los países europeos y los Estados Unidos, en la que el empleo de la *fenacetina* aumentó grandemente los ingresos de la casa Bayer. Al año siguiente, 1890, la compañía dedicó 1,5 millones de marcos para construir un laboratorio de investigación en un edificio de tres plantas, que, en tan sólo cuatro años, se ocupó por casi un centenar de químicos.

Mientras tanto, la fabricación de colorantes se instaló en la propiedad de una pequeña firma, Dr. C. Leverkus & Sons, que recibiría luego el nombre de Leverkusen, y que completaría en 1912, al borde del Rhin, una planta gigante según el diseño de Duisberg. Bajo la dirección de Duisberg, la compañía construyó en los terrenos de Elberfeld una segunda serie de laboratorios de investigación, finalizados en 1896, dedicados exclusivamente a la creación de medicamentos. La lista de medicamentos progresó con tal rapidez que Duisberg decidió promover la creación independiente de la división farmacéutica, cuya misión principal consistió en el desarrollo del gran éxito de la compañía: la fabricación industrial de la *aspirina*. Con este fin, el laboratorio de medicamentos se desdobló en dos secciones: una *farmacéutica* dedicada a la elaboración de nuevos productos, dirigida por Eichengrün; y otra, destinada al *control farmacológico* de los nuevos productos, bajo la dirección de Dreser, profesor de la universidad de Bonn. Uno de los proyectos del nuevo laboratorio farmacéutico fue la supresión de los efectos laterales del ácido salicílico, de lo que se encargó el joven químico Felix Hoffmann, cuyo padre se encontraba imposibilitado desde hacía largo tiempo por un reumatismo crónico. Y, efectivamente, el remedio con ácido salicílico era peor que la enfermedad. Fue el 10 de octubre de 1897, la fecha en que, según el cuaderno de laboratorio de Hoffmann, se dató el proceso de fabricación del *ácido acetilsalicílico*, que se comercializó bajo el nombre de *aspirina*. También es cierto que, como ha quedado señalado anteriormente, la bibliografía había citado su preparación bruta por Gerhardt y, posteriormente, por Kraut. La falta de una auténtica novedad no desanimó a Eichengrün, que la pasó a la sección de farmacología para el control de su actividad, ante la indiferencia de su director Dreser y, sin duda también, de Duisberg.

A esta situación de indiferencia contribuyó el redescubrimiento comercial de la *diacetilmorfina*, sintetizada hacía un par de décadas por el inglés C. R. Wright. Con la intención de lograr un preparado morfínico privado de su característica adicción, la casa Bayer, tras una serie de ensayos clínicos, lanzó una enorme campaña de propaganda y difusión de la *diacetilmorfina* bajo la denominación comercial de *heroína*. En 1898, Dreser comunicó al Congreso de Médicos alemanes que se trataba de un producto diez veces más efectivo que la *codeína*, y con sólo una décima parte de sus efectos tóxicos; y la *heroína* fue presentada como la gran solución de la tremenda plaga de adicción de la *morfina*. El negocio fue extraordinario, sobre todo en los Estados Unidos tras las secuelas de la guerra de independencia sureña.

No tenía nada de extraño que, con este señuelo comercial, la compañía mantuviese el *ácido acetilsalicílico* en el



ostracismo del laboratorio de farmacología. Y, como tantas otras veces en la historia, los enfrentamientos entre la química —representada por Eichengrün y Hoffmann— y la farmacología —dirigida por Dreser— acabaron con la intervención de Duisberg y el lanzamiento del *ácido acetil-salicílico* bajo la denominación de *aspirin*, a la vista del éxito económico de las denominaciones comerciales al estilo de la *fenacetina* y la *heroína*. La denominación de *aspirina* procedía del género *Spiraea*, al que pertenecía la planta conocida vulgarmente como de la «dulce sombra», rica en aldehído salicílico que, al oxidarse, conducía al *ácido salicílico* —*Spirsäure*, en alemán—. Su acetilación rendía el *acetylspirsäure*, del que, en enero de 1899, se acuñó el nombre comercial de *aspirin*, patentado en alrededor de setenta países del mundo. No deja de ser curiosa la participación económica de los protagonistas en las *guerras de la aspirina*. Efectivamente, el director farmacológico Dreser recibía un canon de todos los productos ensayados en la sección; mientras que Eichengrün y Hoffmann lo hacían tan sólo de los medicamentos objeto de patentes, cuya legislación, por otro lado, no admitía los nuevos productos y sí los nuevos procedimientos. Así pues, a pesar de que Eichengrün y Hoffmann fueron los promotores, y a pesar también de la oposición de Dreser, fue solamente éste quien, enriquecido, pudo retirarse en seguida a disfrutar de los beneficios de la *aspirina*.

En cualquier caso, al finalizar el año 1899, la *aspirina* se presentó en todo el mundo; invadió con sus muestras los hospitales y a toda la profesión médica, a la vez que se encarecía al público cualquier noticia sobre la utilidad del nuevo medicamento. En noviembre de 1899 se publicó la primera referencia en inglés sobre la *aspirina*; y en 1902, habían aparecido sobre ella más de ciento sesenta trabajos. Sus éxitos clínicos y comerciales tuvieron un gran acompañamiento social que hizo, por ejemplo, que Enrico Caruso impusiera a sus empresarios la obligación del suministro de *aspirina*, el único remedio para sus dolores de cabeza. Y que Kafka, como explicara a su novia Felice Bauer, utilizara la aspirina en su torturado dolor existencial. Su éxito comercial no resultó, obviamente, del alivio de la ansiedad, sino del remedio que supuso su intervención en los procesos inflamatorios —artritis, fiebre reumática, etc.

## La época contemporánea

Un siglo más tarde, el 2 de marzo de 1988, Frank Young, de la Food and Drug Administration de los Estados Unidos, se presentó en una conferencia de prensa en Washington, ante directivos empresariales farmacéuticos. Cinco semanas antes, el 28 de enero, la revista *New England Journal of Medicine* había publicado los resultados de una inicial encuesta epidemiológica sobre la notable reducción que la aspirina había producido en la mortalidad por infartos cardíacos, la causa primera de muertes en el mundo occidental. El experimento se había realizado durante cuatro años con veintidos mil voluntarios, de los que la mitad to-

maron en días alternos una tableta de aspirina, y la otra mitad lo hizo de un placebo. El comité especializado encargado del seguimiento de la encuesta concluyó que el grupo tratado con aspirina experimentó un 40 por 100 menos de alteraciones cardíacas que el grupo placebo. Teniendo en cuenta que tan sólo en los Estados Unidos morían en esa fecha de infartos, trombosis y síndromes relacionados unas 650.000 personas al año, según las conclusiones de la encuesta, la administración de una tableta de aspirina en días alternos haría descender en 130.000 las muertes por dicha causa. Esto, en los Estados Unidos, suponía que si la mitad de los ciudadanos tomaban una tableta en días alternos, las ventas anuales del medicamento se elevarían en un 75 %, alrededor de 600 millones de dólares.

Sin embargo, ¿qué ha ocurrido entre aquellos finales del siglo pasado, en que se fabricó el medicamento viejo, y las enfermedades nuevas, a las que en la actualidad se aplica?

## ENFERMEDADES NUEVAS

### Antecedentes

Incluso desde antes de la puesta a punto del método de preparación de la *aspirina* por Hoffmann, era un hecho reconocido la *actividad anticoagulante* tanto de la *aspirina* como del simple *ácido salicílico*. Actividad recogida en las lecciones de farmacología de Carl Binz, en 1891, director del Instituto de Farmacología de la Universidad de Bonn, y tenida presente de forma habitual en la práctica quirúrgica.

En 1941, Karl Link ensayó en sí mismo el comportamiento de la *aspirina* y el *ácido salicílico*, comprobando la disminución de *protrombina*, precursor inicial en la cascada de *coagulación de la sangre*, en mayor proporción por parte del *ácido acetilsalicílico* que del *salicílico* mismo. En 1943, el grupo de Link confirmó estos resultados en ratas y humanos. A raíz de estos estudios de Link acerca de la reducción de la coagulabilidad de la sangre se produjo una cierta alarma en la prensa médica; particularmente el *Journal of the American Medical Association* se preguntaba: ¿es la *aspirina* un medicamento peligroso? El médico inglés Paul Gibson, en 1948, recomendaba el empleo del *ácido salicílico* para combatir la *trombosis coronaria*, a la vez que requería ensayos clínicos más extensos para probar la acción de la *aspirina* en la *enfermedad coronaria*.

Poco después, en 1950, Lawrence L. Craven, otorrino de Los Ángeles, publicó en los *Annals of Western Medicine and Surgery* una nota en la que señalaba que, durante varios años, la administración de *aspirina* masticable para aliviar las molestias subsiguientes a la tonsilectomía producía a los pocos días hemorragias de distinta consideración. La interpretación del autor fue que la *aspirina* poseía una actividad para reducir la capacidad fisiológica de formación de trombos. En 1953, Craven realizó un ensayo con ocho mil pacientes, tras el cual afirmó: «ninguno de los pacientes tratados con aspirina manifestó trombosis



cerebral o coronaria». Y, en consecuencia, proclamó que *la administración de aspirina ofrecía un método seguro de profilaxis frente a la trombosis*. Sin embargo, Craven no sólo no pudo, en aquella época, ofrecer razón alguna por la que la aspirina ejercía dicha actividad antitrombótica, sino que sus métodos no fueron científicamente validados.

El estado de los conocimientos acerca de la terapia cardiovascular fue resumido en 1961 por Poole y French en el *Journal of Atherosclerosis*, asegurando que la terapia anticoagulante ni era útil ni podía serlo frente a los ataques cardíacos. Para ello, razonaron sobre los distintos mecanismos del proceso de coagulación según que tenga lugar en el tubo de ensayo o en los vasos sanguíneos, y en éstos según sean venosos o arteriales. Este hecho ejercería una profunda implicación sobre el efecto de los anticoagulantes. En su opinión, *el hecho de interferir con la coagulación, no supone que el músculo cardíaco lesionado recupere su actividad [...], más bien, el único concebible uso de los anticoagulantes habrá de ser frente a los trombos siguientes*. La hipótesis se funda en la suposición de que en las venas, los trombos se construyen sobre un pequeño núcleo blanco a base de plaquetas adheridas a la pared del vaso, al que se unirían los glóbulos rojos mezclados con la fibrina. Este tipo de trombos pueden ser muy dolorosos, pero raramente son fatales. La situación es muy diferente en los trombos arteriales, especialmente si ocluyen alguna de las arterias que nutren el cerebro o el

corazón. En este caso, las plaquetas se agregan, y su masa es frecuentemente motivo de obstáculo para el flujo arterial. Algunas veces se rompen y los fragmentos se dispersan pudiendo de nuevo recrecer en unos pocos minutos hasta que la luz del vaso se obstruye por completo; y solamente cuando la arteria se ciega comienza a construirse la fibrina y a endurecerse el trombo. Últimamente, existe una gran cabeza blanca de plaquetas y una pequeña cola de glóbulos rojos; pero, aun cuando el trombo se componga únicamente de plaquetas, el daño ya ha tenido lugar. De esta forma, el empleo de los anticoagulantes será eficaz tan sólo sobre los trombos siguientes. Y aquí surge la diferencia entre los trombos venosos y los arteriales. Los anticoagulantes distorsionarían la cascada de coagulación impidiendo la formación del producto final, la fibrina. Lo que significa que contrarrestarían la construcción de la cola roja fibrinosa de un trombo, pero ejercerían escasa o ninguna acción sobre la formación del núcleo blanco plaquetario. Y, así, los trombos con una elevada proporción de plaquetas, como los arteriales, serían menos afectados por los anticoagulantes.

#### La actualidad de las enfermedades nuevas

*¿Qué ha cambiado hoy para que algo tan simple como la aspirina ofrezca tal diversidad de potencialidades de empleo, desde la aterosclerosis al cáncer?*

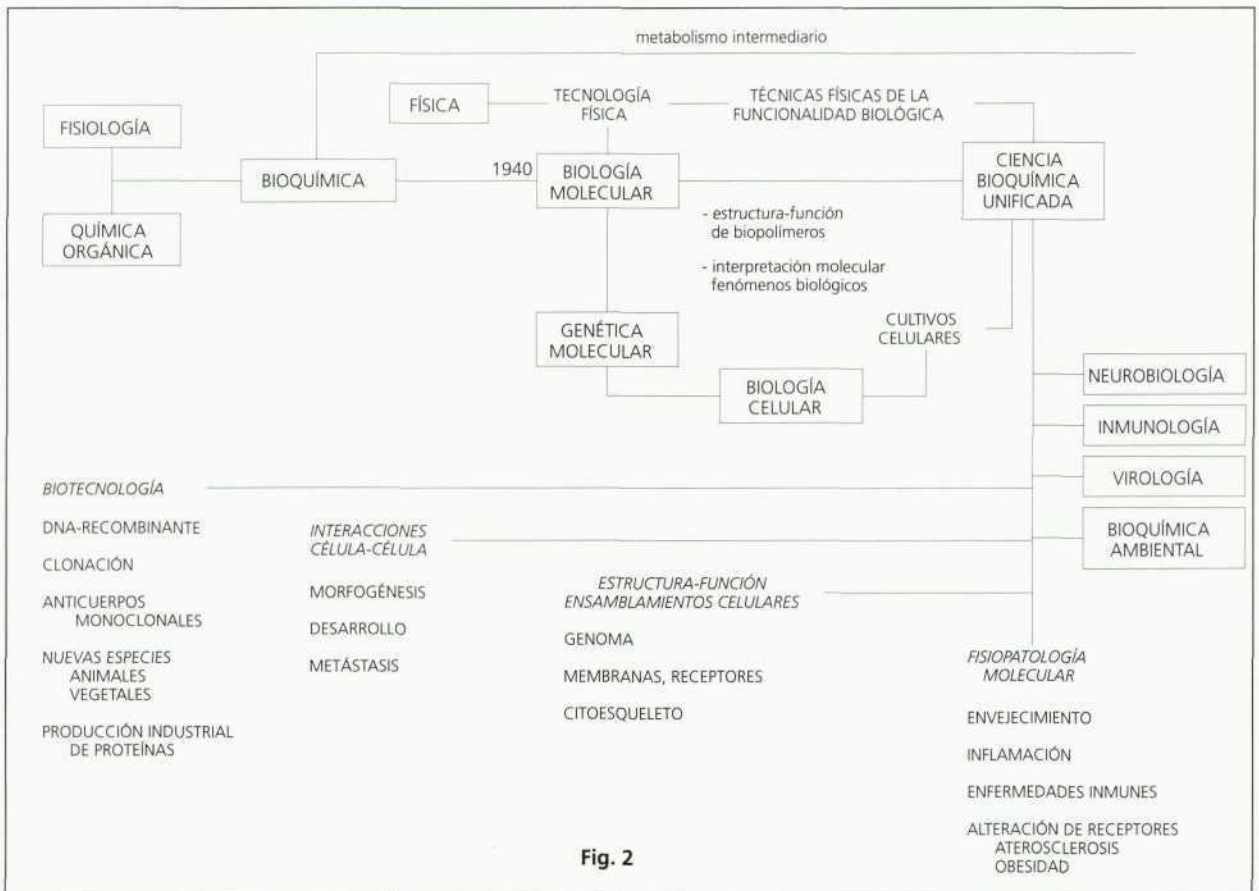


Fig. 2



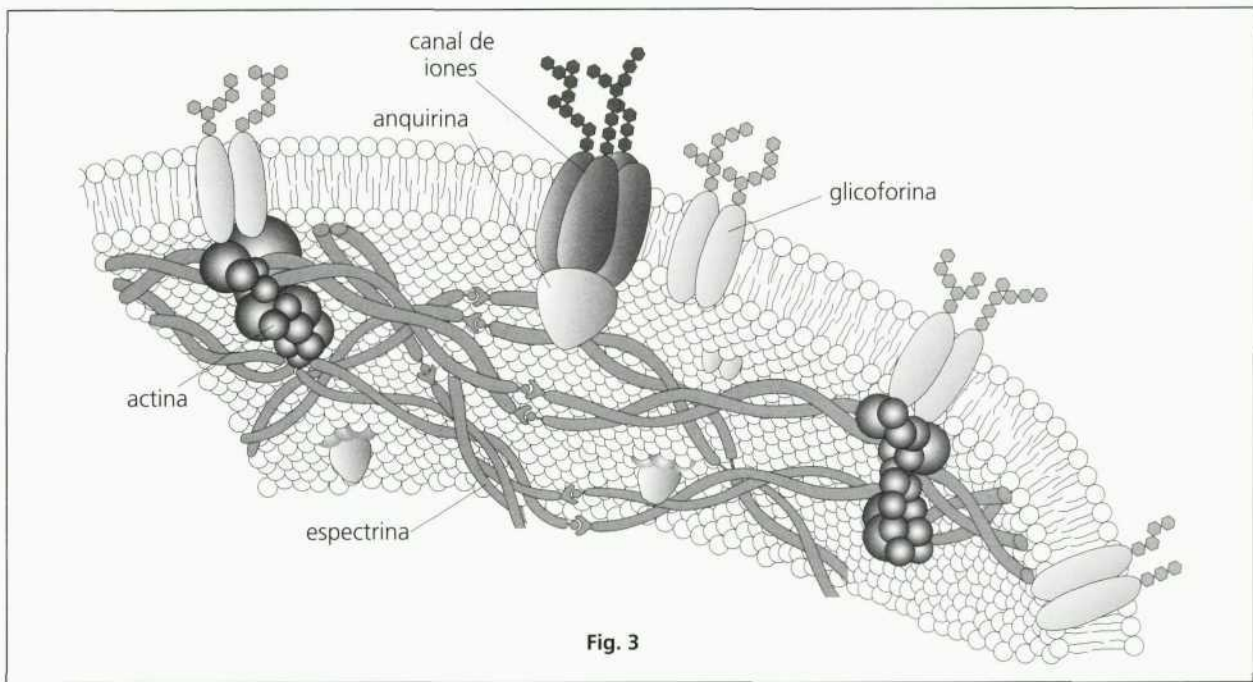


Fig. 3

La respuesta la encontraremos en los descubrimientos del último medio siglo en los campos solapantes de la biología molecular y celular, y de todas aquellas áreas de la biomedicina resultantes. Una interpretación de estas relaciones aparece en la figura 2. Entre otras manifestaciones del espectacular desarrollo que ha conducido al estudio de los mecanismos de las *enfermedades nuevas*, y como más importantes, tenemos las siguientes:

1. La averiguación de la *estructura terciaria de las proteínas*, como fundamento de las interacciones que soporta la transmisión de las actividades biológicas.
2. El descubrimiento de la estructura y el *modo de acción de las enzimas* que gobiernan específicamente cada una de las reacciones de todo tipo de los seres vivos, desde las propias de la digestión de los alimentos a las más nobles participantes en la transmisión de los caracteres hereditarios, en la acción del impulso nervioso y en el conjunto de actividades de los *sistemas de regulación en cascada*—coagulación de la sangre, fibrinólisis, quininas, complemento, etc.
3. Dentro de las actuaciones en *cascada de las enzimas*, la separación de ácidos grasos de los fosfolípidos y las consiguientes transformaciones del *ácido araquidónico* guardan una estrecha relación con los *lípidos de membrana* y con los mecanismos de *regulación de la transducción de las señales biológicas*.
4. El conocimiento de la estructura y la composición—*lípidos y proteínas*—de las *membranas* que constituyen el límite de las células con el medio externo, ha permitido dilucidar muy variados mecanismos de la biología molecular y celular, principalmente los referidos a la transducción de los diversos tipos de se-

ñales externas hacia el núcleo de la célula y la correspondiente regulación de la *expresión génica*.

5. La posición central que, en la biología molecular y celular, ocupa el mecanismo de la *transducción de señales* como fenómeno propio de la *respuesta inmunitaria* e *inmunoinmunitaria*, la *acción hormonal* y de los *factores de crecimiento*, la *transmisión del impulso nervioso*, los *mecanismos del ciclo celular*, la *inflamación* y la *apoptosis*; el fenómeno de la *fototransducción* y el modo de acción de algunos *medicamentos*.
6. De lo que resulta la cada día más abundante relación de anomalías patológicas, las *enfermedades nuevas*, vinculadas a disfunciones de la transducción de señales: *inflamación*, *enfermedades neurodegenerativas* y *cáncer*.

### Composición y estructura de las membranas celulares

Ya desde finales del siglo pasado, los biólogos celulares pusieron de manifiesto, mediante técnicas físicas y químicas, la existencia de *membranas plasmáticas* discretas. Partiendo de los estudios de permeabilidad de las células frente a una variedad de no-electrolitos, se comenzó a especular sobre la naturaleza lipídica de la barrera de permeabilidad. La probabilidad de que los lípidos presentes en las membranas biológicas existan predominantemente bajo la forma de *bicapa lipídica* adquirió en seguida plena confirmación por medio de las medidas físicas—ópticas y eléctricas—llevadas a cabo sobre las membranas y sobre el conjunto de lípidos aislados. Y fruto de ello ha sido la sucesiva elaboración de modelos, y la práctica vigencia del modelo llamado del *mosaico fluido*, de Singer y Nicolson (1972), basado en la doble capa lipídica y en la múltiple naturaleza de las incrustaciones de proteínas y enzimas (figura 3).



Estructura general de las membranas, que responde no sólo de la estructura de las membranas plasmáticas sino de la membrana de los orgánulos citoplásmicos –mitocondrias, retículo endoplásmico, etc.

La relación *lípidos/proteínas* en la composición de los diferentes tipos de membranas es muy variable; desde un 80 % de lípidos en la *mielina*, a un 50 % en los *eritrocitos*, y a un 20 % en la *membrana interna mitocondrial*. Las proteínas, por otro lado, pueden ser *intrínsecas* o *extrínsecas*. La liberación de las proteínas intrínsecas exige una rotura de la membrana mediante detergentes o disolventes orgánicos apropiados; rotura que implica la desagregación de los lípidos con las regiones lipofílicas de las proteínas, ricas en aminoácidos no polares, que se sumergen más o menos completamente en el interior de la membrana. Las proteínas extrínsecas se separan de las preparaciones de membrana por tratamiento con disoluciones de baja fuerza iónica, ya que su frágil asociación puede tener lugar por simple adsorción.

La presencia de los *lípidos* en las membranas biológicas no tiene la simple razón del soporte físico de las proteínas de membrana. La presencia cuantitativa y cualitativa de los diferentes tipos de lípidos es responsable de propiedades singulares de la bicapa lipídica: la *fluidez* que justifica la libertad de movimiento de las fases hidrocarbonadas; la *asimetría* de la disposición de los lípidos individuales en las dos superficies de la membrana, que provoca el diferente ambiente lipídico de cada parte; y la *especificidad* de lípidos particulares en la regulación de la actividad de las proteínas de membrana, como enzimas, receptores, etc. Los lípidos presentes en las membranas responden a los siguientes tipos más importantes: los esteroides, los glicero-fosfolípidos, los gliceroglicolípidos y los fosoesfingolípidos (figura 4).

Los lípidos, por otro lado, no son solamente ingredientes del mosaico fluido de la membrana. En algunas ocasiones, ciertas especies de lípidos o sus productos de hidrólisis pueden actuar como segundos mensajeros de la acción de señales externas.

Y son, precisamente, las *membranas* y sus correspondientes estructuras la sede en la que se inician los fenómenos interrelacionados, que se describen a continuación, y que se centran en:

1. La posición central que ocupa el *ácido araquidónico*, procedente de la hidrólisis enzimática de los glicero-fosfolípidos de membrana, y que, por otro lado, es sustrato de la acción enzimática de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa. La *ciclooxigenasa* se presenta bajo dos formas isoenzimáticas, *COX-1* y *COX-2*, con características diferentes; la segunda, inducible por estímulos inflamatorios y que se sobreexpresa en ciertas manifestaciones patológicas –cáncer colorrectal, por ejemplo.
2. La presencia de las *proteínas de membrana*, cumplidoras de múltiples funciones según la naturaleza de la célula, entre otras las de soportar los fenómenos de *adhesión*, *anti-adhesión*, *recepción de señales e interacciones con el citoesqueleto*. La *recepción de señales* inicia los diferentes tipos de mecanismos de su *transducción*, que participa en procesos de la importancia de la *inflamación* y la *apoptosis*. A modo de ejemplo, se reúnen en la figura 5 las proteínas de membrana de las células T y su disposición específica en el seno de la bicapa lipídica.
3. El proceso de *inflamación* en sus múltiples etapas, que, desde las diferentes causas, conducen a la co-

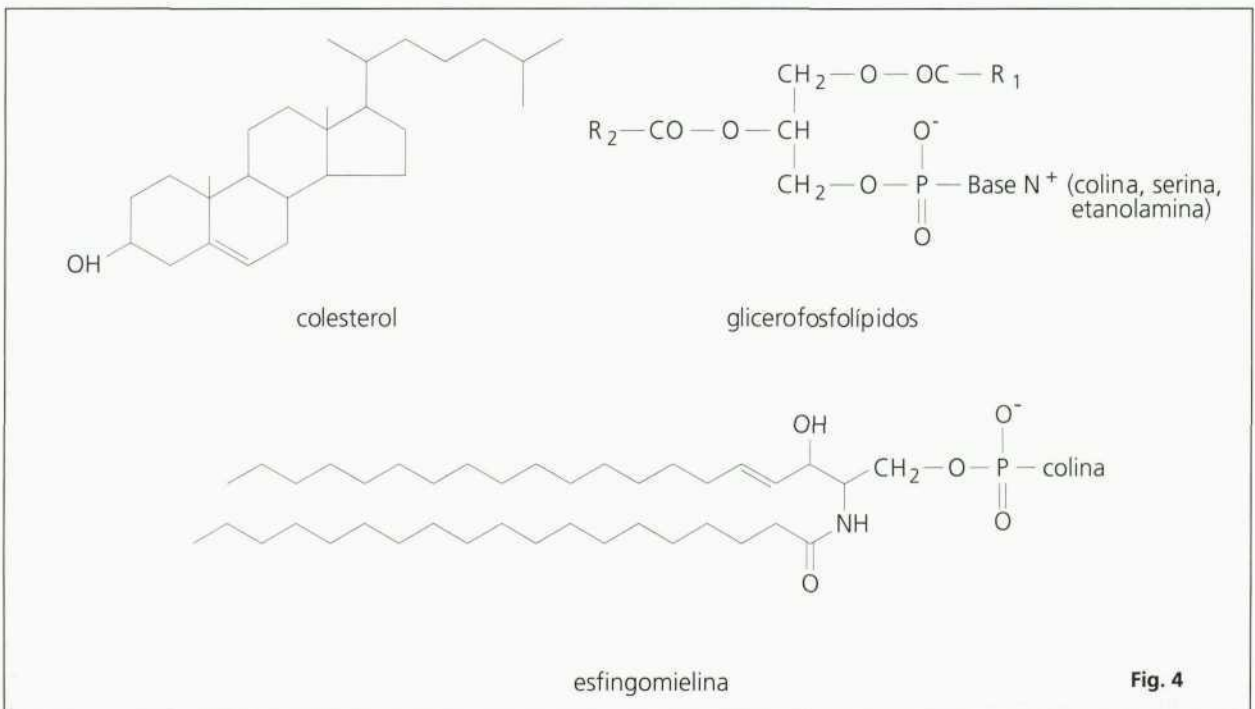
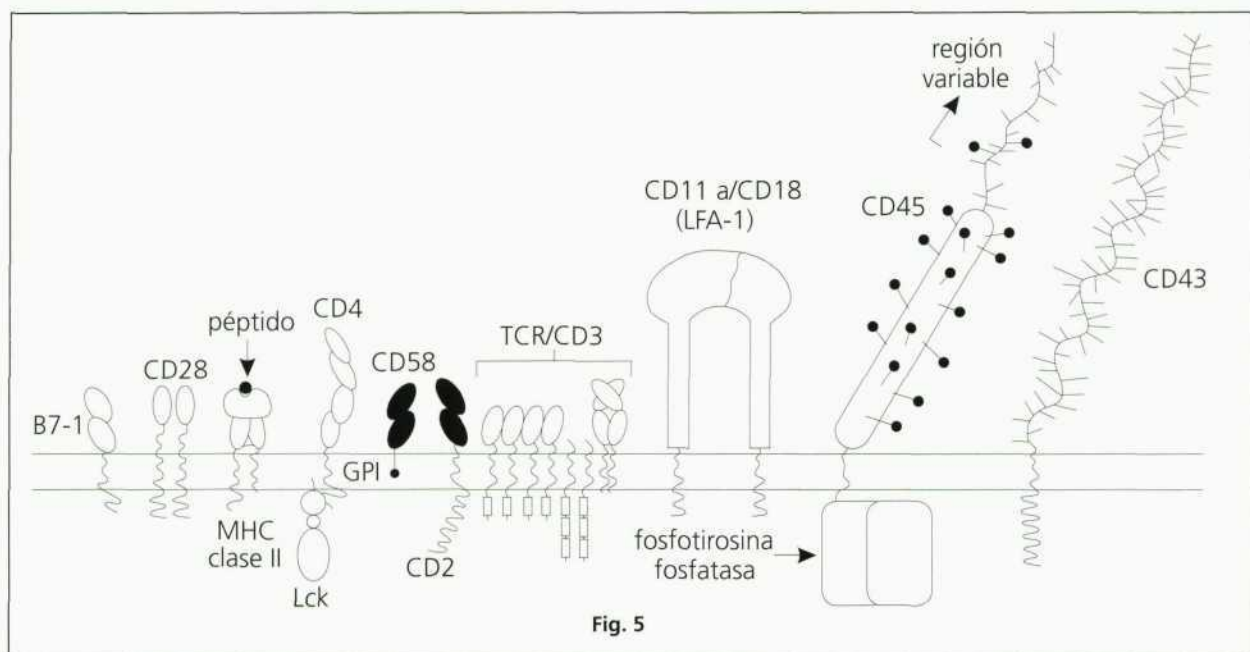


Fig. 4



lección de efectos diversos. Este proceso está involucrado en los mecanismos de transducción de señales.

4. Los complejos mecanismos de *transducción de señales*, a los que se acomoda una serie de acciones biológicas, entre ellas, las de la inflamación y la apoptosis celular.
5. El mecanismo de la *apoptosis celular*, modulable por diversos factores.
6. La posibilidad de la acción farmacológica sobre cada una de estas partes; y, dentro de su integración, la de la acción de las *sustancias antiinflamatorias no esteroideas*.

La integración del conjunto –*transducción de señales, inflamación, apoptosis, cascada del ácido araquidónico e isoenzimas de ciclooxigenasa e inhibición de la inflamación por agentes no esteroideos*– aparece en la figura 6. Cada una de sus partes va a ser objeto, a continuación, de una descripción particular.

### Ácido araquidónico y ciclooxigenasas

La presencia del *ácido araquidónico* (20:4) ocupa una posición central en el presente estudio debido, en primer lugar, a su presencia en los fosfolípidos de membrana; y, por otro lado, a que sus transformaciones enzimáticas –vía *lipoxigenasa* y vía *ciclooxigenasa*– conducen a sustancias del interés fisiopatológico de los *eicosanoides*, en los que se integran las *prostaglandinas*, las *prostaciclina*s, los *leucotrienos* y los *tromboxanos*. Así, la presencia del *fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato* (PtdIns (4,5)P<sub>2</sub>) en las membranas es capaz de servir de sustrato a varios tipos de fosfolipasas –A<sub>2</sub>, D y C– para rendir diversos productos finales de degradación, entre otros el *ácido araquidónico* y los *diacil-*

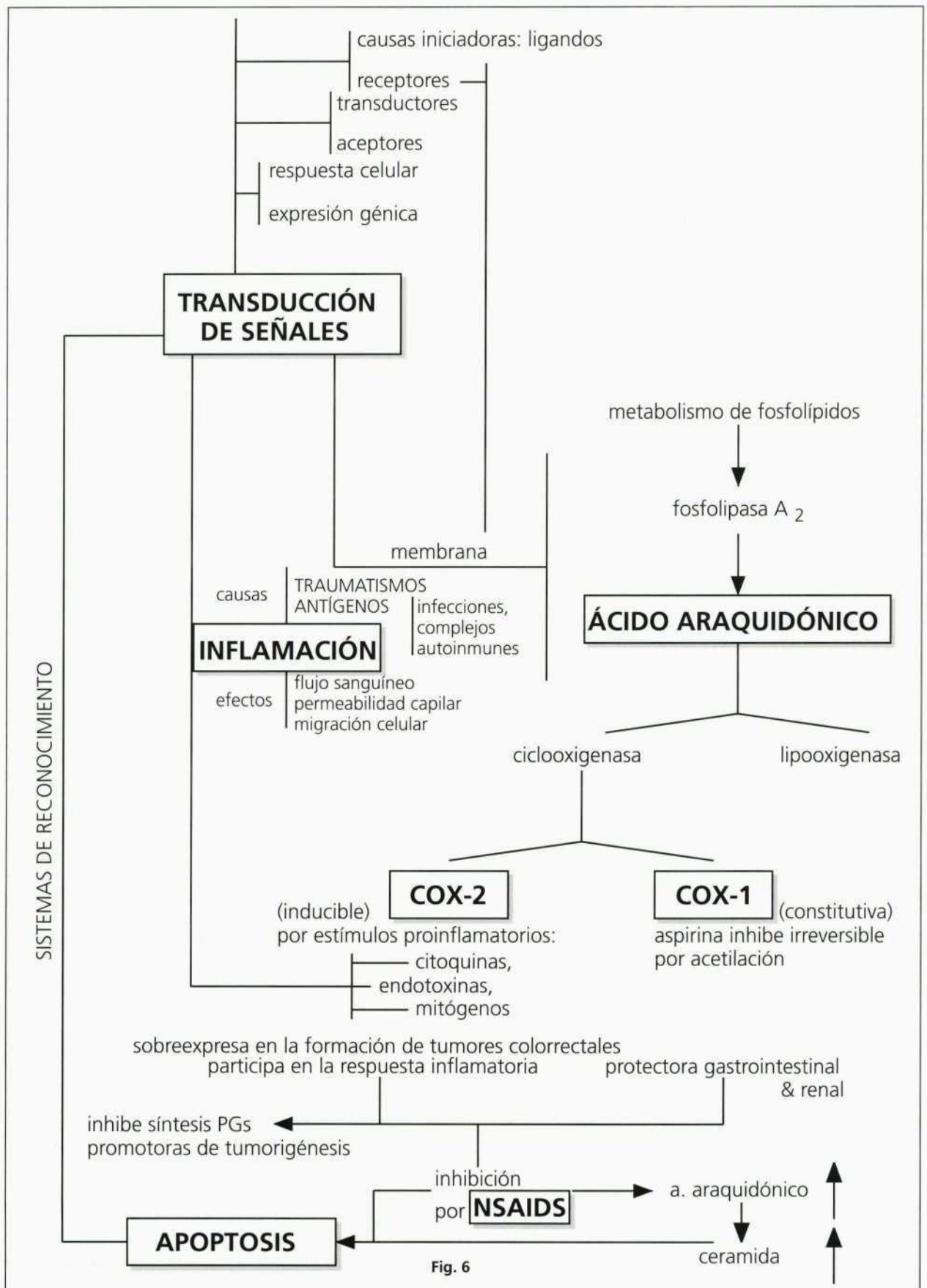
*glicerol*es. Un esquema de estas relaciones aparece en la figura 7. El primero, pues, en íntima conexión con el *sistema de prostaglandinas*, la enzima *ciclooxigenasa* y con la función de los antiguos *salicilatos*. Y los *diacilglicerol*es en cuanto a reguladores de la actividad de *proteína quinasa*s, eslabón de extraordinaria importancia en los mecanismos ulteriores de la *transducción de las señales*.

La figura 8 resume la colección de *eicosanoides* originados a partir del ácido araquidónico, las actividades enzimáticas que intervienen, los efectos fisiológicos particulares de cada uno de los productos y las estructuras químicas de las más importantes especies del sistema de prostaglandinas.

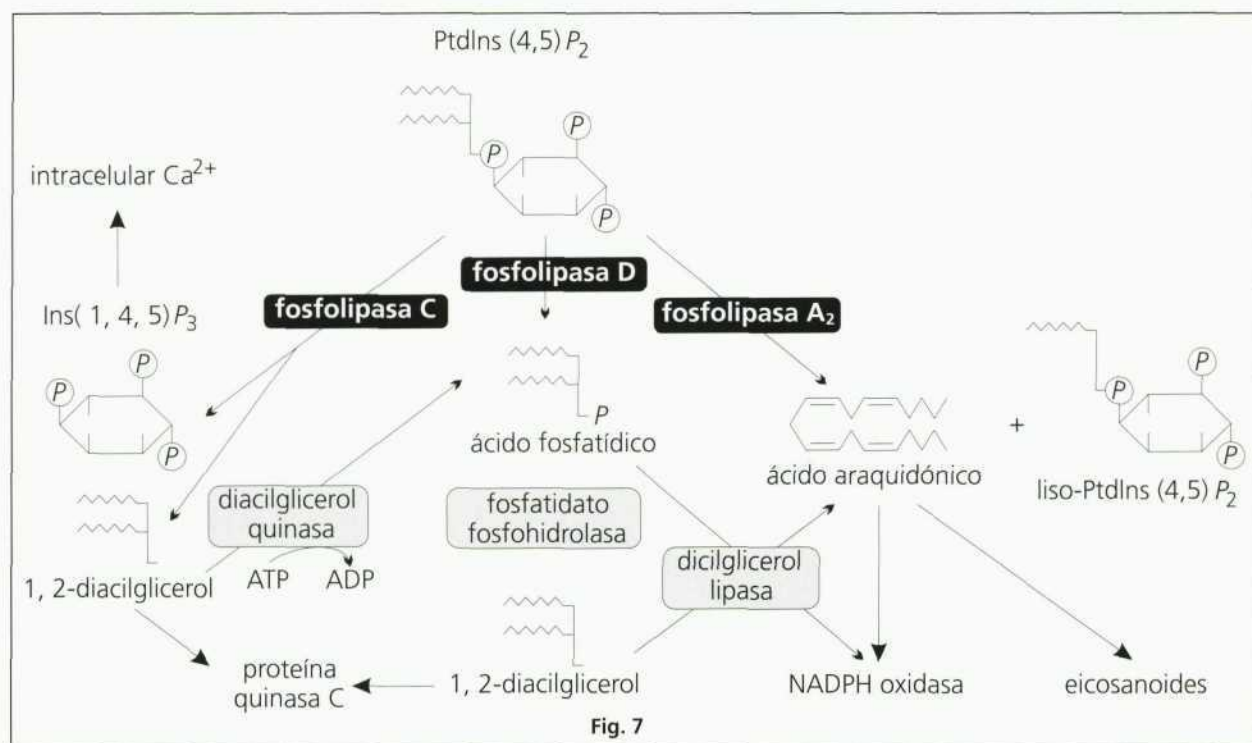
Dentro de este esquema, la enzima *ciclooxigenasa* se convierte en una pieza clave del planteamiento global de este tema. Posición clave que resulta, en resumen, de los siguientes hechos:

1. La *ciclooxigenasa* se presenta bajo dos *isoenzimas*, COX-1 y COX-2; la primera *constitutiva* y la segunda *inducible*; cada una de las cuales se va a modular de manera diferente, va a ser responsable de actividades fisiológicas diferentes y, en consecuencia, su inhibición va a ser la base de acciones farmacológicas específicas.
2. COX-1 es responsable de la génesis de *prostaglandinas* que actúan fisiológicamente, mientras que los niveles de COX-2 en los diferentes tejidos se incrementan por inducción del gen correspondiente por un gran número de acciones biológicas que originan *respuestas inflamatorias*.
3. Estas respuestas pueden tener lugar en las más variadas partes del organismo, incluyendo el *sistema nervioso central*; y de aquí su posible contribución a la patogénesis de las alteraciones neurodegenerativas del tipo de la enfermedad de Alzheimer.









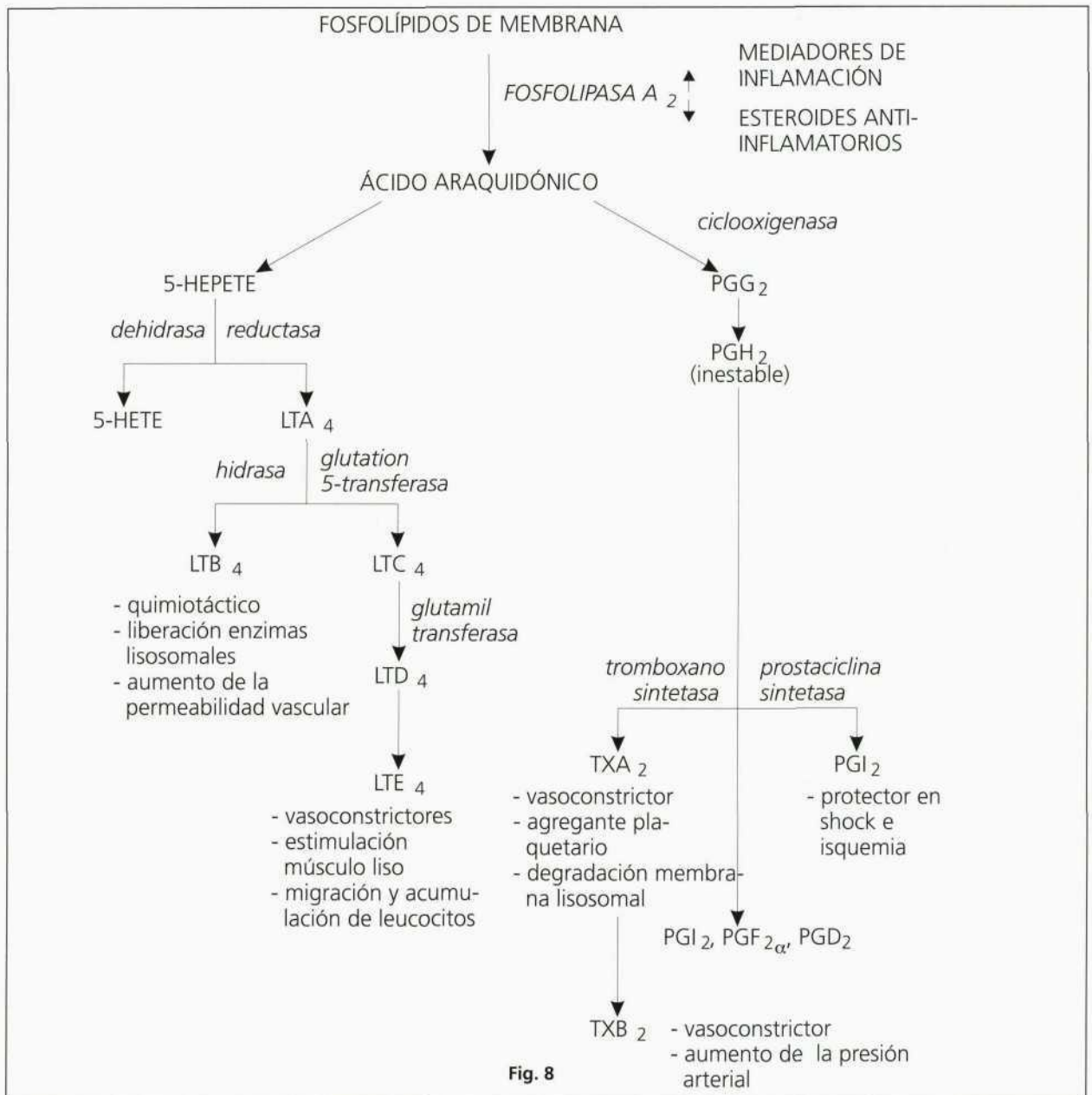
4. Puesto que *COX-1* es necesaria para el normal funcionamiento de estómago y riñón, su inhibición puede ocasionar daños importantes de este tipo de órganos.
5. En ciertas manifestaciones patológicas—cáncer, síndromes neurodegenerativos, etc.— se han descrito modificaciones de los niveles de *COX-2*; de aquí, la importancia de las posibilidades farmacológicas de su inhibición.
6. El reciente conocimiento de las estructuras tridimensionales de ambas enzimas permite el *diseño de inhibidores específicos y reversibles* como fundamento de *nuevos agentes antiinflamatorios*.
7. Esta regulación enzimática guarda relación asimismo con las posibilidades de modulación de la *apoptosis celular* y, por tanto, con los fenómenos basados en ella.

La *prostaglandina H<sub>2</sub> sintasa*, conocida también como *ciclooxigenasa*, cataliza la primera etapa de la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos (figura 8). La actividad ciclooxigenásica, en su conjunto, comporta dos actividades parciales contenidas en la misma proteína dimérica: una, específicamente de ciclooxigenasa, que inserta oxígeno molecular en el ácido araquidónico para formar el intermediario PGG<sub>2</sub>, y una actividad peroxidásica que reduce el hidroperóxido al alcohol correspondiente PGH<sub>2</sub>. Ambas funciones son adyacentes pero espacialmente distintas. Sobre PGH<sub>2</sub> actúan otras actividades enzimáticas para originar los productos finales (figura 8). COX existe, al menos, en dos isoformas, *COX-1* y *COX-2*, capaces de mostrar diferencias sustanciales en su comportamiento farmacológico. COX-1 es

constitutiva y su activación conduce a la formación de prostaciclina con actividad antitrombogénica –en el endotelio– y citoprotectora –en la mucosa gástrica–. COX-2, codificada por un gen diferente del productor de la isoforma 1, es, al contrario, inducible en ciertos tipos de células por estímulos pro-inflamatorios. Los niveles de COX-2 son ordinariamente muy bajos y están controlados rigurosamente por ciertos factores del tipo de las citoquinas y por la disponibilidad del sustrato. La inducción de COX-2 por citoquinas y por estímulos inflamatorios en diversos tipos de células está en línea con la idea de que las acciones antiinflamatorias de los medicamentos no esteroídicos se deben a la inhibición de la COX-2; en tanto que los efectos secundarios del tipo de la irritación gástrica y de la toxicidad renal son debidos a la inhibición enzimática de la COX-1. De aquí que en el diseño de nuevos medicamentos antiinflamatorios sea importante la selectividad de las inhibiciones de ambas isoformas. Ideas que se recogen en la figura 9.

Recientemente se ha descrito la *elevación de COX-2 en tumores de colon*, cuyas células exhiben una menor susceptibilidad a la muerte celular programada. A la vez, se afirma que dicha elevación provoca la *liberación de radicales libres*, potencial origen de mutaciones y de cambios genéticos, que, al menos en teoría, están en el origen de las células cancerosas. En tercer lugar se ha descrito la posibilidad de que la elevación de COX-2 promueva la *producción de factores angiogénicos* facilitadores del crecimiento de tumores. Y, por tanto, el empleo de sustancias inhibitoras de COX-2 puede potencialmente actuar frente a estos efectos consecuentes o concomitantes a su elevación. Más aún, estos inhibidores serán capaces de proteger las célu-





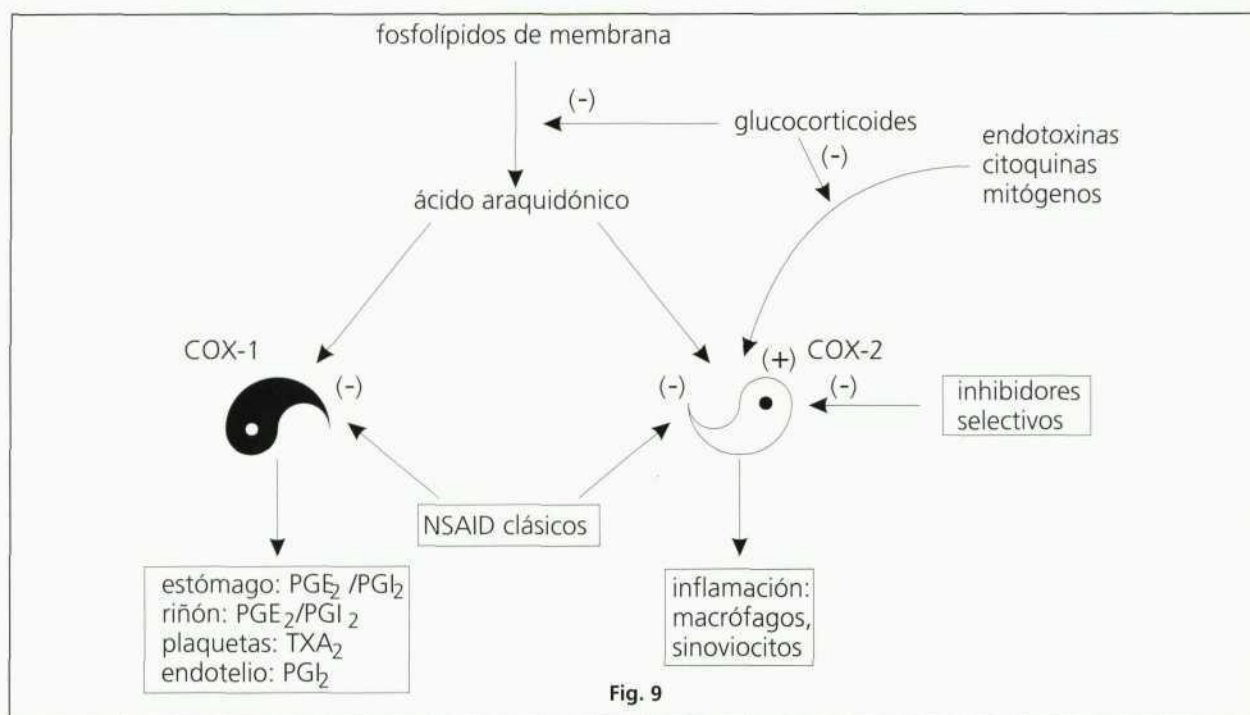
las nerviosas de la *inflamación asociada a las placas amiloides*, depósitos de proteínas presentes en el cerebro de pacientes de la enfermedad de Alzheimer.

#### TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Todas las células poseen la capacidad de procesar la información de su alrededor. Las células especializadas de los órganos sensoriales son blanco de las señales estimuladoras externas, tales como la luz, los aromas y los mensajeros químicos entre células vecinas o distantes. La interacción de estos *ligandos*—citoquinas, antígenos, hormonas polipeptídicas, factores de crecimiento, neurotransmisores, óxido nítrico, etc.—con los *receptores* de la superficie celular genera señales re-

guladoras intracelulares, que constituyen la primera etapa de la cascada de acontecimientos bioquímicos que ocurren a lo largo del sistema de *transducción de señales* hasta alcanzar la modificación de la *expresión génica* y la consiguiente *modulación celular*. Durante este recorrido actúan *proteínas transductoras* y *enzimas generadoras de segundos mensajeros*, los *segundos mensajeros intracelulares solubles*, y los *sistemas efectores* constituidos por *proteína quinasas* y *proteínas reguladoras*. De esta manera, la situación aparece cada día más claramente complicada tanto por la múltiple naturaleza química de las señales como por los variados mecanismos con que opera en cada caso la cascada de interacciones en el seno de la célula. Un esquema de la distribución de las entidades moleculares participantes en un proceso general de *transducción de señales* aparece en la figura 10.





## MECANISMO GENERAL DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES



**Fig. 10**



A lo largo del pasado cuarto de siglo, una colección de hechos bioquímicos independientes ha preparado el complejo terreno de las interacciones moleculares que, desde los receptores de la membrana y a través del interior de la célula, alcanzan los núcleos y llevan a cabo la *regulación de la transcripción*. Escasas décadas durante las cuales se han aclarado fenómenos bioquímicos de la importancia de la *regulación enzimática por modificación covalente*, los *cambios conformacionales*, las *interacciones moleculares*, los *modelos alostéricos*, las *proteínas oligoméricas*, la *cooperatividad*, la *amplificación de señales*, la *fluidez de membrana*, los *modelos de bicapa lipídica* y los *segundos mensajeros de la actividad hormonal*, así como numerosas regulaciones de la actividad enzimática por *modificación covalente* en las áreas del metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos y proteínas. Esta modificación covalente ha tenido su representante más característico en la *fosforilación* y su inversa, la *defosforilación*, catalizadas respectivamente por las *proteína quinasas* y las *fosfatasa*s. *Fosforilación* y *defosforilación* de proteínas que han dado lugar a uno de los mecanismos fundamentales de integración de las señales en las células eucarióticas, y forman parte de, prácticamente, todos los sistemas de transducción de señales.

La interconversión de las formas *fosforilada* y *defosforilada* de una enzima va asociada con un cambio fundamental en su actividad, aunque no siempre el cambio ocurra en la misma dirección. Así, en el metabolismo de la glucosa, la fosforilación activa la degradación del glucógeno en la misma medida que inhibe su síntesis. De esta manera, la actividad de las *proteína quinasas*, y su actuación en cascada, ha originado una larga serie de potencialidades de meca-

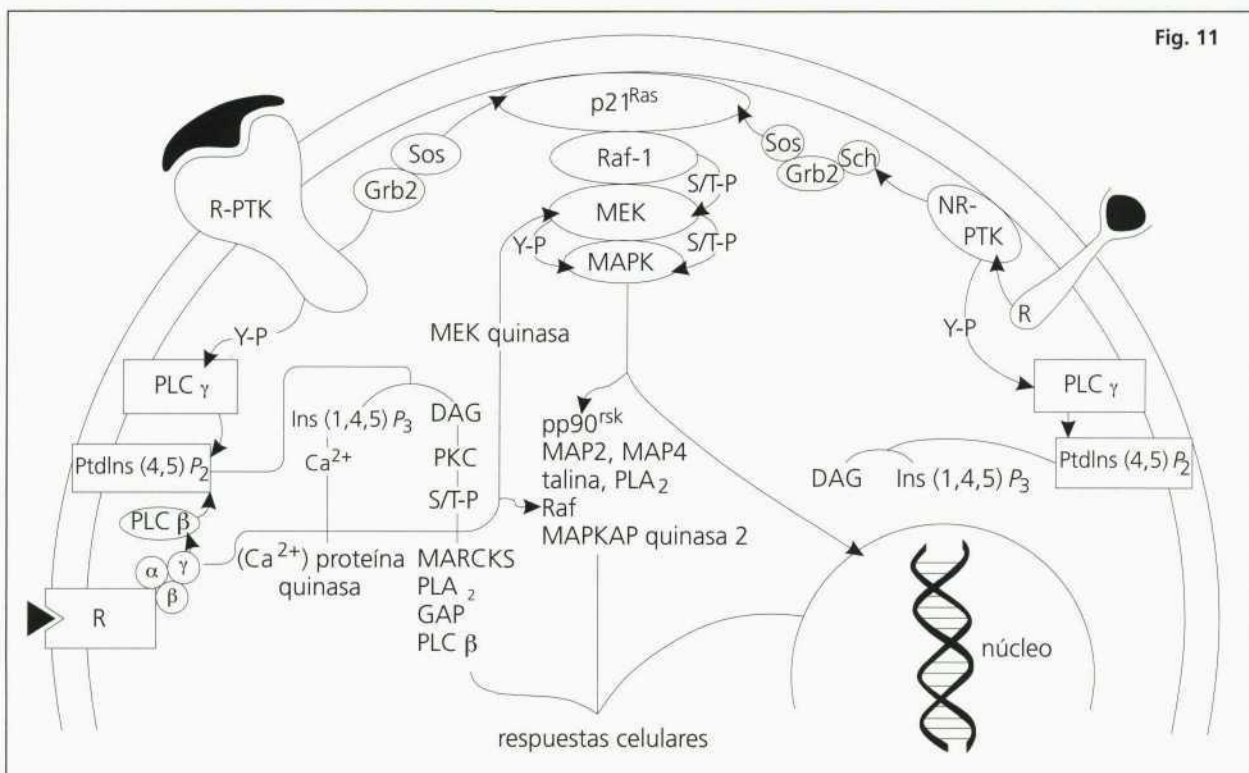
nismos operativos en la *transducción de señales* conducentes a la puesta en marcha de procesos fisiológicos de diversa naturaleza, tales como *desarrollo, diferenciación, morfogénesis, mitogénesis, activación de células T, actividad secretora, movimiento, ciclo celular* y *transcripción génica*.

*El mecanismo de la transducción de señales es, pues, ingrediente central de fenómenos fisiopatológicos complejos, como la inflamación y la apoptosis, en los que, a su vez, interviene de manera fundamental la cascada del ácido araquidónico y las enzimas que lo transforman. La integración de estas cuatro ideas constituye el núcleo de la exposición de las enfermedades nuevas, objetivo de este capítulo.*

La figura 11 da una idea gráfica inicial de la globalidad del fenómeno de *transducción de señales*.

## Transducción de señales. Ligandos

Los efectos a largo plazo sobre la regulación celular se originan por señales transitorias sobre los receptores de la superficie de las células. Las hormonas polipeptídicas —insulina, glucagón, por ejemplo— y los neurotransmisores —ácido glutámico, acetilcolina, por ejemplo— son dos ejemplos clásicos de ligandos que, transportados por la sangre, ejercen su función sobre superficies celulares específicas. En este sentido, una de las líneas modernas de mayor interés se basa en la averiguación de las complejas redes que se forman por interacción entre las células productoras de *citoquinas* y la colección de *células blanco*, por medio de la gran familia de *citoquinas*, mediadores proteicos produci-



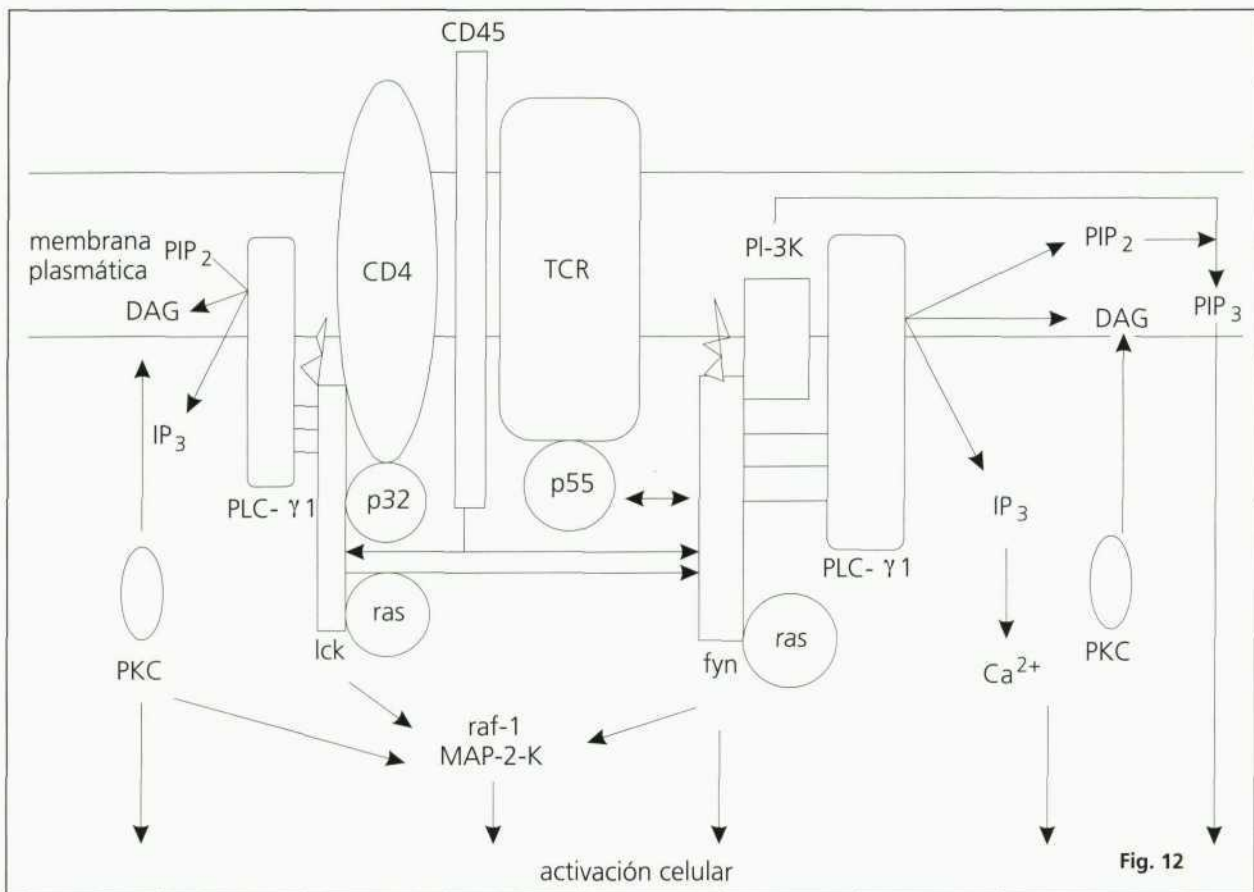


Fig. 12

dos por las primeras, capaces de influir sobre la proliferación, la diferenciación y las funciones de las segundas. Complejidad a la que contribuyen tanto la múltiple naturaleza de ambos tipos de células como el sinergismo, interferencia o redundancia funcional entre las citoquinas.

Las dos familias más importantes de *citoquinas* son las *interleuquinas* (IL) y una serie de *factores de crecimiento*. Las *interleuquinas* desempeñan su papel principal como mediadores intercelulares entre leucocitos. Así, una población de linfocitos T (TH1) secreta IL-2 e interferón-γ (IFN-γ) y promueve la inmunidad mediada por células, en tanto que otra población (TH2) secreta IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, e induce la inmunidad humoral, con producción de IgG, IgE e IgA. Simultáneamente, IL-4 e IL-10 inhiben el desarrollo de la población TH1, mientras que IFN-γ suprime la respuesta de TH2. Asimismo, el desarrollo de las células hemopoyéticas a partir de células pluripotentes viene regulado por la acción secuencial de interleuquinas (IL-3 e IL-5) y factores estimulantes de colonias (CSF) de granulocitos, granulocitos-macrófagos y monocitos. Por otro lado, la disregulación del sistema hematopoyético puede conducir a una plétora de enfermedades, en las que las *citoquinas* pueden tomar parte de los compromisos terapéuticos. Las principales aplicaciones clínicas de estos factores descansan en su empleo frente a la carencia de uno o varios de los componentes celulares del sistema hematopoyético, o en las citopenias provoca-

das por la quimioterapia antitumoral o en los transplantes de médula ósea.

Una serie de *citoquinas* ha demostrado su participación en los mecanismos moleculares de muchas alteraciones patológicas. Entre las *neoplasias*: mieloma (IL-6), linfoma de Burkitt (IL-10), carcinoma de mama (TGF-β), carcinoma de células escamosas (G-CSF), osteosarcoma (GM-CSF), leucemia mieloide (IL-1, GM-CSF, G-CSF, M-CSF) y leucemia linfóide (IL-2, IL-7, TNF). En las *enfermedades autoinmunes*: diabetes tipo II (IL-1, IL-4, GM-CSF), lupus eritematoso sistémico (IL-2, GM-CSF, IFN-γ) y esclerosis múltiple (IL-1, IL-6, TNF). En las variadas formas de la *inflamación*: artritis reumatoide (IL-1, IL-6, TNF, GM-CSF), psoriasis (IL-6, IL-8), eritema (IL-6, IL-8), espondilitis anquilosante (IL-1, IL-6). En el *asma alérgico* (IL-1, IL-4, IL-5), el *shock séptico* (IL-1, IL-6, TNF), la *fibrosis* (TGF-β), la *anemia aplásica* (IFN-γ) y la *malaria cerebral* (IL-3). Habida cuenta de este conjunto de participaciones, se han diseñado distintos tipos de terapias a base de *citoquinas* y *anticitoquinas*, así como vectores virales codificadores de citoquinas, con el objeto de manipular la respuesta inmunitaria.

#### Transducción de señales. Receptores

El ejercicio de la actividad biológica de cada una de las moléculas que actúan como *ligandos* requiere la partici-



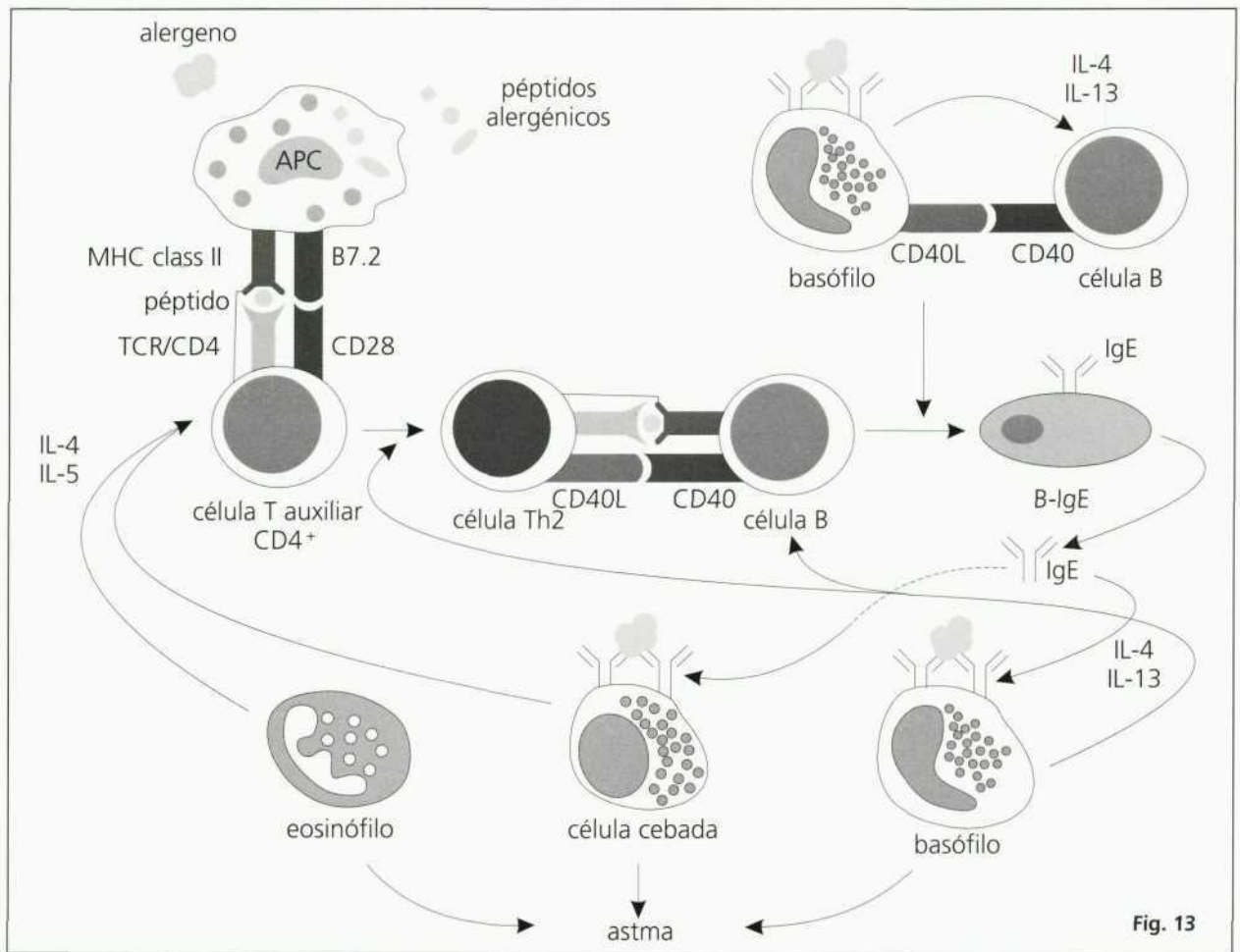


Fig. 13

pación de **receptores en la membrana celular** (figura 12), de cuya interacción resulta la iniciación de la carrera de transmisión de señales en el citoplasma. Desde el punto de vista de su estructura, los **receptores** se clasifican en los siguientes grupos principales:

1. **Polipéptidos dotados de un único dominio hidrofóbico.** Estas cadenas polipeptídicas pueden estar ancladas en la membrana de manera diferente, según que posean o no residuos transmembranares. De acuerdo con la composición de las subunidades, los receptores pueden ser monómeros, homodímeros, heterodímeros, heterotrímeros y heterotetrámeros. Asimismo, algunos receptores pueden poseer **actividades enzimáticas** promovidas por la interacción con el ligando; es el caso de la actividad de tirosina quinasa en los receptores de insulina y de los factores mitogénicos, o de guanilato ciclasa en los receptores de péptidos natriuréticos.
2. **Polipéptidos con siete dominios hidrofóbicos,** estructurados como monómeros, homodímeros o heterodímeros. En su cara intracelular, cada subunidad posee una secuencia de reconocimiento de **proteínas G** que interaccionan con un canal, bien directamente o a través de mensajeros difusibles (PAF, eicosanoides, IL-8, neuropéptidos, etc.)

3. **Oligómeros formadores de canales,** con subunidades homoméricas o heteroméricas. Son independientes de cualquier factor intracelular o difusible de la membrana, por lo que actúan con gran rapidez. Además de la manera usual de activación de los receptores por medio de los transmisores liberados presinápticamente (acetilcolina, GABA, glutamato, 5-hidroxitriptamina, ATP), el transmisor puede originarse intracelularmente como en el caso de los receptores de membrana de orgánulos celulares, por ejemplo los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato, responsables de la transferencia de  $Ca^{2+}$ .

La interacción de múltiples pares **receptor-correceptor** (figura 13) se presenta en la activación clonal de linfocitos T específica de antígenos. El receptor de células T (TCR) reconoce los péptidos antigénicos mostrados por las células presentadoras de antígenos (APC) en el contexto de la actuación del complejo principal de histocompatibilidad. El mecanismo por el que la unión del ligando al TCR desencadena la activación de los linfocitos ha sido uno de los temas más fascinantes de la reciente biología molecular y celular. En él destacan, la fosforilación de la proteína consecuente al acoplamiento con el ligando y la producción de una gran variedad de

citoquinas; entre ellas, las interleuquinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). La complejidad de los sucesos de la transducción de señales iniciados en la membrana plasmática de las células T, y finalizados en el control nuclear de la expresión génica de las linfoquinas, constituye uno de los más interesantes modelos de interacción entre los ingredientes espacio-temporales del sistema. La coordinación de estos factores es crucial para la regulación de la respuesta inmunitaria. En resumen, el acoplamiento del TCR provoca la activación de múltiples proteína quinasas no receptoras;

entre otras, las proteínas p56 y p59 de la familia *src*, que median en muchas de las subsiguientes reacciones de fosforilación. Así, la fosforilación de tirosina inicia una cascada de señales por modulación de la actividad de una fosfolipasa C (PLC- $\gamma_1$ ), requerida para la hidrólisis de fosfoinosítidos, y de otras enzimas generadoras de señales intracelulares. La activación de PLC causa la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), con la formación de segundos mensajeros: diacilglicerol e inositol trifosfato. Estos segundos mensajeros son responsables, respectivamente, de la activación de la proteína quinasa C (PKC) y el incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Esta es la razón por la que los inhibidores de tirosina quinasa pre-

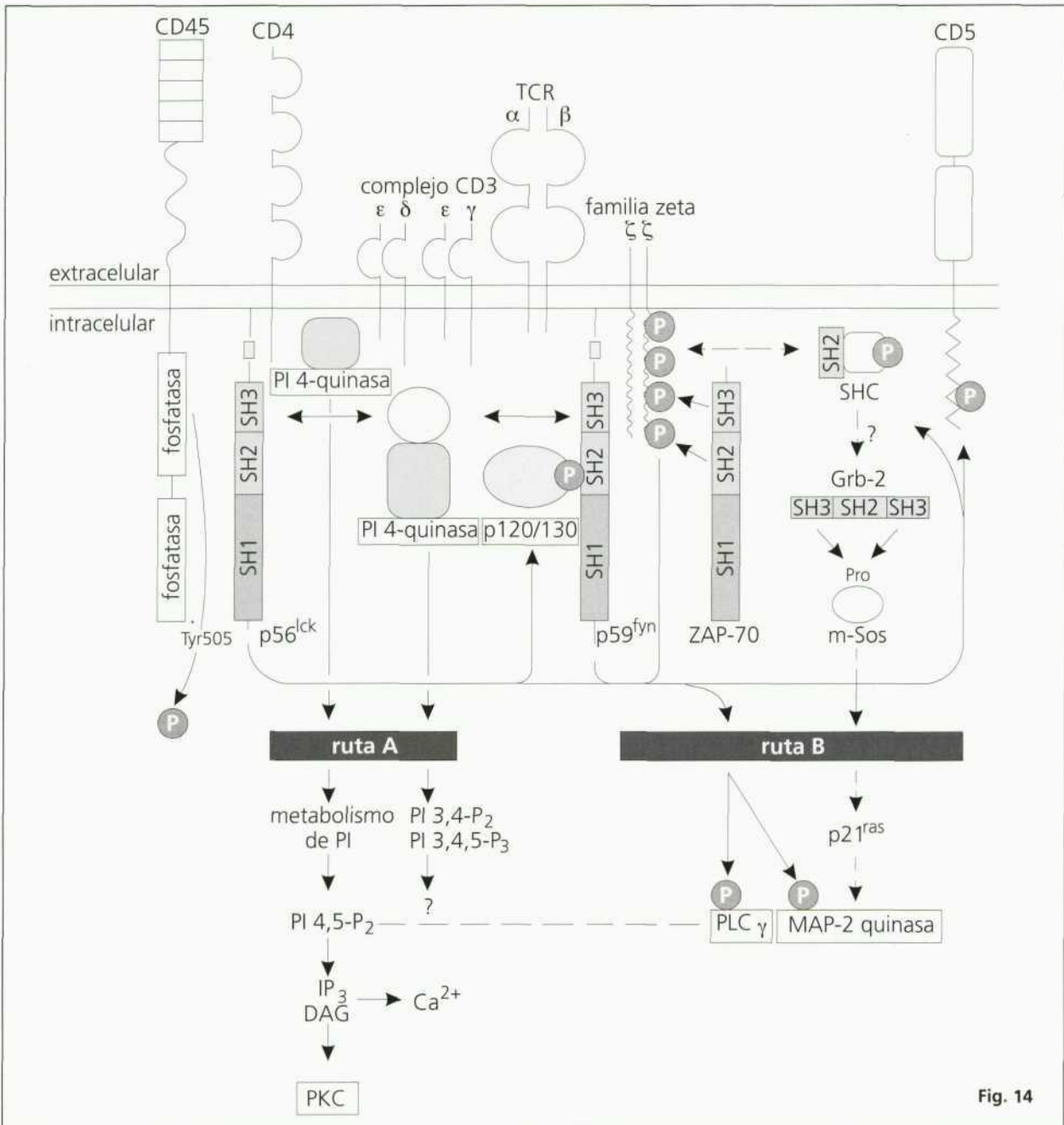


Fig. 14



vienen la expresión génica de las linfoquinas. Sin embargo, los mecanismos por los que la activación de las proteína quinasas, incluyendo la de la PKC, se transducen al núcleo celular no está aún aclarada por completo, si bien se ha identificado un cierto número de entidades mediadoras; por ejemplo, la acumulación del producto del protooncogén p21<sup>ras</sup> sugiere su participación en el curso de la migración de la señal desde la membrana. La lista de polipéptidos fosforilados en la tirosina crece progresivamente, incluyendo en la actualidad los sustratos CD45, PLC $\gamma_1$ , PLC $\gamma_2$ , TCR- $\psi$ , Fc $\epsilon$ R, proteína quinasa activada por mitógenos, proteína activante de GTPasa *ras* y las quinasas *src* (p56<sup>lck</sup>, p59<sup>fyn</sup>, p50<sup>csk</sup>).

Una de las características más sobresalientes del esquema general de *transducción de señales* es la de los **receptores poseedores de actividad enzimática** de *tirosina quinasa* (RTKs). Muchos receptores de factores de crecimiento son *tirosina quinasas* que poseen un dominio catalítico citoplásmico, capaz de autofosforilación y fosforilación de sustratos celulares, tras la unión del ligando a los dominios SH2 (figura 14). Así, por ejemplo, cuando el *factor de crecimiento  $\beta$  derivado de plaquetas* (PDGFB) activa el correspondiente receptor, su región intracelular se une a la *fosfatidilinositol 3-quinasa*, al *factor activante de GTPasa*, a la *fosfolipasa C*, y al *c-src*. El *receptor de insulina* es otro ejemplo de un RTK en que la unión del ligando activa una *fosfatidilinositol 3-quinasa* que no está físicamente asociada al receptor. La mayoría de los *factores de crecimiento* estimulan un grupo de *proteína quinasas* intracelulares, que incluye *Raf1 quinasa*, la *proteína quinasas activadas por mitógenos* (MAP) y la *proteína quinasa C*. La Raf1 quinasa aparece como esencial para la proliferación de fibroblastos inducida por suero y la activación de genes específicos como *c-fos*.

Además de los receptores clonotípicos de células T, los diferentes tipos de células de la línea linfóide-mieloide expresan constitutivamente una familia de proteínas conocidas colectivamente como **receptores Fc** (FcR), que desempeñan una variedad de funciones en la iniciación y en la elaboración de la respuesta inmunitaria. Los receptores FcR se expresan en las células de todas las estirpes hematopoyéticas, a excepción de las eritroides. Las células B, las células NK, los macrófagos, las células cebadas, los granulocitos y las plaquetas expresan constitutivamente altos niveles de FcR, modulados por el estado de activación. Estos receptores FcR no se detectan en las células T convencionales en condiciones basales.

Si la membrana celular es la sede de la recepción de la diversidad de señales externas, y, efectivamente, las proteínas, bajo la forma de *receptores*, constituyen las entidades moleculares fundamentales, no puede olvidarse la presencia de ciertas especies de lípidos en cuanto a su inmediata colaboración en la recepción de las señales. Por ejemplo, el *fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato* y el *fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato* son capaces de interactuar con ciertas regiones—dominios PH— de muy diversas proteínas,

a las que atrae y sitúa en el seno de la membrana. Con arreglo a este mecanismo actúa un componente central del receptor de insulina con actividad de proteína quinasa (PKB). PKB posee un dominio PH que liga específicamente y con gran afinidad a PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>, lo que ocasiona un cambio conformacional de la proteína que exhibe un residuo de treonina para ser fosforilado por la quinasa PDK1. Esta co-localización de ambas, PKB y PDK1, es dependiente del fosfoinosítido, y permite la activación de PDK1 y la fosforilación ulterior de PKB (figura 15).

Por otro lado, la hidrólisis de PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> por *fosfolipasa C* (PLC) genera *diacilglicerol* (DAG) que activan diversas especies de proteína quinasa C. Otro tipo de fosfolipasas, la *fosfolipasa D* (PLD), activada por una variedad de estímulos celulares, cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina de membrana con formación de ácido fosfatídico. Posteriormente, la acción de una fosfohidrolasa sobre el ácido fosfatídico origina asimismo diacilglicerol. Fenómenos que guardan estrecha relación con la elaboración de los *segundos mensajeros*.

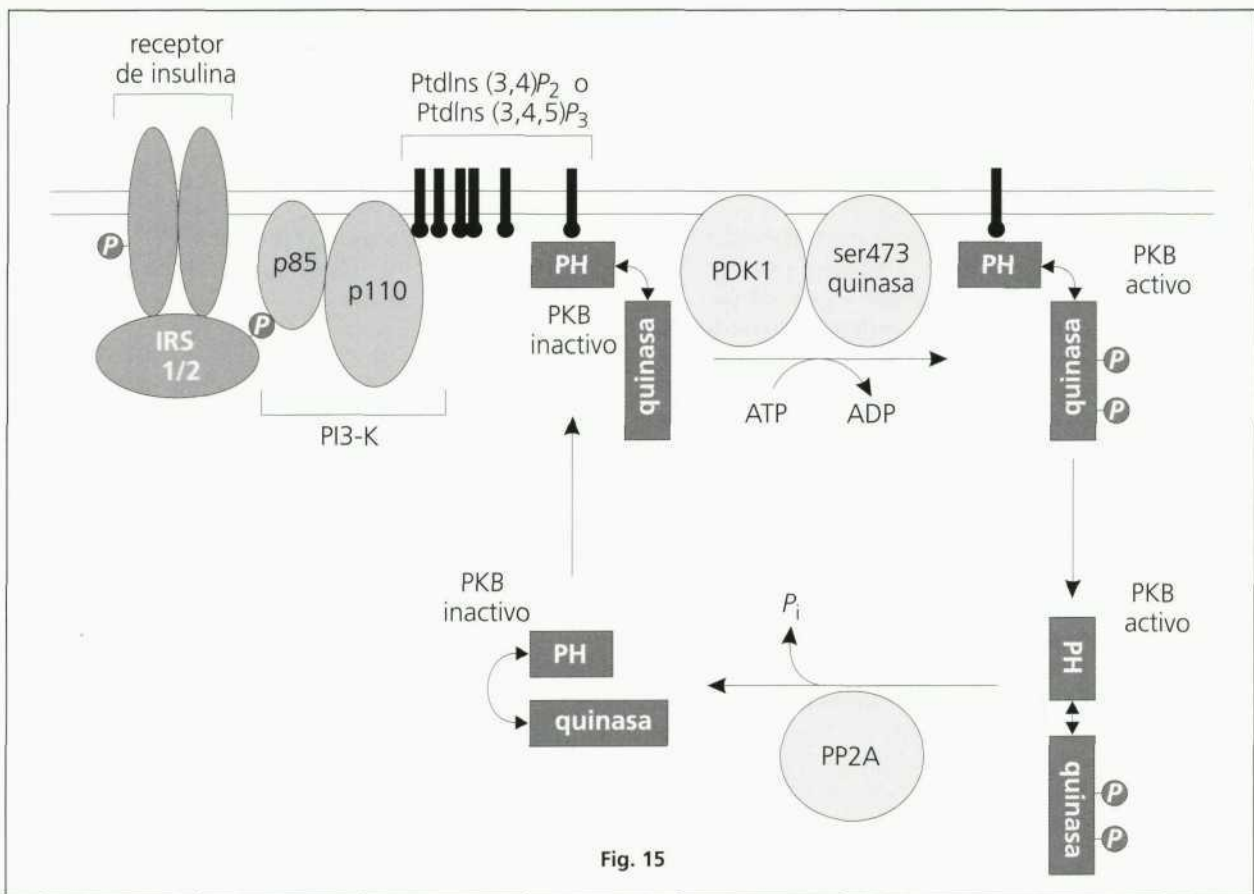
### Proteínas G y fosfolipasas

Las *proteínas G* pertenecen a una gran superfamilia de proteínas homólogas ligantes de nucleótidos de guanina, implicadas en la cascada de algunos de los mecanismos de *transducción de señales*. Y así ocurre con los receptores cuya estructura está basada en siete dominios transmembranares, que transducen a través de la membrana toda una serie de señales desencadenadas, por ejemplo, por neurotransmisores, hormonas, feromonas y odorantes. La participación de las *proteínas G* en la regulación de estas actividades fue sugerida inicialmente por los requerimientos específicos de nucleótidos de guanina en la estimulación hormonal.

De igual manera, a las moléculas efectoras pertenecen las *fosfolipasas A<sub>2</sub>* y *C* y una plétora de *canales de iones* y *transportadores*. Estas proteínas ligan e hidrolizan GTP, y participan en la regulación de fenómenos celulares fundamentales, al estilo de la *transducción de señales*, tráfico de proteínas, proliferación, diferenciación y transcripción. Ya ha sido mencionada la implicación de proteína (tirosina) quinasas (PTKs) en la regulación de la isoforma de fosfolipasa C, PLC- $\gamma_1$ , que genera diacilglicerol e inositol fosfatos, a través de los receptores de antígenos de las células T y B. Otra isoforma de fosfolipasa C, PLC- $\beta$ , se activa a través de los mismos receptores sobre linfocitos, pero mediada por las proteínas G.

Las *proteínas G* son heterotrímeros compuestos de tres subunidades diferentes:  $\alpha$  (39-46 kDa),  $\beta$  (37 kDa) y  $\gamma$  (8 kDa). Las subunidades  $\alpha$  poseen una única localización de alta afinidad para GDP o GTP, de manera que la  $\alpha$ -GDP se une fuertemente al par  $\beta\gamma$  dando lugar a  $\alpha_{\text{GDP}}\beta\gamma$ , inactivo y estimulado por la acción del ligando sobre el receptor para llevar a cabo el intercambio con GTP. En la forma activa,  $\alpha_{\text{GTP}}$  se disocia de  $\beta\gamma$ , y ambos





$\alpha_{GTP}$  y  $\beta\gamma$  interactúan específicamente en el control de sus respuestas celulares. En la actualidad se han descrito más de veinte tipos de subunidades  $\alpha$  que se usan tradicionalmente para definir las proteínas heterotriméricas purificadas:  $G_s$  (neuroepitelio olfatorio),  $G_i$  (cerebro, conos y bastones de la retina, papilas gustativas, plaquetas),  $G_q$  (células B y T, células mieloides, pulmón, riñón, hígado) y  $G_{12}$  (muy extendida). Cada una de estas familias interactúa con particulares receptores y efectores; entre ellos, adenilato ciclasa, fosfolipasas C ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ), fosfolipasa A<sub>2</sub>, y canales de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Frecuentemente, las subunidades  $\alpha$  dan cuenta de la actividad primaria de las proteínas G. Asimismo, se van encontrando nuevas funciones para los dímeros  $\beta\gamma$ , entre otras la regulación de: canales de K<sup>+</sup>, fosfolipasa A<sub>2</sub>, adenilato ciclasa (tipos I, II y IV), fosfolipasas  $\beta_{1-3}$ , quinasas de los receptores muscarínicos y  $\beta$ -adrenérgicos. Además, el conjunto  $\beta\gamma$  es capaz de regular la función de los receptores, aumentando su capacidad de interacción con la subunidad  $\alpha$  o para posibilitar la desensibilización de receptores por la acción de sus quinasas específicas.

La modulación de la actividad de las proteínas G se ha estudiado sobre todo en las dos formas interconvertibles de la familia *ras*: la activa, ligada al GTP; y la inactiva, ligada al GDP. El ciclo GTP/GDP de estas proteínas aparece regulado por dos clases de factores: 1)

proteínas activadoras de GTPasa; y 2) proteínas estimuladoras del intercambio de GDP por GTP, devolviendo a las proteínas G su estado activado. Por otro lado, la capacidad del conjunto  $\beta\gamma$  para interactuar con la subunidad  $\alpha$  en la proteína G de retina, está modulada por la fosfoproteína *fosducina*. Las proteínas *arrestinas* aparecen implicadas en la regulación de muchas cascadas de señales en las que el receptor se acopla con proteínas G.

Dadas las numerosas funciones fisiológicas asignadas al acoplamiento de las proteínas G con los receptores en la neurotransmisión, la acción hormonal, la visión, el olfato y la quimiotaxis, cabe pensar en la existencia de numerosas anomalías moleculares tanto de receptores como de proteínas G, y las consiguientes alteraciones patológicas. Así, por ejemplo, los defectos moleculares de una forma poco frecuente de hipertiroidismo y de la pubertad precoz familiar se han identificado con mutaciones de los receptores acoplados con proteínas G.

La *interleuquina 8* es uno de los más potentes quimio-atrayentes de neutrófilos, y mediante la migración transendotelial de neutrófilos inducida por citoquinas, induce la angiogénesis y desencadena una variedad de efectos asociados con la *respuesta inflamatoria*. Y los receptores en los neutrófilos de esta *interleuquina 8*, designados como  $\alpha$  y  $\beta$ , están acoplados con proteínas G y se activan por *fosfolipasa C*.



## Segundos mensajeros

Ya ha sido mencionado que de la interacción de *mensajeros externos* con receptores específicos de la superficie celular, se origina la primera etapa de la cascada de acontecimientos moleculares que subyacen en la *transducción de señales*. En muchos casos, la estimulación de estos receptores da lugar a la activación de proteínas efectoras, enzimas o canales de iones, que movilizan *segundos mensajeros químicos* que inician las acciones características en el interior de la célula. Así, la activación de *fosfolipasa C-β*—a través del receptor ligado a proteína G— y de *fosfolipasa C-γ*—mediada por tirosina quinasa— producen *segundos mensajeros intracelulares*, a saber *inositol 1,4,5-trifosfato* ( $IP_3$ ) y *diacilglicerol* (DAGs).  $IP_3$  moviliza los depósitos intracelulares de calcio, mientras que los DAGs son activadores fisiológicos de la *proteína quinasa C*. En muchas células,  $IP_3$  media los efectos de los receptores, ligados a la hidrólisis de fosfoinosítidos, sobre la movilización de calcio intracelular (figura 16).

El creciente número de metabolitos de inositol fosfato encontrados, ha llevado a la consideración de que otros inositol fosfatos puedan llevar a cabo importantes funciones celulares. Así, la función de  $IP_4$  aparece ligada a la regulación celular de los flujos de  $Ca^{2+}$ ;  $IP_5$  regula la afinidad de la hemoglobina aviar hacia el oxígeno; mientras que ambos,  $IP_5$  e  $IP_6$ , se han descrito como neurotransmisores.

Los pirofosfatos  $IP_5P$  e  $IP_6P$  se encuentran en diferentes estirpes celulares y en el hongo *Dictyostelium discoideum*.

La actividad de la *fosfolipasa C* sobre fosfolípidos, fosfatidilinositol y fosfatidilcolina contribuye a la generación de DAGs, mientras que la hidrólisis por *fosfolipasa A<sub>2</sub>* produce ácidos grasos, preferentemente insaturados, y lisofosfolípidos. La *fosfolipasa D* produce ácido fosfatídico que, a su vez, rinde DAGs por la acción de una fosfohidrolasa específica. Todos estos metabolitos lipídicos se producen como respuesta a la degradación de fosfolípidos de membrana, inducida por señales particulares, y desempeñan su papel más importante en la activación de la *proteína quinasa C* que posee, a su vez, toda una colección de acciones en el interior de la célula. La concurrencia de la acción de las *fosfolipasas D* y *A<sub>2</sub>* sobre fosfolípidos produce monoacilglicerol 3-fosfato (ácido lisofosfatídico), potencial mensajero intracelular regulador del crecimiento y la motilidad celular.

Por otro lado, la *adenilato ciclasa* y la *guanilato ciclasa* pertenecen a las enzimas efectoras activadas por receptores acoplados a sus ligandos extracelulares. Como resultado de esta activación se originan los *mensajeros intracelulares AMP cíclico* y *GMP cíclico* que regulan funciones bioquímicas características de los tejidos blancos, nucleótidos cíclicos que, hace varias décadas, mostraron su capacidad de regulación sobre la acción hormonal. El *segundo men-*

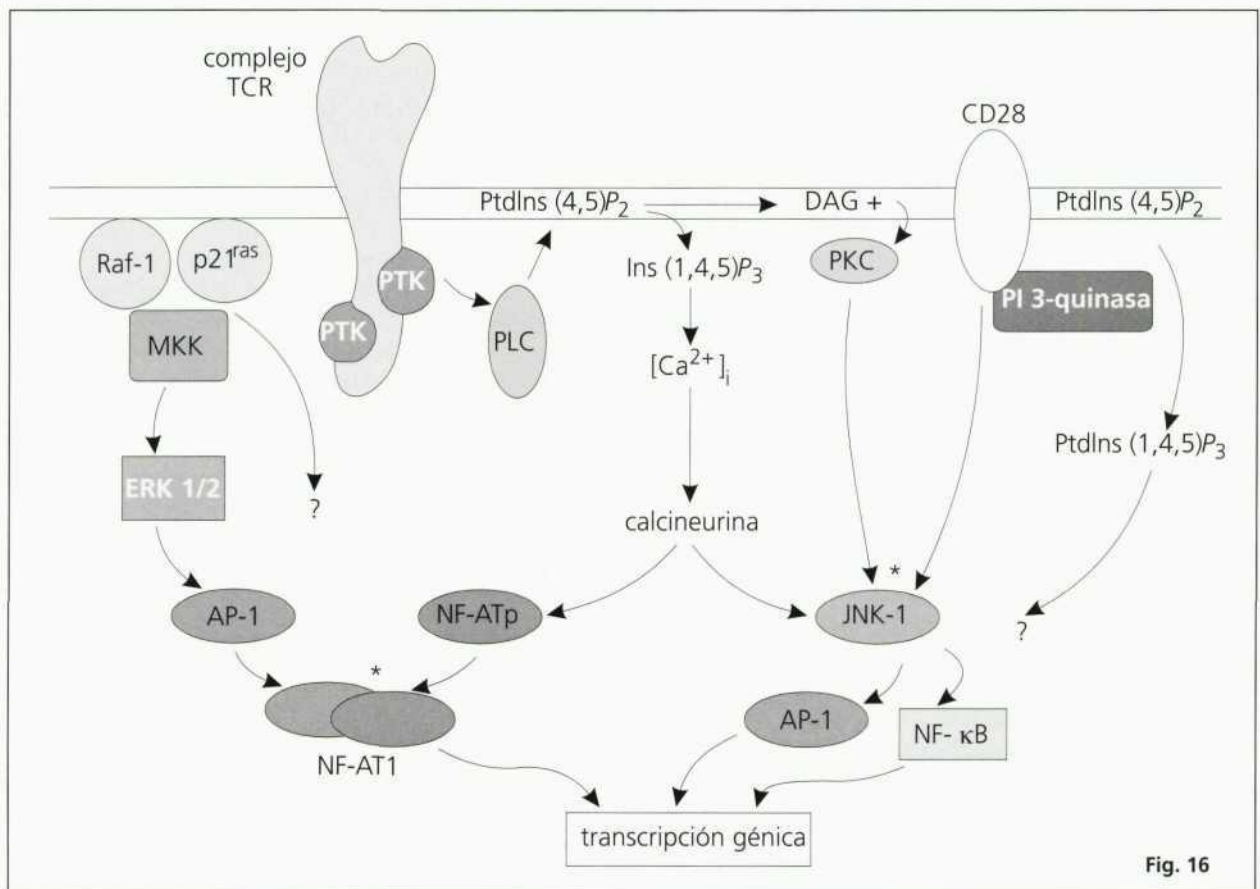
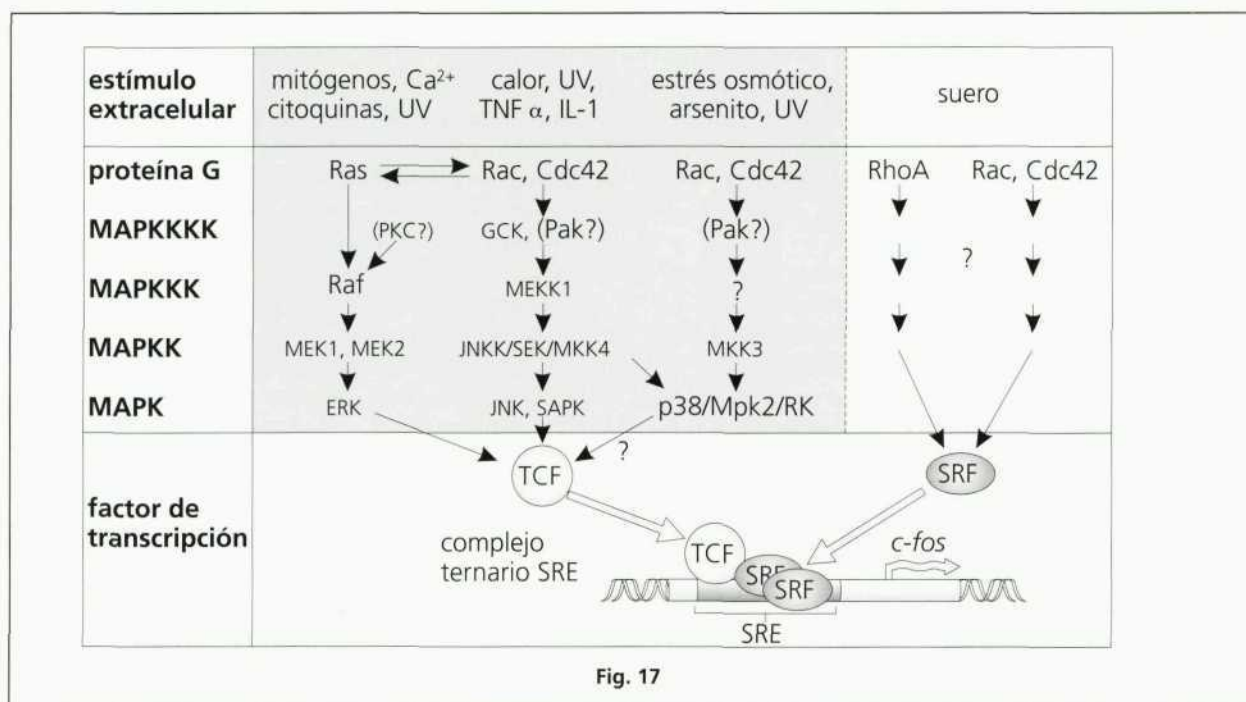


Fig. 16



*sajero AMP cíclico* ejerce prácticamente todos sus efectos a través de su acción activadora de la *proteína quinasa dependiente de cAMP* (PKA), mientras que el *GMP cíclico* activa una específica *proteína quinasa dependiente de cGMP*, localizada predominantemente en el cerebelo y el músculo liso.

### Proteína quinasas y proteína fosfatasas

Se han identificado hasta el momento presente varios centenares de *proteína quinasas* y *proteína fosfatasas*, reguladas por segundos mensajeros, que participan en una diversidad de respuestas frente a toda una colección de estímulos fisiológicos. Por la acción de ambas enzimas tienen lugar fenómenos de *fosforilación* o *defosforilación*, sobre residuos de serina, treonina o tirosina, que desencadenan cambios conformacionales en las proteínas que sirven de sustratos.

La actividad de la *proteína quinasa C* se regula por los DAGs, esenciales para el mantenimiento de las respuestas celulares. Se ha definido una serie de subespecies de PKC: cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), nPKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) y aPKC ( $\zeta$ ,  $\lambda$ ), poseedoras de diferentes propiedades fisicoquímicas y reguladoras, así como distinta expresión en tejidos y localización intracelular. Todos los miembros de la familia de PKC son dependientes de fosfatidilserina y exhiben diferentes requerimientos de Ca<sup>2+</sup> y metabolitos de fosfolípidos. Todas las subespecies de cPKC se activan por la misma serie de efectores: Ca<sup>2+</sup>, DAGs, ácidos grasos libres y lisoPC. Difieren, sin embargo, en la expresión tisular; así, mientras que la distribución de PKC $\alpha$  es universal, la de PKC $\gamma$  está restringida exclusivamente al cerebro.

La activación de la *proteína quinasa C* reduce el péptido  $\beta$ /A4, derivado del precursor de la proteína amiloide de la enfermedad de Alzheimer, lo que ofrece la posibilidad de influir sobre la producción del péptido  $\beta$ /A4. Muchos otros procesos fisiopatológicos se encuentran participados por la *proteína quinasa C*. Igualmente, se han definido ciertas conexiones entre quinasas, por ejemplo las establecidas con motivo de la *transducción de señales mitogénicas*—factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF)— que se inicia en la autofosforilación de los respectivos receptores por activación de los dominios intrínsecos con actividad quínica. La señal se traslada por mediación de MAPK—*proteína quinasas activadas por mitógenos*—, serina/treonina quinasas, de gran versatilidad en toda una colección de procesos de transducción de señales—factores de crecimiento, agentes de diferenciación, neurotransmisores, choque térmico— en virtualmente todos los tipos de células. MAPK existe en forma defosforilada en células quiescentes o sin estimular, y se activa por una *MAP quinasa* que cataliza la fosforilación combinada de treonina y tirosina. La cascada de MAPK (señal  $\rightarrow$  ras p21  $\rightarrow$  MAPKKK  $\rightarrow$  MAPKK  $\rightarrow$  MAPK) se conserva en diversos procesos de *transducción de señales*, desde las levaduras a los vertebrados (figura 17). Una característica singular de esta familia de *proteína quinasas* es la exigencia de fosforilación dual, en treonina y tirosina, para su completa actividad.

La *proteína quinasa A* (proteína quinasa dependiente de AMP cíclico) y la *CAM quinasa* (proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina) participan en numerosos procesos fisiopatológicos, entre otros los vin-



culados a transmisión sináptica excitatoria —la plasticidad sináptica, el desarrollo neuronal y diversas condiciones neuropatológicas— mediados por receptores de glutamato. Estos receptores se modulan directamente por fosforilación y se sugiere que una regulación dinámica de los receptores excitatorios se asocia con algunas formas de aprendizaje y memoria en el cerebro de mamíferos.

Un nuevo tipo de *proteína quinasa* utiliza DNA como señal de su actuación enzimática. La fosforilación activada por DNA se ha observado en lisados de reticulocitos de conejo y en oocitos, huevos o embriones de invertebrados marinos. Esta *proteína quinasa activada por DNA* es una proteína quinasa nuclear que cataliza la fosforilación de serina/treonina.

### INFLAMACIÓN

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

Las diversas *causas* inductoras de la inflamación conducen a los variados *efectos finales* a través de una complicada red de mecanismos de regulación en la que participan *múltiples sistemas de reconocimiento*, *sistemas celulares* y *sistemas enzimáticos de actuación en cascada*. Todos estos mecanismos tienen en común su participación en la elaboración de *mediadores* —citoquinas, linfoquinas, activadores, agentes quimiotácticos, etc.— que cumplen funciones variadas en la globalidad de los *efectos* de la inflamación.

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

Los *sistemas enzimáticos de actuación en cascada* participantes en el proceso de inflamación, que, interrelaciona-

dos, desempeñan a su vez un papel importante en la homeostasis general, responden a cuatro tipos principales: *coagulación*, *fibrinolisis*, *quininas* y *complemento*. Algunos de los productos finales de estos sistemas actúan directamente en la consecución de efectos finales del tipo de la vasodilatación, la permeabilidad vascular, el quimiotactismo, la contracción de los músculos lisos o la movilidad celular, pero pueden actuar asimismo sobre algunas de las células integrantes del *sistema de células accesorias*.

Las *células accesorias* —mastocitos, basófilos y plaquetas, principalmente— producen también mediadores de inflamación, tales como el *factor de activación de plaquetas* (PAF), *prostaglandinas*, *leucotrienos*, *tromboxanos*, *citoquinas*, interleuquinas, etc., para lo cual necesitan ser activadas por ligandos diversos, entre otros, las inmunoglobulinas y los antígenos. Así, la acción de los antígenos sobre los mastocitos provoca su desgranulación y la liberación de mediadores como histamina y sus derivados; y la reacción de los antígenos sobre los linfocitos T provoca la liberación de linfoquinas que activan los macrófagos y producen mediadores de la inflamación. Estas dos acciones de los antígenos inician algunas de las reacciones de hipersensibilidad inmunológica (tipos I y IV).

Así pues, del complejo mecanismo responsable de la respuesta inflamatoria a una acción externa forma parte de toda una colección de entidades moleculares, conexas entre sí, que posee como fundamento físico común la transmisión de señales a través de interacciones ligando-proteína o proteína-proteína. Interacciones que contribuyen a elaborar la compleja red reguladora de la *inflamación*. En realidad, red de *transducción de señales*, con *entradas* —las causas inductoras— y *salidas* —los efectos finales— de múltiple naturaleza. Y dentro de esta compleja red caben aislarse diversos aspectos parciales; entre ellos, los siguientes:

1. La acción desencadenante de la respuesta inflamatoria por parte de los *antígenos*, a través de ambas rutas de recepción: linfocitos B y linfocitos T.
2. La contribución de los *antígenos de histocompatibilidad* HLA (clases I y II) en la *presentación de los antígenos* y los *superantígenos* por ciertos tipos de células: las células presentadoras de los antígenos.
3. La participación de los *receptores no convencionales*  $\gamma/\delta$  de linfocitos T.
4. La función de los *co-receptores* y la participación de las moléculas *coestimuladoras*, asociadas a la presentación de antígenos.
5. La variedad de estímulos extracelulares productores de lesiones celulares, al lado de las citoquinas inflamatorias, tales como el *choque térmico*, la *irradiación*, las *terapias citotóxicas*, el *daño del DNA por medicamentos*, etc., y su vinculación a la acción transductora de cascadas específicas de *proteína quinasa* y de *proteínas G*.
6. La diversidad de *citoquinas proinflamatorias*.
7. Los diferentes *sistemas de adhesión*, moduladores de las interacciones leucocitos-células endoteliales.



8. La gran variedad de los efectos inflamatorios finales, desde la *inflamación sistémica* y las *enfermedades inflamatorias autoinmunes* —la artritis reumatoide, la cirrosis biliar primaria, la diabetes dependiente de insulina, por ejemplo— a la inflamación de órganos y tejidos particulares —aterosclerosis, uveitis, inflamación crónica de la vejiga, etc.—, e, incluso, a la inflamación debida a la presencia de *proteínas específicas* inductoras de artritis autoinmunes —*colágenos* II y XI y la proteína no colágena *agrecano*.
9. La regulación de *enzimas inducibles*, tales como la *óxido nítrico sintasa* (iNOS) y la *prostaglandina sintasa/ciclooxigenasa* y su contribución a la respuesta inflamatoria.
10. La implicación de la *migración de ciertas células* en la génesis de lesiones celulares del tipo de las *placas ateroscleróticas* y la *reestenosis arterial*, y la participación de nuevas *proteínas superficiales*, como las *integrinas complejas*, y, entre ellas, la *integrina  $\alpha$ VB3*.
11. Las posibilidades de *regresión del conjunto inflamatorio* y la participación en ella de *citoquinas especiales*.
12. La *inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias*.

Uno de los más destacados aspectos parciales del proceso inflamatorio se refiere a las etapas superadas desde el descubrimiento en las membranas de los linfocitos humanos de las *proteínas HLA* —expresión génica del complejo principal de histocompatibilidad, localizado en el brazo corto del cromosoma 6— hasta su participación en el *procesado de los antígenos* y, como tal, en los detalles de la activación de los linfocitos B y T.

En efecto, las *proteínas HLA* fueron descubiertas en el hombre, en 1958, por el inmunólogo francés Dausset, veinte años más tarde de su descubrimiento por Gorer en el ratón, y a las que se responsabilizó de los rechazos de los injertos de piel entre donadores y receptores de cepas diferentes. Los estudios genéticos, químicos y físicos, de las diferentes clases, I y II, de estas proteínas, permitieron en seguida el perfecto conocimiento de la estructura primaria y su disposición en la membrana celular, de la estructura tridimensional y la presencia de diversos dominios mediante difracción de rayos X, de las localizaciones en las que se experimentan fosforilaciones, y de su existencia bajo numerosas formas polimórficas. A fin de cuentas, un extraordinario polimorfismo génico manifestado bajo numerosas estructuras primarias diferentes. Estas propiedades de las *proteínas HLA* y, obviamente, su polimorfismo notable se adscriben inmediatamente a los fundamentos responsables de la histocompatibilidad, razón de su descubrimiento; y, así, las proteínas HLA se vinculan a la puesta en marcha de la respuesta inmunitaria, a través de su presencia en la *presentación de los antígenos* a las células B y T. La dicotomía estructural de las proteínas HLA de las clases I y II se traduce en los dos distintos mecanismos de *procesado de los antígenos*: la clase I tiene que ver con el

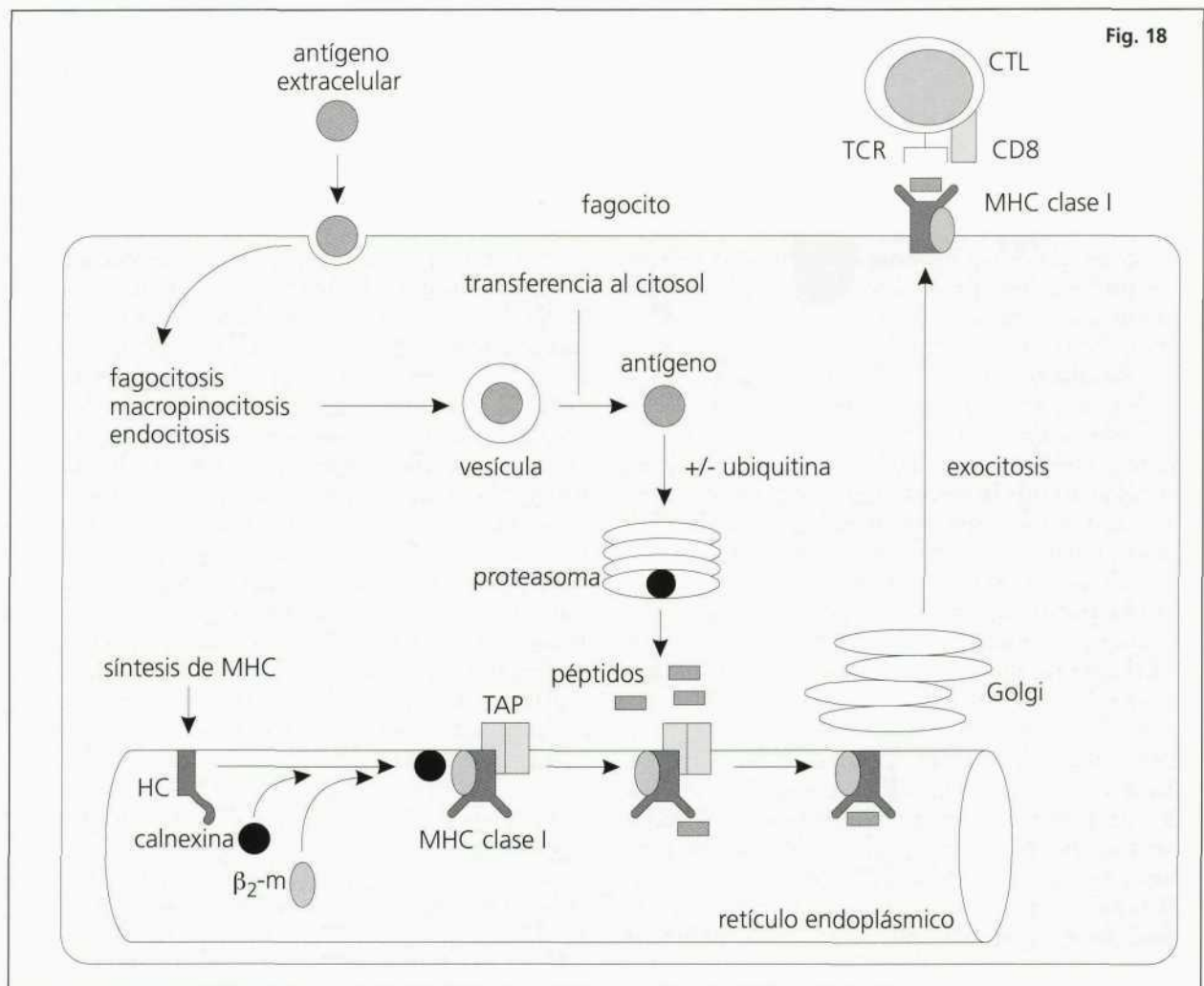
procesado de los antígenos celulares, y la clase II con los extracelulares. Tras el procesado de las proteínas antigénicas, éstas se transforman en péptidos sencillos que se acomodan en un surco que forma la disposición espacial de las proteínas HLA —particularmente sus dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en las de la clase I—. A lo largo de este surco se disponen las regiones hipervariables de las proteínas HLA, causa del polimorfismo. Y, así, el fruto de la interacción *HLA-péptido antigénico* es el que se presenta a las células; y, por ejemplo, los péptidos derivados de los antígenos intracelulares se presentan por lo general a las células T CD8<sup>+</sup> por las moléculas de la clase I que se expresan virtualmente en todas las células; en tanto que los péptidos derivados de los antígenos extracelulares se presentan, por lo general, a las células T CD4<sup>+</sup> por las moléculas de la clase II presentes en las células especializadas. A dos de estas propiedades, el polimorfismo, por un lado, y la inducción inmunitaria, por otro, se debe la vinculación de toda una larga serie de enfermedades autoinmunes —diabetes, artritis, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple, etc.— a marcadores estructurales. Y de aquí surge la relación de los motivos estructurales de las proteínas HLA con la predicción de las alteraciones autoinmunes (figura 18).

Este conjunto *HLA-péptido antigénico* contacta con el receptor de las células T, estableciéndose así un engarce molecular del tipo:

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

Conjunto *HLA-péptido antigénico* que, a su vez, interacciona con otras moléculas del tipo de CD4, CD2, LFA, ICAM, etc., que, a modo de bridas intercelulares, favorecen la capacidad de las células para presentar el antígeno a los linfocitos T. Conjunto *HLA-péptido antigénico* cuyo conocimiento contribuye, de otro lado, al diseño racional de medicamentos en su capacidad de optimizar la afinidad y la especificidad de unión de ligandos, sustratos o inhibidores, a las superficies de las proteínas. Esta *presentación de los péptidos antigénicos* a los receptores de los linfocitos T, CD4<sup>+</sup>, por parte de las células presentadoras (APC) con moléculas de la clase II, ejemplifica también la existencia de *interacciones proteína-proteína* a modo de bridas intercelulares para favorecer la *transducción de señales* y la *secreción de citoquinas*. La transducción se inicia en la fosforilación de residuos de tirosina de las cadenas del complejo CD3, de las proteína quinasas de las familias *src* (p56<sup>lck</sup>, p59<sup>lyn</sup>) y *syk* (ZAP-70) y de la PI 3-quinasa. En la cascada de este flujo de señales participan la fosforilación de la fosfolipasa C  $\gamma 1$  y la hidrólisis de fosfoinosítidos, lo que conduce a un flujo intracelular de Ca<sup>2+</sup> y a la activación de la proteína quinasa C. Y al final se encuentra la generación en el núcleo de *factores de transcripción* que facilitan la expresión de los genes de interleuquina-2 y otras citoquinas. Algunos defectos en estos fenómenos de transducción de señales en las células T constituyen la base de las alteraciones en la inmunogenicidad de ciertas células tumorales, colorrectales y renales, de modo principal.





## APOPTOSIS

El mecanismo de suicidio celular o *apoptosis* es un proceso biológico fundamental de activación programada de una cascada de señales, que participa en el desarrollo y la homeostasis de los organismos multicelulares. Las células mueren por *apoptosis* en el embrión en desarrollo durante la morfogénesis o la sinaptogénesis, y en el animal adulto durante el metabolismo tisular o con motivo de la respuesta inmunitaria. Y al igual que en otros mecanismos de transducción de señales, ciertas células poseen sensores especiales en la superficie o receptores de *muerte* que detectan la presencia de señales extracelulares de *muerte*, tras cuya interacción se desencadena la maquinaria conducente a la *muerte celular*.

La *apoptosis* juega un papel central en el desarrollo y la homeostasis en los metazoos. Así, las células mueren por *apoptosis* en el embrión en desarrollo durante la morfogénesis o sinaptogénesis, y en el adulto durante el metabolismo celular o al final de la respuesta inmunitaria. Y puesto que la función fisiológica de la *apoptosis* es crucial, la distorsión de este proceso es causa de importantes al-

teraciones patológicas. Así, la desregulación temporal de la apoptosis de ciertas neuronas cerebrales contribuye a la génesis de las enfermedades neurodegenerativas, tipo *Alzheimer* y *Parkinson*; mientras que el fallo de las células en división para iniciar la apoptosis por lesión del DNA lo hace en la génesis de la enfermedad cancerosa. En general, el comportamiento inadecuado de los mecanismos apoptóticos participa de numerosos procesos patológicos del tipo de cáncer, infecciones virales y deficiencias inmunitarias.

De todas maneras, los acontecimientos apoptóticos no son tan recientes como ha querido suponerse. Así, procesos de esta naturaleza son propios del desarrollo linfocitario de los órganos linfoides primarios; las células B y T que fallan a experimentar la adecuada redistribución funcional de sus genes o que implican los autoantígenos, están destinadas a morir. Además, en el sistema inmune periférico, la activación de células T por antígenos o superantígenos puede iniciar una expansión clonal y muerte subsecuente de la mayoría de las células activadas; fenómeno conocido como *muerte celular por activación* (AICD).



## Maquinaria apoptótica

Y ha sido en los últimos dos o tres años cuando se han identificado las moléculas que median este proceso de *suicidio celular* regulado, entre las que destacan las denominadas *caspasas* (cysteinyll aspartate-specific proteinases) que están relacionadas con la *enzima convertidora de interleuquina-1 $\beta$*  (ICE o caspasa-1) de mamíferos y con la proteína CED-3, producto de un gen necesario para el suicidio apoptótico en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Efectivamente, las *caspasas* se han encontrado implicadas en el proceso de *apoptosis* por análisis genético en *C.elegans*. La mutación o delección del gen *CED-3* conduce a la abolición de la muerte celular programada que tiene lugar durante el desarrollo hermafrodita del nemátodo. Y la relación del producto de este gen con la *caspasa-1* de mamíferos sugiere la vinculación de esta familia de caspasas con los acontecimientos bioquímicos que gobiernan la apoptosis en los mamíferos. Este nemátodo constituye un excelente modelo para el estudio de los componentes de la maquinaria de muerte celular. Tres productos génicos de *C.elegans* son esenciales para la apoptosis: mientras CED-3 y CED-4 promueven la apoptosis, CED-9 la inhibe. CED-3 existe como zimógeno que se activa por autoproteólisis; CED-4 se une a CED-3 y promueve la activación de este; mientras que CED-9, al unirse a CED-4 y CED-3, mantiene inactivo a CED-3. Normalmente, existe el complejo CED-9/CED-4/CED-3, en el que CED-3 permanece inactivo y los estímulos de apoptosis ocasionan la disociación de CED-9, con lo que se permite la activación de CED-3 y, por tanto, la disponibilidad de la célula para experimentar la muerte celular por apoptosis en *C.elegans*.

La *caspasa-1* es una proteasa responsable de la conversión proteolítica del precursor inactivo *prointerleuquina 1 $\beta$*  de 31 kDa (proIL-1 $\beta$ ) a su forma activa de 17.5 kDa. La acción proteolítica ocurre en el enlace peptídico asp116-ala117. Así pues, la *caspasa-1* es un ingrediente fundamental de los procesos basados en la acción de IL-1, del tipo de las enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. Recientemente, la *caspasa-1* se ha visto implicada en la maduración proteolítica del *factor de inducción del interferón- $\gamma$*  (IGIF), una citoquina de 18 kDa que estimula la producción de interferón- $\gamma$  por células T.

A su vez, la *caspasa-1* se sintetiza bajo la forma de una proenzima inactiva de 45 kDa, presente en el citoplasma celular, y proteolíticamente activada para dar lugar a las dos subunidades de un dímero (una de 20 kDa y otra de 10 kDa).

Una célula que simultáneamente es capaz de recibir señales antagónicas, dirigiendo o atenuando su ciclo de división, gobierna también la posibilidad de su apoptosis. En los vertebrados ha evolucionado una familia de genes análogos a los responsables de la muerte celular en *C.elegans*. En los mamíferos ha evolucionado otro mecanismo que posibilita a los organismos dirigir activamente la auto-destrucción de las células individuales; clase de apoptosis

de importancia especial en el sistema inmunitario. Las *caspasas* de mamíferos son similares a CED-3. CED-4 tiene su homólogo Apaf-1 en mamíferos. CED-9 está relacionado con los productos de la familia de genes *Bcl-2* en mamíferos que, a su vez, incluye dos subgrupos de proteínas que inhiben o promueven la apoptosis: las del subgrupo *ICE* (*caspasas 1, 4 y 5*) que juegan un importante papel en la inflamación, y las del subgrupo *CED-3* (*caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10*) con una gran implicación en la apoptosis (figura 19).

La transmisión de las señales de apoptosis se inician en los receptores de la superficie celular por medio de ligandos específicos —*ligandos mortales*—. Tras la activación de estos receptores, se produce rápidamente la de las *caspasas* y, al cabo de algunas horas, la apoptosis celular. Los *receptores mortales* pertenecen a la familia de los receptores de los *factores de necrosis tumoral* (TNF), con dominios extracelulares ricos en cisteína y, además, una secuencia citoplásmica conocida como *dominio mortal* (DD). Estos dominios DD conectan los receptores con la maquinaria capaz de desencadenar la apoptosis celular, pero que, también, en algunos casos participan en otras funciones diferentes, o aun contrarias, a la apoptosis. Y algunas moléculas que transmiten señales desde los receptores mortales contienen también dominios del tipo DD. Los *receptores mortales* mejor caracterizados son *CD95* (sinónimos: Fas y Apo 1), *TNFR1* (sinónimos: p55 y CD120a), *receptor mortal 3* (DR3) (sinónimos: Apo3, WSL-1, TRAMP y LARD),

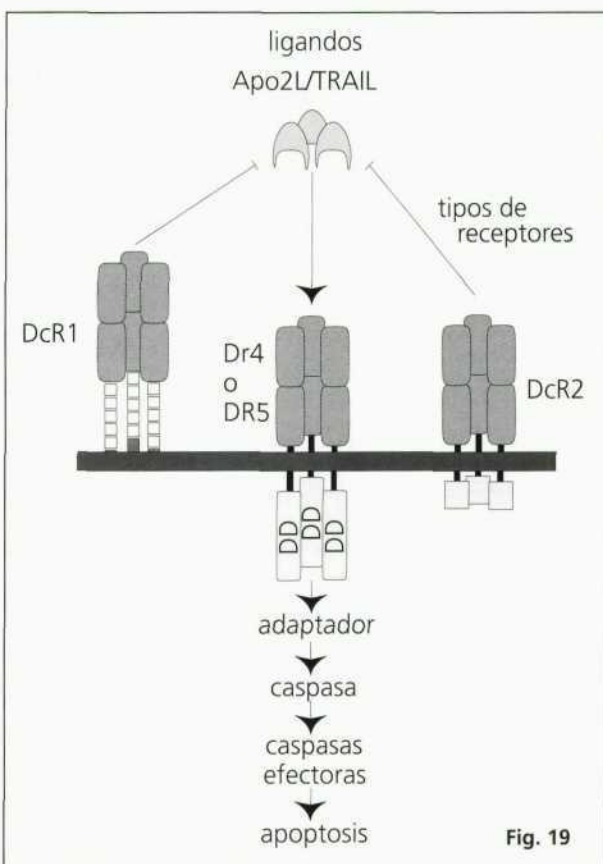


Fig. 19



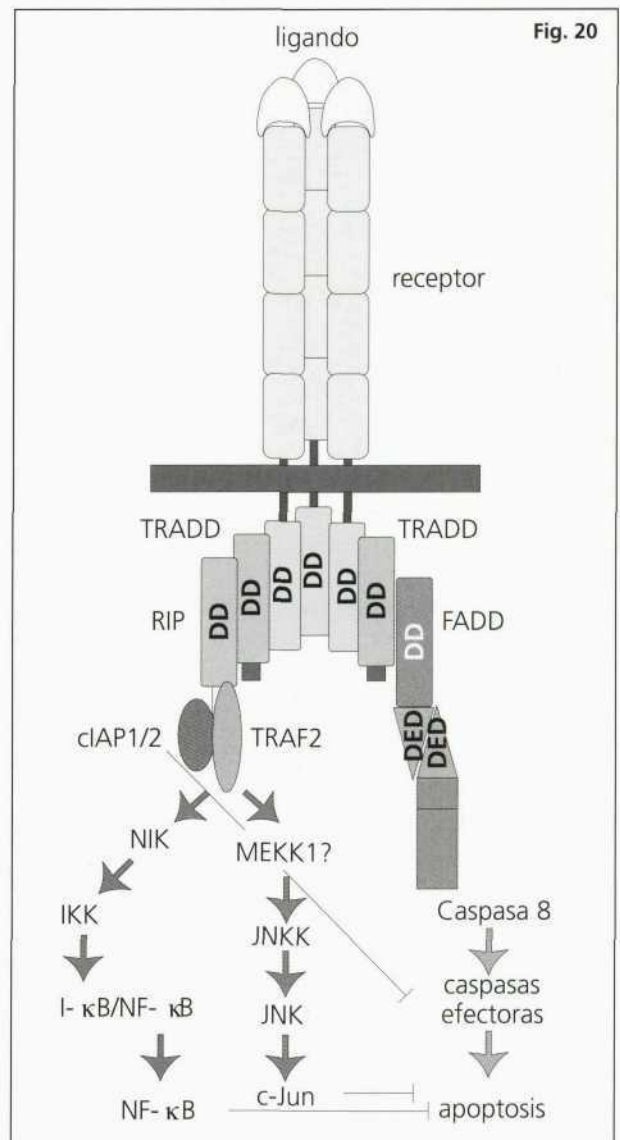
*DR4* y *DR5* (sinónimos: Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2 y KILLER). Los *ligandos* que activan estos receptores son NGF o el conjunto de moléculas relacionadas pertenecientes a la familia de NGF. Así, el ligando *CD95* se une al receptor *CD95*; *TNF* y *linfotóxina* se unen a *TNFR1*; el ligando *Apo3* (Apo3L y TWEAK) se une a *DR3*; y el ligando *Apo2* (Apo2L y TRAIL) se une a *DR4* y *DR5*.

La regulación de la actividad de las *caspasas* tiene lugar predominantemente como consecuencia del proceso de maduración de las proenzimas. Las proenzimas inactivas se transforman en *proteasas heterodiméricas* catalíticamente competentes por rotura proteolítica de enlaces asp-X. La activación *in vivo* de las *caspasas* ocurre, al menos, mediante dos mecanismos diferentes. De un lado, sucede que las *caspasas* participan de una cascada de sucesivas actuaciones proteolíticas en la que unas *caspasas* se activan por otras *caspasas* o por proteasas de semejante actividad. Así, la serina proteasa *granzima B* cataliza la activación de otras caspasas efectoras; mecanismo que ha sido propuesto para la muerte celular mediada por linfocitos citotóxicos. De otro lado, se ha comprobado *in vivo* la existencia de un tipo de activación de *caspasas* por autoproteólisis intermolecular, por ejemplo en el modelo de apoptosis Fas (sinónimos: Apo-1 y CD95). En este sistema, la unión del ligando Fas-L o del TNF al receptor correspondiente (Fas o TNF-R) da lugar a un complejo de señalización formado, en el primero de los casos, por su receptor específico, la proteína adaptadora FADD y la proenzima *caspasa 8*, de forma que la interacción entre los dominios intracelulares (DD), tanto del receptor Fas como del adaptador FADD, produce la dimerización de las dos regiones homólogas. A su vez, FADD se asocia con la forma proenzimática de la *caspasa 8* a través de la dimerización de sus dominios homólogos (DED). Un mecanismo semejante se ha comprobado en el caso de la actuación del TNF como ligando y de la proenzima *caspasa 2*. Este tipo de recientes resultados, en su conjunto, sugieren que las caspasas efectoras son mediadoras de un proceso de *muerte celular*, desencadenado en respuesta a una variedad de estímulos. Conjunto de actividades proteolíticas que dan lugar a la formación de proteínas específicas, implicadas en el mantenimiento normal de las funciones celulares, de diversas proteínas estructurales y del fenotipo apoptótico (figura 20).

Varias *caspasas* pueden activarse por escisión proteolítica, dando lugar a una cascada enzimática. De otro lado, las *caspasas* están conectadas con *esfingomielinasas* que generan *ceramidas* y *gangliosidos*. Finalmente, hay que tener presente la existencia de una *regulación de la apoptosis*, y, entre las moléculas reguladoras, el óxido nítrico (NO) es una de las más importantes.

### Apoptosis y neurotransmisión

El bloqueo de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), durante algunas horas del desarrollo fetal a término o de la primera vida neonatal, es capaz de desencadenar una amplia *neurodegeneración apoptótica del cerebro* de rata en desarrollo; lo que sugiere que el glutamato, neurotransmisor excitador, al actuar sobre los receptores NMDA, controla la supervivencia neuronal. Hechos que pueden relacionarse con alteraciones pre y postnatal del desarrollo neuronal humano; entre las que se incluyen la anestesia pediátrica y la exposición postnatal a medicamentos que bloquean los receptores NMDA, y el abuso materno de drogas con repercusión prenatal.



denar una amplia *neurodegeneración apoptótica del cerebro* de rata en desarrollo; lo que sugiere que el glutamato, neurotransmisor excitador, al actuar sobre los receptores NMDA, controla la supervivencia neuronal. Hechos que pueden relacionarse con alteraciones pre y postnatal del desarrollo neuronal humano; entre las que se incluyen la anestesia pediátrica y la exposición postnatal a medicamentos que bloquean los receptores NMDA, y el abuso materno de drogas con repercusión prenatal.

### Apoptosis e inflamación

El proceso apoptótico juega un papel fundamental en la *patogénesis de la inflamación crónica*, con la posibilidad, por tanto, de ser explotado terapéuticamente. Ciertas enfermedades inflamatorias crónicas son gobernadas por linfocitos T activados que participan en ciclos de infiltración celular y destrucción de tejidos a través de la liberación de citoquinas que, a su vez, definen las respuestas inmu-



nitarias humoral y celular en los órganos afectados. Las células T se activan inicialmente por células presentadoras de antígenos en los tejidos linfoides regionales; pero, en el asma, enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, la activación de los linfocitos auxiliares T (Th), con los marcadores superficiales CD4, dirigen la destrucción tisular a través, principalmente, de sus citoquinas IL-4 e IL-5, que promueven, respectivamente, la sensibilización hacia IgE de los tejidos respiratorios y la inflamación eosinofílica. La gran cantidad de células CD4<sup>+</sup> en las vías celulares asmáticas contiene una población expandida de células T específicas de relativamente pocos antígenos. Las células T en reposo expresan muy pocos receptores de apoptosis Fas, en tanto que durante la activación se eleva su concentración de forma que son particularmente susceptibles a la apoptosis mediada por Fas. Y la enfermedad crónica pudiera resultar simplemente del escape de algunas de estas células de la muerte programada por interacción FasL-Fas; lo que también pudiera evitarse mediante el empleo de anticuerpos activadores de Fas o la administración de FasL adicional. Recientemente se han identificado algunos pacientes raros con una *eosinofilia sistémica* ocasionada por la carencia de muerte celular mediada por Fas. En cualquier caso, la especificidad y diversidad de programas apoptóticos sugieren la posibilidad de aproximaciones farmacológicas para el control de la cronicidad inflamatoria.

## Apoptosis y cáncer

Y, finalmente, otra importante conexión con los mecanismos de la apoptosis es la que relaciona la inhibición de las señales apoptóticas con la *resistencia a la quimioterapia* por parte de las células cancerosas. En efecto, la resistencia a la quimioterapia, adquirida o *de novo*, por las células tumorales, impide el logro de resultados satisfactorios en muchos casos de transformaciones malignas hematológicas y de colon, pulmón y mama. Resistencia que, aunque pueda deberse a una diversidad de factores, tales como el acceso vascular de los medicamentos, suele obedecer generalmente a causas intrínsecas, entre las que se encuentran la *disminución de la captura celular del medicamento*, la *eliminación de los aductos DNA-medicamento*, la *amplificación génica del blanco*, el *incremento de la reparación del DNA lesionado por el medicamento* y, dado que los antitumorales provocan un daño celular que induce la muerte celular programada —tal es el caso de la respuesta de muchos tipos de células tumorales frente a *cisplatino*, *adriamicina* y *Ara-C*—, otro mecanismo de quimiorresistencia puede ser la afectación de los propios mecanismos de apoptosis.

La cascada de señales de *proteína quinasas activadas por mitógenos* (MAPK), en la que participa una gran familia de proteínas de amplia distribución entre los eucariontes, sirve a diferentes fines gobernados por estímulos extracelulares, entre otros la *promoción* o la *inhibición* de la *muerte celular por apoptosis*. En los sistemas de mamíferos se

han reconocido tres sistemas MAPK de señales: 1) la cascada de las *proteína quinasas 1 y 2 reguladas por estímulos extracelulares* (ERK 1 / 2); 2) la cascada de las *quinasas p38<sup>HOG</sup>*; y 3) la cascada de la *proteína quinasa activada por estrés* (SAPK)(figura 21). Las MAPKs mejor estudiadas son las del primer grupo; se activan por fosforilación de residuos de treonina y tirosina, iniciada por factores de crecimiento y mediada por una quinasa de especificidad dual. La ERK 1 / 2 es capaz de inducir la proliferación celular, es decir, protege a las células de la apoptosis. De otro lado, tanto la activación de las SAPKs (también conocidas como proteína quinasa c-Jun N-terminal, JNKs) como la p38<sup>HOG</sup>, se activan por agentes estresantes, tales como TNF $\alpha$ , IL-1, choque térmico, luz ultravioleta e isquemia. Además, las SAPKs se activan por una variedad de agentes quimioterápicos, tales como *cis*-platino, adriamicina y 1- $\beta$ -Darabinofuranosilcitosina. Activación que se logra asimismo por fosforilación de treonina y tirosina por quinasas específicas diferentes en ambos casos (figura 21).

Cómo de la activación de estas quinasas se sigue un daño genotóxico está comenzando a comprenderse. Una de las posibilidades consiste en que la lesión del DNA vaya ligada a la distorsión de la actividad de una proteína quinasa DNA-dependiente. Esta proteína quinasa (DNA-PK) estimula la Abl quinasa que, a su vez, conduce a la activación de la SEK-1. La SAPK activada fosforila c-Jun y otros factores de transcripción. Los mecanismos que conducen a la activación de p38<sup>HOG</sup> por los agentes estresantes están ligados a la activación de ATF2, GADD153 y las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular. Puesto que SAPK y p38<sup>HOG</sup> se activan por estímulos genotóxicos, cabe preguntarse acerca de su participación en la reparación de macromoléculas o, alternativamente, son capaces de desencadenar apoptosis tras un daño extenso. El choque térmico induce la actividad de SAPK en la línea de fibrosarcoma RIF-1, lo que es esencial para la apoptosis celular. En células neurales diferenciadas, SAPK es esencial para la muerte celular tras la acción de factores tróficos; sin embargo, los ratones deficientes de JNK3 —isoforma de SAPK específica de cerebro— son resistentes a la apoptosis del hipocampo tras estímulos excitotóxicos.

SAPK es asimismo un *mediador de apoptosis* en el tratamiento quimioterápico. El bloqueo de SAPK protege a las células de ciertos tipos de tratamientos, por ejemplo de las antraciclinas y las podofilotoxinas. Sin embargo, en las células leucémicas U937, SAPK es esencial para la apoptosis provocada por ceramida, mediador de la citotoxicidad de ciertos agentes quimioterápicos. Asimismo, la expresión ectópica de MEKK —un activador anterior de SAPK— contribuye a la muerte celular por sensibilización de fibroblastos a los efectos letales de un cierto número de antitumorales.

Algunos otros reguladores moleculares de la apoptosis pueden actuar a través de SAPK. Y entre los mecanismos atribuidos a SAPK para interpretar su participación en los mecanismos de apoptosis, se sugiere una acción anterior a las caspasas, aunque en algunos tipos de ligandos,



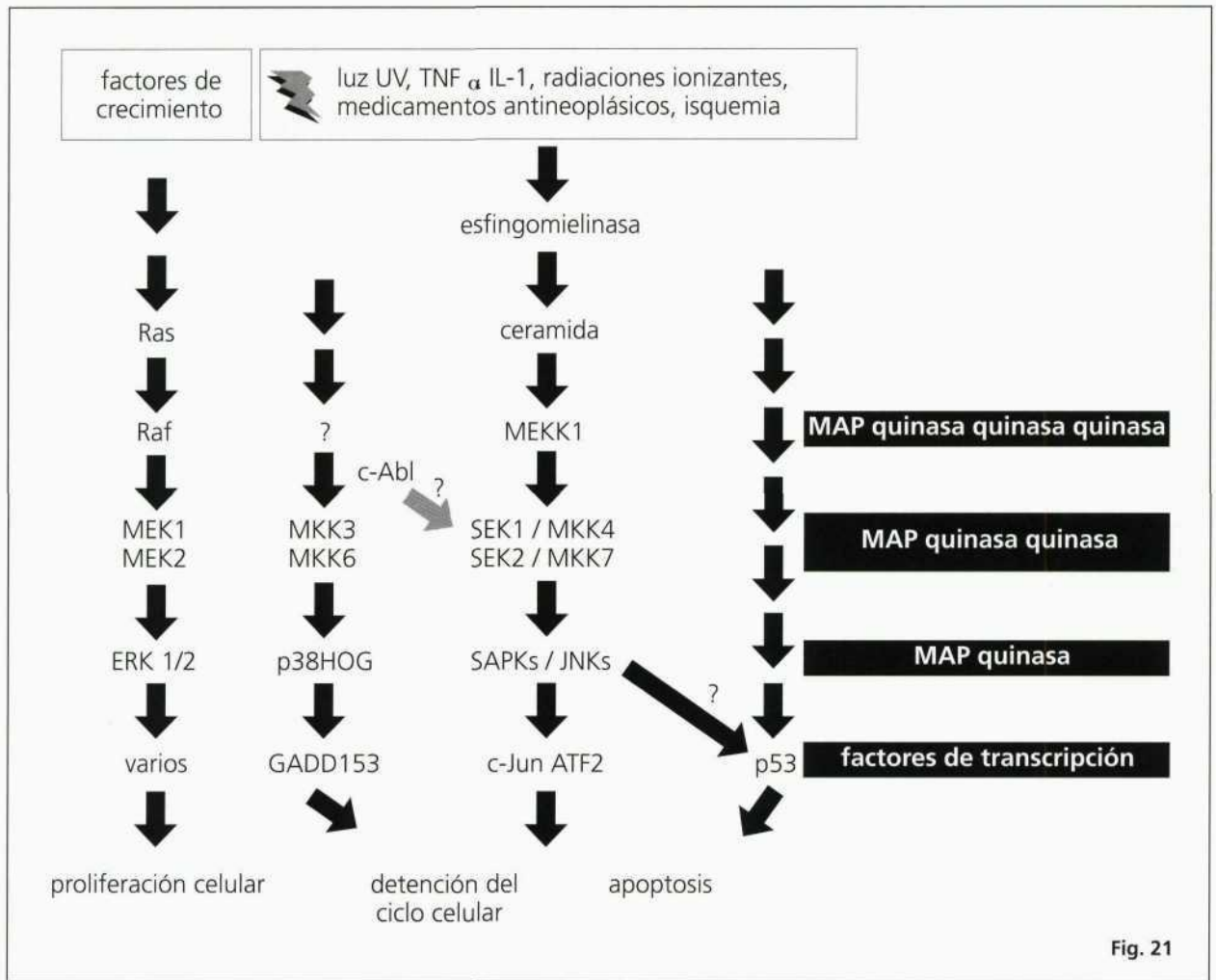


Fig. 21

como en el caso de Fas, se activen las SAPKs en una posición posterior a la de las caspasas.

La mejor comprensión de los mecanismos moleculares de regulación apoptótica y la demostración de los defectos moleculares en la resistencia clínica a la quimioterapia tumoral, habrán de contribuir a diseñar nuevas estrategias farmacológicas para devolver a las células tumorales su sensibilidad frente a los agentes quimioterápicos. Sin embargo, la gran complejidad de los fenómenos de apoptosis posibilita la existencia de numerosas localizaciones de la anormalidad. Y, por tanto, la rápida identificación de estas alteraciones en muestras clínicas servirá para restaurar en la práctica la respuesta apoptótica.

#### BIBLIOGRAFÍA

- AMAN, M. J., y LEONARD, W. J., «Cytokine Signaling: Cytokine-inducible Signaling Inhibitors», *Current Biology*, n.º 7, 1997, págs. R784-R788.
- ASHKENAZI, A., y DIXIT, V. M., «Death Receptors: Signaling and Modulation», *Science*, n.º 281, 1998, págs. 1305-1308.
- BAZÁN, N., BOTTING, J., y VANE, J., *New Targets in Inflammation*, William Harvey Press, 1996.
- DURNER, Jörg, SHAH, J., y KLESSIG, Daniel F., «Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants», *Trends in Plant Science*, n.º 2, 1997, págs. 266-274.
- ELION, Elaine A., «Routing MAP kinase cascades», *Science*, n.º 281, 1998, págs. 1625-1626.
- GOLD, Ralf, HARTUNG, Hans-Peter, y LASSMANN, Hans, «T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms», *TINS*, n.º 20, 1997, págs. 399-404.
- GREEN, Douglas R., «Death deceiver», *Nature*, n.º 396, 1998, págs. 629-630.
- HAQ, R., y ZANKE, B., «Inhibition of Apoptotic Signaling Pathways in Cancer Cells as a Mechanism of Chemotherapy», *Cancer and Metastasis Reviews*, n.º 17, 1998, págs. 233-239.
- HOEY, Timothy, «A New Player in Cell Death», *Science*, n.º 278, 1997, págs. 1578-1579.
- KALGUTKAR, AMIT S., et al., «Aspirin-like Molecules that Covalently Inactivate Cyclooxygenase-2», *Science*, n.º 280, 1998, págs. 1268-1273.

- KING, R. W., et al., «How Proteolysis Drives the Cell Cycle», *Science*, n.º 274, 1996, págs. 1652-1658.
- KUMAR, S., «ICE-like Proteases in Apoptosis», *TIBS*, n.º 20, 1995, págs. 198-200.
- MANN, CHARLES C., y PLUMMER, MARK L., *The Aspirin Wars*, Harvard Business School Press, Boston (Massachusetts), 1991.
- MARTÍN MUNICIO, Á., y MIRAS-PORTUGAL, M. T., *Cell Signal Transduction, Second Messengers and Protein Phosphorylation in Health and Disease*, Plenum Press, Nueva York, 1994.
- MORIMOTO, Richard I., y SANTORO, M. Gabriella, «Stress-inducible responses and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection», *Nature Biotechnology*, n.º 16, 1998, págs. 833-838.
- NICHOLSON, Donald W., y THORNBERRY, Nancy A., «Caspases: Killer Proteases», *TIBS*, n.º 22, 1997, págs. 299-307.
- PIERPOINT, W. S., «The Natural History of Salicylic Acid: Plant Product and Mammalian Medicine», *Interdisciplinary Science Reviews*, n.º 22, 1997, págs. 45-52.
- SERVICE, R. F., «Closing In on a Stomach-Sparing Aspirin Substitute», *Science*, n.º 273, 1996, pág. 1660.
- TANG, D. G., et al., «Arachidonate Lipoxygenases as Essential Regulators of Cell Survival and Apoptosis», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n.º 93, 1996, págs. 5241-5246.
- WALLACH, David, «Placing Death under Control», *Nature*, n.º 388, 1997, págs. 123-125.
- YAFFE, M. B., y CANTLEY, L. C., «Grabbing Phosphoproteins», *Nature*, n.º 402, 1999, págs. 30-31.