

ANALES DE LA REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA



2008

VOLUMEN LXXIV

Núm. 4

Publicación trimestral

Domicilio de la Academia

FARMACIA, 11

•

28004 MADRID

Resistencia a insulina en el músculo esquelético: conexión con la obesidad

Recibido el 28 de mayo de 2008

IRIA NIETO-VÁZQUEZ, SONIA FERNÁNDEZ-VELEDO, LUCÍA
GARCÍA-GUERRA, ROCÍO VILA-BEDMAR, Y MARGARITA
LORENZO*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de
Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.*

RESUMEN

Entre las complicaciones asociadas a la Obesidad, tiene una especial relevancia el desarrollo de resistencia a la insulina, siendo el primer eslabón de una amplia patología conocida como diabetes tipo 2. La Obesidad se considera como un estado crónico de inflamación de baja intensidad, como indican los niveles circulantes elevados de moléculas proinflamatorias. Se ha propuesto al TNF α como el nexo de unión entre

*** Correspondencia:**

Dra. Margarita Lorenzo.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid.

Plaza de Ramón y Cajal, s/n. 28040. Madrid, Spain.

Tel.: 34-913941858. Fax: 34-913941779.

e-mail: mlorenzo@farm.ucm.es

Abreviaturas: AMPK, proteína quinasa dependiente de AMP; AS160, sustrato de AKT de 160 kDa; ERK, quinasas reguladas por señales extracelulares; IGF, factor de crecimiento insulínico; IKK, quinasa del inhibidor de NF-kB; IL, interleuquina; IR, receptor de insulina; IRS, sustrato del receptor de insulina; JNK, c-Jun N-terminal quinasa; LXR, liver X receptor; MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PTP, proteína tirosina fosfatasa; PPAR, receptor activado por proliferadores peroximales; TNF, factor de necrosis tumoral; TZD, tiazolidindionas; UCP, proteínas desacoplantes.

adiposidad y desarrollo de resistencia a insulina ya que la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 son obesos y tienen aumentada la expresión de $\text{TNF}\alpha$ en sus adipocitos, y los animales obesos delecionados para la función del $\text{TNF}\alpha$ o su receptor no desarrollan resistencia a insulina. Las citocinas proinflamatorias producidas por los adipocitos y/o macrófagos activan quinasas de estrés, proinflamatorias y factores de transcripción que actúan sobre los tejidos periféricos (entre ellos el músculo y el propio tejido adiposo) produciendo resistencia a la acción de la insulina, que es un defecto en la señalización a varios niveles. En concreto, el $\text{TNF}\alpha$ activa la quinasa p38MAPK que fosforila en residuos de serina a los IRSs, bloqueando su fosforilación en tirosina en respuesta a la insulina, tanto en adipocitos marrones como en miocitos. Muy recientemente hemos observado que la fosfatasa PTP1B también está implicada en la resistencia a insulina por $\text{TNF}\alpha$ en ambos modelos. En la clínica se está utilizando actualmente el tratamiento con tiazolidindionas en pacientes con diabetes tipo 2. Otros agonistas de receptores nucleares empiezan a aparecer en la bibliografía como potenciales sensibilizadores a acción de la insulina, entre ellos el LXR, que puede antagonizar la señalización proinflamatoria en los propios adipocitos y/o en el músculo.

Palabras clave: Transporte de glucosa.- LXR.- PTP1B.- $\text{TNF}\alpha$.- IL-6.

ABSTRACT

Obesity-Associated Insulin resistance in skeletal muscle

Insulin resistance is an important contributor to the pathogenesis of type 2 diabetes and obesity is a risk factor for its development, due in part to the fact that adipose tissue secretes proteins called adipokines that may influence insulin sensitivity. Among these molecules, $\text{TNF}\alpha$ has been proposed as a link between obesity and insulin resistance because $\text{TNF}\alpha$ is overexpressed in adipose tissues of obese animals and humans, and obese mice lacking either $\text{TNF}\alpha$ or its receptor show protection for developing insulin resistance. The direct exposure to $\text{TNF}\alpha$ induced a state of insulin resistance on glucose uptake in myocytes and brown adipocytes, due to the activation of pro-inflammatory pathways that impair insulin-signaling at the level of the IRS proteins. In this regard the residue Ser307 in IRS-1 has been identified as a site for $\text{TNF}\alpha$ -inhibitory effects in myotubes, with being p38MAPK and IKK involved in the phosphorylation of this residue. Conversely, serine phosphorylation of IRS-2 mediated by $\text{TNF}\alpha$ activation of MAPKs was the mechanism found in brown adipocytes. The phosphatase PTP1B acts as a physiological negative regulator of insulin signaling by dephosphorylating the phosphotyrosine residues of the insulin receptor and IRS-1, and PTP1B expression is increased in muscle and white adipose tissue of obese and diabetic humans and rodents. Moreover, up-regulation of PTP1B expression has recently been found in cells treated with $\text{TNF}\alpha$. Accordingly, myocytes and primary brown adipocytes

deficient on PTP1B are protected against insulin resistance by this cytokine. Furthermore, down-regulation of PTP1B activity is also possible by the use of pharmacological agonists of nuclear receptors that restored insulin sensitivity in the presence of $\text{TNF}\alpha$. In conclusion, the lack of PTP1B in muscle and brown adipocytes increase insulin sensitivity and glucose uptake and could confer protection against insulin resistance induced by adipokines.

Key words: Glucose uptake.- LXR.- PTP1B.- $\text{TNF}\alpha$.- IL-6.

INTRODUCCIÓN

La diabetes, que constituye uno de los principales problemas de salud pública, se define como un estado en el que el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos no está regulado de manera adecuada por la insulina, provocando un aumento de los niveles plasmáticos de glucosa, tanto en situaciones de ayuno como tras la ingesta de nutrientes, y que conduce al desarrollo de patologías asociadas si no se inicia un tratamiento adecuado. En concreto, la diabetes tipo 2 o insulino-independiente, afecta aproximadamente al 90% de los pacientes diabéticos y es el resultado de graves defectos tanto en la secreción de la insulina por el páncreas como en la acción de la hormona en el hígado y en los tejidos adiposo y muscular. Aunque aún no se conoce con exactitud la etiología de este desorden metabólico, una combinación de factores genéticos y ambientales, tales como la edad, una dieta rica en grasa o la inactividad física, estarían implicados en la progresión del mismo. El músculo esquelético es el tejido responsable de la utilización de la mayor tasa de glucosa en respuesta a insulina, y por tanto, es el órgano en el que se detectan los primeros defectos relacionados con la resistencia a dicha hormona (1).

La resistencia a la acción de la insulina, definida como un estado de respuesta a concentraciones normales circulantes de insulina inferior a lo normal, es la característica principal de la diabetes tipo 2 e implica alteraciones en el transporte, metabolismo o almacenamiento de la glucosa. En concreto, en el músculo esquelético de pacientes que desarrollan resistencia a insulina se ha observado, en los primeros

estadios, una reducción en la expresión de GLUT4 y en el transporte de glucosa y, seguidamente, una disminución en el metabolismo no oxidativo de la glucosa y en la síntesis de glucógeno. Estos fenómenos se agravan y desembocan en un estado severo de hiperglucemia, responsable de diversas complicaciones en otros tejidos (2). Varios estudios epidemiológicos en diferentes grupos de la población, indican que la diabetes tipo 2 progresa a lo largo de un continuo empeoramiento en la respuesta a insulina, comenzando por una resistencia periférica a la acción de la misma y terminando con la pérdida de secreción por parte de las células β del páncreas (Figura 1).

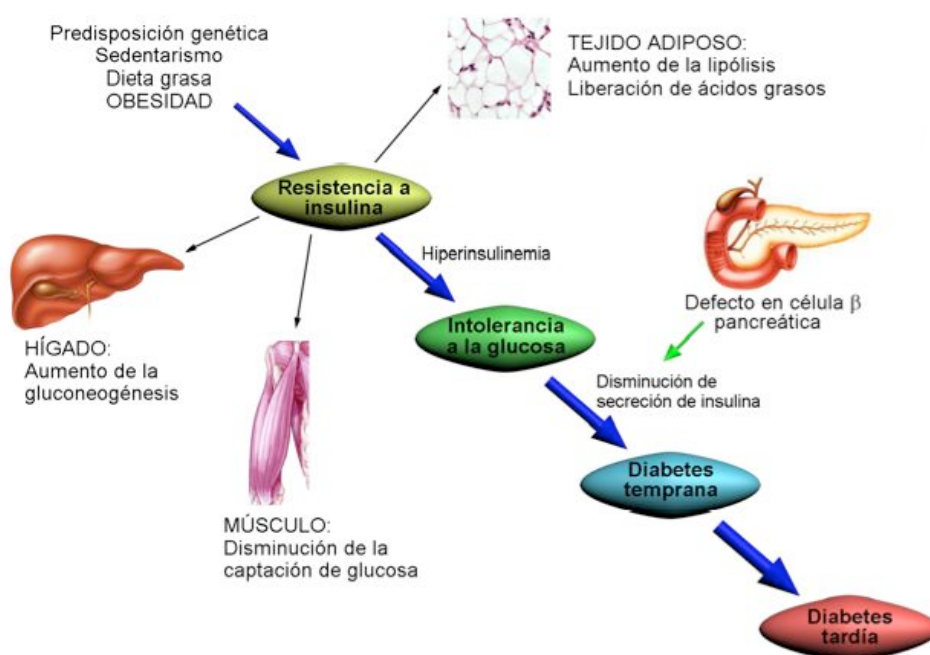


FIGURA 1.- *Etapas del desarrollo de resistencia a insulina y diabetes tipo 2.*

En la mayoría de los pacientes, la resistencia a insulina puede ser detectada mucho antes de que se produzca intolerancia a la glucosa, puesto que una de las primeras manifestaciones es el fallo en la captación de glucosa por parte del músculo esquelético. Asimismo, la aparición en el tejido adiposo de resistencia a los efectos antilipolíticos de la insulina, provoca un incremento en la lipólisis y la liberación de ácidos grasos que merman la capacidad de la hormona para reprimir la producción de glucosa en el hígado, aunque aún se permite la síntesis de ácidos grasos. Esta desregulación del metabolismo de hidratos de carbono y lípidos contribuye a acelerar la progresión de la resistencia a la insulina. En los primeros estadios, las células β pancreáticas responden con un incremento en la secreción de la hormona, generando un estado de hiperinsulinemia compensada, lo que contribuye a largo plazo a agravar este desorden metabólico. El exceso prolongado de insulina circulante hace que las células β no puedan mantener el mecanismo de compensación y fallan a la hora de responder apropiadamente a la glucosa, lo cual desemboca en el desarrollo de intolerancia al azúcar. Así, aproximadamente un 5-10% de los pacientes intolerantes a la glucosa en menos de un año pasan a ser diabéticos, continuando con un agravamiento progresivo de la resistencia a insulina. Las células adiposas generan más ácidos grasos, el hígado produce glucosa de manera incontrolada y las células β pancreáticas fallan totalmente, llegando a las últimas etapas de la enfermedad donde se requieren ya altas dosis de insulina exógena. La falta de respuesta a la acción de la insulina y la hiperinsulinemia, incluso en ausencia de diabetes, conducen a una gran variedad de anormalidades, incluyendo un aumento de triglicéridos, una disminución de los niveles de HDL, un aumento de secreción de VLDL, desórdenes en la coagulación, aumento de la resistencia vascular, cambios en los niveles de hormonas tiroideas, atenuación del flujo de sangre periférico y ganancia de peso. Por todo ello, la resistencia a la insulina se asocia con la obesidad, hipertensión, dislipidemia y aterosclerosis. A este conjunto de síntomas se le denomina síndrome X o síndrome de resistencia a insulina (2).

MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

Durante muchos años varios grupos han estudiado las posibles alteraciones de los componentes de la cascada de señalización de la insulina en situaciones de resistencia a la misma, en un esfuerzo por definir la etiología y los mecanismos moleculares de esta patología. La estimulación con insulina induce la autofosforilación y consecuente activación de su propio receptor localizado en la membrana, y por tanto, éste es el primer fenómeno de la ruta susceptible de modificación. De hecho, en el músculo esquelético de sujetos obesos con resistencia a insulina o de pacientes diabéticos se ha visto una disminución en la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina, en algunos casos consecuencia de un aumento en la cantidad de serinas fosforiladas (1). Recientemente, se ha sugerido que la fosforilación en serina y treonina del receptor de insulina puede estar mediada por alguna isoforma de PKC (3). Por otra parte, se ha observado una disminución en el número de receptores en la superficie celular en estas situaciones, debido a una mayor degradación de los mismos, o bien, a un aumento en el contenido de receptores híbridos de insulina/IGF-I en los tejidos periféricos diana para la acción de la insulina (1). Sin embargo, se ha propuesto que defectos en elementos de la ruta situados por debajo del receptor son los que están directamente implicados en el desarrollo de resistencia a insulina en el músculo esquelético, ya que aunque han observado una reducción en el transporte de glucosa en este tejido en pacientes con diabetes tipo 2, no han detectado diferencias en la fosforilación en tirosina de la cadena β del receptor de insulina respecto a los sujetos sanos (4).

Los sustratos del receptor de insulina que principalmente se expresan en el músculo esquelético son el IRS-1 y el IRS-2. Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* en músculo de pacientes diabéticos han demostrado que la fosforilación en tirosina estimulada por insulina está afectada en ambos sustratos, siendo el efecto sobre el IRS-1 más acentuado. Sin embargo, este fenómeno no ha sido asociado con alteraciones en la expresión de IRS-1, sino con el aumento en la fosforilación en residuos serina/treonina, lo cual disminuye la habilidad del receptor de insulina para activar al IRS-1 en respuesta a la hormona. Además, en el músculo, el IRS-2 no parece ser capaz de compensar los defectos en la señalización mediada por el IRS-1 en situaciones de

resistencia a insulina (4). Resultados muy similares también han sido descritos en biopsias de músculo esquelético de mujeres que padecen el síndrome poliquístico ovárico, diabetes gestacional y en individuos con cáncer de páncreas. Estas observaciones contrastan con las obtenidas del tejido adiposo de pacientes obesos y diabéticos, donde la disminución en la cantidad de residuos tirosina fosforilados del IRS-1 en respuesta a insulina está asociada con una menor cantidad de proteína total de dicho sustrato, y donde aumenta la señalización IRS-2/PI3-K al encontrarse afectada la del IRS-1 (5). Por tanto, aunque ambos son tejidos periféricos diana para la acción de la insulina, existen diferencias importantes en los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de resistencia a la hormona y diabetes tipo 2.

En cuanto a la fosforilación en serina del IRS-1 en el músculo, se han identificado varios residuos, por ejemplo la serina 307 en roedores (serina 312 en humanos), que pueden ser fosforilados por diferentes quinasas, y así, se impide la interacción del dominio catalítico del receptor de insulina con el dominio PTB del IRS-1 (1). En células musculares en cultivo de sujetos con diabetes tipo 2 se ha visto un incremento en la fosforilación de la serina 636 en estado basal, lo cual perjudica la acción de la insulina (4). Además, factores como el $\text{TNF}\alpha$, relacionado con el desarrollo de resistencia a insulina en diferentes tejidos, o la infusión de ácidos grasos libres directamente en el músculo inducen la fosforilación de IRS-1 en residuos serina, de manera que se convierten en inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina, disminuyen la actividad de la PI3-K y el transporte de glucosa en presencia de la hormona en este tejido. En estos casos se ha implicado a distintas quinasas como JNK-1, quinasas activadas por la vía MEK, $\text{IKK}\beta$, $\text{PKC}\zeta$ y MAPK (6). No obstante, el desarrollo de resistencia a insulina por $\text{TNF}\alpha$ en el músculo esquelético se detalla más adelante.

Por debajo de estos sustratos se ha implicado a las proteínas AKT y PKCs atípicas en la traslocación de GLUT4 a la membrana y en el transporte de glucosa inducidos por la insulina. El estudio de la relación entre AKT y el desarrollo de resistencia a dicha hormona ha sido complicado debido a la existencia de varias isoformas de esta quinasa, y por tanto, a los posibles mecanismos de compensación. En los primeros trabajos al respecto se había observado que, tras la administración de

dosis fisiológicas de insulina, la actividad de AKT1 en el músculo esquelético era muy similar en pacientes diabéticos tipo 2, con o sin obesidad, y pacientes sanos. Además, la estimulación de AKT2 y AKT3 en respuesta a la hormona era normal en el músculo de sujetos obesos con diabetes tipo 2, a pesar de tener reducida la actividad de la PI3-K asociada a IRS-1 e IRS-2. Sin embargo, en los estudios anteriores la cuestión de la especificidad de las isoformas de AKT no fue resuelta, ya que las técnicas empleadas no permitían discriminar entre AKT1 y AKT2. En un trabajo más reciente, realizado en pacientes con obesidad mórbida y resistencia a insulina, se ha demostrado que la hormona únicamente es capaz de activar a AKT1 en el músculo de estos sujetos, sugiriendo que tanto AKT2 como AKT3 son las isoformas responsables del transporte de glucosa y del desarrollo de esta patología, al menos en este tejido (7).

En cuanto al papel de las PKCs atípicas, se han conocido evidencias recientes que sugieren que la activación de PKC ζ/λ por insulina está disminuida en el músculo esquelético de pacientes obesos y/o diabéticos, fenómeno que es parcialmente explicado por una reducción en la expresión de estas quinasas. Algunos autores han defendido la hipótesis de que la primera lesión que aparece en este tejido, durante el desarrollo de diabetes tipo 2, es a nivel de las PKCs atípicas. De hecho, en los miotubos de sujetos obesos con intolerancia a la glucosa se ha visto que la acción de la insulina sobre la activación de PKC ζ/λ está significativamente afectada (8). Por tanto, se ha estipulado la posibilidad de que algunos factores genéticos puedan contribuir a esta alteración sobre las PKCs, aunque aún no se ha publicado ninguna mutación de estas quinasas asociada con la resistencia a insulina. También se han visto incrementos significativos en la cantidad total de PKC θ y PKC ϵ en el músculo esquelético de roedores insulino-resistentes, consecuencia de una dieta rica en grasa, hecho que se ha relacionado directamente con el contenido muscular de triglicéridos y diglicéridos (3).

Mientras que las alteraciones en la señalización de la insulina a través de la ruta IRSs/PI3-K/AKT/PKCs parecen ser características en el músculo esquelético de diabéticos tipo 2, los defectos en la cascada de las quinasas MAP son menos conocidos. En este sentido, se ha observado que la activación de p42/p44MAPK por insulina no se encuentra afectada, y en estado basal, la fosforilación de estas quinasas no varía, o incluso

aumenta, en diferentes modelos de células musculares obtenidas de sujetos diabéticos (4, 7). Por otro lado, se ha publicado que la fosforilación basal de la p38MAPK es mayor en el músculo esquelético aislado de pacientes con diabetes tipo 2, y que esta quinasa no se activa en repuesta a insulina en esa situación. Además, no se han detectado variaciones significativas en la cantidad total de proteína de p42/p44MAPK ni de p38MAPK en ninguno de los trabajos anteriores. También se ha descrito un papel negativo de la JNK sobre la señalización de la insulina, ya que esta ruta media la fosforilación en residuos serina de IRS-1 por $TNF\alpha$, disminuyendo su fosforilación en tirosina e inhibiendo la señalización de la hormona, fenómeno que no se observa en ratones carentes del gen *jnk1* (9) (Tabla I). Además, la inhibición de JNK disminuye los niveles de glucosa en sangre e incrementa la insulina plasmática (10), y protege a las células β pancreáticas de la apoptosis pudiendo aumentar la secreción de insulina en situaciones de hiperglucemia. No obstante, son necesarios más estudios para clarificar la implicación de estas quinasas en el desarrollo de resistencia a insulina.

Otro mecanismo implicado en la reducción del transporte de glucosa y en los defectos en la señalización de la insulina en la diabetes tipo 2 es el aumento en el contenido de PTPs. Se ha visto que la expresión y/o actividad de al menos tres PTPs se encuentra aumentada en músculo y tejido adiposo de individuos y ratones obesos con resistencia a insulina: PTP1B, LAR y SH-PTP2 (11). De hecho, en el caso de la PTP1B, ratones carentes de este gen presentan mayor sensibilidad a la acción de la insulina y son resistentes a la obesidad inducida por una dieta rica en grasas (12, 13) (Tabla I).

Por último, las rutas de señalización mediadas por la quinasa activada por AMP (AMPK), importante sensor energético de la célula y activador del transporte de glucosa de forma independiente de insulina en músculo esquelético (14); y por la insulina convergen en algunos puntos, de manera que en situaciones de resistencia a insulina también puede verse afectada la cascada de AMPK. No obstante los resultados obtenidos en este campo son contradictorios. Así, algunos autores han defendido que la activación de AMPK inducida por AICAR o hipoxia, es preservada en el músculo esquelético de ratones obesos y de pacientes con diabetes tipo 2, indicando que estos factores pueden mediar la traslocación de

GLUT4 y el transporte de glucosa. Sin embargo, otros grupos han observado que la sobreexpresión de una forma mutada dominante negativa de AMPK en músculo, bloquea completamente la habilidad de AICAR o la hipoxia para activar el transporte de glucosa, mientras que el efecto producido por la contracción es parcialmente reducido (15).

TABLA I.- *Fenotipos desarrollados por ratones knock-out relacionados con la vía de señalización de la insulina.*

GENOTIPO	TEJIDO ESPECÍFICO	FENOTIPO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
IR^{-/-}	Organismo completo.	Severa cetoacidosis diabética y muerte.	Bruning y col., 1997
IR^{+/-}		Desarrollo de diabetes.	Kido y col., 2000
IR^{-/-}	Músculo esquelético.	Descenso en la captación de glucosa en músculo y aumento en tejido adiposo. Incremento de la masa grasa y alteraciones en el metabolismo lipídico. Ligera disminución de la tolerancia a la glucosa.	Bruning y col., 1998
	Músculo esquelético. + Tejido adiposo.	Intolerancia a la glucosa.	Lauro y col., 1998
IGFR^{-/-}	Organismo completo.	Hiperglucemia moderada, ya que los efectos metabólicos son compensados por el IR.	Withers y col., 1999
P85^{-/-}	Organismo completo.	Hipoglucemia e hipersensibilidad a insulina, consecuencia del aumento del transporte de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo.	Terauchi y col., 1999
IRS-1^{-/-}	Organismo completo.	Resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa. Resistencia a IGF-I e IGF-II y retraso en el crecimiento. Hiperinsulinemia por hiperplasia de las células β Hipertrigliceridemia, hipertensión y una menor capacidad de relajación del endotelio vascular.	Tamemoto y col., 1994 Sesti y col., 2001
	Músculo esquelético.	Disminución la síntesis de proteínas. Datos contradictorios en el transporte de glucosa, ya que puede haber compensación por el IRS-2.	Yamauchi y col., 1996 Previs y col., 2000

TABLA I.- *Fenotipos desarrollados por ratones knock-out relacionados con la vía de señalización de la insulina (cont.).*

<i>IRS-2^{-/-}</i>	Organismo completo.	<i>Resistencia a insulina y disfunción de las células β. Desarrollo de diabetes tipo 2. Pequeño retraso en el crecimiento. Hiperfagia, obesidad y resistencia a la acción de la leptina.</i>	<i>Kido y col., 2000 Burks y col., 2000</i>
	Músculo esquelético.	Compensación por parte del IRS-1 en respuesta a insulina e IGF-I.	Higaki y col., 1999
<i>AKT2^{-/-}</i>	Organismo completo.	Resistencia a insulina en hígado y músculo Hiperinsulinemia e hiperglucemia. Incapacidad de suprimir la producción de glucosa hepática en respuesta a insulina.	Cho y col., 2001
<i>PTP1B^{-/-}</i>	Organismo completo.	Aumento de la sensibilidad a insulina. Resistencia a la obesidad inducida por la dieta.	Klaman y col., 2000 Elchebly y col., 1999
<i>SH-PTP2^{+/-}</i>	Organismo completo.	Aumento en la traslocación de GLUT4 y en el almacenamiento de glucógeno en el músculo.	Clement y col., 2001
<i>GLUT4^{-/-}</i>	Organismo completo.	Retardo en el crecimiento. Moderada resistencia a insulina tras la ingesta, en machos asociada a una hiperglicemia, pero no en hembras.	Katz y col., 1995
<i>GLUT4^{+/-}</i>		Machos desarrollan una severa resistencia a insulina sin obesidad. Cuadro más severo que GLUT4 ^{-/-} porque no hay compensación por otros transportadores.	Stenbit y col., 1997
<i>GLUT4^{-/-}</i>	Músculo esquelético.	Resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa. Aumento en los depósitos de glucógeno hepático. Disminución del transporte de glucosa estimulado por insulina en el músculo y en el organismo completo.	Zisman y col., 2000
<i>JNK1^{-/-}</i>	Organismo completo.	Protección frente a la obesidad y al desarrollo de resistencia a insulina. Disminución de la fosforilación en la serina 307 del IRS-1.	Hirosimi y col., 2002
<i>TNFα^{-/-}</i>	Organismo completo.	Protección frente a la obesidad y resistencia a insulina por una dieta grasa. Aumento en la sensibilidad a insulina. Niveles bajos de ácidos grasos libres circulantes.	Uysal y col., 1997

TABLA I.- *Fenotipos desarrollados por ratones knock-out relacionados con la vía de señalización de la insulina (cont.).*

<i>IL-6^{-/-}</i>	<i>Organismo completo.</i>	<i>Desarrolla obesidad con la edad. Alteración del metabolismo lipídico y de carbohidratos. Aumento de los niveles de leptina y del gasto energético.</i>	<i>Wallenius y col., 2002 Fäldt y col., 2004</i>
<i>LXRα^{-/-}</i>	Organismo completo.	Acumulación de colesterol en el hígado. Hepatomegalia.	Peet y col., 2002
<i>LXRβ^{-/-}</i>	Organismo completo.	Resistencia a la acumulación de colesterol en hígado ante una dieta rica en colesterol.	Alberti y col., 2003

CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN EL DESARROLLO DE RESISTENCIA A INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO: TNFα E IL-6

Desde hace décadas, gran cantidad de estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el riesgo de padecer diabetes, y presumiblemente resistencia a insulina, aumenta al incrementar el contenido graso del cuerpo. El índice de masa corporal (BMI) es un reflejo de la adiposidad en general, pero hay que destacar que no todos los sitios del organismo donde se acumula la grasa contribuyen de igual manera al desarrollo de estas enfermedades. En este sentido, los depósitos de grasa central (intra-abdominal o visceral) están más relacionados con el riesgo de padecer diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares que los depósitos de grasa periférica (subcutánea), debido a la diferente actividad lipolítica de las células adiposas. Así, en los adipocitos viscerales la liberación de ácidos grasos de los triglicéridos es mayor que en los adipocitos subcutáneos, donde las hormonas antilipolíticas, como la insulina, tienen un efecto más pronunciado, y las catecolaminas, lipolíticas, tienen menor efecto. Como consecuencia, aumentan los niveles y el flujo de ácidos grasos a la circulación portal, y por tanto, en el hígado. Este fenómeno conlleva una estimulación de la gluconeogénesis, un aumento en la síntesis de triglicéridos y una inhibición de la retirada de glucosa de la circulación, desarrollando dislipidemia, hiperglucemia e

hiperinsulinemia, las cuales conducen un aumento en el riesgo de padecer diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (16).

El adipocito no es sólo un sistema de almacén de lípidos, sino que también es secretor de un número importante de factores circulantes, entre los que se incluyen el $\text{TNF}\alpha$, la IL-6, la leptina, el angiotensinógeno y, las recientemente descritas, adiponectina y resistina. Todos ellos desempeñan un papel importante en el desarrollo de la resistencia a insulina asociada a la obesidad y en la diabetes tipo 2, no solo en el tejido adiposo, sino también en otros tejidos del organismo (17).

$\text{TNF}\alpha$: El $\text{TNF}\alpha$ es una citoquina proinflamatoria multifuncional que ejerce una gran cantidad de acciones biológicas en diferentes tejidos y especies. Sin embargo, la producción inapropiada de este factor o la activación sostenida de su cascada de señalización se ha relacionado con la patogénesis de varias enfermedades, por ejemplo, sepsis, osteoporosis, cáncer, diabetes o procesos autoinmunes (18). El $\text{TNF}\alpha$ se sintetiza como una proteína monomérica transmembrana de 26 kDa, la cual es proteolizada por una metaloproteasa de membrana, llamada TACE (enzima convertidora de $\text{TNF}\alpha$), que libera una forma soluble de 17 kDa. A pesar de tener diferente tamaño y localización, ambas formas de $\text{TNF}\alpha$ son capaces de mediar respuestas biológicas. La transducción de señales por el $\text{TNF}\alpha$ es consecuencia de su interacción con dos tipos de receptores: el receptor de $\text{TNF}\alpha$ tipo 1, TNFR1, un péptido de 55 y 60 kDa en roedores y humanos, respectivamente; y el receptor de $\text{TNF}\alpha$ tipo 2, TNFR2, de 75 kDa en roedores y 80 kDa en humanos. En cuanto a su estructura, ambos receptores poseen cuatro repeticiones del aminoácido cisteína en el dominio extracelular, conservadas evolutivamente, y que son el sitio de unión del ligando en su forma trimérica. Sus dominios intracelulares, que no poseen actividad enzimática, son bastantes diferentes, y de hecho, definen dos subgrupos dentro de la familia de los receptores de $\text{TNF}\alpha$: los que contienen un dominio de muerte (denominados DD), en este caso TNFR1, y que se acoplan a la activación de caspasas y la apoptosis; y aquellos que interaccionan con las proteínas TRAF (factor asociado al receptor de $\text{TNF}\alpha$) o TNFR2, el cual se asocia directamente con TRAF2 e induce la expresión génica (19). Otra diferencia entre ambos receptores es su distribución, mientras que TNFR1

se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, la expresión de TNFR2 está estrictamente regulada. Los estudios que se han realizado a este respecto han determinado que, aunque ambos receptores son capaces de transducir la señal, el TNF α lleva a cabo sus acciones mayoritariamente a través del TNFR1, mientras que el TNFR2 juega principalmente un papel regulador en la captación de ligando. Los dos receptores pueden ser liberados de la superficie celular y circular en forma soluble, de manera que, en la resistencia a insulina y en la diabetes tipo 2 los niveles de los TNFRs circulantes son muy elevados (18).

Las proteínas TRAF constituyen el principal grupo de moléculas adaptadoras que se unen directa o indirectamente a los receptores de TNF α . Aunque estas proteínas no parecen poseer ninguna actividad enzimática, pueden inducir la activación de diferentes cascadas de quinasas, como PI3-K, ERK1/2, p38MAPK, JNK o IKKs, y mediar el efecto del TNF α en los procesos de proliferación y diferenciación celular, apoptosis y respuesta inflamatoria (20). Por tanto, a través de sus receptores, esta citoquina puede activar diferentes rutas de transducción de señales, muchas de ellas comunes a las que utilizan la insulina, los IGFs y otros factores de crecimiento, como el FGF.

Puesto que la obesidad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de resistencia a insulina y diabetes tipo 2, se ha propuesto al TNF α como un nexo de unión entre la obesidad y la resistencia a la hormona (6). De hecho, se ha demostrado que la mayoría de pacientes diabéticos son obesos, que la expresión de TNF α en tejido adiposo está elevada en una variedad de modelos experimentales de obesidad y en personas obesas y que ratones deficientes en TNF α (TNF α ^{-/-}), sometidos a una dieta rica en grasa, presentan protección frente al desarrollo de resistencia a insulina, incluso viendo mejorada la sensibilidad a la misma. Estos ratones tienen niveles bajos de ácidos grasos libres circulantes, pudiendo resultar de la pérdida de los efectos lipolíticos del TNF α en el tejido adiposo, o alternatively, del aumento de la eficiencia de la insulina para suprimir la lipólisis en ausencia de TNF α (Tabla I) (19). Además, la administración directa de TNF α a ratas adultas produce una disminución en la sensibilidad a la insulina asociada a cambios en la

expresión génica en los adipocitos y a la liberación de ácidos grasos a la circulación, sin afectar a la expresión génica en el músculo (21). Por ejemplo, se ha descrito que el $\text{TNF}\alpha$ aumenta tanto la expresión como actividad de PTP1B en músculo y tejido adiposo marrón, impidiendo el transporte de glucosa estimulado por insulina en ambos tejidos (22, 23). Sin embargo, la deficiencia de esta fosfatasa confiere protección frente a la resistencia a insulina inducida por $\text{TNF}\alpha$ (23). En ensayos *in vitro* el tratamiento con $\text{TNF}\alpha$ también inhibe la acción de la hormona sobre el transporte de glucosa en diferentes modelos celulares, como adipocitos 3T3-L1 o cultivos primarios de adipocitos humanos y marrones fetales de rata (24, 25). Estos resultados indican que el $\text{TNF}\alpha$ es un importante mediador de la resistencia a la acción de la insulina en la obesidad.

Un mecanismo que podría explicar la resistencia a insulina inducida por $\text{TNF}\alpha$ es la alteración causada por esta citoquina sobre la vía de señalización de la insulina (Figura 2). Se ha descrito que el $\text{TNF}\alpha$ inhibe la ruta de la insulina a través de la fosforilación en serina de IRS-1, convirtiéndolo en un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor de la insulina *in vivo*, de manera que disminuye la actividad de la enzima PI3-K y el transporte de glucosa (20). También se ha descrito un papel negativo de la JNK sobre la señalización de la insulina, ya que esta ruta media la fosforilación en residuos serina de IRS-1 por $\text{TNF}\alpha$, disminuyendo su fosforilación en tirosina e inhibiendo la señalización de la hormona, fenómeno que se observa en ratones carentes del gen *Jnk1* (Tabla I) (9). Otros trabajos han implicado a las proteínas IKKs en la fosforilación en serina del IRS-1, ya que la inactivación del gen *ikk- β* o el salicilato (inhibidor farmacológico de IKKs) revierten la resistencia a insulina inducida por la obesidad o por una dieta grasa (26), restaurando la sensibilidad a la acción de la insulina en la traslocación de GLUT4 y en el transporte de glucosa, además de recuperar toda la señalización de la hormona en miotubos neonatales (27).

Además de este mecanismo, se ha demostrado una disminución en el contenido total de IRS-1 en modelos animales y celulares resistentes a insulina, consecuencia de hiperinsulinemia o del tratamiento con $\text{TNF}\alpha$, indicando que el IRS-1 es degradado por el proteosoma en estas circunstancias. También se ha sugerido el posible papel de

p42/p44MAPK y p38MAPK, activadas por esta citoquina, en el desarrollo de resistencia a insulina (27), aunque existe controversia al respecto. Se ha descrito que el $\text{TNF}\alpha$ causa resistencia a la acción de la insulina en adipocitos marrones fetales en cultivo primario, disminuyendo la fosforilación de IRS-2 sin verse afectada la señalización de IRS-1 o bien por la producción de ceramida que mantiene a AKT en un estado defosforilado (24).

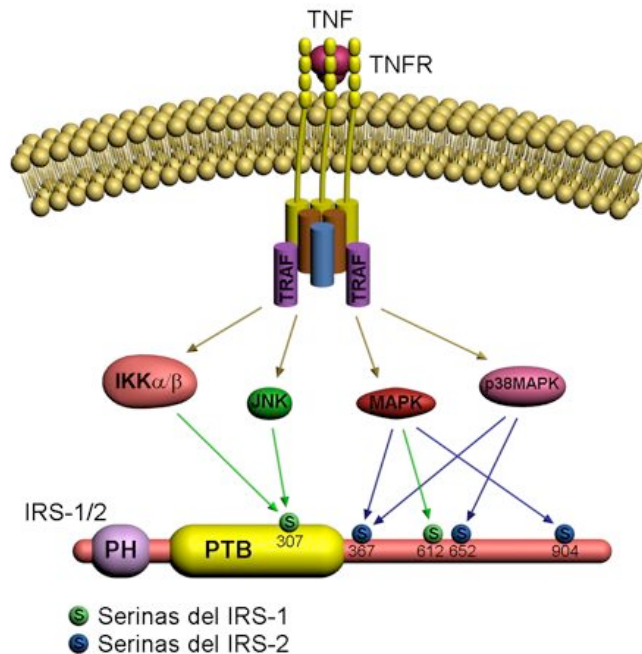


FIGURA 2.- *Esquema de los residuos serina fosforilados por la acción del $\text{TNF}\alpha$ en los sustratos del receptor de insulina.*

Al contrario de lo que se ha descrito en el tejido adiposo, el papel del $\text{TNF}\alpha$ en el músculo esquelético es muy controvertido, y de hecho, los resultados existentes hasta el momento apuntan en diferentes direcciones. Se ha aceptado que tanto la ceramida como los ácidos grasos

circulantes causan resistencia a insulina en el músculo esquelético. Algunos grupos no han observado un efecto inhibitorio de $\text{TNF}\alpha$ sobre la acción de la insulina, aunque sí está más o menos establecido que esta citoquina incrementa el transporte basal de glucosa en este tejido (28), y que este fenómeno puede ser consecuencia de una mayor expresión génica del transportador GLUT1. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que la cascada de la insulina se encuentra notablemente afectada en presencia de $\text{TNF}\alpha$. Así, el tratamiento de miotubos de la línea muscular C2C12 con esta citoquina disminuye la fosforilación en residuos tirosina de IRS-1, la activación de PI3-K asociada a IRS-1 e IRS-2, la fosforilación de p42/p44MAPK y el transporte de glucosa estimulados por insulina. Además, resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado que el $\text{TNF}\alpha$ produce resistencia a insulina en miotubos primarios neonatales por un mecanismo dependiente de la activación de la isoforma β de p38MAPK e $\text{IKK}\beta$ que implica la fosforilación en el residuo serina 307 del IRS-1, lo que supone una disminución en la traslocación de GLUT4 y en el transporte de glucosa en respuesta a insulina y la atenuación de la ruta de señalización de la hormona (27).

Por otro lado, el $\text{TNF}\alpha$ también afecta a los depósitos de glucosa y de glucógeno, así como a la actividad de la enzima glucógeno sintasa en el músculo esquelético (29). Además bloquea las acciones hemodinámicas de la insulina en el músculo liso; y disminuye la fosforilación del receptor de insulina, actuando a través de las $\text{PKC}\alpha$ y $\text{PKC}\delta$, perjudicando de esta manera toda la señalización activada por la hormona en el tejido muscular (30). De hecho, esta citoquina fosforila a la proteína fosfatasa PP-1, en este caso inactivándola, de forma que inhibe la síntesis de glucógeno inducida por insulina, y en concreto, este último mecanismo de actuación del $\text{TNF}\alpha$ ha sido descrito en sistemas celulares de músculo esquelético. Finalmente, se ha visto que los receptores de insulina aislados de biopsias de músculo de pacientes con resistencia a la hormona presentan muchos residuos serina y treonina fosforilados y una menor actividad intrínseca tirosina quinasa, comparados con los receptores de insulina de sujetos sanos (6).

En otro tipo de experimentos se ha demostrado que la administración de anticuerpos específicos contra el $\text{TNF}\alpha$ a ratas envejecidas revierte completamente el estado de resistencia a insulina que padecen estos animales consecuencia de su edad, únicamente en el músculo esquelético. Este fenómeno es debido a una disminución en la cantidad de $\text{TNF}\alpha$ específica de tejido, ya que en el tejido adiposo el contenido proteico de esta citoquina no es afectado bajo estas circunstancias (6). Por último, en otro sentido, el $\text{TNF}\alpha$ reduce la expresión de la enzima creatina quinasa muscular, la cantidad de los receptores de acetilcolina e inhibe la formación de células multinucleadas en el músculo esquelético, es decir, esta citoquina ejerce un papel negativo sobre la miogénesis (29).

IL-6: Recientemente se ha relacionado a la IL-6 con el desarrollo de resistencia a insulina. Se ha observado un aumento en los niveles plasmáticos de IL-6 en situaciones de obesidad, intolerancia a la glucosa y diabetes tipo II (31). La expresión de $\text{TNF}\alpha$ a nivel local y de IL-6 en plasma es mayor en pacientes obesos con resistencia a insulina. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con el $\text{TNF}\alpha$, existen pocos estudios que argumenten el potencial metabólico de la IL-6 para modificar la sensibilidad a la insulina y causar resistencia a la misma.

La IL-6 es un miembro de la familia de las citoquinas formada por el factor inhibidor de leucemia, la IL-11, el factor neurotrófico ciliar, la oncostatina M y la cardiotrofina 1. Todos ellos poseen una alta similitud en su estructura proteica en hélice y comparten la subunidad glucoproteica transmembrana del receptor gp130. La IL-6 es una proteína que puede ser glicosilada en los residuos 73 y 172. Así, su peso molecular oscila entre 22-27 kDa, dependiendo de las modificaciones postraduccionales que sufra y del tipo celular dónde se sintetice. En realidad, es sintetizada como una proteína precursora de 212 aminoácidos, con 28 de ellos como una secuencia señal (31).

Esta citoquina es producida por muchos tipos celulares; *in vivo* se ha visto que las principales fuentes son monocitos y macrófagos, células gliales, fibroblastos y células endoteliales vasculares, lo cual es indicativo del importante papel modulador de la IL-6 en el sistema inmune. Otras células que también expresan IL-6 son queratinocitos, osteoblastos, células T, células B, neutrófilos, eosinófilos, células musculares lisas y

células del músculo esquelético (31). Recientemente se ha observado que, entre un 10-35% de la IL-6 basal circulante procede del tejido adiposo, lo cual permite pensar en esta citoquina como un posible mediador metabólico. Se ha descrito una mayor susceptibilidad a desarrollar obesidad y alteraciones metabólicas en ratones deficientes en IL-6, pudiendo ser causa de la obesidad la deficiencia central de esta citoquina (Tabla I) (32). De hecho, se ha descrito que una inyección intracraneal de esta citoquina podría disminuir la masa grasa vía sistema nervioso central (32). Sin embargo, el papel de esta citoquina en la obesidad es aún confuso, ya que su concentración parece estar aumentada en la obesidad como citoquina proinflamatoria.

En condiciones normales, los niveles plasmáticos de IL-6 son bajos, sin embargo su producción se puede ver alterada en condiciones de estrés, infección o ejercicio. Por tanto, la IL-6 es una proteína de localización ubicua cuya expresión es estimulada por diferentes agentes tanto fisiológicos como patológicos. Algunos de ellos son IL-1, TNF α y endotoxina bacteriana. Además, la hipoxia induce la expresión de IL-6 en cultivo de células endoteliales, e *in vivo* incrementa sus niveles plasmáticos, mientras que, glucocorticoides y estrógenos, pueden suprimir su producción (31).

La IL-6 ejerce sus múltiples acciones actuando a través de su unión a un complejo formado por una subunidad de 80 kDa (IL-6R α), y por dos homodímeros transmembrana de la glicoproteína (gp) 130. Esta última, se asocia con otras tirosina quinasas activas como Jak1, Jak2 y Tyk2, las cuales activan a su vez por fosforilación a las proteínas STAT1, STAT3 y STAT5. Las proteínas STATs activas, forman homo o heterodímeros que pueden translocarse al núcleo y activar la transcripción de diferentes factores, lo que desencadena una compleja red de señalización. La IL-6 circulante, puede unirse también, de manera específica, a la forma soluble del IL-6R α (gp50). Este complejo, puede acoplarse posteriormente a la subunidad transmembrana gp130, y activar así, la cascada de señalización de la IL-6, incluso en aquellas células que no expresan IL-6R α (31).

La ruta de señalización de la IL-6 puede interaccionar en diferentes puntos con la cascada de señalización de la insulina. De hecho, se ha descrito que las proteínas SOCS (supresor de la señalización de

citoquinas), en concreto la isoforma SOCS-3, interaccionan directamente con IR β e IRS-1 inhibiendo la señalización por insulina. En adipocitos 3T3-L1 el tratamiento crónico con IL-6 induce la expresión de SOCS-3, efecto que es revertido por el tratamiento con rosiglitazona, antidiabético que se está utilizando actualmente en la clínica (33), y dicho supresor es sobreexpresado en el tejido adiposo de ratones obesos.

Se ha visto que estimulaciones largas con IL-6 incrementan el transporte basal de glucosa en adipocitos 3T3-L1, mientras que la estimulación en agudo no ejerce ningún efecto. En las líneas adipocíticas 3T3-L1 y 3T3-F442A el tratamiento crónico con IL-6 induce su propia secreción, disminuye la cantidad total de IR β e IRS-1 además de inhibir la activación por insulina de IR β , IRS-1, AKT y ERK1/2, y disminuye la lipogénesis y el transporte de glucosa estimulados por insulina (33). Existe también algún estudio realizado en células adiposas humanas en cultivo donde se observa como la IL-6 es capaz de incrementar la lipólisis y la oxidación de grasas, afectando posiblemente a la homeostasis de la glucosa de forma indirecta (34). A diferencia del TNF α , la IL-6 en tejido adiposo no aumenta la fosforilación en residuos de serina de IRS-1 ni la activación de JNK, pero sí ejerce un efecto inhibitorio a nivel transcripcional sobre IRS-1 y GLUT4 disminuyendo el transporte de glucosa estimulado por insulina, y sobre algunos genes específicos del tejido adiposo como PPAR γ y C/EBP α (33).

La IL-6 también parece desempeñar un papel importante en el desarrollo de resistencia a insulina en el hígado. Así, niveles elevados de IL-6 pueden estar relacionados con la inhibición de la enzima glucógeno sintasa hepática, la activación de la enzima glucógeno fosforilasa y de la lipólisis, y de un incremento en la producción de ácidos grasos. El tratamiento crónico con IL-6 de la línea celular HepG2 y de hepatocitos de ratón inhibe el efecto de la insulina sobre la fosforilación en residuos de tirosina de IRS-1 y su asociación con la subunidad p85 de la PI3K, además de la activación de AKT y la síntesis de glucógeno. También se ha descrito la capacidad de la IL-6 para incrementar los niveles de las proteínas SOCS en este tejido (35).

El papel que tiene la IL-6 en el tejido muscular esquelético es más controvertido hasta el momento. De hecho no hay publicaciones que realmente afiancen su implicación en la resistencia a insulina, sino más

bien el efecto contrario. Está muy bien documentado que la concentración plasmática de IL-6 aumenta más de 100 veces después de realizar algún ejercicio. Tanto la transcripción del gen como la secreción de la IL-6 son mayores cuando los niveles de glucógeno son bajos. Este incremento está además relacionado con la intensidad y la duración del ejercicio físico y con la masa muscular implicada, y en algunos trabajos se ha relacionado también con el nivel plasmático de catecolaminas (36). Se ha postulado recientemente a la quinasa AMPK como nexo de unión entre el ejercicio y la IL-6 en el músculo. La IL-6 aumenta la fosforilación de AMPK tanto en el músculo como en el tejido adiposo. De hecho, ratones delecionados para IL-6 (IL-6^{-/-}) presentan menor fosforilación de AMPK y de ACC (acetil CoA carboxilasa) en ambos tejidos (Tabla I) (37). Por otra parte, la IL-6 está involucrada en el metabolismo lipídico en el músculo esquelético. Esta citoquina atenúa los efectos lipogénicos de la insulina incrementando la oxidación de los ácidos grasos, y el tratamiento conjunto de IL-6 y leptina inhibe la síntesis de DAG inducida por TNF α en músculo (38).

También, se ha descrito que la IL-6 media la producción endógena de glucosa durante el ejercicio, y es importante en el mantenimiento de la homeostasis glucídica. Este efecto no parece ser dependiente de los niveles circulantes de algunas hormonas, ya que las concentraciones de insulina, glucagón, epinefrina, norepinefrina, cortisol u hormona del crecimiento no se alteran respecto a su control. Hay evidencias que sugieren que la IL-6 podría sensibilizar a la insulina. Por ejemplo, ratones diabéticos no obesos que sobreexpresan el gen humano de la IL-6 sobreviven más tiempo, y ratones deficientes en IL-6 (IL-6^{-/-}) tienen niveles de glucosa más elevados y una peor distribución de la misma durante un test de tolerancia (32) (Tabla I). Por ello, podría llamarse a la IL-6 como una nueva mioquina implicada en el metabolismo lipídico y glucídico, al menos durante la realización de un ejercicio físico y que actúa como un sensor energético.

TRATAMIENTO DE LA RESISTENCIA A INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO CON AGONISTAS DE RECEPTORES NUCLEARES

La diabetes de tipo 2 es considerada como una de las enfermedades metabólicas más frecuentes en el mundo occidental. No obstante, los tratamientos terapéuticos y preventivos existentes hasta la fecha son insuficientes. En los últimos años se ha sugerido una relación funcional entre la superfamilia de receptores nucleares, entre los que se encuentran los factores de transcripción PPAR, los receptores nucleares hepáticos LXR α y de ácidos RARs, y la fisiopatología de esta enfermedad.

Los receptores nucleares son factores de transcripción dependientes de ligando, que controlan una gran variedad de procesos biológicos como crecimiento, diferenciación, metabolismo, reproducción, inflamación y morfogénesis en organismos superiores y humanos. Estos factores regulan transcripcionalmente la expresión de numerosos genes en respuesta a pequeños compuestos lipofílicos, ideales por su habilidad para difundir a través de la membrana, mediante la unión a secuencias específicas del DNA en forma de heterodímeros formados con el receptor nuclear RXR.

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares son proteínas que presentan una organización modular, con un dominio central de unión a DNA denominado DBD, muy conservado y que les caracteriza. Además de este dominio de unión al DNA, suelen diferenciarse: una región N-terminal, que es una región no conservada, de tamaño e importancia funcional muy variable; y una región C-terminal que engloba una región bisagra, un dominio de dimerización con RXR y el dominio de unión a ligando (LBD), que es un dominio conservado en esta superfamilia, aunque menos que el DBD.

La región N-terminal es la más variable, tanto en tamaño como en secuencia y función, puesto que desempeña un papel importante en la inducción de la transcripción ya que se ha descrito en esta región un dominio AF-1 que está implicado en la transactivación independiente de ligando. Frecuentemente, esta región es diana de fosforilación para varias rutas de señalización, pudiendo afectar significativamente esta modificación, a su actividad transcripcional. La región C-terminal contiene también una zona capaz de activar la transcripción dependiente

de ligando (AF-2). Se piensa que este dominio, AF-2, interacciona con otros factores (coactivadores) necesarios para dicha transcripción.

PPAR: Dentro de la familia de los receptores nucleares se encuentran incluidos los receptores de PPAR, los cuales juegan un papel clave en el catabolismo y almacenamiento de las grasas de la dieta. Estos receptores PPAR, heterodimerizan con la familia de receptores para el ácido 9-cis-retinoico (RXR) y son activados por ácidos grasos saturados e insaturados, o sus metabolitos, procedentes de la dieta. Los PPAR pueden ser regulados por fosforilación de varios de sus residuos, afectando este proceso a la capacidad de unión de sus ligandos o a su unión al DNA (39). Debido a su función en el mantenimiento de la homeostasis lipídica, algunos de los activadores de los PPARs, como las tiazolidindionas, fibratos o estatinas, se emplean hoy en día para el tratamiento de desórdenes lipídicos, aumentando las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la sensibilidad a insulina, y disminuyendo los niveles de triglicéridos (40).

Hasta la fecha, se han identificado tres isoformas de PPAR con una distribución tisular y actividades biológicas diferentes: PPAR α , PPAR γ y PPAR β/δ (Figura 3). **PPAR α** fue la primera isoforma de PPAR clonada, se expresa en tejidos y órganos con una alta actividad metabólica como músculo esquelético, hígado, corazón y riñón, donde regula el catabolismo de ácidos grasos. Se han descrito ligandos naturales y sintéticos como los eicosanoides y los ácidos grasos insaturados, que aumentan la expresión de genes implicados en el transporte y la β -oxidación de los ácidos grasos. La activación de PPAR α , favorece la oxidación de ácidos grasos principalmente en hígado y corazón y, en menor medida, en músculo esquelético, reduciendo así, la adiposidad y la redistribución de los depósitos de grasa. El aumento de la oxidación de los ácidos grasos, es uno de los mecanismos que explican cómo los ligandos de PPAR α pueden, en ocasiones, mejorar la sensibilidad a insulina reduciendo la acumulación de lípidos en los tejidos (40). En el músculo esquelético, defectos en el gen que codifica para PPAR α , disminuyen la β -oxidación (41) y la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico. Sin embargo, PPAR δ , tanto en músculo de

humanos, como de roedores, es capaz de compensar los defectos debidos a fallos en la expresión de PPAR α (41).

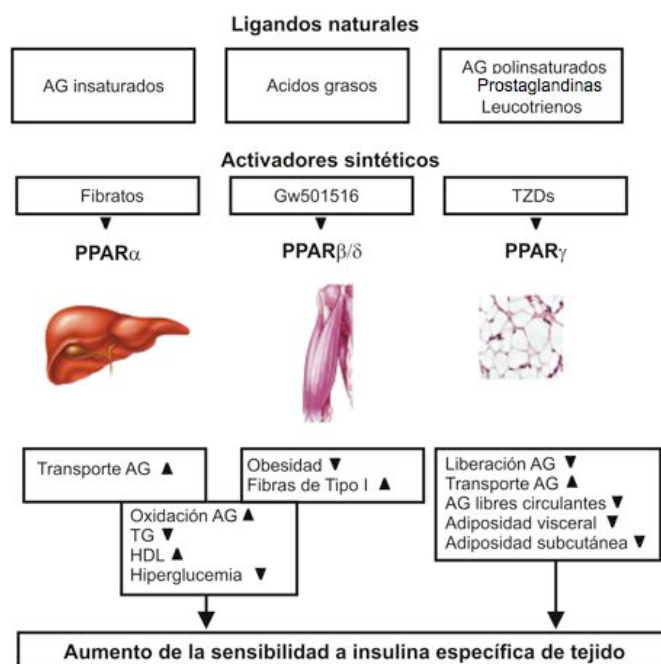


FIGURA 3.- *Ligandos naturales y activadores sintéticos de los PPAR y sus principales tejidos diana de actuación.*

PPAR β/δ se expresa de manera ubicua, aunque sobre todo en tejidos sensibles a insulina como el tejido adiposo y el músculo esquelético. Aunque se trata de la isoforma más abundante en músculo esquelético, su función y regulación no están totalmente definidas. Estudios recientes, han determinado que su función parece estar relacionada con la transcripción de genes del metabolismo lipídico, definiéndolo como un importante regulador del gasto energético. Por ejemplo, su sobreexpresión en el tejido adiposo marrón induce la síntesis de UCP-1 y de genes implicados en la oxidación de ácidos grasos (42).

Se han descrito a los prostanoïdes como sus ligandos naturales, aunque también se han desarrollado agonistas sintéticos como el GW501516. La administración de este agonista, en modelos animales, produce un aumento de la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético. Conjuntamente, la sobreexpresión de la forma activa de PPAR δ en este tejido, confiere resistencia a la obesidad inducida por la dieta, aumenta el metabolismo lipídico y disminuye los niveles de triglicéridos en las células musculares (43). Asimismo, se ha relacionado la sobreexpresión de PPAR δ con un aumento en el número de fibras musculares de tipo I (42).

PPAR γ ha sido el miembro de la familia más estudiado. Se expresa principalmente en tejido adiposo y aunque en menor medida en macrófagos. Se han identificado los ácidos grasos polinsaturados, prostaglandinas y leucotrienos, como ligandos naturales de PPAR γ , y las TZDs, como sus agonistas sintéticos. Su función se ha relacionado con la regulación de procesos inflamatorios además de su participación en la diferenciación de los adipocitos y homeostasis de la glucosa (40), donde contribuye a la disminución en los niveles circulantes de ácidos grasos en los paciente diabéticos, mejorando la sensibilidad a la insulina y la función de la célula β -pancreática. En este sentido, el ratón deficiente para PPAR γ desarrolla resistencia a insulina severa (44) sin embargo, cuando sometemos al ratón heterozigoto (PPAR γ a una dieta rica en grasas, mejora la sensibilidad a insulina, disminuyen los ácidos grasos y aumentan las adipoquinas (leptina y adiponectina) presentes en plasma, siendo además, sus adipocitos de menor tamaño que los del ratón normal (40).

Las TZDs son una clase de drogas antidiabéticas orales que mejoran el control metabólico en pacientes con diabetes tipo 2 a través del aumento de la sensibilización a la acción de la insulina. Las TZDs disminuyen la resistencia a insulina y actúan sobre factores asociados con el metabolismo de los adipocitos. Actualmente tres TZDs (troglitazona, rosiglitazona y pioglitazona) ligandos específicos del PPAR γ , han sido aprobadas para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Aunque la Troglitazona ha sido retirada del mercado por su efecto adverso de hepatotoxicidad, con las dos últimas no se han visto efectos desfavorables

sobre el hígado. A pesar de que son comúnmente utilizadas en la práctica clínica, sin embargo, el mecanismo por el que median la sensibilización a la acción de la insulina no está totalmente definido. Se ha descrito que estos agentes disminuyen la hiperglucemia porque directamente reducen la resistencia a insulina, conduciendo a un aumento del transporte de glucosa en músculo esquelético y en tejido adiposo, y a una disminución en la producción de glucosa hepática. Además, las TZDs aumentan la expresión de la proteína CAP y de GLUT4 lo que contribuye también, en cierta medida, a aliviar la hiperglucemia (40). Por otra parte las TZDs parecen mejorar también la función de la célula β en el páncreas. Recientemente se ha visto que la terapia con rosiglitazona mejora el efecto antilipolítico de la insulina *in vivo*, en el tejido adiposo de pacientes con diabetes tipo 2 (45). En paralelo a este efecto, las TZDs podrían inducir también la redistribución de lípidos intracelulares desde músculo esquelético, hígado y páncreas hacia adipocitos periféricos, conduciendo a una restauración de la señalización de la insulina en estos tejidos.

A pesar de la relevancia de las TZDs descrita en tejido adiposo, también es importante su papel en el músculo esquelético aunque la expresión de PPAR γ en este tejido sea relativamente baja. La sobreexpresión de PPAR γ en células C2C12 tratadas con TZDs, parece mejorar la sensibilidad a insulina. Además, la estimulación de miocitos L6 con TZDs, restaura la transducción de señales mediante la activación de la vía AMPK (46) aumentando, consecuentemente, el transporte de glucosa. En este sentido, otros investigadores, han descrito que el tratamiento de células musculares con TZDs incrementa la relación AMP/ATP, por lo que podría establecerse una relación entre la regulación de PPAR γ en respuesta al ejercicio. No obstante, los mecanismos encaminados a esclarecer estos procesos, son aún muy controvertidos (45).

Respecto al mecanismo de acción responsable de los efectos antidiabéticos de las TZDs, estudios recientes realizados en animales, parecen explicar la aparente paradoja que existe en la utilización de fármacos antidiabéticos que favorecen la ganancia de peso corporal y la adipogénesis para el tratamiento de la diabetes tipo 2, siendo la obesidad el factor de riesgo más importante para el desarrollo de esta patología.

Además, existen otros efectos negativos colaterales, como la alteración del perfil lipídico y la disminución de la hemoglobina y del hematocrito, éstas últimas parecen deberse a un aumento del volumen plasmático. Por lo que sería necesario desarrollar nuevos fármacos agonistas de receptores nucleares que sean capaces de evitar el aumento de peso y las alteraciones del perfil lipídico.

LXR: Identificados originalmente como miembros huérfanos de la superfamilia de receptores nucleares, los LXRs (*Liver X Receptors*) desempeñan un papel primordial en el metabolismo lipídico y de carbohidratos, en la homeostasis glucídica y en la respuesta inflamatoria. Esta subfamilia consta de dos miembros, LXR α y LXR β , ambos activados por compuestos naturales (oxiesteroles como el (22R)-hidroxicolesterol) y ligandos sintéticos como el compuesto T0901317 o el GW3965. La distribución tisular de estas isoformas es diferencial: mientras la expresión de LXR β es ubicua; el LXR α se detecta mayoritariamente en tejidos diana para la acción de la insulina como el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético (47).

Los estudios iniciales realizados en ratones deficientes en LXR, describieron a estos receptores como sensores del metabolismo lipídico y del colesterol ya que inducen el transporte de colesterol desde tejidos periféricos al hígado, mediante la producción de apolipoproteínas y transportadores ABC y la producción de ácidos grasos y triacilglicerol, a través de la inducción de la expresión del factor SREBPc1. No obstante, datos recientes apuntan hacia nuevas funciones fisiológicas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos (48). Se ha observado que el tratamiento de diferentes modelos animales diabéticos con estos agonistas de los LXRs, inhibe la expresión de enzimas gluconeogénicas en el hígado, como la PEPCK; reduce la concentración de glucosa en plasma, aumentando la tolerancia a la misma e incrementa la sensibilidad a insulina. Además, se ha comprobado que, tanto en el hígado como en el tejido adiposo blanco, la activación de los LXRs incrementa la captación de glucosa a través de los transportadores GLUT1 y GLUT4 (49).

Por otro lado, estudios recientes relacionan a los LXRs con la obesidad, ya que se han identificado genes diana como la leptina y la UCP-1, moléculas implicadas en el control del estado nutricional. Además, en macrófagos, los LXR inhiben la expresión de genes

relacionados con procesos inflamatorios (47). En este sentido, en nuestro grupo hemos relacionado la resistencia a insulina asociada a la obesidad, con la regulación mediada por los LXR en la producción de $\text{TNF}\alpha$, ya que se ha descrito a esta citoquina proinflamatoria, como nexo de unión entre ambas patologías (22). No obstante, actualmente se desconoce la implicación de estos receptores nucleares en la producción de $\text{TNF}\alpha$ por parte de el tejido adiposo, proceso íntimamente relacionado con la sensibilidad a insulina por parte de los tejidos periféricos.

RAR y RXR: Los receptores RAR (*Retinoic Acid Receptor*) y RXR (*Retinoic X Receptor*) se expresan principalmente en aquellos tejidos diana de la acción de la insulina. Al igual que los factores PPAR, estos receptores nucleares están implicados en la diferenciación adipocítica, aunque en los últimos años ha cobrado fuerza la utilización de agonistas específicos como posibles agentes sensibilizadores a la acción de la insulina. De este modo, se ha comprobado que activadores sintéticos del RXR (rexinoides) pueden atenuar la hiperglicemia, la hipertriglicemia y la hiperinsulinemia de ratones obesos y diabéticos de manera similar a las TZD. No obstante, y a diferencia de estas últimas, los rexinoides provocan una disminución del peso corporal y presentan un amplio espectro de tejidos (50). Por otro lado, la activación de los RXRs y RARs induce la expresión génica de ciertas UCPs (*uncoupling proteins*), proteínas mitocondriales implicadas en la regulación del gasto energético y en el metabolismo de ácidos grasos. Asimismo, y al igual que los LXRs, se ha descrito que los retinoides (agonistas de los RARs) presentan acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Estudios recientes muestran cómo estos agonistas atenúan la expresión de iNOS (*inducible Nitric Oxid Synthase*) inducida por $\text{TNF}\alpha$ en líneas celulares adipocitarias. Sin embargo, la relación entre la activación de los receptores de retinoicos y la generación de NO es un hecho controvertido. Por otro lado, también se ha descrito como el ácido retinoico es capaz de inhibir la expresión de la resistina, adipoquina implicada en la sensibilidad sistémica a la insulina, por parte del tejido adiposo (47).

La implicación de estos RXR, RAR y LXR en el metabolismo del colesterol, ácidos grasos y glucosa, y recientemente como integradores de procesos inflamatorios, sugiere que estos receptores están ampliamente relacionados con el riesgo de desarrollar diabetes cuando no son

funcionales (50). Por lo que el desarrollo de agonistas de estos receptores nucleares sería una interesante herramienta terapéutica para la resistencia a insulina asociada a la obesidad y la diabetes tipo 2.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha contado con la financiación de los proyectos BFU-2005-03054 del Ministerio de Educacion y Ciencia; S-SAL-0159-2006 de la Comunidad de Madrid; Santander-UCM-06; CIBERDEM CB07-08-0007 del Ministerio de Sanidad y Consumo. Agradecemos también el apoyo de la acción europea COST BM0602.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ZIERATH, J. R. AND KAWANO, Y. (2003) The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17: 385-398.
- (2) LIZCANO, J. M. AND ALESSI, D. R. (2002) The insulin signalling pathway. *Curr. Biol.* 12: R236-R238.
- (3) ITANI, S. I.; PORIES, W. J.; MACDONALD, K. G. AND DOHM, G. L. (2001) Increased protein kinase C theta in skeletal muscle of diabetic patients. *Metabolism.* 50: 553-557.
- (4) KROOK, A.; BJORNHOLM, M.; GALUSKA, D.; JIANG, X. J.; FAHLMAN, R.; MYERS, M. G. JR.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. AND ZIERATH, J. R. (2000) Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 49: 284-292.
- (5) RONDINONE, C.M.; WANG, L. M.; LONNROTH, P.; WESSLAU, C.; PIERCE, J. H. AND SMITH, U. (1997) Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 4171-4175.
- (6) BORST, S. E. (2004) The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine.* 23: 177-182.
- (7) BROZINICK, J. T. JR.; ROBERTS, B. R. AND DOHM, G. L. (2003) Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes.* 52: 935-941.
- (8) VOLLENWEIDER, P.; MENARD, B. AND NICOD, P. (2002) Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase

activation, and impaired atypical protein kinase C (zeta/lambda) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 51: 1052-1059.

- (9) HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GORGUN, C. Z.; UYSAL, K. T.; MAEDA, K.; KARIN, M. AND HOTAMISLIGIL, G. S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 420: 333-336.
- (10) BENNETT, B. L.; SATOH, Y. AND LEWIS, A. J. (2003) JNK: A new therapeutic target for diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3: 420-425.
- (11) KOREN, S. AND FANTUS, G. (2007) Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 8: 621-640.
- (12) ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A. L.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J.; CHAN, C. C.; RAMACHANDRAN, C.; GRESSER, M. J.; TREMBLAY, M. L. AND KENNEDY, B. P. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*. 283: 1544-1548.
- (13) KLAMAN, L.D.; BOSS, O.; PERONI, O. D.; KIM, J. K.; MARTINO, J. L.; ZABOLOTNY, J. M.; MOGHAL, N.; LUBKIN, M.; KIM, Y. B.; SHARPE, A. H.; STRICKER-KRONRAD, A.; SHULMAN, G. I.; NEEL, B. G. AND KAHN, B. B. (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 20: 5479-5489.
- (14) MUSI, N. AND GOODYEAR, L. J. (2003) AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand.* 178: 337-345.
- (15) MU, J.; BROZINICK, J. T. JR.; VALLADARES, O.; BUCAN, M. AND BIRNBAUM, M. J. (2001) A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell.* 7: 1085-1094.
- (16) ARNER, P. (2003) The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol. Metab.* 14: 137-145.
- (17) HOLST, D. AND GRIMALDI, P. A. (2002) New factors in the regulation of adipose differentiation and metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 241-245.
- (18) CHEN, G. AND GOEDEL, D. V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 296: 1634-1635.
- (19) WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K. AND SCHEURICH, P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death. Differ.* 10: 45-65.
- (20) DEMPSEY, P.W.; DOYLE, S. E.; HE, J. Q. AND CHENG, G. (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 193-209.
- (21) RUAN, H.; MILES, P. D.; LADD, C. M.; ROSS, K.; GOLUB, T. R.; OLEFSKY, J. M. AND LODISH, H. F. (2002) Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes*. 51: 3176-3188.

- (22) BODEN, G. AND SHULMAN, G. I. (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* 32 Suppl 3: 14-23.
- (23) FERNANDEZ-VELEDO, S.; NIETO-VAZQUEZ, I.; RONDINONE, C. M. AND LORENZO, M. (2006) Liver X receptor agonists ameliorate TNF α -induced insulin resistance in murine brown adipocytes by downregulating protein tyrosine phosphatase-1B gene expression. *Diabetologia*. 49: 3038-3048.
- (24) NIETO-VAZQUEZ, I.; FERNANDEZ-VELEDO, S.; DE ALVARO, C.; RONDINONE, C. M.; VALVERDE, A. M. AND LORENZO, M. (2007) Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Myocytes Show Increased Insulin Sensitivity and Protection Against Tumor Necrosis Factor- α -Induced Insulin Resistance. *Diabetes*. 56: 404-413.
- (25) LORENZO, M.; FERNÁNDEZ-VELEDO, S.; VILA-BEDMAR, R.; GARCIA-GUERRA, L.; DE ALVARO, C. AND NIETO-VAZQUEZ, I. (2007) Insulin resistance induced by tumor necrosis factor- α in myocytes and brown adipocytes. *Journal of Animal Science*. 86: E94-E104.
- (26) YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J.; HANSEN, L.; LI, Z. W.; KARIN, M. AND SHOELSON, S. E. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ B β . *Science*. 293: 1673-1677.
- (27) DE ALVARO, C.; TERUEL, T.; HERNANDEZ, R. AND LORENZO, M. (2004) Tumor necrosis factor α produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor κ B kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 279: 17070-17078.
- (28) PLOMGAARD, P.; BOUZAKRI, K.; KROGH-MADSEN, R.; MITTENDORFER, B.; ZIERATH, J. R. AND PEDERSEN, B. K. (2005) Tumor necrosis factor- α induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes*. 54: 2939-2945.
- (29) HALSE, R.; PEARSON, S. L.; MCCORMACK, J. G.; YEAMAN, S. J. AND TAYLOR, R. (2001) Effects of tumor necrosis factor- α on insulin action in cultured human muscle cells. *Diabetes*. 50: 1102-1109.
- (30) ROSENZWEIG, T.; BRAIMAN, L.; BAK, A.; ALT, A.; KUROKI, T. AND SAMPSON, S. R. (2002) Differential effects of tumor necrosis factor- α on protein kinase C isoforms α and δ mediate inhibition of insulin receptor signaling. *Diabetes*. 51: 1921-1930.
- (31) FEBBRAIO, M. A. AND PEDERSEN, B. K. (2005) Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc. Sport Sci. Rev.* 33:114-9.
- (32) WALLENIS, V.; WALLENIS, K.; AHRÉN, B.; RUDLING, M.; CARLSTEN, H.; DICKSON, S. L.; OHLSSON, C. AND JANSSON, J. O. (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.* 8: 75-9.
- (33) LAGATHU, C.; BASTARD, J. P.; AUCLAIR, M.; MAACHI, M.; CAPEAU, J. AND CARON, M. (2003) Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6

- secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 372-379.
- (34) HISCOCK, N.; FISCHER, C. P.; SACCHETTI, M.; VAN HALL, G.; FEBBRAIO, M. A. AND PEDERSEN, B. K. (2005) Recombinant human interleukin-6 infusion during low-intensity exercise does not enhance whole body lipolysis or fat oxidation in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289: E2-7.
- (35) SENN, J. J.; KLOVER, P. J.; NOWAK, I. A. AND MOONEY, R. A. (2002) Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes.* 51: 3391-3399.
- (36) KELLER, P.; KELLER, C.; CAREY, A. L.; JAUFFRED, S.; FISCHER, C. P.; STEENBERG, A.; AND PEDERSEN, B. K. (2003) Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: autocrine regulation by IL-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 550-554.
- (37) KELLY, M.; KELLER, C.; AVILUCEA, P. R.; KELLER, P.; LUO, Z.; XIANG, X.; GIRALT, M.; HIDALGO, J.; SAHA, A. K.; PEDERSEN, B. K. AND RUDERMAN, N. B. (2004) AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 449-54.
- (38) BRUCE, C. R. AND DYCK, D. J. (2004) Cytokine regulation of skeletal muscle fatty acid metabolism: effect of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: E616-E621.
- (39) DIRADOURIAN, C.; GIRARD, J. AND PEGORIER, J. P. (2005) Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie.* 87: 33-8.
- (40) MOLLER, D. E. AND BERGER, J. P. (2003) Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27 Suppl 3: S17-21
- (41) MUOIO, D. M.; MACLEAN, P. S.; LANG, D. B.; LI, S.; HOUMARD, J. A.; WAY, J. M.; WINEGAR, D. A.; CORTON, J. C.; DOHM, G. L. AND KRAUS, W. E. (2002) Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR δ . *J. Biol. Chem.* 277: 26089-97.
- (42) WANG, C.; MAO, X.; WANG, L.; LIU, M.; WETZEL, M. D.; GUAN, K. L.; DONG, L. Q. AND LIU, F. (2007) Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. *J. Biol. Chem.* 282: 7991-7996.
- (43) TANAKA, T.; YAMAMOTO, J.; IWASAKI, S.; ASABA, H.; HAMURA, H.; IKEDA, Y.; WATANABE, M.; MAGOORI, K.; IOKA, R. X.; TACHIBANA, K.; WATANABE, Y.; UCHIYAMA, Y.; SUMI, K.; IGUCHI, H.; ITO, S.; DOI, T.; HAMAKUBO, T.; NAITO, M.; AUWERX, J.; YANAGISAWA, M.; KODAMA, T. AND SAKAI, J. (2003) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 15924-9.

- (44) HEVENER, A. L.; HE, W.; BARAK, Y.; LE, J.; BANDYOPADHYAY, G.; OLSON, P.; WILKES, J.; EVANS, R. M. AND OLEFSKY, J. (2003) Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat. Med.* 9: 1491-7.
- (45) VALVERDE, A. M.; BENITO, M. AND LORENZO, M. (2005) The brown adipose cell: a model for understanding the molecular mechanisms of insulin resistance. *Acta Physiol. Scand.* 183: 59-73.
- (46) LESSARD, S. J.; CHEN, Z. P.; WATT, M. J.; HASHEM, M.; REID, J. J.; FEBBRAIO, M. A.; KEMP, B. E. AND HAWLEY, J. A. (2006) Chronic rosiglitazone treatment restores AMPK α 2 activity in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 290: E251-7.
- (47) LAFFITTE, B.A.; CHAO, L.C.; LI, J.; WALCZAK, R.; HUMMASTI, S.; JOSEPH, S. B.; CASTRILLO, A.; WILPITZ, D.C.; MANGELSDORF, D. J.; COLLINS, J. L.; SAEZ, E. AND TONTONOS P. (2003) Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 5419-24.
- (48) STEFFENSEN, K. R. AND GUSTAFSSON, J. A. (2004). Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes.* 53 Suppl 1: S36-S42.
- (49) JUVET, L. K.; ANDRESEN, S. M.; SCHUSTER, G. U.; DALEN, K. T.; TOBIN, K. A.; HOLLUNG, K.; HAUGEN, F.; JACINTO, S.; ULVEN, S. M.; BAMBERG, K.; GUSTAFSSON, J. A. AND NEBB, H. I. (2003) On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 17: 172-182.
- (50) VILLARROYA, F.; IGLESIAS, R. AND GIRALT, M. (2004) Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance: novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr. Med. Chem.* 11: 795-805.

Prostanoids actions in cardiovascular physiopathology

Recibido el 28 de mayo de 2008

MANUEL FRESNO*, MANUEL D. DÍAZ-MUÑOZ, NATALIA
CUESTA, CRISTINA CACHEIRO-LLAGUNO AND MIGUEL A.
ÍÑIGUEZ

*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Departamento de Biología
Molecular. Unversidad Autónoma de Madrid. Consejo Superior de
Investigaciones Científicas. Cantoblanco. 28049, Madrid, Spain.*

ABSTRACT

Prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs) play a pivotal role in cardiovascular physiopathology. They are synthesized from arachidonic acid by the enzymatic action of cyclooxygenases (COXs), leading to the production of an unstable intermediate, PGH_2 that is subsequently converted to the different prostaglandins and thromboxanes (PGE_2 , PGD_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ and TXA_2) by the action of different synthases and isomerases. There are two well characterized COX enzymes, termed COX-1 and COX-2, with different properties. While COX-1 is expressed constitutively in most tissues and is thought to be involved in homeostatic prostanoid biosynthesis, COX-2 is

* Corresponding author:

Dr. Manuel Fresno.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa - Departamento de Biología Molecular.
Universidad Autónoma de Madrid- Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Cantoblanco 28049, Madrid, Spain.

Phone: + 34 911964565; Fax : + 34 911964420; e-mail: mfresno@cbm.uam.es

Abbreviations: COX, Cyclooxygenase; DP, PGD receptor; EP, PGE receptor; FP, PGF receptor; IL, Interleukin; IP, PGI receptor; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; PG, prostaglandin; PGES, PGE synthase; PGDS, PGD synthase; PGFS, PGF synthase; PGIS, PGI synthase; TP, Thromboxane receptor; TX, Thromboxane; TXS, Thromboxane synthase.

transcriptionally up-regulated in response to mitogens and pro-inflammatory stimuli being the predominant isoform involved in the inflammatory response.

In the cardiovascular system, prostanoids have been shown to modulate the pathogenesis of vascular diseases as thrombosis and atherosclerosis through a variety of processes, including platelet aggregation, vasorelaxation and vasoconstriction, local inflammatory response and leukocyte-endothelial cell adhesion. Multiple studies using pharmacological inhibitors and genetically deficient mice have demonstrated the importance of prostanoid-mediated actions on cardiovascular physiology. However, recent withdrawal of COX-2 selective inhibitors from the clinic because of their adverse effects in patients with potential cardiovascular risk has opened a debate about the role of COX-derived prostanoids in vascular pathologies and the benefits and risks for the use of COX inhibitors in cardiovascular diseases.

Key words: Prostaglandins.- Thromboxanes.- Cyclooxygenases.- Prostanoid receptors.- NSAIDs.- Cardiovascular physiopathology.

RESUMEN

Acciones de los prostanoïdes en la fisiopatología cardiovascular

Las prostaglandinas (PGs) y los tromboxanos (TXs) juegan un papel esencial en la fisiopatología cardiovascular. Estos prostanoïdes son sintetizados a través de la acción enzimática de las ciclooxigenasas (COXs) sobre el ácido araquidónico, lo que lleva a la producción de un intermediario inestable, la PGH_2 , a partir de la cual diversas sintetasas e isomerastas generarán las diferentes prostaglandinas y tromboxanos (PGE_2 , PGD_2 , PGI_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ and TXA_2). Existen dos ciclooxigenasas bien caracterizadas denominadas COX-1 y COX-2, con diferentes propiedades. COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, estando implicada en la biosíntesis de prostanoïdes con funciones homeostáticas. Por otro lado, la expresión de COX-2 se induce en respuesta a mitógenos y estímulos pro-inflamatorios, constituyendo la isoforma predominantemente implicada en la respuesta inflamatoria.

Los prostanoïdes modulan la patogénesis de enfermedades vasculares como la trombosis y la aterosclerosis a través de una serie de procesos como: la agregación plaquetaria, la vasodilatación y vasoconstricción, y la respuesta inflamatoria local. Múltiples estudios han demostrado la importancia de las acciones mediadas por los prostanoïdes en la fisiopatología cardiovascular, bien mediante el uso de inhibidores farmacológicos o a través del análisis de ratones genéticamente deficientes. Sin embargo, la reciente retirada del mercado de inhibidores selectivos de COX-2 a causa de sus efectos adversos en pacientes con riesgo cardiovascular, ha abierto el debate sobre el papel de los prostanoïdes en la patología vascular y sobre las ventajas o inconvenientes del uso de inhibidores de COXs en las enfermedades cardiovasculares.

Palabras clave: Prostaglandinas.- Tromboxanos.- Ciclooxigenasas.-
Receptores de prostanoïdes.- AINEs.- Fisiopatología cardiovascular.

INTRODUCTION

Prostanoids, including prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs) are a group of bioactive lipids that play a very important role in many physiological and pathological processes, including inflammation (1), cancer (2), angiogenesis (3) and cardiovascular diseases (4-7). Arachidonic acid liberated from membrane phospholipids by several phospholipases, is metabolized by the sequential action of cyclooxygenases (COX) and prostaglandin or thromboxane synthases to produce the diverse classes of prostanoids (8, 9). COX enzymes catalyze the formation of an unstable endoperoxide intermediate, PGH_2 , which in turn can be metabolized by cell-specific isomerases and synthases to a range of eicosanoids with potent and diverse biological effects, as PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 , and TXA_2 (Figure 1). Finally after their synthesis, prostanoids are quickly released to the extracellular medium exerting multiple effects upon interaction with prostanoid receptors present in the neighbouring cells.

CYCLOOXYGENASES

There are two main COX isoenzymes named COX-1 and COX-2, encoded by two separate genes (8-10). A COX-3 enzyme derived from alternative splicing of the COX-1 gene has been also described, although its role is still unclear (11). COX-1 is constitutively expressed in most, but not all, cell types and tissues and is responsible for vascular, renal and gastric homeostasis (12). In contrast, COX-2 expression is generally induced at sites of inflammation by many stimuli that includes among others, proinflammatory cytokines as interleukin (IL)- 1β , tumor necrosis factor (TNF)- α , growth factors, mechanical stress, oxidized lipids, free radicals and bacterial products (9-13). Those stimuli activate many

transcription factors such as nuclear factor (NF)- κ B, NF-IL6 (C/EBP), cAMP response element-binding protein (CREBP), Activator protein (AP) -1, interferon regulatory factors (IRFs) and nuclear factor of activated T cells (NFAT) (13-15) that induce COX-2 transcription in different cell types. COX-2 transcriptional induction can be inhibited by anti-inflammatory and immunosuppressive drugs as glucocorticoids and Cyclosporin A (16, 17) as well as by anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-10 and IL-13 (18, 19).

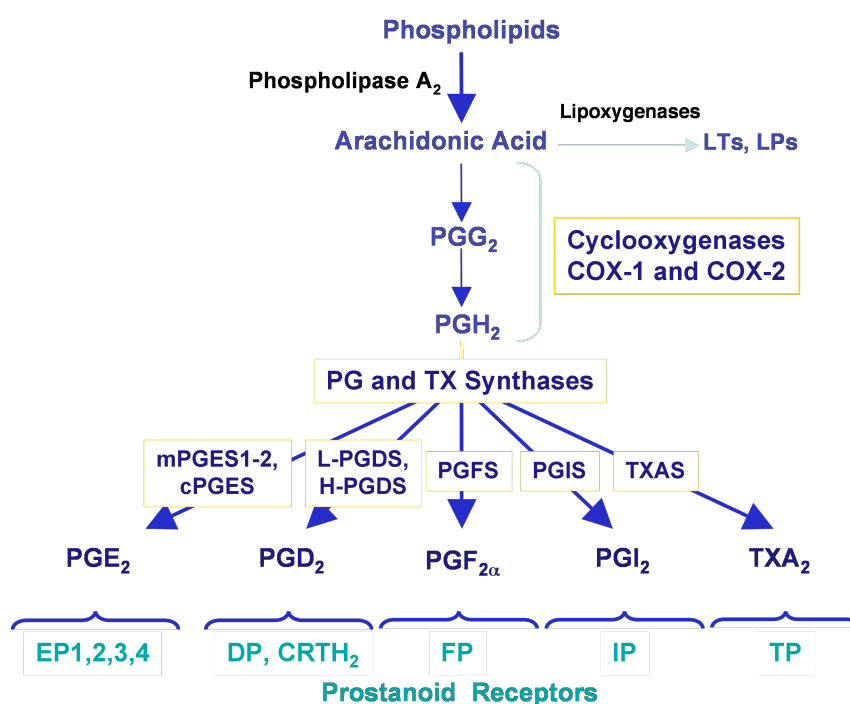


FIGURE 1.- **Biosynthesis of prostanoïds.** Arachidonic acid is liberated from the membrane phospholipids by phospholipase A_2 (PLA_2) and converted to PGH_2 and then to PGG_2 by cyclooxygenases (COX-1 or COX-2). Subsequent conversion of PGH_2 to different prostanoïds (PGs, prostaglandins and TXs, thromboxanes) is catalyzed by the respective synthases and isomerases. Prostanoïds signal through G protein-coupled receptors with seven trans-membrane domains. PGE_2 signals via 4 different receptors

(EP1, EP2, EP3 and EP4). PGD₂, PGF_{2α}, PGI and TXA₂ bind to the DP and CRTH₂, FP, IP and TP receptors respectively.

Cyclooxygenases are the target of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). It is generally accepted that these drugs exert their anti-inflammatory and analgesic actions through inhibition of COX enzymatic activity. Classic NSAIDs, such as aspirin, inhibit both isoforms at standard doses. Inhibition of COX-1 may account for some of the unwanted side effects of these drugs such as gastrointestinal and renal toxicity. On the other hand, as COX-2 is thought to be the predominant isoform involved in the inflammatory response, the ability of NSAIDs to inhibit COX-2 activity may explain their therapeutic effects as anti-inflammatory drugs (Figure 2). Therefore, most of the new research on anti-inflammatory drugs has been aimed at targeting the COX-2 inducible production of PGs (8, 20). Newly developed drugs with high selectivity against COX-2 such as Celecoxib and Rofecoxib have been proved to be potent anti-inflammatory compounds without causing gastric toxicity (21).

Many of the functions associated with each COX isoform have been defined by the therapeutic or adverse effects resulting from pharmacological inhibition by NSAIDs selective for each isoform. However, increasing evidence has shown that certain actions of NSAIDs could be mediated through mechanisms independent of cyclooxygenase activity and prostaglandin production that may be relevant to their effects *in vivo* (22). Thus, extrapolating the role of COX -derived PGs by the use of COX inhibitors may lead to confusing conclusions. In this sense, information provided by the use of mice genetically deficient in COX-1 or COX-2 has provided valuable insight into the roles played by those enzymes *in vivo* (12, 23, 24). These studies have shown that these two closely related enzymes have a non-redundant role. Overall, they have indicated that, contrary to expectations, both, COX-2 and COX-1 participate in the maintenance of normal physiology. In this sense, despite being mostly inducible, COX-2 deficiency in mice produces dramatic phenotypic changes related to normal development and in the maintenance of homeostasis. Thus, COX-2 deficiency results in a severe defect in renal development and in reproduction in females (25, 26).

Surprisingly, COX-1 KO mice show no gastric pathology and are resistant to classical NSAIDs-induced gastric ulceration. COX-1 deficient mice show reduced platelet aggregation that is consistent with the fact that platelets express only COX-1. However, those mice also have a decreased arachidonic acid-induced inflammation indicating a role of this enzyme in inflammatory responses (27).

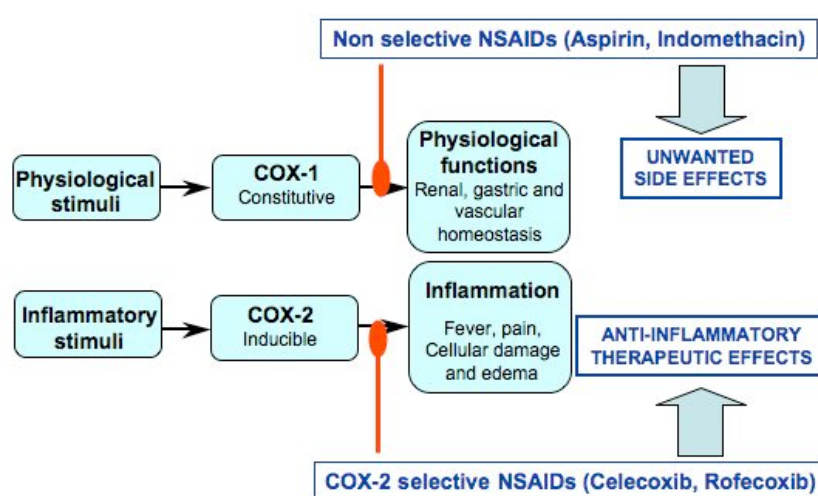


FIGURE 2.- *Cyclooxygenases are the target of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). NSAIDs exert their anti-inflammatory and analgesic actions through inhibition of COX enzymatic activity. Classical non selective NSAIDs, such as Aspirin and Indomethacin inhibit COX-1 and COX-2 isoforms at standard doses. Unwanted side effects of these drugs such as gastrointestinal and renal toxicity occurs through the inhibition of the COX-1 –dependent production of prostanoids involved in physiological functions. The ability of NSAIDs to inhibit COX-2 activity explains their therapeutic effects as anti-inflammatory drugs. Newer NSAIDs belonging to the family of Coxibs, such as Celecoxib and Rofecoxib, with high selectivity against COX-2, have been shown to exhibit potent anti-inflammatory properties without causing gastric toxicity.*

Subcellular location of COX isoenzymes may also be important in determining their distinct functions. Thus, COX-1 has been mainly

located in the endoplasmic reticulum and nuclear envelope whereas COX-2 is preferentially expressed around the nuclear membrane (9, 12).

PROSTAGLANDIN AND THROMBOXANE SYNTHASES

Despite the importance of COX isoenzymes in prostanoid generation, the actual prostanoid profile synthesized by a particular cell type is determined by the presence of different downstream PG and TX synthases and isomerases (28) (Figure 1). A particular cell type may predominantly express a particular isomerase, which will largely determine which prostanoid is generated. Moreover, some cell types can express more than one isomerase and a particular COX isoenzyme can couple to different isomerases in the same cell (29). Thus, COX-1 preferentially couples with Thromboxane synthase (TXS) and PGF_{2α} synthase (PGFS), while COX-2 is associated to Prostacyclin synthase (PGIS) and microsomal PGE₂ synthase -1 (mPGES-1) (29, 30). Evenmore, PGH₂ and other endoperoxides generated in one cell type may be secreted and metabolized by isomerases present in surrounding cells by the so-called “transcellular metabolism” (31).

PGE₂ is synthesized by the action of PGE synthases (PGES) of which there are 3 types: one cytosolic (cPGES) and two membrane-associated PGE synthases (mPGES)-1 and -2. The (cPGES) belongs to the glutathione transferase family, is ubiquitously expressed and is preferentially functionally coupled to COX-1, thus, involved in housekeeping production of PGE₂ (32, 33). In contrast, mPGES-1, which belongs to the Membrane-Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism (MAPEG) superfamily, is inducible by similar stimuli that induce COX-2, being its induction also suppressed by glucocorticoids. Moreover, mPGES-1 appears functionally coupled with COX-2 and its induction is usually coordinated with COX-2 (34). A second type of membrane-bound microsomal PGES is the mPGES-2, able to couple with both COX isoenzymes, although its functional significance is still unclear (35).

PGD₂ is synthesized from PGH₂ by the action of PGD synthases (PGDS) of which there are two isoforms. The haematopoietic PGDS is

present in mast cells, basophils, and in a subset of T helper cells (Th2) and may play a role in allergy (36). The lipocalin-type PGD synthase is mostly expressed in brain and it is especially abundant in the cerebrospinal fluid (37). Interestingly, PGD₂ can be further metabolized by dehydration to PGJ₂, delta12-PGJ₂, and 15- deoxy-delta(12,14)-PGJ₂, which is a ligand for the nuclear transcription factor peroxisomal proliferator activated receptor (PPAR)-gamma having anti-inflammatory activity (38).

PGF_{2α} can be synthesized from PGH₂ by PGH 9-11-endoperoxide reductase or PGF synthase (PGFS). In addition it can be generated from PGE₂ by PGE 9-ketoreductase or from PGD₂ by PGD-11-ketoreductase (39).

Prostacyclin, PGI₂, is produced by the action of PGI synthase (PGIS) which can be induced by mechanical stress, via activation of AP-1 (40).

TXA₂ is synthesized from PGH₂ by thromboxane synthase (TXS), which is constitutively expressed in platelets as well as other blood cells and various tissues as kidney, lung, liver and placenta. Its regulation takes place mainly at the transcriptional level (41).

PROSTANOID RECEPTORS

Prostanoids actions, with the possible exception of cyclopentenone PGs, are mediated through cell surface receptors. These are cell seven membrane spanning G-protein coupled receptors that are classified into five basic types, named according to their ligands: DP for PGD₂, EP for PGE₂, FP for PGF₂, IP for PGI₂, and TP for TXA₂ (6, 42).

DP (also named DP1) is weakly expressed in brain despite the important action of PGD₂ in this organ. It is moderately expressed in the ileum with very weak expression in the lung. DP2, also called CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells), is expressed on Th2 immune cells being a chemoattractant receptor for Th2 lymphocyte subset in allergic inflammation (43).

FP is most abundantly expressed in the corpus luteum according to the role played by PGF_{2α} in menstrual cycle. It is also expressed in the

heart, lung, kidney, and stomach, although its expression in these tissues does not vary during the estrous cycle as does in the corpus luteum (44). There are several splice variants of FP (FP_A and FP_B) but its particular role is unclear.

IP is expressed in larger quantities by dorsal root ganglion neurons but also by platelet precursors (megakaryocytes) as well as in the smooth muscle cells of arteries consistent with the important action of PGI₂ in the cardiovascular system (45).

PGE₂ has four receptors, EP1 to 4. In addition, there are several splice variants of EP3. More importantly, each one is linked to a different transduction pathway that may even give rise to opposite effects (activation or inhibition) on cellular responses (6). Thus, EP1 induces an inhibition of adenylate cyclase leading to a decrease in cAMP whereas EP2 and EP4 receptors activate this enzyme. On the other hand, EP3 is coupled to Gαq and its activation results in intracellular calcium increase. EP3 and EP4 receptors have a wide distribution throughout the body, being expressed in almost all tissues examined. In contrast, EP1 is restricted to the lung, kidney and stomach, and EP2 is scarcely expressed.

In the cardiovascular system, IP, DP, EP4 and EP2 receptors that mediate cAMP increases are termed “relaxant” receptors, whereas TP, FP, and EP1 receptors, which induce calcium mobilization, represent the “contractile” receptor group. EP3, which reduces cAMP levels, has been named the “inhibitory” receptor (6).

Nuclear actions of prostanoids have also been reported. Thus, PGJ₂ derivatives can bind and activate peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) nuclear transcription factors (46). There are four types of PPARs (alpha, delta, gamma-1, and gamma-2), which may bind various PGs with different sensitivity (47). In this way, PGs may also act as intracellular signalling molecules and regulate gene expression (48). Generally PPARs induces transcription of anti-inflammatory genes as well as inhibits activation of pro-inflammatory ones (46). Besides, cyclopentenone PGs (that includes PGA1) have a reactive ring which may lead to have receptor-independent actions through redox alterations (49).

PROSTANOIDS IN CARDIOVASCULAR HOMEOSTASIS

Among eicosanoids, TXA₂ and PGI₂ are thought to be the most important prostanoids in controlling the homeostasis of the cardiovascular system, as proposed more than 20 years ago by Bunting, Moncada and Vane (5, 50, 51). They are synthesized by blood platelets and vascular endothelium, respectively, and have opposed biological activities. TXA₂ is potent vasoconstrictor as well as a potent inducer of platelet adhesion and regulates renal hemodynamics and sodium handling by the kidney (4). On the other hand, PGI₂ is the predominant prostanoid produced by cells of the vasculature, having an important vasodilator effect by promoting renal sodium excretion and regulating the growth of vascular smooth muscle cells. Moreover, it opposes TXA₂ effects on platelets inhibiting their aggregation and action (28, 52).

Due to this, many aspects of cardiovascular disease have traditionally been explained by alterations in the balance between PGI₂ and TXA₂ during the interactions between platelets and vessel wall (53) although recent studies argue about this theory (54). Since platelets express COX-1 but not COX-2, it is inferred that TXA₂ production by TXAS uses PGH₂ derived from COX-1. In this regard, platelet TXA₂ is blunted in COX-1 deficient mice, which have decreased platelet aggregation and thrombosis (55). Mice deficient in the TP (51, 56) or human patients with a genetic disorder in the TP receptor (57, 58) exhibit an increase in bleeding tendency and resistance to platelet aggregation, confirming the role of TXA₂ in those activities and consistent with the effects of TP antagonists in humans. Conversely, transgenic mice specifically overexpressing TP in the vasculature results in placental ischemia during pregnancy and suppression of TXA₂ formation rescue the phenotype (59). Since TXA₂ is a mitogen of vascular smooth muscle cells, TP KO mice have decreased vascular proliferation and platelet response after artery injury to the carotid although they are normotensive (51).

Whether PGI₂ is synthesized through COX-1 or COX-2 has been of paramount importance in classical cardiovascular research. Initial reports indicated that vascular endothelial cells and smooth muscle cells have COX-1, and that PGI₂ can be formed through COX-1 which was supported by the fact that in endothelial cells, PGIS co-localizes with

COX-1 but not with COX-2 (10, 54). However, PGIS expression can be induced together with COX-2 in endothelial cells by hemodynamic shear stress or by oxidized low density lipoproteins (oxLDLs) leading to PGI₂ production (60, 61). Moreover, in healthy individuals COX-2 specific inhibitors reduce PGI₂ metabolites in urine without affecting TXA₂ metabolites (62). This suggests that COX-2 is a major source of PGI₂ in the human cardiovascular system and plays a role under physiological conditions. The predominant coupling of PGI₂ to COX-2 suggests that COX-2 specific inhibitor could be prothrombotic, since anti-aggregatory PGI₂ circulating levels within would be reduced. This has been proposed to explain the putative associations between COX-2 inhibitors and the development of cardiovascular complications (63, 64). In contrast to TP deficient mice, IP knockout mice have normal blood pressure and develop normally without suffering from spontaneous thrombosis. However, after endothelial damage they show an enhanced thrombotic response compared to control littermates (65), indicating that PGI₂ does play a major role only in response to stress and not in the basal systemic circulation. Mice lacking IP have enhanced vascular smooth cell proliferation and platelet activation in response to vascular injury likely caused by enhanced TXA₂/PGI₂ ratio (51). Simultaneous deletion of the TP and the IP abrogated both increased responses (51). Selective inhibition, knockout, mutation or deletion of COX-2 or IP has been shown to accelerate thrombogenesis. These responses were attenuated by COX-1 knock down (66). IP KO mice also show vascular hyperplasia and increased vascular remodeling (67) as well as cardiac hypertrophy and fibrosis (68). Taken together those results indicate that PGI₂ regulates the cardiovascular activity of TXA₂ and further support the hypothesis that cardiovascular homeostasis is resulting from the balance between these two eicosanoids.

ROLE OF PROSTANOIDS IN ATHEROSCLEROSIS

Atherosclerosis is one of the most important diseases of the developed countries and can be considered as a multifactorial inflammatory disease triggered by high levels of cholesterol in serum

leading to an inflammation in the intima of large arteries and involving several cell types including immune cells as T lymphocytes and monocytes/macrophages as well as endothelial and smooth muscle cells and platelets (69, 70). Among those, monocytes/macrophages play an important key role in many phases of atherogenic process. Thus, after an atherogenic stimulus, monocyte-macrophages reversibly adhere to the endothelium and migrate across it, leading to a prolonged retention of those cells in the intima which is central in atherogenesis. A variety of substances including prostanoids have been implicated in the pathogenesis of atherosclerosis.

Prostanoids may be involved in atherosclerosis through their ability to regulate a variety of mechanisms potentially involved in the pathogenesis such as inflammation, vasodilatation, vasoconstriction, platelet aggregation and leukocyte-endothelial cell adhesion, and leukocyte migration among others (71, 72). In this regard, COX-2 expression has been observed in symptomatic atherosclerotic lesions (73). This enzyme may play a dual role in the pathogenesis of the atherosclerosis. Initially, COX-2 expression is induced in monocytes by pro-inflammatory cytokines and several growth factors. Then, COX-2-mediated PG production by activated macrophages may promote atherosclerosis in the artery wall through several mechanisms, as induction of other proinflammatory mediators or by favouring migration of macrophages and other immune cells or by induction of adhesion molecules. Later on, COX-2-derived PGI₂, likely from the endothelial cells, may have a protective role in atherogenesis by favouring vasodilatation. Moreover, in atherosclerotic patients, PGI₂ can be formed through the action of both COX-1 and COX-2 (54). COX-1 but not COX-2 is expressed in normal arteries, whereas both isoforms are expressed in atherosclerotic lesions. In those lesions COX-2 is expressed not only by monocyte/macrophages, but also by endothelial and proliferating smooth muscle cells (7). Atherogenic lipoproteins, such as oxidized low density lipoproteins (oxLDL) may promote atherosclerosis first by contributing to inflammation by activating monocytes/macrophages and later by stimulating lipid uptake by macrophages, leading to foam cell formation. Interestingly, oxLDL has apparently contradictory effect on macrophages, since they can activate the expression of some pro-inflammatory genes

whereas reduce COX-2 expression (74). In agreement with this is the fact that macrophage-derived foam cells from the atherosclerotic lesions in mice, did not express COX-2. Thus induction COX-2 expression in macrophages takes place before their transformation into foam cells in the plaques.

In spite of the clear involvement of COX-2 derived prostanoids in vascular atherosclerosis, results on the effect of COX-2 selective inhibitors on the formation and progression of atherosclerotic plaques are controversial. Results from different studies have shown increased, reduced as well as unaltered atherogenesis (7, 62, 75-78). Those discrepant effects of COX-2 may reflect the dual role of COX-2 in promoting (early) but protecting later atherosclerotic lesions, mentioned above. Results about the influence of COXs in atherosclerosis in animal models, apart from those using pharmacological inhibitors, have been obtained by means of cell transplantation from fetal liver or bone marrow from COX-1 or COX-2 deficient mice into ApoE or LDLR KO mice (75, 79, 80). The size of the atherosclerotic lesions was significantly reduced when cells deficient in COX-2 were transplanted compared to the mice transplanted with wild type fetal liver cells (75, 80). Those results implicate COX-2 expression in the macrophage and not in other cells as endothelial cells, smooth muscle cells, or T-cells in promoting atherosclerotic lesion formation. Efforts to obtain information from mice deficient in both COX-2 and ApoE or LDLR genes have been unsuccessful due to the severe renal defects of COX-2 mice. Regarding to COX-1, both proatherosclerotic and anti-atherosclerotic roles also have been reported (79, 81).

Various prostanoids may play a significant role in the atherogenic process (71, 82). Patients with extensive disease as well as murine models of atherosclerosis have enhanced formation of TXA₂. Even more, TP antagonists decrease atherogenesis in mice. TP deficiency in atherosclerotic mice models induced a significant delay in atherogenesis, compared with mice deficient in apoE alone (72).

In contrast, PGI₂ may theoretically have a beneficial effect in the atherogenic process by limiting platelet adhesion to the endothelium and activation in the plaques. In accordance with this, local delivery of PIGS gene through an adenoviral vector reduces the platelet deposition seen

following vascular injury (83). Genetic deletion of the IP receptor, both in the LDRL and in the ApoE KO mice models, aggravated atherogenesis (72, 84). As platelets are thought to contribute to the development and progression of atherosclerosis in the late phase, PGI₂ may likely suppress lesion formation by limiting platelet deposition. Those mice exhibited a significant acceleration in atherogenesis with enhanced platelet activation and increased rolling of leukocytes on the vessel walls. Those results indicate that TXA₂ promotes whereas PGI₂ prevents the initiation and progression of atherogenesis by modulating platelet activation and leukocyte-endothelial cell interaction.

In addition to PGI₂ and TXA₂, other PGs, such as PGE₂ and PGD₂, could also play an important role in the pathophysiology of atherosclerosis. In this regard, vasoconstrictor responses to PGE₂ are greatly increased in atherosclerosis (85) and PGE₂ may also promote angiogenesis (3). Moreover, inducible mPGES-1 has been detected in activated macrophages in atherosclerotic lesions where it colocalizes with COX-2 both in mice and humans (73). Disruption of this enzyme in mice reduced foam cell formation and atherosclerosis in fat-fed LDLR^{-/-} mice. mPGES-1 deletion augmented both PGIS and TXS expression in endothelial cells (86). On the other hand, COX-2 derived PGs as PGD₂ may possess anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties in such a way that the balance between PGDS and PGES has been shown to be a major determinant of atherosclerotic plaque instability (87).

PHARMACOLOGICAL IMPLICATIONS

Based on the hypothesis that atherosclerosis is an inflammatory disease, it was proposed that COX inhibition by NSAIDs, and in particular selective inhibition of COX-2 by the Coxibs family of NSAIDs, might have protective and even anti-atherogenic effects. However, clinical studies have indicated that there is an increased risk of atherothrombosis in individuals taking these drugs in such a way that some of them as Rofecoxib have been recently withdrawn from the market (88-91). These undesirable effects of COX-2 selective inhibitors have been explained by the TXA₂/PGI₂ balance theory by which selective

inhibition of COX-2 lead to a reduction in the production of the vasodilator PGI₂ whereas production of the vasoconstrictor and pro-aggregatory TXA₂, mostly COX-1–dependent, remains unaffected. Thus, disruption of the physiological balance between TXA₂ and PGI₂ accelerates atherosclerosis and increases the risk of thrombosis and other cardiovascular complications (Figure 3).

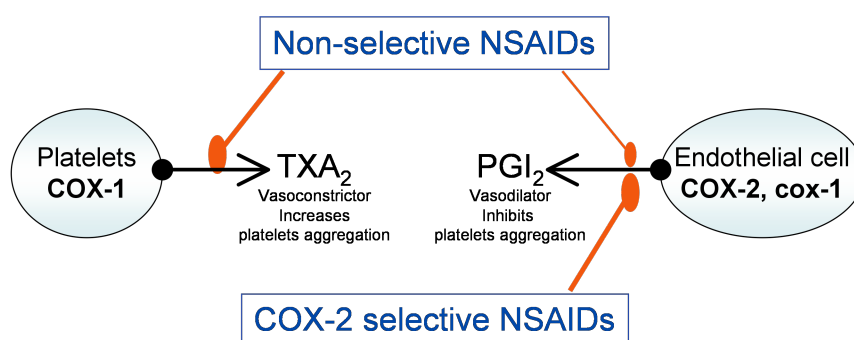


FIGURE 3.- **The balance hypothesis for the cardiovascular effects of NSAIDs.** Cardiovascular homeostasis is controlled by the balance between COX-1 –dependent production of TXA₂ by platelets and COX-2 –mediated PGI₂ (prostacyclin) production by endothelial cells. Whereas TXA₂ function as a potent platelet activator and vasoconstrictor, PGI₂ inhibits platelet aggregation and thrombosis. Classical non-selective NSAIDs reduce the production of TXA₂ by platelets through their ability to inhibit COX-1 activity thus displaying anti-thrombotic properties. In contrast, COX-2 selective NSAIDs reduce PGI₂ formation by endothelial cells consequently disturbing the equilibrium between TXA₂ and PGI₂ and potentially favouring pro-thrombotic cardiovascular events.

Nevertheless, the mechanisms underlying the pathogenesis of cardiovascular complications upon NSAIDs administration remain to be clarified as the TXA₂/PGI₂ balance theory is somewhat simple and it does not consider some important clinical and experimental evidences as the increased risk of cardiovascular events by some non-selective NSAIDs, the contribution of other prostanoids to the overall effect in cardiovascular physiopathology, and the COX-2 independent effects of NSAIDs. In this sense, a more profound knowledge of the complex

relations between prostanoids-mediated actions and function of cells in the cardiovascular system is required to clearly understand the benefits and risks of NSAIDs on cardiovascular diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the financial support of Comunidad Autónoma de Madrid (S-SAL-0159-2006), Ministerio de Educación y Ciencia-FEDER (SAF 2004-05109, BFU2004-04157 and BFU2007-62659), European Commission (EICOSANOX integrated project LSH-CT-2004-005033; and MAIN network of excellence) and Laboratorios del Dr. ESTEVE S.A.

REFERENCES

- (1) WILLIAMS, C. S.; MANN, M. AND DUBOIS, R. N. (1999) The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*. 18: 7908-7916.
- (2) SUBBARAMAIAH, K. AND DANNENBERG, A. J. (2003) Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 96-102.
- (3) INIGUEZ, M. A.; RODRIGUEZ, A.; VOLPERT, O. V.; FRESNO, M. AND REDONDO, J. M. (2003) Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol. Med.* 9: 73-78.
- (4) FITZGERALD, G. A.; AUSTIN, S.; EGAN, K.; CHENG, Y. AND PRATICO, D. (2000) Cyclo-oxygenase products and atherothrombosis. *Ann. Med.* 32 Suppl 1: 21-26.
- (5) DAVIDGE, S. T. (2001) Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ. Res.* 89: 650-660.
- (6) ALFRANCA, A.; INIGUEZ, M. A.; FRESNO, M. AND REDONDO, J. M. (2006) Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* 70: 446-456.
- (7) BELTON, O. AND FITZGERALD, D. J. (2003) Cyclooxygenase isoforms and atherosclerosis. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2003: 1-18.
- (8) SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M. AND HLA, T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56: 387-437.

- (9) SMITH, W. L.; DEWITT, D. L. AND GARAVITO, R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 145-182.
- (10) WARNER, T. D. AND MITCHELL, J. A. (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J.* 18: 790-804.
- (11) CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S. AND SIMMONS, D. L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 13926-13931.
- (12) MORITA, I. (2002) Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 165-175.
- (13) TANABE, T. AND TOHNAI, N. (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 95-114.
- (14) BLANCO, J. C.; CONTURSI, C.; SALKOWSKI, C. A.; DEWITT, D. L.; OZATO, K. AND VOGEL, S. N. (2000) Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J. Exp. Med.* 191: 2131-2144.
- (15) INIGUEZ, M. A.; MARTINEZ-MARTINEZ, S.; PUNZON, C.; REDONDO, J. M. AND FRESNO, M. (2000) An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 23627-23635.
- (16) INIGUEZ, M. A.; PUNZON, C. AND FRESNO, M. (1999) Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J. Immunol.* 163: 111-119.
- (17) KUJUBU, D. A. AND HERSCHMAN, H. R. (1992) Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J. Biol. Chem.* 267: 7991-7994.
- (18) NIRO, H.; OTSUKA, T.; IZUHARA, K.; YAMAOKA, K.; OHSHIMA, K.; TANABE, T.; HARA, S.; NEMOTO, Y.; TANAKA, Y.; NAKASHIMA, H. AND NIHO, Y. (1997) Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood.* 89: 1621-1628.
- (19) DIAZ-CAZORLA, M.; PEREZ-SALA, D.; ROS, J.; JIMENEZ, W.; FRESNO, M. AND LAMAS, S. (1999) Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells--transcriptional inhibition by IL-13. *Eur. J. Biochem.* 260: 268-274.
- (20) DANNHARDT, G. AND KIEFER, W. (2001) Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.* 36: 109-126.
- (21) WARNER, T. D.; GIULIANO, F.; VOJNOVIC, I.; BUKASA, A.; MITCHELL, J. A. AND VANE, J. R. (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 7563-7568.
- (22) TEGEDER, I.; PFEILSCHIFTER, J. AND GEISSLINGER, G. (2001) Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb J.* 15: 2057-2072.

- (23) LOFTIN, C. D.; TIANO, H. F. AND LANGENBACH, R. (2002) Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 177-185.
- (24) MARTIN SANZ, P.; HORTELANO, S.; BOSCA, L. AND CASADO, M. (2006) Cyclooxygenase 2: understanding the pathophysiological role through genetically altered mouse models. *Front. Biosci.* 11: 2876-2888.
- (25) DINCHUK, J. E.; CAR, B. D.; FOCHT, R. J.; JOHNSTON, J. J.; JAFFEE, B. D.; COVINGTON, M. B.; CONTEL, N. R.; ENG, V. M.; COLLINS, R. J.; CZERNIAK, P. M. AND ET AL. (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature.* 378: 406-409.
- (26) MORHAM, S. G.; LANGENBACH, R.; LOFTIN, C. D.; TIANO, H. F.; VOULOUMANOS, N.; JENNETTE, J. C.; MAHLER, J. F.; KLUCKMAN, K. D.; LEDFORD, A.; LEE, C. A. AND SMITHIES, O. (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell.* 83: 473-482.
- (27) LANGENBACH, R.; MORHAM, S. G.; TIANO, H. F.; LOFTIN, C. D.; GHANAYEM, B. I.; CHULADA, P. C.; MAHLER, J. F.; LEE, C. A.; GOULDING, E. H.; KLUCKMAN, K. D.; KIM, H. S. AND SMITHIES, O. (1995) Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell.* 83: 483-492.
- (28) HELLIWELL, R. J.; ADAMS, L. F. AND MITCHELL, M. D. (2004) Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 70: 101-113.
- (29) UENO, N.; TAKEGOSHI, Y.; KAMEI, D.; KUDO, I. AND MURAKAMI, M. (2005) Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 70-76.
- (30) MURAKAMI, M.; KAMBE, T.; SHIMBARA, S. AND KUDO, I. (1999) Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.* 274: 3103-3115.
- (31) KARIM, S.; HABIB, A.; LEVY-TOLEDANO, S. AND MACLOUF, J. (1996) Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J. Biol. Chem.* 271: 12042-12048.
- (32) MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; TANIOKA, T. AND KUDO, I. (2002) Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 383-399.
- (33) TANIOKA, T.; NAKATANI, Y.; SEMMYO, N.; MURAKAMI, M. AND KUDO, I. (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275: 32775-32782.

- (34) SAMUELSSON, B.; MORGENSTERN, R. AND JAKOBSSON, P. J. (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol. Rev.* 59: 207-224.
- (35) MURAKAMI, M.; NAKASHIMA, K.; KAMEI, D.; MASUDA, S.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; OHMIYA, Y.; WATANABE, K. AND KUDO, I. (2003) Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 278: 37937-37947.
- (36) KANAOKA, Y. AND URADE, Y. (2003) Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 69: 163-167.
- (37) URADE, Y. AND HAYAISHI, O. (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1482: 259-271.
- (38) SCHER, J. U. AND PILLINGER, M. H. (2005) 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin. Immunol.* 114: 100-109.
- (39) WATANABE, K. (2002) Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 401-407.
- (40) WU, K. K. AND LIOU, J. Y. (2005) Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 45-52.
- (41) WANG, L. H. AND KULMACZ, R. J. (2002) Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 409-422.
- (42) HATA, A. N. AND BREYER, R. M. (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.* 103: 147-166.
- (43) KABASHIMA, K. AND NARUMIYA, S. (2003) The DP receptor, allergic inflammation and asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 69: 187-194.
- (44) TSUBOI, K.; SUGIMOTO, Y. AND ICHIKAWA, A. (2002) Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 535-556.
- (45) SMYTH, E. M. AND FITZGERALD, G. A. (2002) Human prostacyclin receptor. *Vitam. Horm.* 65: 149-165.
- (46) STRAUS, D. S. AND GLASS, C. K. (2001) Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.* 21: 185-210.
- (47) BERGER, J. AND MOLLER, D. E. (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53: 409-435.
- (48) IDE, T.; EGAN, K.; BELL-PARIKH, L. C. AND FITZGERALD, G. A. (2003) Activation of nuclear receptors by prostaglandins. *Thromb. Res.* 110: 311-315.
- (49) GRAU, R.; INIGUEZ, M. A. AND FRESNO, M. (2004) Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor, and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in colon carcinoma

- cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *Cancer Res.* 64: 5162-5171.
- (50) BUNTING, S.; MONCADA, S. AND VANE, J. R. (1983) The prostacyclin--thromboxane A₂ balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br. Med. Bull.* 39: 271-276.
- (51) CHENG, Y.; AUSTIN, S. C.; ROCCA, B.; KOLLER, B. H.; COFFMAN, T. M.; GROSSER, T.; LAWSON, J. A. AND FITZGERALD, G. A. (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science.* 296: 539-541.
- (52) YOKOYAMA, C.; YABUKI, T.; SHIMONISHI, M.; WADA, M.; HATAE, T.; OHKAWARA, S.; TAKEDA, J.; KINOSHITA, T.; OKABE, M. AND TANABE, T. (2002) Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction. *Circulation.* 106: 2397-2403.
- (53) VANE, J. R. (2002) Biomedicine. Back to an aspirin a day? *Science.* 296: 474-475.
- (54) FLAVAHAN, N. A. (2007) Balancing prostanoid activity in the human vascular system. *Trends Pharmacol. Sci.* 28: 106-110.
- (55) YU, Y.; CHENG, Y.; FAN, J.; CHEN, X. S.; KLEIN-SZANTO, A.; FITZGERALD, G. A. AND FUNK, C. D. (2005) Differential impact of prostaglandin H synthase 1 knockdown on platelets and parturition. *J. Clin. Invest.* 115: 986-995.
- (56) THOMAS, D. W.; MANNON, R. B.; MANNON, P. J.; LATOUR, A.; OLLIVER, J. A.; HOFFMAN, M.; SMITHIES, O.; KOLLER, B. H. AND COFFMAN, T. M. (1998) Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J. Clin. Invest.* 102: 1994-2001.
- (57) FUSE, I.; HIGUCHI, W. AND AIZAWA, Y. (2000) Pathogenesis of a bleeding disorder characterized by platelet unresponsiveness to thromboxane A₂. *Semin. Thromb. Hemost.* 26: 43-45.
- (58) HIRATA, T.; KAKIZUKA, A.; USHIKUBI, F.; FUSE, I.; OKUMA, M. AND NARUMIYA, S. (1994) Arg60 to Leu mutation of the human thromboxane A₂ receptor in a dominantly inherited bleeding disorder. *J. Clin. Invest.* 94: 1662-1667.
- (59) ROCCA, B.; LOEB, A. L.; STRAUSS, J.F. 3RD.; VEZZ, R.; HABIB, A.; LI, H. AND FITZGERALD, G. A. (2000) Directed vascular expression of the thromboxane A₂ receptor results in intrauterine growth retardation. *Nat. Med.* 6: 219-221.
- (60) NORATA, G. D.; CALLEGARI, E.; INOUE, H. AND CATAPANO, A. L. (2004) HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 871-877.
- (61) TOPPER, J. N.; CAI, J.; FALB, D. AND GIMBRONE, M. A. JR. (1996) Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 10417-10422.

- (62) FITZGERALD, G. A. AND PATRONO, C. (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N. Engl. J. Med.* 345: 433-442.
- (63) BELTON, O. AND FITZGERALD, D. (2003) Cyclooxygenase-2 inhibitors and atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41: 1820-1822.
- (64) FITZGERALD, G. A. (2003) COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2: 879-890.
- (65) MURATA, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; HIRATA, M.; YAMASAKI, A.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; AZE, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; UENO, A.; OH-ISHI, S. AND NARUMIYA, S. (1997) Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature.* 388: 678-682.
- (66) CHENG, Y.; WANG, M.; YU, Y.; LAWSON, J.; FUNK, C. D. AND FITZGERALD, G. A. (2006) Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J. Clin. Invest.* 116: 1391-1399.
- (67) RUDIC, R. D.; BRINSTER, D.; CHENG, Y.; FRIES, S.; SONG, W. L.; AUSTIN, S.; COFFMAN, T. M. AND FITZGERALD, G. A. (2005) COX-2-derived prostacyclin modulates vascular remodeling. *Circ. Res.* 96: 1240-1247.
- (68) FRANCOIS, H.; ATHIRAKUL, K.; HOWELL, D.; DASH, R.; MAO, L.; KIM, H. S.; ROCKMAN, H. A.; FITZGERALD, G. A.; KOLLER, B. H. AND COFFMAN, T. M. (2005) Prostacyclin protects against elevated blood pressure and cardiac fibrosis. *Cell. Metab.* 2: 201-207.
- (69) ROSS, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340: 115-126.
- (70) HANSSON, G. K. AND LIBBY, P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 508-519.
- (71) VILA, L. (2004) Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med. Res. Rev.* 24: 399-424.
- (72) KOBAYASHI, T.; TAHARA, Y.; MATSUMOTO, M.; IGUCHI, M.; SANO, H.; MURAYAMA, T.; ARAI, H.; OIDA, H.; YURUGI-KOBAYASHI, T.; YAMASHITA, J. K.; KATAGIRI, H.; MAJIMA, M.; YOKODE, M.; KITA, T. AND NARUMIYA, S. (2004) Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 114: 784-794.
- (73) CIPOLLONE, F.; PRONTERA, C.; PINI, B.; MARINI, M.; FAZIA, M.; DE CESARE, D.; IEZZI, A.; UCCHINO, S.; BOCCOLI, G.; SABA, V.; CHIARELLI, F.; CUCCURULLO, F. AND MEZZETTI, A. (2001) Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation.* 104: 921-927.
- (74) BANFI, C.; COLLI, S.; ELIGINI, S.; MUSSONI, L. AND TREMOLI, E. (2002) Oxidized LDLs influence thrombotic response and cyclooxygenase 2. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 67: 169-173.
- (75) BURLEIGH, M. E.; BABAEV, V. R.; OATES, J. A.; HARRIS, R. C.; GAUTAM, S.; RIENDEAU, D.; MARNETT, L. J.; MORROW, J. D.; FAZIO, S. AND LINTON, M. F.

- (2002) Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*. 105: 1816-1823.
- (76) FOSSLIE, E. (2005) Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 35: 347-385.
- (77) RAY, W. A.; STEIN, C. M.; DAUGHERTY, J. R.; HALL, K.; ARBOGAST, P. G. AND GRIFFIN, M. R. (2002) COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. *Lancet*. 360: 1071-1073.
- (78) MARTINEZ-GONZALEZ, J. AND BADIMON, L. (2007) Mechanisms underlying the cardiovascular effects of COX-inhibition: benefits and risks. *Curr. Pharm. Des.* 13: 2215-2227.
- (79) BABAEV, V. R.; DING, L.; REESE, J.; MORROW, J. D.; BREYER, M. D.; DEY, S. K.; FAZIO, S. AND LINTON, M. F. (2006) Cyclooxygenase-1 deficiency in bone marrow cells increases early atherosclerosis in apolipoprotein E- and low-density lipoprotein receptor-null mice. *Circulation*. 113: 108-117.
- (80) BURLEIGH, M. E.; BABAEV, V. R.; YANCEY, P. G.; MAJOR, A. S.; MCCAULEY, J. L.; OATES, J. A.; MORROW, J. D.; FAZIO, S. AND LINTON, M. F. (2005) Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39: 443-452.
- (81) PRATICO, D.; TILLMANN, C.; ZHANG, Z. B.; LI, H. AND FITZGERALD, G. A. (2001) Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 98: 3358-3363.
- (82) REISS, A. B. AND EDELMAN, S. D. (2006) Recent insights into the role of prostanoids in atherosclerotic vascular disease. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 4: 395-408.
- (83) YAMADA, M.; NUMAGUCHI, Y.; OKUMURA, K.; HARADA, M.; NARUSE, K.; MATSUI, H.; ITO, T. AND HAYAKAWA, T. (2002) Prostacyclin synthase gene transfer modulates cyclooxygenase-2-derived prostanoid synthesis and inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 256-262.
- (84) EGAN, K. M.; LAWSON, J. A.; FRIES, S.; KOLLER, B.; RADER, D. J.; SMYTH, E. M. AND FITZGERALD, G. A. (2004) COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science*. 306: 1954-1957.
- (85) LOPEZ, J. A.; ARMSTRONG, M. L.; HARRISON, D. G.; PIEGORS, D. J. AND HEISTAD, D. D. (1989) Vascular responses to leukocyte products in atherosclerotic primates. *Circ. Res.* 65: 1078-1086.
- (86) WANG, M.; ZUKAS, A. M.; HUI, Y.; RICCIOTTI, E.; PURE, E. AND FITZGERALD, G. A. (2006) Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 103: 14507-14512.
- (87) CIPOLLONE, F.; FAZIA, M.; IEZZI, A.; CIABATTONI, G.; PINI, B.; CUCCURULLO, C.; UCCHINO, S.; SPIGONARDO, F.; DE LUCA, M.; PRONTERA, C.; CHIARELLI, F.; CUCCURULLO, F. AND MEZZETTI, A. (2004) Balance between PGD

- synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 1259-1265.
- (88) BOMBARDIER, C.; LAINE, L.; REICIN, A.; SHAPIRO, D.; BURGOS-VARGAS, R.; DAVIS, B.; DAY, R.; FERRAZ, M. B.; HAWKEY, C. J.; HOCHBERG, M. C.; KVIEN, T. K. AND SCHNITZER, T. J. (2000) Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N. Engl. J. Med.* 343: 1520-1528, 1522 p following 1528.
- (89) MCGETTIGAN, P. AND HENRY, D. (2006) Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *Jama.* 296: 1633-1644.
- (90) CALDWELL, B.; ALDINGTON, S.; WEATHERALL, M.; SHIRTCLIFFE, P. AND BEASLEY, R. (2006) Risk of cardiovascular events and celecoxib: a systematic review and meta-analysis. *J. R. Soc. Med.* 99: 132-140.
- (91) KEARNEY, P. M.; BAIGENT, C.; GODWIN, J.; HALLS, H.; EMBERSON, J. R. AND PATRONO, C. (2006) Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 332: 1302-1308.

Role of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in migration and inflammation

Recibido el 28 de mayo de 2008

PETRONILA PENELA, CRISTINA MURGA, CATALINA RIBAS,
ALICIA SALCEDO, MARÍA JURADO-PUEYO, IVETTE AYMERICH
AND FEDERICO MAYOR JR*

*Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular
“Severo Ochoa” (CSIC-UAM). Universidad Autónoma de Madrid.
Madrid, Spain.*

ABSTRACT

G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) emerges as a key modulator of G protein-coupled receptors and other plasma membrane receptors triggered by chemotactic messengers. In addition, GRK2 has been reported to interact with a variety of signal transduction proteins related to cell migration. Interestingly, the levels of expression and activity of this kinase are altered in several inflammatory disorders, thus suggesting that it may play an important role in the onset or progression of these pathologies. This review summarizes the mechanisms involved in the control of GRK2 expression and function and highlights novel functional interactions of this protein that might help to explain how altered GRK2 levels affects cell migration in different cell types and pathological settings.

Key words: GPCR.- Arrestins.- GIT.- p38MAPK.- MEK.

*** Contacto:**

Dr. Federico Mayor, Jr.
Departamento de Biología Molecular and Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”
(CSIC-UAM). Universidad Autónoma de Madrid.
E-28049 Madrid, Spain
Phone: +34-91-497-4865; Fax +34-91-196-4420; e-mail: fmayor@cbm.uam.es

RESUMEN

Papel de GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2) en migración e inflamación

La quinasa GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2) se perfila como un modulador clave de receptores acoplados a proteínas G y de otros receptores de membrana plasmática que responden a estímulos migratorios. Además, GRK2 es capaz de interactuar con diferentes proteínas señalizadoras relacionadas con la migración celular. Por otra parte, puesto que los niveles de expresión y actividad de esta quinasa se encuentran alterados en distintas enfermedades inflamatorias, se sugiere que GRK2 puede desempeñar un papel importante en el desencadenamiento o la progresión de estos procesos. Esta revisión resume los mecanismos implicados en el control de la expresión y función de GRK2 y resalta nuevas interacciones funcionales de esta proteína que pueden contribuir a explicar cómo las alteraciones en los niveles de GRK2 afectan a la migración de distintos tipos celulares y a diversas situaciones patológicas.

Palabras clave: GPCR.- Arrestinas.- GIT.- p38MAPK.- MEK.

INTRODUCTION

Signal-directed migration requires a spatio-temporal integration of information arising from mechanical cues and from diffusible molecules such as chemokines, bioactive lipids and growth factors. Failures in this process might result in aberrant migration leading to chronic inflammatory disorders, tumor metastasis, impaired wound healing or other diseases (1). Key messengers involved in cell migration (such as chemokines or sphingosine-1-phosphate, S1P) emit signals to the actin cytoskeleton and to adhesion structures by binding to plasma-membrane receptors of the GPCR family (2, 3).

GRK2 is a ubiquitous member of the G protein-coupled receptor kinase family, a group of seven serine/threonine protein kinases that specifically recognize and phosphorylate agonist-activated G protein-coupled receptors (GPCRs). GRK2-mediated receptor phosphorylation triggers the binding of cytosolic proteins termed arrestins, which block the ability of GPCR to interact with G proteins, leading to rapid desensitization. As a result of β -arrestin binding, phosphorylated receptors are also targeted for clathrin-mediated endocytosis, a process that

classically serves to re-sensitize and recycle receptors back to the plasma membrane, but may also help to promote the activation of additional signalling pathways by way of arrestins and/or GRKs acting as agonist-regulated adaptor scaffolds (4, 5). Interestingly, GRK2 expression and function has been shown to be altered in several inflammatory conditions (see below), thus suggesting that it may play an important role in the onset or progression of the inflammatory disease. Therefore, the understanding of the molecular mechanisms leading to altered GRK2 levels and functionality, as well as of the consequences of such changes on key cellular processes is a very active field of research.

Consistent with its role in GPCR desensitization, GRK2 has been shown to attenuate chemokine-induced migration in T cells and monocytes (revised in (6)), thus emerging as a relevant modulator of inflammatory responses. However, pro-migratory effects for β -arrestins and for a member of a distinct GRK subfamily, GRK6, have also been reported in response to different GPCR in several cell types (2, 6), thereby suggesting other unknown functional roles different to those related to GPCR desensitization.

Interestingly, in addition to phosphorylate a variety of GPCR, recent data indicate that GRK2 is also able to phosphorylate other types of membrane receptors, such as the PDGF-receptor, and non-receptor substrates as tubulin, the ERM family protein ezrin, or the p38 MAPK (see (4, 5, 7) and references therein). Thus, GRK2 may participate in the regulation of diverse cellular phenomena through the phosphorylation of substrates that are very varied functionally. Moreover, GRK2 has been shown to interact with a variety of proteins involved in migration (MEK, Akt, PI3K γ or GIT (reviewed in (5))). In this review we will briefly summarize the main mechanisms involved in the control of GRK2 expression and function, its reported alterations in inflammatory disorders and the emerging functional interactions of GRK2 with diverse molecules related to cell migration and inflammation (see Figure 1) that may shed new light on how GRK2 influences motility in different cellular types and on the physiological consequences of altering the cellular complement of this kinase.

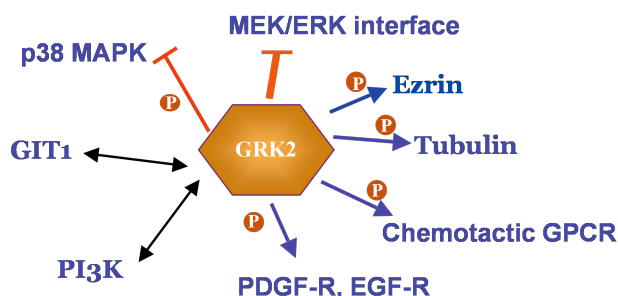


FIGURE 1.- *GRK2 functionally interacts with multiple signalling proteins involved in cell migration. See text for details.*

GRK2 STRUCTURE AND MODULATION

GRK family members can be subdivided into three main groups based on sequence homology: rhodopsin kinase or visual GRK subfamily (GRK1 and GRK7), the β -adrenergic receptor kinase subfamily (GRK2/GRK3) and the GRK4 subfamily (GRK4, GRK5 and GRK6). GRK2, 3, 5 and 6 are ubiquitously expressed in mammalian tissues.

GRKs share a common structural architecture with a well-conserved, central catalytic domain (~270 aa), similar to that of other serine-threonine kinases, flanked by an N-terminal domain (~185 aa) and a variable-length carboxyl-terminal domain (~105-230 aa). The N-terminal domain has been proposed to be important for receptor recognition, for intracellular membrane anchoring and also contains an RH domain (regulator of G protein signalling homology domain) of ~120 aa. In the case of GRK2 and GRK3, the RH domain has been shown to specifically interact with G α_q family members, thus blocking its interaction with their effector phospholipase C beta. The C-terminal region of GRK2 contains a pleckstrin homology domain (PH) with binding sites for the membrane phospholipid PIP₂ and free G $\beta\gamma$ subunits and therefore is involved in its agonist-dependent translocation to the plasma membrane (4, 5).

In addition to this general domain architecture, ongoing research is unveiling the existence of regions involved in interaction with different cellular proteins and of regulatory phosphorylation sites in the GRK2

structure. Association with actinin, actin, calmodulin, caveolin, the Raf kinase inhibitor protein (RKIP) or with an undetermined microsomal component negatively modulates GRK kinase-dependent functions. In addition, phosphorylation of GRKs at different sites and by a variety of protein kinases has emerged as an important mechanism for regulation of their activity, the interaction with other proteins and even protein stability (4, 5).

REGULATION OF GRK2 BY PHOSPHORYLATION

Phosphorylation by second-messenger-modulated protein kinases (PKC and PKA).

PKC and PKA have been shown to modulate GRK activity and membrane targeting. “In vitro”, PKC-mediated phosphorylation of GRK2 led to an enhanced phosphorylation of receptor but not soluble peptides, suggesting that PKC phosphorylation stimulated GRK2 translocation from the cytosol to the plasma membrane without affecting catalytic activity. It has been recently reported that phosphorylation of GRK2 by PKC takes place at serine 29 (8) within the calmodulin-binding region of GRK2. It has been suggested that in intact cells a pool of GRK2 may be tonically inhibited by forming a complex with calmodulin, and that PKC phosphorylation would release such inhibitory interaction and allow for GRK2 binding to the receptor substrate (8).

On the other hand, PKA activated by Gs-coupled receptors can directly phosphorylate GRK2, leading to an enhanced GRK2 activity toward β_2 -adrenergic receptors (9). The site of PKA phosphorylation on GRK2 was mapped at Serine 685, which is in close proximity to the G $\beta\gamma$ binding domain of GRK2. In fact, PKA phosphorylation does not affect the kinase activity, but rather enhances binding of GRK2 to G $\beta\gamma$ subunits, thereby facilitating membrane targeting of GRK2 and interaction with activated receptors.

Phosphorylation by c-Src and MAPK.

c-Src can directly phosphorylate GRK2 “in vitro” with high affinity and also promotes tyrosine phosphorylation of GRK2 upon agonist

stimulation of β 2-adrenergic receptors (10). This process is dependent on the ability of β -arrestins to recruit c-Src (11). The activity of tyrosine-phosphorylated GRK2 is increased toward both soluble and membrane-bound substrates, suggesting a direct effect on its catalytic activity. Mutagenesis experiments have identified tyrosine residues within the RH region of GRK2 (amino acids 13, 86 and 92) that are critical for c-Src-mediated phosphorylation. Tyrosine phosphorylation also appears to enhance the interaction of GRK2 with $G\alpha_q$ (12) and to promote its degradation by the proteasome pathway (see below).

GRK2 activity is also regulated by p42/p44 MAPK. “In vitro” and “in situ” experiments revealed that ERK1 is able to phosphorylate recombinant GRK2 on serine 670 (13, 14), and both kinases are specifically co-immunoprecipitated in an agonist-dependent manner (13). Interestingly, Serine 670 lies within the $G\beta\gamma$ binding domain of GRK2, and MAPK phosphorylation of this site strongly impairs the GRK2/ $G\beta\gamma$ interaction, thereby inhibiting kinase translocation and catalytic activity toward receptor membrane substrates.

REGULATION OF GRK2 EXPRESSION LEVELS

Little has been reported about the mechanisms governing GRK transcription. In aortic smooth muscle cells, agents that induce physiological vasoconstriction and hypertrophy markedly enhance GRK2 promoter activity, whereas pro-inflammatory cytokines promote the opposite effect, suggesting that the expression of GRK2 is strongly controlled at the transcriptional level by the interplay between various signal transduction pathways (15). However, whether these mechanisms apply to other cell types awaits further investigation.

On the other hand, regulation of GRK2 stability may provide an important mechanism for modulating its expression levels (Figure 2). GRK2 is rapidly degraded by the proteasome pathway, and β_2 AR activation enhances GRK2 ubiquitination and turnover (16). Our laboratory has also shown that agonist-dependent binding of β -arrestin to GPCR supports GRK2 degradation by allowing the recruitment of c-Src

and the phosphorylation of GRK2 on critical tyrosine residues (11). MAPK-mediated GRK2 phosphorylation also triggers GRK2 degradation in a process which is again dependent on β -arrestin function (17). More recently, we have shown that Mdm2, an E3-ubiquitin ligase involved in the control of cell growth and apoptosis, plays a key role in GRK2 degradation (18). Mdm2 and GRK2 association and subsequent proteolysis is enhanced by β_2 -adrenergic receptor stimulation and β -arrestin. On the contrary, activation of the PI3K/Akt pathway by agonists such as IGF-1 alters Mdm2-mediated GRK2 degradation, leading to enhanced GRK2 stability and increased kinase levels, what might be relevant in several pathophysiological contexts.

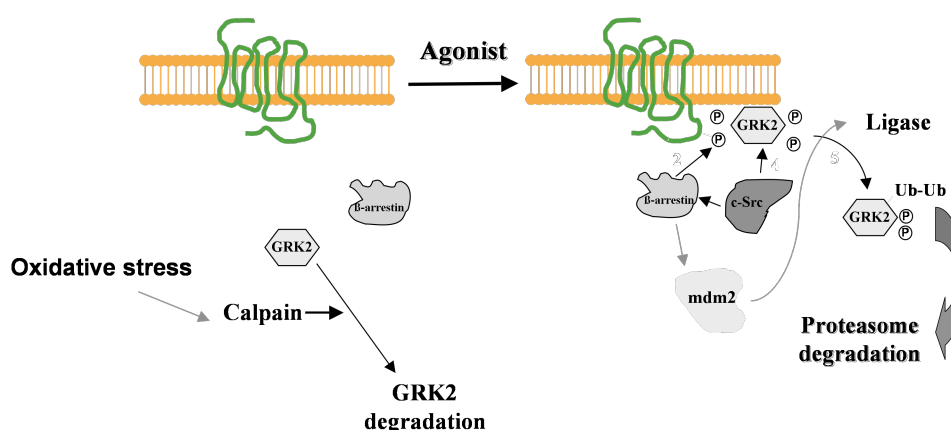


FIGURE 2.- *Mechanisms involved in the regulation of GRK2 stability. See text for details.*

GRK2 levels might also be downregulated by additional proteolytic pathways. Rheumatoid arthritis (RA) patients display significantly reduced GRK2 levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) without significant changes in GRK mRNA levels. The same is observed in rats in an animal model of adjuvant arthritis (6). Proinflammatory cytokines as IL-6 and $\text{INF}\gamma$ are elevated in patients with RA, and treatment of PBMC with these compounds strongly promotes GRK2 down-regulation.

Production of reactive oxygen species (ROS) has been detected in different cells treated with these cytokines, suggesting that ROS could mediate the decrease in GRK2 levels observed in these experimental models of inflammation. In fact, it has been recently described that exposure of lymphocytes to oxidative stress results in decreased GRK2 levels in T lymphocytes (19). Interestingly, the H₂O₂-induced decreases in GRK2 protein were prevented by inhibiting calpain activity, but not proteasome function. “In vitro” proteolysis experiments show that purified m-calpain promotes partial degradation of GRK2 in a calcium-dependent way (19). It is tempting to suggest that calpain-mediated degradation of GRK2 could also play a role in other situations characterized by altered calpain activity and GRK levels, such as hypertension. Overall, these results indicate the occurrence of different proteolytic pathways for GRK2 down-regulation (proteasome- and calpain dependent). How these mechanisms are activated and contribute to the control of GRK2 stability in a given cell type and physiological condition is an interesting area of future research.

GRK2 AND INFLAMMATORY DISORDERS

GRK2, which is highly expressed in different cellular types of the immune system, emerges as an important regulator of the immune cell responses during inflammation. GRK2 phosphorylates manifold chemokine receptors such as CCR5, CCR2b, CXCR4, CXCR2 and chemotactic receptors for substance P, S1P or formyl-peptide, responsible of leukocyte trafficking to the inflammatory foci, T cell egression from lymphoid organs, leukocyte activation or proliferation (6). Interestingly, a decrease of GRK2 protein expression (~55%) and kinase activity was found in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis (RA), as compared with kinase levels in healthy subjects (20). The decline of GRK2 is a direct consequence of the pathology as demonstrated in animal models of experimental arthritis (21), which specifically show a reduction in GRK2 levels in splenocytes and mesenteric lymph node cells. Down-regulation of GRKs in immune cells during inflammation may represent initially an adaptive mechanism to facilitate cell response, but chronic GRK2 down-regulation can lead to an aberrant inflammatory

response. Indeed, T cells from GRK2^{+/-} mice, that display a 50% reduction in GRK2 levels, showed a significant increase in signalling and chemotaxis toward CCR1 and CCR5 receptor ligands compared to wild-type T cells (22). However, whether GRK2 expression levels are determinant for the progression of RA still requires further evidence. Interestingly, such notion was indeed demonstrated for another inflammatory disorder, i.e. multiple sclerosis (MS) (23). Expression of GRK2 in leukocytes from patients suffering from MS, but not from neurological disorders without an inflammatory component, was also decreased by circa 40% compared with kinase levels from healthy individuals. GRK2 levels have a direct impact in the clinical course of experimental MS. Thus, the onset of the relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in hemizygous GRK2^{+/-} mice was significantly accelerated, what is paralleled by a higher initial infiltration of T cells into the brain. Curiously, these animals display lower inflammatory infiltrates in the long-term and do not develop relapses of the disease compared to wild-type animals. Reactive microglia and neuronal damage secondary to excessive glutamate signalling are important components of diverse neurological disorder that course with inflammation. Interestingly, GRK2 expression levels in brain also modulates the strength of microglia-mediated inflammation, what might determine the sensitivity to cerebral stroke by means of rate-limiting the extent of local release of inflammatory mediators that could attract T cells (24). Therefore, the effects of altered GRK2 expression are far to be clear-cut in terms of inflammation, since many different cell types, not only from the immune system but also from the inflamed tissue, are responsible for the course of the disease and can respond distinctly to GRK2 changes.

Brain GRK2 also modulates the strength of microglia-mediated inflammation and its protein expression levels might determine the sensitivity to cerebral stroke (24). Reactive microglia and neuronal damage secondary to excessive glutamate signalling are important components of AD pathology. Recently, a study aimed to evaluate peripheral lymphocyte GRK2 expression in patients suffering from AD has shown a positive correlation between kinase protein levels and the severity of the disease (25).

NOVEL GRK2 FUNCTIONAL INTERACTIONS MIGHT BE RELATED TO THE ROLE OF THIS KINASE IN INFLAMMATION AND CELL MIGRATION

GRK2 as a modulator of the MEK/ERK interface upon chemokine challenge

We have recently reported, using GRK2-transfected cells or splenocytes from heterozygous GRK2 mice, that elevated levels of GRK2 can inhibit chemokine-mediated induction of ERK activity and, on the contrary, that decreased levels of GRK2 promote a more robust ERK activation upon agonist treatment. Neither the kinase activity of GRK2 nor its interaction with G protein subunits is necessary for this inhibitory effect and no changes were observed in the extent of MEK activation in our experimental settings. Interestingly, we have found that GRK2 and MEK1 are present in the same multimolecular complex and that this interaction correlates with an inhibition of ERK activation, that involves a direct or coordinate interaction with MEK (26). Thus, this association seems to be important in the control of chemokine induction of MAPK activation hence for the extent of chemotactic cell motility. By binding to MEK, GRK2 could interfere (at the cellular level or at defined cellular locations) with MEK association to proteins important for its cellular compartmentation, internalization, or activity, such as MEK-ERK scaffolds. Therefore, changes in GRK2 expression in pathological conditions would alter chemokine receptor signaling at different levels.

GRK2/p38 MAPK

We have found that GRK2 directly phosphorylates p38 α at the Thr123 residue located at the entrance of the p38 docking groove (7). Mimicking phosphorylation of this residue interferes with the binding and phosphorylation of well-established p38 substrates (ATF2, MEF2, MK2), and also with the ability of p38 to bind and become phosphorylated by MKK6 in vitro and in cells. This phosphorylation has an impact on p38-dependent cellular functions, since changing GRK2 levels alters the secretion of TNF α upon LPS stimulation, this process being increased in GRK2^{+/-} murine macrophages.

Kinases upstream p38 have been classically involved in its activation by means of phosphorylation at the activation loop, but this work defines GRK2 as a kinase upstream of p38 and also as an “inactivating MAP2K”, what may have important consequences in the regulation of p38 activation subsequent to stimuli that potentiate GRK2 activity, such as GPCRs. Accordingly, one may envisage a scenario where previous GPCR stimulation could lead to an increased pool of pT123-p38 and thus serve to dampen subsequent p38 stimulation by other stimuli. In support of this notion, p38 activity happens to be reduced in end stage failing myocardium in humans while the elevation of GRK2 levels is an early event in cardiac failure (see ref. (27) for a review). In striking accordance, activation of p38 has long been shown to be critical for the development of various inflammatory processes including rheumatoid arthritis, pulmonary illnesses and inflammatory bowel disease (28). Precisely, as mentioned above, a significant reduction of GRK2 levels was described in animal models of adjuvant-induced arthritis (21), or human rheumatoid arthritis and multiple sclerosis (20, 23), what also points to a negative correlation between GRK2 levels and p38 activity, and a functional role for GRK2 in the control of p38 activation, that might be altered in inflammatory conditions.

GRK2/GIT

The GIT family of proteins display a complex domain structure, including a zinc-finger motif, three ankyrin repeats present in the N-terminal region of the protein, a Spa2-homology domain (SHD), a coiled-coiled domain and a paxillin-binding site (PBS). As a result of such multidomain architecture, GIT proteins can interact with a variety of signalling molecules involved in multiple cellular processes as cytoskeletal dynamics, membrane trafficking, cell adhesion and signal scaffolding (29). Therefore, the GRK2/GIT1 interaction may be involved in the modulation of cell migration processes (5). However, only recently the functional consequences and the modulation of such interaction by extra-cellular signals have been addressed. Our laboratory has found that GRK2 positively regulates epithelial cell migration by mechanisms involving coordinated fibronectin and S1P-mediated signalling and the modulation of the Rac/PAK/MEK/ERK1/2 pathway in response to S1P and adhesion,

based on the dynamic regulation of the interaction of GRK2 with GIT1 (Penela et al., EMBO J., in press). These results suggest that the overall contribution of GRK2 to cell migration would be cell-type specific and stimulus-specific. This possibility is currently being investigated in our group.

In sum, the complex GRK2 "interactome" with multiple signaling proteins involved in inflammation and cell migration (summarized in Figure 1), its reported alterations in inflammatory disorders and the network of mechanisms controlling its activity and expression levels suggest key functional roles for GRK2 in inflammation, that deserve to be explored in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our laboratory is funded by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-03053), Fundación Ramón Areces, Fundación Mutua Madrileña, The Cardiovascular Network (RECAVA) of Ministerio Sanidad y Consumo-Instituto Carlos III (RD06-0014/0037 and PI060713), Comunidad de Madrid (S-SAL-0159-2006), and the MAIN European Network (LSHG-CT-2003-502935).

REFERENCES

- (1) RIDLEY, A. J.; SCHWARTZ, M. A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R. A.; GINSBERG, M. H.; BORISY, G.; PARSONS, J. T. AND HORWITZ, A. R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 302: 1704-1709.
- (2) DEFEA, K. A. (2007) Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. *Annu. Rev. Physiol.* 69: 535-560.
- (3) SPIEGEL, S.; ENGLISH, D. AND MILSTIEN, S. (2002) Sphingosine 1-phosphate signaling: providing cells with a sense of direction. *Trends Cell. Biol.* 12: 236-242.
- (4) PENELA, P.; RIBAS, C. AND MAYOR, F. JR. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* 15: 973-981.

- (5) RIBAS, C.; PENELA, P.; MURGA, C.; SALCEDO, A.; GARCIA-HOZ, C.; JURADO-PUEYO, M.; AYMERICH, I. AND MAYOR, F. JR. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768: 913-922.
- (6) VROON, A.; HEIJNEN, C. J. AND KAVELAARS, A. (2006) GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 80: 1214-1221.
- (7) PEREGRIN, S.; JURADO-PUEYO, M.; CAMPOS, P. M.; SANZ-MORENO, V.; RUIZ-GOMEZ, A.; CRESPO, P.; MAYOR, F. JR. AND MURGA, C. (2006). Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK. *Curr. Biol.* 16: 2042-2047.
- (8) KRASEL, C.; DAMMEIER, S.; WINSTEL, R.; BROCKMANN, J.; MISCHAK, H. AND LOHSE, M. J. (2001) Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J. Biol. Chem.* 276: 1911-1915.
- (9) CONG, M.; PERRY, S. J.; LIN, F. T.; FRASER, I. D.; HU, L. A.; CHEN, W.; PITCHER, J. A.; SCOTT, J. D. AND LEFKOWITZ, R. J. (2001) Regulation of membrane targeting of the g protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein akap79. *J. Biol. Chem.* 276: 15192-15199.
- (10) SARNAGO, S.; ELORZA, A. AND MAYOR, F. JR. (1999) Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 274: 34411-34416.
- (11) PENELA, P.; ELORZA, A.; SARNAGO, S. AND MAYOR, F. JR. (2001) Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J.* 20: 5129-5138.
- (12) MARIGGIO, S.; GARCIA-HOZ, C.; SARNAGO, S.; DE BLASI, A.; MAYOR, F. JR. AND RIBAS, C. (2006) Tyrosine phosphorylation of G-protein-coupled-receptor kinase 2 (GRK2) by c-Src modulates its interaction with Galphaq. *Cell Signal.* 18: 2004-2012.
- (13) ELORZA, A.; SARNAGO, S. AND MAYOR, F. JR. (2000) Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol. Pharmacol.* 57: 778-783.
- (14) PITCHER, J. A.; TESMER, J. J.; FREEMAN, J. L.; CAPEL, W. D.; STONE, W. C. AND LEFKOWITZ, R. J. (1999) Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* 274: 34531-34534.
- (15) RAMOS-RUIZ, R.; PENELA, P.; PENN, R. B. AND MAYOR, F. JR. (2000) Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation.* 101: 2083-2089.
- (16) PENELA, P.; RUIZ-GOMEZ, A.; CASTANO, J. G. AND MAYOR, F. JR. (1998) Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 35238-35244.

- (17) ELORZA, A.; PENELA, P.; SARNAGO, S. AND MAYOR, F. JR. (2003) MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* 278: 29164-29173.
- (18) SALCEDO, A.; MAYOR, F. JR. AND PENELA, P. (2006) Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J.* 25: 4752-4762.
- (19) LOMBARDI, M. S.; KAVELAARS, A.; PENELA, P.; SCHOLTENS, E. J.; ROCCIO, M.; SCHMIDT, R. E.; SCHEDLOWSKI, M.; MAYOR, F. JR. AND HEIJNEN, C. J. (2002) Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* 62: 379-388.
- (20) LOMBARDI, M. S.; KAVELAARS, A.; SCHEDLOWSKI, M.; BIJLSMA, J. W.; OKIHARA, K. L.; VAN DE POL, M.; OCHSMANN, S.; PAWLAK, C.; SCHMIDT, R. E. AND HEIJNEN, C. J. (1999) Decreased expression and activity of G-protein-coupled receptor kinases in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *Faseb J.* 13: 715-725.
- (21) LOMBARDI, M. S.; KAVELAARS, A.; COBELENS, P. M.; SCHMIDT, R. E.; SCHEDLOWSKI, M. AND HEIJNEN, C. J. (2001) Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system. *J. Immunol.* 166: 1635-1640.
- (22) VROON, A.; HEIJNEN, C. J.; LOMBARDI, M. S.; COBELENS, P. M.; MAYOR, F. JR.; CARON, M. G. AND KAVELAARS, A. (2004) Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *J. Leukoc. Biol.* 75: 901-909.
- (23) VROON, A.; KAVELAARS, A.; LIMMROTH, V.; LOMBARDI, M. S.; GOEBEL, M. U.; VAN DAM, A. M.; CARON, M. G.; SCHEDLOWSKI, M. AND HEIJNEN, C. J. (2005) G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 174: 4400-4406.
- (24) LOMBARDI, M. S.; VAN DEN TWEEL, E.; KAVELAARS, A.; GROENENDAAL, F.; VAN BEL, F. AND HEIJNEN, C. J. (2004) Hypoxia/ischemia modulates G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestin-1 levels in the neonatal rat brain. *Stroke.* 35: 981-986.
- (25) LEOSCO, D.; FORTUNATO, F.; RENGO, G.; IACCARINO, G.; SANZARI, E.; GOLINO, L.; ZINCARELLI, C.; CANONICO, V.; MARCHESE, M.; KOCH, W. J. AND RENGO, F. (2007) Lymphocyte G-protein-coupled receptor kinase-2 is upregulated in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 415: 279-282.
- (26) JIMENEZ-SAINZ, M. C.; MURGA, C.; KAVELAARS, A.; JURADO-PUEYO, M.; KRAKSTAD, B. F.; HEIJNEN, C. J.; MAYOR, F. JR. AND ARAGAY, A. M. (2006) G Protein-coupled Receptor Kinase 2 Negatively Regulates Chemokine Signaling at a Level Downstream from G Protein Subunits. *Mol. Biol. Cell.* 17: 25-31.
- (27) PENELA, P.; MURGA, C.; RIBAS, C.; TUTOR, A. S.; PEREGRIN, S. AND MAYOR, F. JR. (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 69: 46-56.

- (28) KUMAR, S.; BOEHM, J. AND LEE, J. C. (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 717-726.
- (29) HOEFEN, R. J. AND BERK, B. C. (2006) The multifunctional GIT family of proteins. *J. Cell. Sci.* 119: 1469-1475.

Signals emanating from leukocyte-endothelium interactions during inflammation

Recibido el 28 de mayo de 2008

OLGA BARREIRO^{1,2} AND FRANCISCO SÁNCHEZ-MADRID^{1,2*}

¹*Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, Spain.*

²*Departamento de Biología Vascular e Inflamación, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Madrid, Spain.*

ABSTRACT

Leukocyte trafficking throughout the vasculature is a crucial step for the development of innate and adaptive immunity (1). The coordinate function of adhesion receptors, cytoskeleton and signaling molecules in both cellular types is fundamental during leukocyte extravasation. Hence, the correct integration of “outside-in” and “inside-out” signals in leukocytes and endothelium during each stage of the process is critical to allow the completion of the so-called “multi-step paradigm” (leukocyte tethering and rolling involving selectins and their ligands, followed by leukocyte firm adhesion and crawling mediated by integrins and their endothelial counter-receptors and the subsequent diapedesis also mediated by junctional proteins) (2, 3). This review focuses on the signaling pathways triggered during the extravasation that allow leukocytes to efficiently migrate towards the inflammatory foci to exert their effector functions.

*** Correspondencia:**

Dr. Francisco Sánchez-Madrid.

Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid.

C/ Diego de León 62, 28006. Madrid, Spain.

E-mail: fsanchez.hlpr@salud.madrid.org

Phone: 34-91-3092115

Fax: 34-91-5202374

Key words: Inflammation.- Leukocyte adhesion.- Transendothelial migration.- Adhesion receptor signaling.

RESUMEN

Señalización derivada de la interacción leucocito-endotelio durante la inflamación

El tráfico leucocitario a través de la vasculatura es un paso crucial para el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa. El funcionamiento coordinado de los receptores de adhesión, el citoesqueleto y las moléculas señalizadoras tanto en el leucocito como en el endotelio es fundamental durante el proceso de extravasación. Así, la correcta integración de las señales del exterior hacia el interior y del interior hacia el exterior en ambos tipos celulares durante cada etapa del proceso es crítica para la consecución del llamado “paradigma multi-secuencial” (el rodamiento de los leucocitos en el que están implicadas las selectinas y sus ligandos, seguido de la adhesión firme mediada por las integrinas leucocitarias y sus contra-receptores endoteliales, así como el subsiguiente paso de diapedesis en el que también están implicadas moléculas típicas de uniones intercelulares). Esta revisión se centra en las vías de señalización que se desencadenan durante la extravasación que permiten a los leucocitos migrar de manera eficiente hacia los focos inflamatorios donde ejercen sus funciones efectoras.

Palabras clave: Inflamación.- Adhesión leucocitaria.- Migración transendotelial.- Señalización mediada por receptores de adhesión.

ROLLING MEDIATORS AS SIGNALING RECEPTORS

Free-flowing leukocytes contact with and adhere to the vascular wall under shear forces to initiate an inflammatory response or to migrate into a secondary lymphoid organ (homing). Leukocyte tethering and rolling on activated endothelial cells are the first steps of the sequential process of extravasation, followed by the firm adhesion and transendothelial migration of leukocytes (4). These initial contacts are largely mediated by selectins and their ligands.

Selectins (P-, E- and L-selectin) are cell adhesion molecules that predominantly mediate the initial interactions of leukocytes with endothelium. They are type I transmembrane glycoproteins that bind to sialylated carbohydrate moieties present on ligand molecules in a

calcium-dependent manner. Although selectins and their ligands tend to interact with a variable affinity, their rapid association and dissociation rates mediate transient contacts between leukocytes and endothelium ("tethering") (5, 6). Tethering results in the slowing of leukocytes in the bloodstream and their rolling on the surface of endothelium, which favors subsequent interactions with endothelial cells mediated by integrins and their ligands, increasing the adhesiveness of leukocytes, that leads to their final arrest on the vessel wall (7).

It has been demonstrated that L-selectin activates multiple signaling pathways involved in the reorganization of the actin cytoskeleton, such as the MAPK cascade (8), the tyrosine kinase p56^{lck} and Ras (9) or the Rho GTPase Rac2 (10). In this regard, it has been described that neutrophils from Rac2^{-/-} mice show deficient actin polymerization and L-selectin-mediated rolling (11). On the other hand, the best characterized selectin ligand named PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) activates the MAPK pathway (12), and acts as a negative regulator of human hematopoietic progenitor cells (13). In addition, it has been shown that PSGL-1 induces a rapid synthesis of uPAR and different cytokines such as TNF-alpha, IL-8 and MCP-1 in neutrophils, monocytes and T cells (14-17). Moreover, PSGL-1 induces activation of beta-2 integrins and binding to ICAM-1 in neutrophils (18-20). Our group has also described the interaction of PSGL-1 with ERM proteins, which link membrane molecules with the actin cytoskeleton (21, 22). This interaction is of critical importance for the leukocyte activation that occurs before extravasation, because it allows the recruitment of the tyrosine kinase Syk by association to ERM proteins through their phosphorylated ITAM-like motifs. Therefore, after PSGL-1 ligation to P-selectin or E-selectin, Syk conveys rolling-emanating signals to the activation of gene expression programs (23). This phenomenon suggests that the intracellular signals induced through PSGL-1 have a priming effect on leukocyte activation, up-regulating the expression of different molecules further involved in extravasation and effector functions (24) and an unsuspected role inducing tolerogenic functions in dendritic cells (25). Since it has been demonstrated that the cytoplasmic tail of L-selectin also interacts with moesin (26), it is very likely that selectins use a similar strategy to trigger intracellular signaling cascades. In this regard, it has

been shown that E-selectin is dephosphorylated upon endothelial cell interaction with leukocytes, supporting its role as a signal transduction molecule (27). In addition, P-selectin also functions as a signaling receptor, mediating stimulation through its interaction with ligands expressed by leukocytes (28). Finally, it has been recently reported that another E-selectin ligand, CD44, can control rolling velocity and mediate E-selectin-dependent redistribution of PSGL-1 and L-selectin to a major rear pole on slowly rolling leukocytes through p38 signaling to promote firm adhesion (29).

CHEMOKINE MODULATION OF INTEGRIN ACTIVITY

During their rolling, leukocytes are stimulated by chemokines and integrin ligands expressed on the surface of endothelial cells. These outside-in signals induce an important increase in the affinity and/or avidity of leukocyte integrins (inside-out signals) that allows the shear-resistant arrest of these cells and their firm adhesion to activated endothelium.

Leukocytes modify their adhesive properties to be properly adapted to every immune scenario (30). Hence, free-flowing leukocytes maintain their integrins in non-adhesive conformation, to avoid unspecific contacts with non-inflamed vascular walls, but upon encountering localized inflammatory foci, a rapid *in situ* activation of leukocyte integrins by endothelium-displayed activating signals takes place during the transition of rolling to adhesion (31). Therefore, the regulation of integrin adhesiveness is independent of their membrane expression and, during the extravasation process, it is modulated by the chemokines coupled to apical endothelial glycosaminoglycans (32). These chemokines act by signaling through GPCRs and induce an array of “inside-out” signals within fractions of seconds, leading to multiple conformational changes of integrins with important effects on leukocyte adhesion and morphology (33-35). Both the endothelium-immobilized chemokines and the chemokine receptors expressed on leukocytes are concentrated on microvilli to facilitate their interaction. The presence of specific chemokines on different vascular beds contributes to orchestrate

the selective recruitment of leukocyte subsets to inflammation foci or secondary lymphoid organs (26). In addition, chemokines may exert a differential effect on specific integrins within the same microenvironment. Accordingly, it has been described that chemokines can only mediate lymphocyte arrest dependent on VLA-4/VCAM-1 when binding their GPCRs with high affinity and with high relative occupancy, but this signal threshold-dependent effect is not observed with chemokine-stimulated $\beta 2$ integrins (37).

Small GTPases play a central regulatory role in the integrin activation induced by chemokines, mainly through RhoA activation or/and RhoH inactivation (37-39). It has been also suggested that Rac1 and its GDP/GTP exchanging factors (GEFs) Vav-1 and DOCK2 are involved in the chemokine-mediated activation of integrins in T and B cells (40-42). However, other authors propose that DOCK2 is mainly involved in microvilli collapse, lamellipodium formation, and lateral mobility induced by chemokines (43). On the other hand, the ras-like small GTPase Rap1 can regulate integrin activation through RAPL that binds to the cytoplasmic tail of LFA-1 α chain (44, 45). The important role of Rap1 in integrin activation has been recently underscored by a deficiency in lymphocyte adhesiveness (LAD III), that correlates with a selective impairment in the activation of Rap1 induced by chemokines via CalDAG-GEFI (46, 47). Furthermore, the activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K) and PKC ζ by chemokines is involved in LFA-1 clustering at areas of low ICAM-1 density (33, 37, 38). In addition, the ARF-guanine-nucleotide exchange factor Cytohesin-1 induces LFA-1 activation by direct interaction with its $\beta 2$ cytoplasmic domain (48, 49). However, there are also negative regulators of integrin activation, such as PKA, H-ras and ILK (integrin-linked kinase) (37, 50, 51). Due to the complexity and timeframes of the signaling mechanisms controlling integrin activation, it is conceivable the existence of preformed compartmentalized protein networks ("signalosomes") in leukocytes encountering endothelial chemokines (37).

INTEGRIN SIGNALING TRIGGERED BY LIGAND BINDING

Upon interaction with their ligands, integrins activate distinct myosin contractility effectors, actin-remodeling GTPases and molecules involved in microtubule network regulation at the leading and trailing edges of motile leukocytes (52, 53). During cell polarization, Cdc42, MLCK, Rac, RAPL, Rap1, mDia, Myosin-IIA and chemokine receptors are redistributed to the cellular front, participating in the formation of exploratory filopodia and in the extension of lamellipodia. In contrast, Rho and ROCK (both involved in trailing edge retraction), the microtubule-organizing center (MTOC) and the adhesion receptors ICAM-1, ICAM-3, CD44 and CD43 move towards the rear pole (54). Interestingly, the redistribution of integrin ligands to the uropod seems to be involved in the recruitment of bystander leukocytes through this cellular structure (55). Hence, the integration of signals generated in both cellular poles leads to a coordinate movement of the leukocyte.

The $\alpha 4$ integrins can bind paxillin upon dephosphorylation of Ser988 in their cytoplasmic domain at the sides and rear pole of the cell, whereas PKA-mediated phosphorylation of these integrins is confined at the leading edge of the cell. Paxillin regulates $\alpha 4$ integrin function (tethering and firm adhesion) in immune cells (56), enhancing their rate of migration and reducing their spreading. In addition, paxillin/ $\alpha 4$ interaction down-regulates the formation of focal adhesions, stress fibers and lamellipodia by triggering the activation of different tyrosine kinases such as FAK, Pyk2, Src and Abl (57). The $\alpha 4$ /paxillin complex inhibits stable lamellipodia by recruiting an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein (Arf-GAP) that decreases Arf activity, thereby inhibiting Rac, and limiting lamellipodia formation to the cell front (58).

On the other hand, it has been described that LFA-1 and Mac-1 may use the adaptor molecules talin, α -actinin, filamin and 14-3-3 to properly anchor to the actin cytoskeleton (59, 60). Regarding the subcellular localization, the pattern of LFA-1 varies from low expression in the lamellipodia to high expression in the uropod. However, it has been reported that high affinity clustered LFA-1 is restricted to a mid-cell zone, termed the “focal zone”, different from focal adhesions and focal contacts. In addition, talin, properly activated by phosphorylation or PIP₂,

is essential for the formation and stability of the focal zone and for LFA-1-dependent migration (61).

SIGNALS TRIGGERED BY ENDOTHELIAL RECEPTORS UPON INTEGRIN ENGAGEMENT

VCAM-1 and ICAM-1, members of the Ig superfamily, are the two major endothelial adhesion molecules involved in the binding to the main leukocyte integrins VLA-4 and LFA-1, respectively (62, 63). ICAM-1 but not VCAM-1 is expressed at low levels in resting endothelium, and both molecules are induced upon cell activation by pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- α (64, 65).

Endothelium is no longer considered as a passive barrier during Transendothelial Migration (TEM). In fact, endothelial cells form “docking” structures to firmly attach leukocytes upon the binding of VCAM-1 and ICAM-1 to their respective leukocyte ligands, VLA-4 and LFA-1. These cup-like structures are based on microvilli that emerge from the endothelial apical surface and their essential constituents include endothelial adhesion receptors, together with the actin cytoskeleton, adaptor proteins (ERM, alpha-actinin, vinculin, VASP) and signaling molecules (PIP₂, Rho/ROCK) (66). The relevant role of these structures for leukocyte adhesion and transmigration has been unveiled in experiments under flow conditions (66).

VCAM-1 and ICAM-1 are capable of transducing signals after ligand binding, that cooperate to increase endothelial permeability and facilitate leukocyte transmigration (67, 68). VCAM-1 is involved in the opening of the “endothelial passage” through which leukocytes can extravasate. In this regard, VCAM-1 ligation induces NADPH oxidase activation and the production of reactive oxygen species (ROS) in a Rac-mediated manner, with subsequent activation of matrix metalloproteinases and loss of VE-cadherin-mediated adhesion. This signaling pathway can be blocked by TGFbeta1 and IFNgamma (69-72). On the other hand, cross-linking of both VCAM-1 and ICAM-1 induces a rapid increase in intracellular Ca²⁺ concentration (28, 73). ICAM-1-mediated calcium increase triggers activation of Src and subsequent

phosphorylation of cortactin (73, 74). ICAM-1 is also able to activate RhoA inducing stress fiber formation (75) and phosphorylation of FAK, paxillin and p130^{Cas}, which in turn trigger different signaling pathways involving JNK or p38 (76-78). Moreover, ICAM-1 cross-linking stimulate c-fos and rhoA transcription (75). ICAM-1 cross-linking can also induce its own expression as well as that of VCAM-1, as a regulatory mechanism to facilitate leukocyte transendothelial migration (TEM) (79). More recently, it has been described the ICAM-1-mediated tyrosine phosphorylation of VE-cadherin dependent on Src and Pyk-2 activity and required for neutrophil transmigration (80).

INTEGRINS DURING TRANSENDOTHELIAL MIGRATION (TEM)

Once the leukocyte finds a proper site for transmigration, mostly at intercellular junctions, it extends exploratory pseudopodia in between the two adjacent endothelial cells. Subsequently, pseudopodia evolve into a lamella squeezed into the monolayer gap. During this process, LFA-1 is the integrin with a more prominent role. This molecule is rapidly relocalized, forming a ring-like cluster at the leukocyte-endothelial interface, where it interacts with ICAM-1 and, in some cellular models, with JAM-A. When the transmigration process is over, LFA-1 is finally concentrated at the uropod (81, 82). Interestingly, the NADase/ADP-ribosyl cyclase CD157 is localized at endothelial junctions and can associate with $\beta 2$ -integrins, playing an important role in TEM (83).

ENDOTHELIAL SIGNALS CONTRIBUTING TO THE LEUKOCYTE TRANSMIGRATION

Several molecules specifically localized at endothelial intercellular contacts induce signaling pathways to facilitate leukocyte transmigration. This is the case for CD99 that activates in leukocytes and probably in endothelial cells the ERK, JNK and MAPK pathways (84). In addition,

PECAM-1 can trigger “outside-in” signals via PKC and PI-3K leading to activation of $\alpha_v\beta_3$ (85).

CONCLUDING REMARKS

Understanding the complex signaling networks that govern the extravasation process is of critical importance for the identification of novel therapeutical targets in the treatment of chronic inflammatory and autoimmune diseases. Moreover, the development of new non-invasive and localized drug release strategies instead of systemic pharmacological administration will contribute to this aim.

REFERENCES

- (1) VON ANDRIAN, U. H. AND MACKAY, C. R. (2000) T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343: 1020.
- (2) BUTCHER, E. C. (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 67: 1033.
- (3) SPRINGER, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76: 301.
- (4) SPRINGER, T. A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 827.
- (5) MEHTA, P.; CUMMINGS, R. D. AND MCEVER, R. P. (1998) Affinity and kinetic analysis of P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Biol. Chem.* 273: 32506.
- (6) NICHOLSON, M. W.; BARCLAY, A. N.; SINGER, M. S.; ROSEN, S. D. AND VAN DER MERWE, P. A. (1998) Affinity and kinetic analysis of L-selectin (CD62L) binding to glycosylation-dependent cell-adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* 273: 763.
- (7) VESTWEBER, D. AND BLANKS, J. E. (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79: 181.
- (8) WADDELL, T. K.; FIALKOW, L.; CHAN, C. K.; KISHIMOTO, T. K. AND DOWNEY, G. P. (1995) Signaling functions of L-selectin: enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. *J. Biol. Chem.* 270: 15403.
- (9) BRENNER, B.; GULBINS, E.; SCHLOTTMANN, K.; KOPPENHOEFER, U.; BUSCH, G. L.; WALZOG, B.; STEINHAUSEN, M.; COGGESHALL, K. M.; LINDERKAMP, O. AND LANG, F. (1996) L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 15376.

- (10) BRENNER, B.; GULBINS, E.; BUSCH, G. L.; KOPPENHOEFER, U.; LANG, F. AND LINDERKAMP, O. (1997) L-selectin regulates actin polymerisation via activation of the small G-protein Rac2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 802.
- (11) ROBERTS, A. W.; KIM, C.; ZHEN, L.; LOWE, J. B.; KAPUR, R.; PETRYNIAK, B.; SPAETTI, A.; POLLOCK, J. D.; BORNEO, J. B.; BRADFORD, G. B.; ATKINSON, S. J.; DINAUER, M. C. AND WILLIAMS, D. A. (1999) Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity*. 10: 183.
- (12) HIDARI, K. I.; WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A. AND MCEVER, R. P. (1997) Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 272: 28750.
- (13) LEVESQUE, J. P.; ZANNETTINO, A. C.; PUDNEY, M.; NIUTTA, S.; HAYLOCK, D. N.; SNAPP, K. R.; KANSAS, G. S.; BERNDT, M. C. AND SIMMONS, P. J. (1999) PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity*. 11: 369.
- (14) CELI, A.; PELLEGRINI, G.; LORENZET, R.; DE BLASI, A.; READY, N.; FURIE, B. C. AND FURIE, B. (1994) P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 8767.
- (15) DAMLE, N. K.; KLUSSMAN, K.; DIETSCH, M. T.; MOHAGHEGHPUR, N. AND ARUFFO, A. (1992) GMP-140 (P-selectin/CD62) binds to chronically stimulated but not resting CD4⁺ T lymphocytes and regulates their production of proinflammatory cytokines. *Eur. J. Immunol.* 22: 1789.
- (16) WEYRICH, A. S.; MCINTYRE, T. M.; MCEVER, R. P.; PRESCOTT, S. M. AND ZIMMERMAN, G. A. (1995) Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- α secretion. Signal integration and NF- κ B translocation. *J. Clin. Invest.* 95: 2297.
- (17) WEYRICH, A. S.; ELSTAD, M. R.; MCEVER, R. P.; MCINTYRE, T. M.; MOORE, K. L.; MORRISSEY, J. H.; PRESCOTT, S. M. AND ZIMMERMAN, G. A. (1996) Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97: 1525.
- (18) RUCHAUD-SPARAGANO, M. H.; WALKER, T. R.; ROSSI, A. G., HASLETT, C. AND DRANSFIELD, I. (2000) Soluble E-selectin acts in synergy with platelet-activating factor to activate neutrophil β 2-integrins. Role of tyrosine kinases and Ca²⁺ mobilization. *J. Biol. Chem.* 275: 15758.
- (19) SIMON, S. I.; HU, Y.; VESTWEBER, D. AND SMITH, C. W. (2000) Neutrophil tethering on E-selectin activates β 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Immunol.* 164: 4348.
- (20) ZARBOCK, A.; LOWELL, C. A. AND LEY, K. (2007) Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced α (L) β (2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity*. 26: 773.

- (21) ALONSO-LEBRERO, J. L.; SERRADOR, J. M.; DOMÍNGUEZ-JÍMEZ, C.; BARREIRO, O.; LUQUE, A.; POZO, M. A. D.; SNAPP, K.; KANSAS, G.; SCHWARTZ-ALBIEZ, R.; FURTHMAYR, H.; LOZANO, F. AND SÁNCHEZ-MADRID, F. (2000) Polarization and interaction of adhesion molecules P-selectin Glycoprotein Ligand-1 and Intercellular Adhesion Molecule-3 with moesin and ezrin in myeloid cells. *Blood*. 95: 2413.
- (22) SERRADOR, J. M.; URZAINQUI, A.; ALONSO-LEBRERO, J. L.; CABRERO, J. R.; MONTOYA, M. C.; VICENTE-MANZANARES, M.; YAÑEZ-MÓ, M. AND SÁNCHEZ-MADRID, F. (2002) A juxta-membrane amino acid sequence of P-selectin glycoprotein ligand-1 is involved in moesin binding and ezrin/radixin/moesin-directed targeting at the trailing edge of migrating lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 32: 1560.
- (23) URZAINQUI, A.; SERRADOR, J. M.; VIEDMA, F.; YAÑEZ-MÓ, M.; RODRÍGUEZ, A.; CORBÍ, A. L.; ALONSO-LEBRERO, J. L.; LUQUE, A.; DECKERT, M.; VÁZQUEZ, J. AND SÁNCHEZ-MADRID, F. (2002) ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity*. 17: 401.
- (24) GONZALEZ-AMARO, R. AND SANCHEZ-MADRID, F. (1999) Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.* 19: 389.
- (25) URZAINQUI, A.; MARTINEZ DEL HOYO, G.; LAMANA, A.; DE LA FUENTE, H.; BARREIRO, O.; OLAZABAL, I. M.; MARTIN, P.; WILD, M. K.; VESTWEBER, D.; GONZALEZ-AMARO, R. AND SANCHEZ-MADRID, F. (2007) Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol.* 179: 7457.
- (26) IVETIC, A.; DEKA, J.; RIDLEY, A. J. AND AGER, A. (2002) The cytoplasmic tail of L-selectin interacts with members of the Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) family of proteins: cell activation-dependent binding of Moesin but not Ezrin. *J. Biol. Chem.* 277: 2321.
- (27) YOSHIDA, M.; SZENTE, B. E.; KIELY, J. M.; ROSENZWEIG, A. AND GIMBRONE, M. A. J. (1998) Phosphorylation of the cytoplasmic domain of E-selectin is regulated during leukocyte-endothelial adhesion. *J. Immunol.* 161: 933.
- (28) LORENZON, P.; VECILE, E.; NARDON, E.; FERRERO, E.; HARLAN, J. M.; TEDESCO, F. AND DOBRINA, A. (1998) Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J. Cell. Biol.* 142: 1381.
- (29) HIDALGO, A.; PEIRED, A. J.; WILD, M. K.; VESTWEBER, D. AND FRENETTE, P. S. (2007) Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*. 26: 477.
- (30) MAYADAS, T. N.; JOHNSON, R. C.; RAYBURN, H.; HYNES, R. O. AND WAGNER, D. D. (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*. 74: 541.

- (31) CAMPBELL, J. J.; HEDRICK, J.; ZLOTNIK, A.; SIANI, M. A.; THOMPSON, D. A. AND BUTCHER, E. C. (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*. 279: 381.
- (32) ROT, A. AND VON ANDRIAN, U. H. (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 891.
- (33) CONSTANTIN, G.; MAJEED, M.; GIAGULLI, C.; PICCIO, L.; KIM, J. Y.; BUTCHER, E. C. AND LAUDANNA, C. (2000) Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*. 13: 759.
- (34) SANCHEZ-MADRID, F. AND DEL POZO, M. A. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J.* 18: 501.
- (35) SHAMRI, R.; GRABOVSKY, V.; GAUGUET, J. M.; FEIGELSON, S.; MANEVICH, E.; KOLANUS, W.; ROBINSON, M. K.; STAUNTON, D. E.; VON ANDRIAN, U. H. AND ALON, R. (2005) Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat. Immunol.* 6: 497.
- (36) LUSTER, A. D. (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338: 436.
- (37) LAUDANNA, C.; CAMPBELL, J. J. AND BUTCHER, E. C. (1996) Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science*. 271: 981.
- (38) GIAGULLI, C.; SCARPINI, E.; OTTOBONI, L.; NARUMIYA, S.; BUTCHER, E. C.; CONSTANTIN, G. AND LAUDANNA, C. (2004) RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. *Immunity*. 20: 25.
- (39) CHERRY, L. K.; LI, X.; SCHWAB, P.; LIM, B. AND KLINKSTEIN, L. B. (2004) RhoH is required to maintain the integrin LFA-1 in a nonadhesive state on lymphocytes. *Nat. Immunol.* 5: 961.
- (40) GARCIA-BERNAL, D.; SOTILLO-MALLO, E.; NOMBELA-ARRIETA, C.; SAMANIEGO, R.; FUKUI, Y.; STEIN, J. V. AND TEIXIDO, J. (2006) DOCK2 is required for chemokine-promoted human T lymphocyte adhesion under shear stress mediated by the integrin alpha4beta1. *J. Immunol.* 177: 5215.
- (41) GARCIA-BERNAL, D.; WRIGHT, N.; SOTILLO-MALLO, E.; NOMBELA-ARRIETA, C.; STEIN, J. V.; BUSTELO, X. R. AND TEIXIDO, J. (2005) Vav1 and Rac control chemokine-promoted T lymphocyte adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. *Mol. Biol. Cell.* 16: 3223.
- (42) NOMBELA-ARRIETA, C.; LACALLE, R. A.; MONTOYA, M. C.; KUNISAKI, Y.; MEGIAS, D.; MARQUES, M.; CARRERA, A. C.; MANES, S.; FUKUI, Y.; MARTINEZ, A. C. AND STEIN, J. V. (2004) Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing. *Immunity*. 21: 429.

- (43) SHULMAN, Z.; PASVOLSKY, R.; WOOLF, E.; GRABOVSKY, V.; FEIGELSON, S. W.; EREZ, N.; FUKUI, Y. AND ALON, R. (2006) DOCK2 regulates chemokine-triggered lateral lymphocyte motility but not transendothelial migration. *Blood*. 108: 2150.
- (44) SHIMONAKA, M.; KATAGIRI, K.; NAKAYAMA, T.; FUJITA, N.; TSURUO, T.; YOSHIE, O. AND KINASHI, T. (2003) Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell. Biol.* 161: 417.
- (45) KATAGIRI, K.; OHNISHI, N.; KABASHIMA, K.; IYODA, T.; TAKEDA, N.; SHINKAI, Y.; INABA, K. AND KINASHI, T. (2004) Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 5: 1045.
- (46) ALON, R. AND ETZIONI, A. (2003) LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends. Immunol.* 24: 561.
- (47) PASVOLSKY, R.; FEIGELSON, S. W.; KILIC, S. S.; SIMON, A. J.; TAL-LAPIDOT, G.; GRABOVSKY, V.; CRITTENDEN, J. R.; AMARIGLIO, N.; SAFRAN, M.; GRAYBIEL, A. M.; RECHAVI, G.; BEN-DOR, S.; ETZIONI, A. AND ALON, R. (2007) A LAD-III syndrome is associated with defective expression of the Rap-1 activator CalDAG-GEFI in lymphocytes, neutrophils, and platelets. *J. Exp. Med.* 204: 1571.
- (48) KOLANUS, W.; NAGEL, W.; SCHILLER, B.; ZEITLMANN, L.; GODAR, S.; STOCKINGER, H. AND SEED, B. (1996) Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*. 86: 233.
- (49) WEBER, K. S.; WEBER, C.; OSTERMANN, G.; DIERKS, H.; NAGEL, W. AND KOLANUS, W. (2001) Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines. *Curr. Biol.* 11: 1969.
- (50) HUGHES, P. E.; RENSHAW, H. W.; PFAFF, M.; FORSYTH, J.; KEIVENS, V. M.; SCHWARTZ, M. A. AND GINSBERG, M. H. (1997) Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell*. 88: 521.
- (51) FRIEDRICH, E. B.; SINHA, S.; LI, L.; DEDHAR, S.; FORCE, T.; ROSENZWEIG, A. AND GERSZTEN, R. E. (2002) Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J. Biol. Chem.* 277: 16371.
- (52) SPERANDIO, M.; SMITH, M. L.; FORLOW, S. B.; OLSON, T. S.; XIA, L.; MCEVER, R. P. AND LEY, K. (2003) P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J. Exp. Med.* 197: 1355.
- (53) HOGG, N.; LASCHINGER, M.; GILES, K. AND MCDOWALL, A. (2003) T-cell integrins: more than just sticking points. *J. Cell. Sci.* 116: 4695.
- (54) VICENTE-MANZANARES, M. AND SANCHEZ-MADRID, F. (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 110.

- (55) DEL POZO, M. A.; SANCHEZ-MATEOS, P. AND SANCHEZ-MADRID, F. (1996) Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment? *Immunol. Today*. 17: 127.
- (56) ALON, R.; FEIGELSON, S. W.; MANEVICH, E.; ROSE, D. M.; SCHMITZ, J.; OVERBY, D. R.; WINTER, E.; GRABOVSKY, V.; SHINDER, V.; MATTHEWS, B. D.; SOKOLOVSKY-EISENBERG, M.; INGBER, D. E.; BENOIT, M. AND GINSBERG, M. H. (2005) Alpha4beta1-dependent adhesion strengthening under mechanical strain is regulated by paxillin association with the alpha4-cytoplasmic domain. *J. Cell. Biol.* 171: 1073.
- (57) ROSE, D. M.; LIU, S.; WOODSIDE, D. G.; HAN, J.; SCHLAEPFER, D. D. AND GINSBERG, M. H. (2003) Paxillin binding to the alpha 4 integrin subunit stimulates LFA-1 (integrin alpha L beta 2)-dependent T cell migration by augmenting the activation of focal adhesion kinase/proline-rich tyrosine kinase-2. *J. Immunol.* 170: 5912.
- (58) NISHIYA, N.; KIOSSES, W. B.; HAN, J. AND GINSBERG, M. H. (2005) An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat. Cell. Biol.* 7: 343.
- (59) FAGERHOLM, S. C.; HILDEN, T. J.; NURMI, S. M. AND GAHMBERG, C. G. (2005) Specific integrin alpha and beta chain phosphorylations regulate LFA-1 activation through affinity-dependent and -independent mechanisms. *J. Cell. Biol.* 171: 705.
- (60) PAVALKO, F. M.; WALKER, D. M.; GRAHAM, L.; GOHEEN, M.; DOERSCHUK, C. M. AND KANSAS, G. S. (1995) The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin. *J. Cell. Biol.* 129: 1155.
- (61) SMITH, A.; CARRASCO, Y. R.; STANLEY, P.; KIEFFER, N.; BATISTA, F. D. AND HOGG, N. (2005) A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 170: 141.
- (62) MARLIN, S. D. AND SPRINGER, T. A. (1987) Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell*. 51: 813.
- (63) ELICES, M. J.; OSBORN, L.; TAKADA, Y.; CROUSE, C.; LUHOWSKYJ, S.; HEMLER, M. E. AND LOBB, R. R. (1990) VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*. 60: 577.
- (64) CARLOS, T. M. AND HARLAN, J. M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 84: 2068.
- (65) DUSTIN, M. L.; ROTHLEIN, R.; BHAN, A. K.; DINARELLO, C. A. AND SPRINGER, T. A. (1986) Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137: 245.
- (66) BARREIRO, O.; YAÑEZ-MÓ, M.; SERRADOR, J. M.; MONTOYA, M. C.; VICENTE-MANZANARES, M.; TEJEDOR, R.; FURTHMAYR, H. AND SÁNCHEZ-MADRID, F.

- (2002) Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell. Biol.* 157: 1233.
- (67) HORDIJK, P. L. (2006) Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *Febs J.* 273: 4408.
- (68) COOK-MILLS, J. M. AND DEEM, T. L. (2005) Active participation of endothelial cells in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 77: 487.
- (69) VAN WETERING, S.; VAN BUUL, J. D.; QUIK, S.; MUL, F. P.; ANTHONY, E. C.; TEN KLOOSTER, T. P.; COLLARD, J. G. AND HORDIJK, P. L. (2002) Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J. Cell. Sci.* 115: 1837.
- (70) VAN WETERING, S.; VAN DEN BERK, N.; VAN BUUL, J. D.; MUL, F. P.; LOMMERSE, I.; MOUS, R.; TEN KLOOSTER, J. P.; ZWAGINGA, J. J. AND HORDIJK, P. L. (2003) VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 285: C343.
- (71) COOK-MILLS, J. M. (2002) VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol. Immunol.* 39: 499.
- (72) HORDIJK, P. L. (2003) Endothelial signaling in leukocyte transmigration. *Cell. Biochem. Biophys.* 38: 305.
- (73) ETIENNE-MANNEVILLE, S.; MANNEVILLE, J. B.; ADAMSON, P.; WILBOURN, B.; GREENWOOD, J. AND COURAUD, P. O. (2000) ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J. Immunol.* 165: 3375.
- (74) YANG, L.; KOWALSKI, J. R.; ZHAN, X.; THOMAS, S. M. AND LUSCINSKAS, F. W. (2006) Endothelial cell cortactin phosphorylation by Src contributes to polymorphonuclear leukocyte transmigration in vitro. *Circ. Res.* 98: 394.
- (75) THOMPSON, P. W.; RANDI, A. M. AND RIDLEY, A. J. (2002) Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J. Immunol.* 169: 1007.
- (76) GREENWOOD, J.; ETIENNE-MANNEVILLE, S.; ADAMSON, P. AND COURAUD, P. O. (2002) Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul. Pharmacol.* 38: 315.
- (77) HUBBARD, A. K. AND ROTHLEIN, R. (2000) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1379.
- (78) WANG, Q. AND DOERSCHUK, C. M. (2002) The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid. Redox Signal.* 4: 39.
- (79) CLAYTON, A.; EVANS, R. A.; PETTIT, E.; HALLETT, M.; WILLIAMS, J. D. AND STEADMAN, R. (1998) Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1. *J. Cell. Sci.* 111: 443.

- (80) ALLINGHAM, M. J.; VAN BUUL, J. D. AND BURRIDGE, K. (2007) ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J. Immunol.* 179: 4053.
- (81) SANDIG, M.; NEGROU, E. AND ROGERS, K. A. (1997) Changes in the distribution of LFA-1, catenins, and F-actin during transendothelial migration of monocytes in culture. *J. Cell. Sci.* 110: 2807.
- (82) SHAW, S. K.; MA, S.; KIM, M. B.; RAO, R. M.; HARTMAN, C. U.; FROIO, R. M.; YANG, L.; JONES, T.; LIU, Y.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. A. AND LUSCINSKAS, F. W. (2004) Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J. Exp. Med.* 200: 1571.
- (83) ORTOLAN, E.; TIBALDI, E. V.; FERRANTI, B.; LAVAGNO, L.; GARBARINO, G.; NOTARO, R.; LUZZATTO, L.; MALAVASI, F. AND FUNARO, A. (2006) CD157 plays a pivotal role in neutrophil transendothelial migration. *Blood.* 108: 4214.
- (84) HAHN, M. J.; YOON, S. S.; SOHN, H. W.; SONG, H. G.; PARK, S. H. AND KIM, T. J. (2000) Differential activation of MAP kinase family members triggered by CD99 engagement. *FEBS Lett.* 470: 350.
- (85) CHIBA, R.; NAKAGAWA, N.; KURASAWA, K.; TANAKA, Y.; SAITO, Y. AND IWAMOTO, I. (1999) Ligation of CD31 (PECAM-1) on endothelial cells increases adhesive function of α v β 3 integrin and enhances β 1 integrin-mediated adhesion of eosinophils to endothelial cells. *Blood.* 94: 1319.

Nanocomplejos del receptor para el antígeno de linfocitos T: agruparse para cooperar

Recibido el 28 de mayo de 2008

WOLFGANG W. A. SCHAMEL¹, HISSE M. VAN SANTEN²,
MAHIMA SWAMY¹ Y BALBINO ALARCÓN^{2*}

¹*Max Planck-Institut für Immunbiologie and University of Freiburg,
Stübeweg 51, 79108 Freiburg, Alemania*

²*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-Universidad
Autónoma de Madrid, Madrid 28049*

RESUMEN

El receptor para antígeno de los linfocitos T (TCR) es un complejo multiproteico responsable de la activación y regulación de la respuesta inmune adaptativa. Este receptor muestra una gran especificidad y sensibilidad, a la vez que tiene una baja afinidad por su ligando. El ligando del TCR es un complejo formado por el péptido antigénico y una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Es más, los linfocitos T responden a antígeno en un rango muy amplio de concentraciones. Esto es, los linfocitos T continúan dando una respuesta aumentada a concentraciones de antígeno que exceden en varios órdenes de magnitud la concentración activadora mínima. La estequiometría y organización del TCR en la membrana han estado bajo intenso escrutinio porque pueden ser clave para explicar sus propiedades paradójicas. Esta revisión subraya la existencia de nuevos datos que indican que el TCR se presenta en linfocitos T intactos y en reposo como una mezcla variable de

*** Información de contacto:**

Dr. Balbino Alarcón.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid,
Cantoblanco, Madrid 28049.

Tel.: 914978458; FAX: 914974799.

E-mail: balarcon@cbm.uam.es

Abreviaturas: TCR, Receptor para antígeno de linfocitos T.

formas monovalentes (con sólo un sitio de unión para el ligando) y formas multivalentes de distinto grado. Estos resultados contrastan con datos anteriores de estequiometría del TCR obtenidos por procedimientos bioquímicos. No obstante, la mayor parte de estas discrepancias pueden deberse al efecto de distintos detergentes en la integridad del receptor. Aquí discutimos un modelo donde los complejos multivalentes del TCR son los responsables de dotar a los linfocitos T de sensibilidad a antígeno porque son activados por bajas concentraciones de antígeno, mientras que los complejos monovalentes son los responsables del amplio rango dinámico.

Palabras clave: Estequiometría.- Cambio conformacional.- Receptor para antígeno.- Transducción de señales.- Interacciones de membrana.

ABSTRACT

T cell receptor nanocomplexes: cooperating clusters

The T cell antigen receptor (TCR·CD3) is a multi-subunit complex responsible for triggering an adaptive immune response. It shows high specificity and sensitivity while having a low affinity for the ligand. Furthermore, T cells respond to antigen over a wide concentration range. The stoichiometry and architecture of TCR·CD3 in the membrane have been under intense scrutiny because they might be key to explaining its paradoxical properties. This review highlights new evidence that TCR·CD3 is found on intact, unstimulated T cells in monovalent (one ligand-binding site per receptor) as well as in several distinct multivalent forms. This is in contrast to the TCR·CD3 stoichiometries determined by several biochemical means, but these data can be explained by the effects of different detergents on the integrity of the receptor. Here, we discuss a model in which the multivalent receptors are important for the detection of low concentrations of ligand, and therefore confer sensitivity, whereas the co-expressed monovalent TCR·CD3s allow a wide dynamic range.

Key words: Stoichiometry.- Conformational change.- T cell antigen receptor.- Signal transduction.- Transmembrane interactions.

INTRODUCCIÓN

Cómo los receptores de membrana responden a sus ligandos con gran sensibilidad y plasticidad es objeto todavía de estudio. El receptor para antígeno de los linfocitos T (TCR) es un caso particularmente interesante. Está compuesto de los dímeros $\text{TCR}\alpha/\beta$, $\text{CD3}\gamma\epsilon$, $\text{CD3}\delta\epsilon$ y

CD3 ζ 2 (CD247) que se asocian entre sí de forma no covalente. Las subunidades invariables (CD3) contienen, cada una, una región transmembrana con un aminoácido ácido y un tallo citoplásmico con varios motivos de transducción de señales (1-3). Las subunidades TCR α y TCR β contienen cada una un dominio variable (V) de inmunoglobulina, los cuales forman conjuntamente la superficie de interacción con el ligando. Las subunidades TCR α y TCR β tienen también aminoácidos básicos en sus regiones transmembrana que están implicados en la interacción con las subunidades CD3 (4-6). El ligando del TCR es un péptido antigénico presentado por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de células presentadoras de antígeno (APCs). Paradójicamente, los linfocitos T pueden ser activados por unas pocas moléculas de MHC asociado al péptido antigénico (pMHC) (7, 8), incluso cuando la afinidad de la interacción pMHC-TCR α/β es muy baja (entre 1 y 50 μ M) (9). Es más, las APCs expresan concentraciones de moléculas de MHC asociadas a péptidos propios que son de 10^3 a 10^4 veces superiores a las concentraciones de pMHC antigénico. Los complejos MHC asociados a péptidos propios no son capaces por sí mismos de activar una respuesta en los linfocitos T, incluso cuando su afinidad por el TCR α/β puede ser tan sólo 10 veces inferior a la afinidad del pMHC antigénico. Resulta por lo tanto difícil de entender cómo esta pequeña diferencia en afinidad resulta suficiente para obtener una gran especificidad cuando existe un gran exceso de péptidos propios unidos a MHC (10). Además de una gran sensibilidad, los linfocitos T son todavía capaces de mostrar efectos dosis-respuesta a concentraciones de ligando de 10^3 a 10^6 (8, 11, 12). Resulta por lo tanto también intrigante el comprender cómo los linfocitos T pueden mostrar una respuesta no saturada a un rango tan amplio de concentraciones de pMHC, dadas las propiedades del TCR.

El conocimiento de la estequiometría del TCR (es decir, el número de copias de cada subunidad por complejo) y el ordenamiento del TCR en la membrana es fundamental para intentar resolver estas paradojas. Esta revisión se centra en los avances concernientes a la arquitectura del TCR y trata de dar explicación a algunas de las preguntas mencionadas.

EL MODELO DE TCR MONOVALENTE

El consenso existente en cuanto a la composición del TCR es que está formado por los dímeros $\text{TCR}\alpha\beta$, $\text{CD3}\gamma\epsilon$, $\text{CD3}\delta\epsilon$ y $\text{CD3}\zeta\zeta$ (Figura 1). La estequiometría mínima del TCR debe ser por lo tanto $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$. De especial importancia es la valencia del TCR, es decir, el número de heterodímeros $\text{TCR}\alpha/\beta$, responsables de la unión al ligando, por complejo.

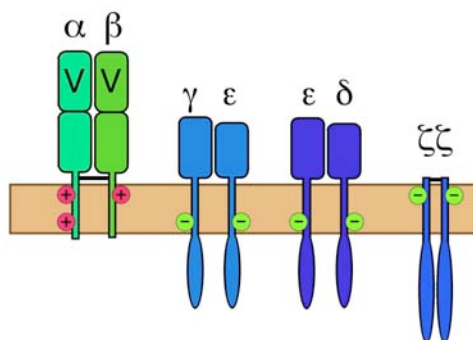


FIGURA 1.- *El receptor para antígeno de los linfocitos T (TCR) está compuesto por los dímeros $\alpha\beta$, $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$. Las 6 subunidades del TCR se muestran de forma esquemática. Los dominios variables de tipo inmunoglobulina del $\text{TCR}\alpha\beta$ (V) reconocen el ligando, mientras que los tallos citoplásmicos de las subunidades CD3 ($\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, $\zeta\zeta$) interaccionan con proteínas citoplásmicas encargadas de la transmisión de señales. Los puentes disulfuro se muestran como líneas negras gruesas. Las cargas potencialmente existentes en las regiones transmembrana han sido indicadas también.*

Los primeros trabajos dirigidos a dilucidar la valencia del TCR utilizaron el detergente digitonina para extraer el TCR de la membrana. Utilizando ratones transgénicos (13) o linfocitos T humanos (14) que expresan simultáneamente dos heterodímeros $\text{TCR}\alpha/\beta$ distintos, se demostró que la inmunoprecipitación de uno de los heterodímeros no resultaba en la co-precipitación del otro y viceversa. Estos datos

alimentaron la hipótesis de que el TCR es monovalente. En 2002 se presentó una estequiometría completa del TCR, incluyendo todas sus subunidades (6). Utilizando un procedimiento de co-purificación de complejos TCR producidos en un sistema de traducción *in vitro* acoplado a microsomas derivados del retículo endoplásmico (ER) (6, 15), la estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ fue experimentalmente confirmada para el complejo TCR extraído en digitonina (Figura 2, modelo antiguo). Sin embargo, como CD3 ζ se ensambla con las otras subunidades sólo en el aparato de Golgi (16) y como el TCR se modifica postraduccionalmente a lo largo de la ruta secretora, resultaba poco claro si los datos obtenidos en el sistema de traducción *in vitro* representaban la estequiometría del TCR en la membrana plasmática o tan sólo su posible estequiometría en el ER.

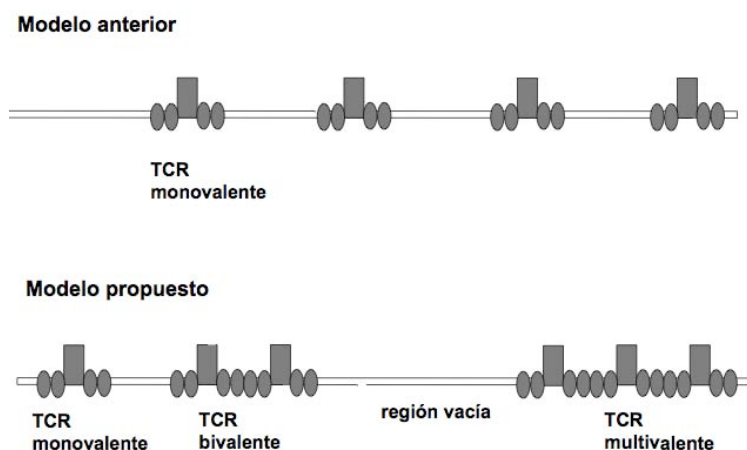


FIGURA 2.- **Distribución de los complejos TCR en la superficie celular en linfocitos en reposo.** Modelo anterior: los receptores monovalentes con una estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ están distribuidos de forma uniforme en la membrana plasmática. Modelo propuesto: los receptores monovalentes coexisten en la membrana de linfocitos en reposo con una variedad de receptores multivalentes. Debido a la incertidumbre sobre la estequiometría última de los complejos monovalentes y multivalentes, no se ha querido mostrar ninguna relación real entre subunidades. Sin embargo, los TCR monovalentes podrían tener la estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$. La membrana tiene también grandes áreas carentes de cualquier TCR.

EL MODELO DE TCR MULTIVALENTE

Una estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ produciría un desequilibrio de cargas potencialmente negativas en la región transmembrana (Figura 1). Este problema podría teóricamente resolverse si el TCR contuviera un heterodímero $\text{TCR}\alpha/\beta$ adicional, resultando en un complejo bivalente $\gamma\epsilon\alpha\beta\zeta\zeta\alpha\beta\delta\epsilon$ con una región transmembrana neutra (17-19). Alternativamente, la estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ del TCR llevó a plantear que cada aminoácido básico contacta con dos aminoácidos ácidos en la membrana (6).

La primera evidencia experimental a favor de una estequiometría multivalente (esto es, un TCR con más de un heterodímero $\text{TCR}\alpha/\beta$) vino de mediciones hidrodinámicas del tamaño del TCR tras su extracción en octilglucósido, las cuales revelaron que el TCR era más grande que el complejo $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ (20). Otros estudios realizados posteriormente y que no implicaban la solubilización de la membrana con detergentes sugirieron también la existencia de multivalencia (19). La existencia de señales de FRET (Resonancia de Transferencia de Energía por Fluorescencia) entre dos $\text{TCR}\alpha/\beta$ diferentes en linfocitos T primarios de ratones doblemente transgénicos demostró que al menos dos heterodímeros $\text{TCR}\alpha/\beta$ tenían que estar presentes en un complejo TCR único. Es más, cuando las células se lisaron con cualquiera de los detergentes Nonidet P-40 (NP40) y Brij96, se pudieron co-precipitar los dos heterodímeros $\text{TCR}\alpha/\beta$ en un complejo único. El tratamiento con endoglicosidasa H de los receptores demostró que era el TCR expresado en la membrana plasmática el que tenía dos $\text{TCR}\alpha/\beta$ (19). Estos datos claramente mostraron que el TCR está constituido por más de un heterodímero $\text{TCR}\alpha/\beta$, aunque no demostraron que la estequiometría fuera $\gamma\epsilon\alpha\beta\zeta\zeta\alpha\beta\delta\epsilon$. ¿Cómo podía resolverse la discrepancia entre los modelos monovalente y multivalente?

UN MODELO UNIFICADO DE LA VALENCIA DEL TCR

Los dominios transmembrana tienen un papel fundamental en las interacciones entre las subunidades TCR α/β y CD3 (4-6). Por lo tanto, la elección de detergente es crítica para el mantenimiento de las interacciones. El detergente debe también ser lo suficientemente eficaz como para disolver la membrana alrededor del complejo proteico. Por otro lado, no se debe asumir que el TCR deba existir en un complejo único. Por lo tanto, la aproximación experimental para estudiar un complejo multiproteico debería poder discriminar entre complejos con diferentes estequiometrías.

Se aplicó la electroforesis en condiciones nativas basada en azul Coomassie (Blue native polyacrylamide gel electrophoresis, BN-PAGE) (21, 22) con diferentes detergentes al estudio del tamaño y estequiometría del TCR (23, 34). Al contrario que los experimentos de co-precipitación y de FRET, el sistema BN-PAGE permite determinar la abundancia relativa y el número de complejos diferentes producidos por una proteína dada. Es más, los complejos se forman en condiciones nativas, lo que permite la interacción con otras proteínas tales como chaperonas, así como modificaciones postraduccionales. Cuando el TCR fue extraído en digitonina a partir tanto de linfocitos primarios como de líneas celulares de ratón y humanas, se detectó un único complejo (23-25). Este complejo resultó ser monovalente, con la estequiometría $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta\zeta$. Por el contrario, los detergentes Brij96 y Brij98 permitieron la separación de varios complejos de tamaño diferente (23, 24). Una serie de controles excluyeron que el Brij96 causara una agregación artificiosa del TCR (23). Se demostró que los complejos grandes estaban en la membrana plasmática y que se fosforilaban en tirosina tras la estimulación con pMHC. Además, experimentos de coprecipitación a partir de células que expresan dos TCRs diferentes (esto es, con dos heterodímeros TCR α/β distintos), demostraron que ambos TCRs podían ser coprecipitados si se habían extraído en Brij96, pero no si se habían extraído en digitonina (23). Estos datos eran por lo tanto compatibles con que los complejos aislados en Brij96 contenían TCR multivalentes, mientras que en digitonina eran exclusivamente monovalentes.

La coexistencia de complejos TCR con diferentes valencias identificados por BN-PAGE en Brij96 y otros detergentes está de acuerdo con los datos de FRET previamente mencionados en células intactas. Es

más, los resultados de microscopía electrónica en células primarias y líneas celulares marcadas con anticuerpos anti-TCR demostraron que en células en reposo el TCR se expresa como una variedad de complejos multivalentes (23) (Figura 2, modelo nuevo). La misma conclusión fue alcanzada utilizando una técnica de microscopía electrónica diferente (B. Lillemeier & M.M. Davis, unpublished data). Los complejos más grandes del TCR consisten de alrededor de 20 unidades (23). Estos complejos TCR preformados son demasiado pequeños para ser detectados por microscopía confocal, y son por lo tanto diferentes a los llamados microcomplejos que se detectan por microscopía óptica tras la estimulación del TCR y la agregación subsiguiente (26, 27).

En resumen, los complejos TCR multivalentes eran coexpresados con receptores monovalentes en la membrana plasmática de linfocitos T en reposo (Figura 2). Como era de esperar, los diferentes detergentes tienen un impacto diferente en la integridad de los complejos del TCR. Brij96 es el detergente más suave, extrae todos los complejos TCR manteniendo intactos tanto los complejos monovalentes como los multivalentes. Por el contrario, la digitonina rompe los complejos multivalentes en sus componentes monovalentes. Teniendo en cuenta los diferentes efectos de los detergentes, la coexistencia de complejos monovalentes y multivalentes está de acuerdo con todos los datos previamente publicados (6, 13-15, 19, 20, 23, 25, 28, 29).

ARQUITECTURA DE LOS COMPLEJOS TCR MULTIVALENTES

En la línea T de ratón 2B4 la mitad de los heterodímeros TCR α/β están presentes como complejos monovalentes y el resto como complejos multivalentes con distinto grado de valencia (23). Esta proporción varía entre distintos tipos celulares para un heterodímero TCR α/β dado (24), indicando que factores distintos a la especificidad del TCR determinan el grado de multimerización en linfocitos T en reposo.

Como se muestra por microscopía electrónica, los complejos TCR grandes y pequeños están distribuidos de manera no homogénea por la superficie celular, dejando grandes áreas libres (Figura 2 e I. Arechaga, H.

M. van S., J.M. Valpuesta, W. S. & B. A., datos no publicados). Los complejos multivalentes se disponen de forma lineal, dejando muy poco espacio entre las partículas de oro utilizadas para visualizar los complejos. Puesto que la resolución del microscopio electrónico es mayor que 1 nm y el tamaño predicho de una unidad de TCR es superior al diámetro de las partículas de oro utilizadas (10 nm) (30), concluimos que las unidades del TCR deben estar lo suficientemente cerca como para establecer interacciones proteína-proteína. Además, el empaquetamiento de los complejos multivalentes en ordenamientos lineales, más que en dos dimensiones, supone un apoyo adicional a la idea que interacciones proteína-proteína son las responsables de la multimerización del TCR. No obstante, el desensamblaje de los complejos TCR multivalentes tras la extracción de colesterol (23), sugiere que interacciones lípido-proteína tienen también un papel estructural dentro de los complejos multivalentes. Es así probable que el colesterol confiera estabilidad a los complejos multivalentes, pero no a los monovalentes. Esta conclusión está apoyada también por un estudio que indica que existen dos poblaciones de TCR diferentes en la superficie de las células vivas, una sensible y la otra resistente a la extracción de colesterol (31). Debido a la dependencia de colesterol, los complejos TCR multivalente podrían estar presentes en balsas lipídicas, mientras que los receptores monovalentes estarían excluidos. Puesto que los niveles de colesterol en el ER son bajos (32), es cuestionable que los experimentos de traducción *in vitro* de Wucherpfennig y colegas pudieran permitir detectar los complejos multivalentes (6, 15).

LA ESTEQUIOMETRÍA DEL TCR NO ESTÁ TODAVÍA RESUELTA

Aunque la estequiometría realmente relevante es la del TCR en la membrana plasmática, en el momento presente sólo se tiene información sobre estequiometrías en micelas de detergente. Las estequiometrías en detergentes más suaves que la digitonina está todavía por conocerse. Cuando se utilizó el detergente Lubrol, que mantiene los complejos multivalentes intactos, en el sistema de traducción *in vitro*, se encontró

una relación 1:1:1:1 para $\alpha\beta:\gamma\epsilon:\delta\epsilon:\zeta\zeta$ (15). Puesto que no se sabe si los complejos multivalentes se pueden formar en el ER, es difícil interpretar los datos de Lubrol, pero podrían indicar que el TCR monovalente tiene la estequiometría $\alpha\beta\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$. Otra consideración importante es si los complejos multivalentes derivan directamente de la multimerización del complejo monovalente, o si dentro de los complejos multivalentes la distintas subunidades mantienen proporciones diferentes. Una posibilidad interesante es que en la membrana plasmática se establezca un equilibrio dinámico entre los receptores multivalentes y monovalentes.

Hasta que la estequiometría no esté resuelta es prematuro concluir si cada carga positiva potencial en la membrana plasmática está compensado por una (17, 19) o por dos cargas negativas (6). En este contexto, merece la pena mencionar que los estudios de mutagénesis llevados a cabo para determinar cómo se produce la interacción entre aminoácidos cargados (6), fue únicamente realizada en presencia de digitonina y, por lo tanto, puede no reflejar las interacciones que ocurren en membranas intactas.

AGRUPARSE PARA AUMENTAR LA SENSIBILIDAD

Hemos demostrado recientemente que los complejos multivalentes son activados por concentraciones bajas de pMHC, mientras que los monovalentes permanecen inalterados (23). Este descubrimiento podría explicarse por tres mecanismos diferentes. Primero, los complejos multivalentes probablemente aumentan la avidéz por el ligando (pMHC) que también se expresa en grupos en la superficie de las APCs (33-35). Una consecuencia podría ser que a bajas concentraciones de ligando solo los complejos multivalentes son contactados, mientras que los complejos monovalentes requieren concentraciones de ligando más altas (23). Esto es especialmente evidente cuando se consideran complejos de MHC con péptidos propios que tienen una afinidad intermedia por $\text{TCR}\alpha/\beta$. Estos complejos no pueden activar al TCR por sí mismos (Figura 3C), pero podrían aumentar la sensibilidad de los linfocitos T a concentraciones bajas de antígeno (36-38). En estas condiciones sólo los complejos multivalentes serían activados debido a su avidéz más alta por pMHC

comparada con la forma monovalente (Figura 3A). El TCR monovalente sería únicamente activado a concentraciones de agonista muy altas (Figura 3C y D). Segundo, los complejos multivalentes pueden permitir la propagación de señales de activación desde los $\text{TCR}\alpha/\beta$ ligados por pMHC a receptores no ligados dentro del mismo complejo multivalente, amplificando por lo tanto el efecto de unión (Figura 3B). Este mecanismo puede explicar la alta sensibilidad de los linfocitos T. En este modelo, las moléculas de MHC asociadas a péptidos propios juegan también un papel en la ocupación de heterodímeros $\text{TCR}\alpha/\beta$ no unidos a pMHC agonista dentro de los complejos multivalentes, contribuyendo a activar receptores adicionales (Figura 3B). Tercero, la organización lineal de los complejos multivalentes podría contribuir a que una única molécula de pMHC active de forma seriada a varios TCRs (39).

Los complejos multivalentes podrían ser los responsables de la respuesta de los linfocitos T a muy bajas concentraciones de antígeno; condiciones que se dan, por ejemplo, al comienzo de la respuesta inmune (Figura 3A). Mediante modelado matemático se ha propuesto que los complejos multivalentes permiten efectos cooperativos que permiten amplificar pequeñas diferencias en la afinidad del ligando (40). Por lo tanto, los complejos multivalentes del TCR podrían ser más eficaces que los monovalentes en la discriminación entre complejos pMHC distintos. Este mecanismo podría resolver la paradoja de baja afinidad/gran especificidad de la interacción TCR-pMHC.

LOS COMPLEJOS MONOVALENTES ELEVAN EL UMBRAL DE SATURACIÓN DEL TCR

Los linfocitos T responden a un amplio rango de concentraciones (8, 11, 12). Cuando los complejos multivalentes estén ya saturados por pMHC, los monovalentes serían todavía susceptibles de ser estimulados a concentraciones crecientes de pMHC (23). De hecho, según el modelo de Bray y colegas, la expresión de formas monovalentes y multivalentes de un receptor dado en la células puede dotar a las mismas de gran sensibilidad a bajas concentraciones de ligando y respuestas escaladas al ligando cuando las concentraciones del mismo ya son altas (41). Por lo

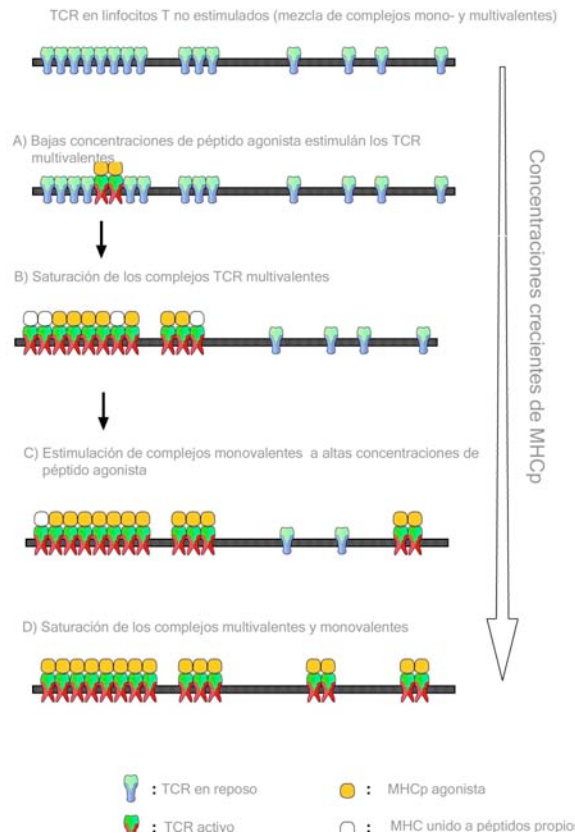


FIGURA 3.- **La combinación de complejos multivalentes y monovalentes dota a los linfocitos de T de gran sensibilidad a antígeno y de un amplio rango de respuesta.** En linfocitos T en reposo, el TCR está organizado en agrupaciones más o menos grandes, resultando en una mezcla de receptores monovalentes y multivalentes de distinto grado. **A)** Sólo los complejos multivalentes son capaces de responder a bajas concentraciones de péptido agonista asociado a MHC (MHCp), debido a su mayor avidéz por TCR multimérico (representado como una rueda con dos raíces). **B)** A concentraciones medias de MHCp agonista, los complejos multivalentes del TCR resultan saturados. Algunos TCRs de los complejos multivalentes pueden ser ocupados por moléculas de MHC unidas a péptidos propios de baja afinidad (en blanco). **C)** A concentraciones altas de MHCp agonista los complejos monovalentes del TCR empiezan a ser ocupados. Esto permite a los linfocitos T seguir respondiendo a concentraciones crecientes de antígeno cuando los TCR multivalentes están ya ocupados en su totalidad. **D)** Sólo a muy altas concentraciones de MHCp, cuando todos los complejos TCR, multivalentes y monovalentes, están ocupados, se satura la respuesta del linfocito T.

tanto, la presencia de los TCRs monovalentes podría dotar a la célula T de la capacidad de producir una respuesta dosis-dependiente incluso a concentraciones de pMHC altas, cuando los complejos multivalentes ya estén saturados (Figura 3C y D).

CONCLUSIONES

La controversia sobre la estequiometría del TCR ha sido resuelta mediante la combinación de métodos bioquímicos avanzados utilizando detergentes de distinto tipo en combinación con técnicas no invasivas tales como e inmunomicroscopía electrónica. La demostración de la coexistencia de complejos TCR monovalentes y multivalentes en la superficie de los linfocitos T sirve de base para la construcción de nuevas hipótesis. Esperamos que la demostración de la expresión simultánea de complejos monovalentes y multivalentes del TCR sirva para comprender el funcionamiento del mismo y de la biología de los linfocitos T.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF2006-01391), por la Comunidad de Madrid (S-SAL-0159-2006) y por la Deutscher Akademischer Austauschdienst (D/0232957). Se agradece también el apoyo institucional de la Fundación Ramón Areces al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

REFERENCIAS

- (1) MALISSEN, B. (2003) An evolutionary and structural perspective on T cell antigen receptor function. *Immunol. Rev.* 191: 7-27.
- (2) ALARCON, B.; GIL, D.; DELGADO, P. AND SCHAMEL, W. W. A. (2003) Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol. Rev.* 191:38-46.
- (3) RETH, M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature.* 338: 383.

- (4) BLUMBERG, R. S.; ALARCON, B.; SANCHO, J.; McDERMOTT, F. V.; LOPEZ, P.; BREITMEYER, J. AND TERHORST, C. (1990) Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain. *J. Biol. Chem.* 265: 14036-14043.
- (5) COSSON, P.; LANKFORD, S. P.; BONIFACINO, J. S. AND KLAUSNER, R. D. (1991) Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature.* 351: 414-416.
- (6) CALL, M. E.; PYRDOL, J.; WIEDMANN, M. AND WUCHERPFENNIG, K. W. (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell.* 111: 967-979.
- (7) PURBHOO, M. A.; IRVINE, D. J.; HUPPA, J. B. AND DAVIS, M. M. (2004) T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* 5: 524-530.
- (8) IRVINE, D. J.; PURBHOO, M. A.; KROGSGAARD, M. AND DAVIS, M. M. (2002) Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature.* 419: 845-849.
- (9) DAVIS, M. M.; BONIFACE, J. J.; REICH, Z.; LYONS, D.; HAMPL, J.; ARDEN, B. AND CHIEN, Y. (1998) Ligand recognition by alpha/beta T cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 523-544.
- (10) BONIFACE, J. J.; RABINOWITZ, J. D.; WÜLFING, C.; HAMPL, J.; REICH, Z.; ALTMAN, J. D.; KANTOR, R. M.; BEESON, C.; McCONNELL, H. M. AND DAVIS, M. M. (1998) Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the peptide multivalent engagement of MHC ligands. *Immunity.* 9: 459-466.
- (11) BACHMANN, M.F.; SPEISER, D. E.; ZAKARIAN, A. AND OHASHI, P. S. (1998) Inhibition of TCR triggering by a spectrum of altered peptide ligands suggests the mechanism for TCR antagonism. *Eur. J. Immunol.* 28: 3110-3119.
- (12) COCHRAN, J. R.; CAMERON, T. O. AND STERN, L. J. (2000) The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity.* 12: 241-250.
- (13) PUNT, J. A.; ROBERTS, J. L.; KEARSE, K. P. AND SINGER, A. (1994) Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR α , one TCR β and two CD3 ϵ chains. *J. Exp. Med.* 180: 587-593.
- (14) HOU, X.; DIETRICH, J.; KUHLMANN, J.; WEGENER, A. M. AND GEISLER, C. (1994) Structure of the T cell receptor in a T α V β 2, α V β 8-positive T cell line. *Eur. J. Immunol.* 24: 1228-1233.
- (15) CALL, M. E.; PYRDOL, J. AND WUCHERPFENNIG, K. W. (2004) Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 16: 2348-2357.
- (16) DIETRICH, J.; KASTRUP, J.; LAURITSEN, J. P.; MENNE, C.; VON BULOW, F. AND GEISLER, C. (1999) TCR ζ is transported to and retained in the Golgi

- apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. *Eur. J. Immunol.* 29: 1719-1728.
- (17) GREEN, N. M. (1991) Biological membranes. The semiotics of charge. *Nature.* 351: 349-350.
- (18) ROJO, J. M. AND PORTOLES, P. (1991) A symmetrical view of the T-cell receptor-CD3 complex. *Immunol. Today.* 12: 377-378.
- (19) FERNANDEZ-MIGUEL, G.; ALARCON, B.; IGLESIAS, A.; BLUETHMANN, H.; ALVAREZ-MON, M.; SANZ, E. AND DE LA HERA, A. (1999) Multivalent structure of an alphabeta T cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 1547-1552.
- (20) EXLEY, M.; WILEMAN, T.; MUELLER, B. AND TERHORST, C. (1995) Evidence for multivalent structure of T-cell antigen receptor complex. *Mol. Immunol.* 32: 829-839.
- (21) SCHÄGGER, H. AND VON JAGOW, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223-231.
- (22) SCHAMEL, W. W. AND RETH, M. (2000) Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity.* 13: 5-14.
- (23) SCHAMEL, W. W.; ARECHAGA, I.; RISUENO, R. M.; VAN SANTEN, H. M.; CABEZAS, P.; RISCO, C.; VALPUESTA, J. M. AND ALARCON, B. (2005) Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response. *J. Exp. Med.* 202: 493-503.
- (24) HELLWIG, S.; SCHAMEL, W. W.; PFLUGFELDER, U.; GERLICH, B. AND WELTZIEN, H. U. (2005) Differences in pairing and cluster formation of T cell receptor alpha- and beta-chains in T cell clones and fusion hybridomas. *Immunobiol.* 210: 685-694.
- (25) ZAPATA, D. A.; SCHAMEL, W. W.; TORRES, P. S.; ALARCON, B.; ROSSI, N. E.; NAVARRO, M. N.; TORIBIO, M. L. AND JR, R. (2004) Biochemical differences in the alphabeta T cell receptor. CD3 surface complex between CD8+ and CD4+ human mature T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 24485-24492.
- (26) MOSSMAN, K. D.; CAMPI, G.; GROVES, J. T. AND DUSTIN, M. L. (2005) Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science.* 310: 1191-1193.
- (27) YOKOSUKA, T.; SAKATA-SOGAWA, K.; KOBAYASHI, W.; HIROSHIMA, M.; HASHIMOTO-TANE, A.; TOKUNAGA, M.; DUSTIN, M. L. AND SAITO, T. (2005) Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat. Immunol.* 6: 1253-1262.
- (28) BLUMBERG, R. S.; LEY, S.; SANCHO, J.; LONBERG, N.; LACY, E.; MCDERMOTT, F.; SCHAD, V.; GREENSTEIN, J. L. AND TERHORST, C. (1990) Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7220-7224.

- (29) DE LA HERA, A.; MULLER, U.; OLSSON, C.; ISAAZ, S. AND TUNNACLIFFE, A. (1991) Structure of the T cell antigen receptor (TCR): two CD3 epsilon subunits in a functional TCR/CD3 complex. *J. Exp. Med.* 173: 7-17.
- (30) SUN, Z. Y.; KIM, S. T.; KIM, I. C.; FAHMY, A.; REINHERZ, E. L. AND WAGNER, G. (2004) Solution structure of the CD3epsilon delta ectodomain and comparison with CD3epsilon gamma as a basis for modeling T cell receptor topology and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 16867-16872.
- (31) UHLIN, M.; MASUCCI, M. G. AND LEVITSKY, V. (2003) Pharmacological disintegration of lipid rafts decreases specific tetramer binding and disrupts the CD3 complex and CD8 heterodimer in human cytotoxic T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 57: 99-106.
- (32) HOLTHUIS, J. C. AND LEVINE, T. P. (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 209-220.
- (33) KRISHNA, S.; BENARACH, P. AND PILLAI, S. (1992) Tetrameric cell-surface MHC class I molecules. *Nature.* 357: 164-167.
- (34) KROPSHOFER, H.; SPINDELDREHER, S.; ROHN, T. A.; PLATANIA, N.; GRYGAR, C.; DANIEL, N.; WOLPL, A.; LANGEN, H.; HOREJSI, V. AND VOGT, A. B. (2002) Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat. Immunol.* 3: 61-68.
- (35) ANDERSON, H. A.; HILTBOLD, E. M. AND ROCHE, P. A. (2000) Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat. Immunol.* 1: 156-162.
- (36) WÜLFING, C.; SUMEN, C.; SJAASTAD, M. D.; WU, L. C.; DUSTIN, M. L. AND DAVIS, M. M. (2002) Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat. Immunol.* 3: 42-47.
- (37) KROGSGAARD, M.; LI, Q. J.; SUMEN, C.; HUPPA, J. B.; HUSE, M. AND DAVIS, M. M. (2005) Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature.* 434: 238-243.
- (38) YACHI, P. P.; AMPUDIA, J.; GASCOIGNE, N. R. AND ZAL, T. (2005) Nonstimulatory peptides contribute to antigen-induced CD8-T cell receptor interaction at the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 6: 785-792.
- (39) VALITUTTI, S.; MULLER, S.; CELLA, M.; PADOVAN, E. AND LANZAVECCHIA, A. (1995) Serial Triggering of many T-Cell Receptors by a few Peptide-MHC Complexes. *Nature.* 375: 148-151.
- (40) SCHAMEL, W. W.; RISUENO, R. M.; MINGUET, S.; ORTIZ, A. R. AND ALARCON, B. (2006) A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR-CD3 complex. *Trends Immunol.* 27: 176-182.
- (41) BRAY, D.; LEVIN, M. D. AND MORTON-FIRTH, C. J. (1998) Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. *Nature.* 393: 85-88.

Inflamación y neuropatogenia asociada al VIH

Recibido el 28 de mayo de 2008

SUSANA ÁLVAREZ^{1,2}, ALMUDENA BLANCO¹ Y MARÍA
ÁNGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ^{1*}

¹*Laboratorio Inmuno-Biología Molecular, Hospital General
Universitario Gregorio Marañón, Madrid.*

²*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa-CSIC-Univ. Autónoma de
Madrid. Madrid.*

RESUMEN

La infección cerebral por el VIH puede resultar en una profunda afectación del conocimiento, comportamiento y capacidades motoras, todo ello conocido como

*** Correspondencia:**

Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández.

Lab. Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón.
28007, Madrid. Spain.

Phone: 00 34 91 5868565. Fax: 00 34 91 5868018.

E-mail: mmunoz.hgugm@madrid.salud.org

Abreviaturas: **VIH**, Virus de la Inmunodeficiencia Humana; **SNC**, Sistema Nervioso Central; **TARGA**, Terapia antirretroviral de alta eficacia; **CDS**, Complejo demencia SIDA; **PG**, Prostaglandina; **NO**, Óxido nítrico; **BHE**, Barrera hematoencefálica; **RMh**, receptor humano de manosa; **NMDA**, N-Metil-D-Aspartato; **TNF**, Factor de necrosis tumoral; **NOS**, Óxido nítrico sintasa inducible; **MCP**, Proteína quimioatrayente de macrófagos; **ICAM**, Molécula de adhesión intercelular 1; **VCAM**, Molécula de adhesión de células vasculares; **LCR**, Líquido cefalorraquídeo; **MAPK**, Proteína quinasa activada por mitógenos; **NF-κB**, Factor nuclear kappa B; **AP-1**, Proteína activadora 1; **SDF**, Factor derivado de células del estroma; **COX**, Prostaglandina endoperoxidasa sintasa H o ciclooxigenasa; **TX**, tromboxano; **AINes**, Fármacos antiinflamatorios no esteroideos; **CREB**, Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc; **NFAT**, Factor nuclear de células activadas.

complejo demencia sida (CDS) en adultos y encefalopatía en niños (EP). Aunque la introducción de la TARGA ha prolongado y mejorado la vida de los individuos infectados, parece claro que la terapia antirretroviral no proporciona una protección completa frente al daño neurológico observado en esta enfermedad. La demencia-VIH es un complejo fenómeno que aparece como resultado de varios mecanismos causados por múltiples mediadores utilizando diferentes vías de señalización intracelular. Ya que el VIH no parece infectar masivamente a las neuronas, el daño neuronal es probablemente inducido por factores solubles entre los que se incluyen proteínas virales (gp120 y Tat principalmente), citocinas proinflamatorias, quimiocinas y prostaglandinas liberadas por macrófagos cerebrales infectados y células de la microglía activadas y/o infectadas. Estos factores solubles son además los responsables de la activación de células no infectadas aumentando y perpetuando de este modo el daño cerebral. Es pues necesario que la terapia esté dirigida no solo a limitar la infección de la microglía sino también la producción de estos mediadores inflamatorios y la activación de los astrocitos, para poder disminuir el daño neuronal observado en esta enfermedad.

Palabras clave: Sistema Nervioso.- Inflamación.- VIH.- Citocinas.- Neurodegeneración.

ABSTRACT

Inflammation and HIV-neuropatogenicity

Brain HIV-1-infection may result in a syndrome of profound cognitive, behavioural and motor impairment known as AIDS dementia complex (ADC) in adults and HIV-related encephalopathy in children. Although the introduction of HAART has prolonged and improved the lives of infected individuals, it is clear that HAART does not provide complete protection against neurological damage in HIV/AIDS. HIV-associated dementia is a complex phenomenon, which could be the result of several mechanisms caused by those players using different intracellular signalling pathways. Since HIV-1 does not easily infect neuronal cells, neuronal damage is likely to be induced by soluble factors including viral proteins, proinflammatory cytokines, chemokines or prostaglandins released by HIV-1-infected macrophages or microglial cells. These soluble factors are also responsible for activation of uninfected cells and, thus, for spreading and perpetuation of brain damage. Thus, it is necessary an antiretroviral therapy that not only inhibit microglia infection, but also diminish pro-inflammatory factors and astrocytic activation to reduce neuronal damage.

Key words: Central Nervous System.- Inflammation.- HIV.- Cytokines.- Neurodegeneration.

ENCEFALOPATÍA-VIH O COMPLEJO DEMENCIA SIDA

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), al igual que otros lentivirus, se caracteriza por su tendencia a causar enfermedad neurológica crónica en el huésped. Por tanto, las complicaciones neurológicas en la infección por el VIH son frecuentes y no se limitan a infecciones oportunistas, pudiendo afectar a cualquier nivel del sistema nervioso, incluyendo cerebro, meninges, médula espinal, nervios y músculos. Tres factores esenciales intervienen en la infección del sistema nervioso central (SNC) por el VIH: el propio virus, el SNC y el sistema inmune. La acción del VIH en las alteraciones del SNC se debe a su neuropenetrancia o propiedad de penetración del virus en el SNC, su neurotropismo o capacidad de infectar diversas células del sistema nervioso y a su neurovirulencia o capacidad de ocasionar patología (1).

PATOGENIA DE LA ENCEFALOPATÍA ASOCIADA AL VIH

Aunque la introducción de la terapia antirretroviral de gran actividad o TARGA ha reducido la incidencia del complejo-demencia SIDA (CDS) (2), el daño neurológico asociado a la infección por el VIH continúa siendo un grave problema clínico entre individuos con una infección prolongada (3). Las pautas de tratamiento actuales recomiendan el inicio de la TARGA cuando se observa un descenso importante en el número de células TCD4+, lo que puede ocurrir varios años después de la infección primaria. En este caso, la TARGA no inhibiría en ningún caso la llegada del virus al SNC que según se ha descrito se produce durante la primoinfección, permitiendo que el virus permanezca en esta localización durante años (4).

La causa principal de la patogenia del CDS es desconocida, pero como la infección productiva del VIH en el SNC ocurre mayoritariamente en microglía y macrófagos cerebrales, se cree que estos tipos celulares son los que desempeñan el principal papel en el desarrollo de anormalidades neurológicas. Tradicionalmente, el CDS se ha relatado como consecuencia de daño o disfunción neuronal resultante de la

liberación de sustancias neurotóxicas por parte de la microglía infectada (5) o de modo alternativo por la interacción neuronal con proteínas virales secretadas o expresadas por células infectadas.

La combinación de factores como la infección de microglía y la activación de células inmunocompetentes explicaría el hecho de que en muchas ocasiones el grado de demencia no correlacione con la carga viral y sí, por ejemplo, con el nivel de monocitos circulantes. De este modo, la replicación viral parece ser necesaria pero no suficiente para que se produzca la enfermedad.

Resulta paradójico el hecho de que las variantes virales mayoritarias aisladas de cerebro de pacientes VIH con alteraciones neurológicas sean variantes monocitotrópicas (R5/NSI) (6), y sin embargo, en adultos la definición de enfermedad a nivel clínico tiene lugar cuando el fenotipo viral mayoritario es IS/X4. A pesar de la presencia mayoritaria de cepas R5 en el cerebro, el papel que desempeñan los virus X4 en el desarrollo y la evolución de la demencia-VIH se desconoce.

Por otro lado, parece cada vez más evidente que el CDS tiene una etiología inflamatoria. En condiciones fisiológicas normales, existe una comunicación bidireccional entre el sistema nervioso e inmunológico, que se refleja por la liberación de moléculas solubles o citocinas por células inmunocompetentes, o bien hormonas y neurotransmisores del sistema neuroendocrino. En la demencia-VIH se ha detectado una activación de células fagocíticas que conduce a niveles elevados de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, así como la presencia de prostaglandinas (PGs) y óxido nítrico (NO) que modulan la supervivencia y función neuronal (7).

Aunque no existe un claro consenso sobre los mecanismos directamente responsables de neuropatogénesis inducida por el VIH, actualmente predominan 2 hipótesis. En primer lugar, las proteínas virales podrían ser las principales responsables del daño neuronal observado en la enfermedad aunque se necesitaría la cooperación de células no-neuronales. De manera alternativa, la apoptosis neuronal podría resultar de la secreción de sustancias neurotóxicas bien por la microglía o por macrófagos cerebrales en respuesta a la infección, o por activación

inmune. En principio estas dos teorías no son excluyentes y existen datos que apoyan a ambas (8).

ENTRADA DEL VIRUS EN EL SISTEMA NERVIOSO

El VIH atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) y penetra en el sistema nervioso precozmente en un periodo de tiempo que va entre pocos días a semanas postinfección en la periferia (9), probablemente de forma concomitante a la infección sistémica inicial, mediante la hipótesis denominada *Caballo de Troya*, es decir, transportado al SNC en macrófagos infectados. Aunque esta hipótesis es la más comúnmente admitida, en realidad no explica el por qué se produce una migración de células infectadas a través de la BHE. Parece ser que proteínas virales podrían inducir la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión que favoreciesen esta migración selectiva.

CÉLULAS DIANA EN EL SISTEMA NERVIOSO

Macrófagos/microglía.

Existen numerosas evidencias de que en el tejido nervioso la principal diana del VIH son los macrófagos perivasculares y la microglía (10). Así, la replicación del VIH-1 se ha demostrado en numerosas ocasiones tanto en cultivos primarios de microglía aislados de adultos (11) como del SNC fetal humano (12). La infección de la microglía conduce a la formación de sincitios, indicando que la infección por VIH puede asociarse con efectos citopáticos sobre este tipo celular (13). El receptor CD4 y el correceptor CCR5 son utilizados por el virus en la infección de este tipo celular (14, 15).

Astrocitos.

Se han usado varios sistemas de cultivos celulares, incluyendo astrocitos fetales primarios así como líneas tumorales para estudiar la infección e interacciones de VIH-1 con estas células. Al contrario de lo que ocurre en la infección de células CD4+, la infección de los astrocitos

por el VIH no ocasiona un efecto citopático claro. Varios estudios han demostrado que la entrada del VIH-1 en este tipo celular es independiente de CD4 (16) y receptores de quimiocinas (17), habiéndose propuesto varios receptores potenciales. Entre ellos los más importantes son la galactosil-ceramida (18) y más recientemente, el receptor de manosa humano (RMh) (19). El RMh se ha propuesto como mediador de procesos de endocitosis, aunque no está claro si esto representa un mecanismo general de entrada del VIH-1 en el astrocito.

Después de una infección aguda inicial de este tipo celular (2-7 días), la producción viral disminuye a niveles muy bajos o indetectables. Esta infección latente puede activarse temporalmente por tratamiento con citocinas inflamatorias (20). Este hecho sugiere que los astrocitos infectados pueden transmitir el virus a otras células desempeñando un papel importantísimo como reservorios.

Neuronas.

Se desconoce con exactitud si las células neuronales pueden infectarse por el VIH, aunque nuestro grupo ha demostrado que existen transcritos de VIH en neuronas inmaduras (21) y que líneas de neuroblastoma son infectadas por VIH-1 (22). Sin embargo, ni las neuronas primarias ni la mayoría de líneas celulares neuronales expresan CD4 (23), ni anticuerpos contra CD4 son capaces de bloquear la infección neuronal (22). Asimismo, se ha descartado que los receptores de quimiocinas estén implicados en la infección neuronal por el VIH-1 en este tipo celular (22).

De este modo, aunque el daño neuronal observado en esta enfermedad no parece debido a la infección directa por el VIH, lo cierto es que la pérdida neuronal en estos pacientes es muy común probablemente debido a neurotoxinas y mediadores solubles producidos por otros tipos celulares. Así, se ha descrito que la apoptosis neuronal correlaciona con la activación microglial y el daño axonal (24), sugiriendo que los mediadores secretados especialmente por la microglía juegan un papel fundamental en el inicio de las cascadas apoptóticas.

MEDIADORES INFLAMATORIOS ASOCIADOS A LA NEUROPATHOGENIA DE VIH

Efectos patogénicos de proteínas virales.

Tanto factores virales como celulares pueden contribuir a la neuropatogenicidad del VIH-1. Así por ejemplo, ciertas proteínas virales son neurotóxicas como resultado de las interacciones directas con las neuronas o estimulando la producción de factores neurotóxicos por las células gliales (25). Las fuentes potenciales de proteínas virales en el cerebro son las partículas de virus libre y las células infectadas. Las células productivamente infectadas, como la microglía, son la principal fuente de proteínas estructurales, como las proteínas de la envuelta viral, mientras que las células con una replicación en cierta medida restringida, como los astrocitos, son la principal fuente de factores reguladores.

Proteína gp120.

La glicoproteína gp120 del VIH-1 afecta tanto directa como indirectamente a la viabilidad y/o funcionalidad neuronal (26). Así, se ha descrito que la exposición de los astrocitos a la gp120 compromete su capacidad de captar glutamato del medio, lo que conduciría a un aumento del mismo en la vecindad de la célula neuronal alterando la transmisión sináptica. Además, esta proteína altera la expresión génica en astrocitos (27) y neuronas (26), sugiriendo cambios en las funciones celulares que contribuye al daño neuronal. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que la gp120 causa muerte neuronal no se conoce totalmente, habiéndose descrito multitud de vías por las que se induce daño como peroxidación lipídica (28), activación de p53 (29), activación de la cascada del ácido araquidónico (30), activación de receptores tipo NMDA (N-Metil-D-Aspartato) y producción de NO (31). Además, parece que la interacción con receptores de quimiocinas puede inducir FasL y TNF que de modo autocrino induciría apoptosis neuronal contribuyendo a la aparición de alteraciones neurológicas (32).

Proteína Tat.

A pesar de que la proteína Tat es capaz de modular la expresión de numerosos genes celulares (33), su principal función consiste en

transactivar la transcripción de los ARNs virales, lo que permite una correcta replicación viral (34). Tat es además activamente secretada por células infectadas en pacientes con CDS (35, 36), habiéndose detectado Tat extracelular en cerebros de pacientes con demencia-VIH y encefalitis (37). Se ha comprobado que ratones que expresan Tat en astrocitos también muestran síntomas neurológicos similares a aquellos asociados con la infección a nivel cerebral en humanos (38). En astrocitos, Tat induce la producción de varios mediadores inflamatorios, principalmente TNF que promueve inflamación a nivel cerebral (39). Además, se ha encontrado que la expresión intracelular de Tat en astrocitos es capaz de activar la expresión de la óxido nítrico sintasa (iNOS) e incrementar la producción de NO (40).

Tanto Tat intracelular como extracelular puede causar neurotoxicidad por varios mecanismos que interfieren con el normal funcionamiento de las células gliales y neuronales (41). Tat extracelular puede inducir neurotoxicidad por inducción de estrés oxidativo, daño mitocondrial y/o iniciación de cascadas inflamatorias (38).

Tat puede presentar también actividad quimiotáctica, aumentando la infiltración de monocitos en el cerebro al incrementar la producción de MCP-1 y moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 por parte de los astrocitos (42).

Citocinas.

Como se ha mencionado anteriormente, la infección de macrófagos cerebrales y microglía parece ser el principal responsable del daño neuronal y muerte (43) observado en CDS. Esta infección de la microglía tiene como resultado la activación celular y producción de neurotoxinas responsables de la muerte neuronal, de modo que se explica el que células infectadas normalmente no colocalizan con neuronas muertas. Estos factores neurotóxicos solubles incluyen citocinas, aminoácidos excitatorios, eicosanoides y especies reactivas de oxígeno.

Las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β juegan un importantísimo papel en la inducción de daño neuronal en la demencia asociada al SIDA. Sin embargo, a pesar de ser consideradas tradicionalmente neurotóxicas, ambas moléculas también presentan

efectos neuroprotectores mostrando que las causas de las alteraciones neurológicas son en la mayoría de los casos multifactoriales.

Se han descrito concentraciones alteradas de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α y la presencia de metabolitos neurotóxicos como el ácido quinolínico en suero y LCR de pacientes con SIDA pediátricos y adultos (44). Además parece que el TNF aumenta la permeabilidad de la BHE permitiendo una mayor invasión del VIH-1 al cerebro (45), al igual que la expresión de ICAM, VCAM y E-selectina en astrocitos y células endoteliales permitiendo la migración de monocitos/macrófagos al SNC.

El VIH ejerce múltiples efectos sobre la producción de citocinas *in vivo* e *in vitro*, tanto directos, debidos a la infección celular o a la unión del virus a la membrana celular, como indirectos, mediados por la respuesta a la infección por el VIH. A nivel molecular, TNF ejerce su acción a través de una cascada de señales, entre la que se encuentran implicados múltiples segundos mensajeros como las quinasas MAPK o IKK (46). La activación de estas quinasas resulta en la activación de diversos factores de transcripción, siendo los más importantes NF- κ B y AP-1 conduciendo a la inducción transcripcional de genes proinflamatorios e inmunomoduladores (47). El TNF también puede inducir apoptosis en algunos tipos celulares a través de uno de sus receptores, aunque parecen existir factores celulares que pueden contrarrestar esta actividad apoptótica.

Quimiocinas.

El comprender el modo de actuación que tienen las quimiocinas es bastante complejo, desde el momento en que una misma quimiocina es capaz de unirse a más de un receptor y un receptor puede unir varias quimiocinas (48).

El receptor de β -quimiocinas CCR5, se expresa en neuronas, microglía, astrocitos y células endoteliales (49). Así se ha demostrado en cultivos mixtos *in vitro* que la unión de las β -quimiocinas al CCR5 protege a las neuronas de la apoptosis inducida por la gp120. Se ha descrito que varias quimiocinas, al igual que anticuerpos monoclonales anti-CCR3 pueden inhibir la infección de la microglía por aislados que utilizan estos correceptores. El mecanismo por el cual las quimiocinas

pueden inhibir la infección por el VIH puede deberse a varios factores: 1) inhibición competitiva con la gp120 viral por la unión al correceptor; 2) disminución de la expresión de los correceptores; 3) señalización intracelular que altera la replicación viral, expresión de genes virales, u otros pasos en el ciclo viral (50, 51). Por otro lado, se han encontrado valores elevados de MCP-1, RANTES o ambas en LCR de pacientes VIH y estos niveles han correlacionado con el grado de encefalitis y demencia (52).

La α -quimiocina SDF (también denominada CXCL12) desempeña un papel fundamental en la regulación del tráfico, migración, proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas (53-55). Se expresa ampliamente en cerebro y de manera específica se ha localizado en astrocitos y neuronas (56, 57). Además, se ha propuesto que el SDF participa en el mantenimiento de la homeostasis cerebral y la coordinación de la actividad neuronal e inmune (58). El receptor para SDF es el CXCR4, que se expresa en macrófagos, microglía, células endoteliales y en subpoblaciones de neuronas y astrocitos de varias regiones cerebrales (14). Recientemente, se ha descrito la capacidad del CXCR4 de mediar directamente muerte neuronal en CDS al unirse a la proteína gp120, proceso que parece ser determinante en el desarrollo de la enfermedad (59, 60). Por otro lado, la interacción del SDF con el CXCR4 produce numerosos efectos funcionales como movilización de calcio, proliferación de astrocitos y activación microglial (61, 62) (Figura 1).

Prostaglandina Endoperóxido Sintasa H.

Las prostaglandinas endoperóxido sintasas H o ciclooxigenasas (COX) son las enzimas limitantes en la síntesis de PGs y tromboxanos (TXs). Existen dos isoformas (COX-1 y COX-2) (63, 64), que difieren en términos de genética, bioquímica y función. COX-1 se expresa de forma constitutiva en muchos órganos y se piensa que está relacionada con la síntesis de prostanoides en funciones homeostáticas, mientras que COX-2 generalmente es inducible por varios estímulos asociados con activación celular e inflamación. La actividad enzimática de ambas isoformas de COX es inhibida por la aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (65).

Niveles elevados de COX-2, y metabolitos del ácido araquidónico como PGE_2 , se han implicado en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, esclerosis múltiple además de en CDS (66). Además, se ha demostrado la correlación positiva entre la disfunción cognitiva, y la desregulación del ciclo celular neuronal en un modelo de ratones transgénicos sobreexpresando COX-2 (67).

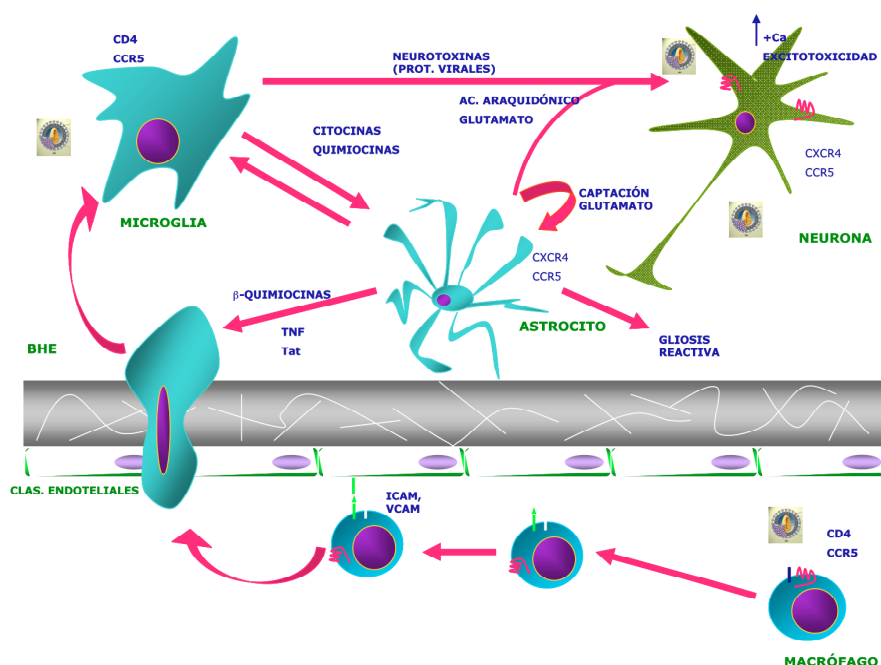


FIGURA 1.- **Mecanismo de neuropatogénesis.** Los macrófagos infectados y la microglía participan activamente en la neurodegeneración por varios mecanismos: 1) liberación de proteínas virales y 2) secreción de citocinas y quimiocinas en el SNC. Quimiocinas, Tat y TNF contribuyen al daño en la BHE permitiendo la llegada de nuevas células infectadas al SNC. Las citocinas proinflamatorias secretadas activan a la microglía y los astrocitos que secretan más neurotoxinas que pueden alterar funciones del astrocito básicas para el mantenimiento de una buena homeostasis cerebral. El daño neuronal es multifactorial: neurotoxinas secretadas por diferentes tipos celulares y activación de la microglía y los astrocitos tienen como consecuencia el daño neuronal.

Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que citocinas como la IL-1 β y el TNF en cultivos de macrófagos, microglía y astrocitos, pueden ejercer parte de sus efectos neurotóxicos a través de la activación de enzimas como la COX-2, acompañada de la acumulación de PGE₂, que conduce a apoptosis de las células neuronales (68). Por otro lado, parece que la liberación de glutamato por parte de los astrocitos puede ser modificada por PGs, sugiriendo que la relación glía-neurona puede verse alterada por cambios en la concentración de esta molécula (69).

A pesar de la evidencia cada vez mayor de la implicación de COX-2 en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, existen pocos datos sobre la expresión de la misma en la encefalopatía VIH y su papel en la patogénesis de esta enfermedad (70-72).

Regulación de la expresión de COX-2.

En cuanto a la expresión de COX-2 en el SNC existen varios trabajos que apuntan a una localización exclusivamente neuronal (73) y por otro lado existen datos de que tanto el ARNm como la propia proteína se han detectado tanto en neuronas corticales como en astrocitos (74).

La regulación de la síntesis de COX-2 ocurre tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional regulando la estabilidad del ARNm (64). Además, dependiendo del tipo celular y del estímulo usado, diferentes factores de transcripción parecen ser los responsables de la inducción de COX-2. Estudios de su regulación transcripcional han demostrado la implicación de los factores de transcripción, CREB (cyclic AMP responsive element binding factor), AP-1, NF- κ B (64), o NFAT en células T y células endoteliales (75). Recientemente, nuestro grupo ha descrito que la inducción de la COX-2 en respuesta a gp120 en células neuronales está mediada por la activación de NF- κ B y AP-1 (76), mientras que en astrocitos el factor de transcripción implicado en la inducción de COX-2 es básicamente el NF- κ B (72).

Por otro lado, tras la activación de CXCR4, receptor de gp120, por su ligando natural SDF, se induce TNF (77); en astrocitos, el TNF induce COX-2 y PGE₂ que incrementa de modo autocrino/paracrino el Ca²⁺ intracelular y la toxicidad asociada al glutamato. Podría existir de este modo, una interacción entre diferentes tipos celulares del SNC con gp120 (o SDF)/COX-2 y moléculas inflamatorias a varios niveles que

constituiría una de las bases de la neurodegeneración asociada al VIH-1 (78). Asimismo, inhibidores específicos de la COX-2 bloquean la replicación viral y reducen la expresión génica viral debido a una disminución de los niveles de PGE₂ (79). Esto es interesante desde el momento en que en otros sistemas se han relacionado directamente los niveles de PGE₂ con el aumento de replicación de diferentes virus como el RSV (80), o el virus de la pseudorrabia (81).

CONCLUSIÓN

La infección por el VIH induce una respuesta inflamatoria debida a la activación celular de la microglía, macrófagos cerebrales y astrocitos, que a su vez producen mediadores inflamatorios que resultan ser neurotóxicos. Así, las células neuronales van a ver alterada su función y su viabilidad por estas sustancias. Además, las neuronas pueden aumentar el proceso inflamatorio produciendo a su vez más neurotoxinas. No es sorprendente que una reacción inflamatoria de este tipo en un tiempo prolongado resulte en neurodegeneración. Como se ha visto a lo largo de este trabajo, el proceso de neurodegeneración es multifactorial, de modo que la terapia dirigida contra uno solo de los factores que participan en el desarrollo de la enfermedad no asegura en absoluto neuroprotección. Así, es necesario no solamente limitar la producción de mediadores inflamatorios si no también la activación de diferentes tipos celulares que intervienen en este proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) SEILHEAN, D. ET AL. (1998) Pathophysiology of HIV-1 infection of the nervous system and AIDS-related dementia. *Rev. Neurol. (Paris)*. 154: 830-42.
- (2) KANDANEARATCHI, A.; WILLIAMS, B. AND EVERALL, I.P. (2003) Assessing the efficacy of highly active antiretroviral therapy in the brain. *Brain Pathol.* 13: 104-10.
- (3) SACKTOR, N. ET AL. (2002) HIV-associated cognitive impairment before and after the advent of combination therapy. *J. Neurovirol.* 8: 136-42.

- (4) BELL, J. E. (2004) An update on the neuropathology of HIV in the HAART era. *Histopathology*. 45: 549-59.
- (5) GIULIAN, D.; VACA, K. AND NOONAN, C. A. (1990) Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science*. 250: 1593-6.
- (6) GHORPADE, A. ET AL. (1998) Human immunodeficiency virus neurotropism: an analysis of viral replication and cytopathicity for divergent strains in monocytes and microglia. *J. Virol*. 72: 3340-50.
- (7) POWER, C.; GILL, M. J. AND JOHNSON, R. T. (2002) Progress in clinical neurosciences: The neuropathogenesis of HIV infection: host-virus interaction and the impact of therapy. *Can. J. Neurol. Sci*. 29: 19-32.
- (8) JONES, G. AND POWER, C. (2006) Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection. *Neurobiol. Dis*. 21: 1-17.
- (9) DAVIS, L. E. ET AL. (1992) Early viral brain invasion in iatrogenic human immunodeficiency virus infection. *Neurology*. 42: 1736-9.
- (10) ANDERSON, E. ET AL. (2002) HIV-1-associated dementia: a metabolic encephalopathy perpetrated by virus-infected and immune-competent mononuclear phagocytes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 31: S43-54.
- (11) ALBRIGHT, A.V. ET AL. (2000) Characterization of cultured microglia that can be infected by HIV-1. *J. Neurovirol*. 6: S53-60.
- (12) MCCARTHY, M.; HE, J. AND WOOD, C. (1998) HIV-1 strain-associated variability in infection of primary neuroglia. *J. Neurovirol*. 4: 80-9.
- (13) STRIZKI, J. M. ET AL. (1996) Infection of primary human microglia and monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 isolates: evidence of differential tropism. *J. Virol*. 70: 7654-62.
- (14) VALLAT, A. V. ET AL. (1998) Localization of HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 in the brain of children with AIDS. *Am. J. Pathol*. 152: 167-78.
- (15) SHIEH, J. T. ET AL. (1998) Chemokine receptor utilization by human immunodeficiency virus type 1 isolates that replicate in microglia. *J. Virol*. 72: 4243-9.
- (16) HAROUSE, J. M. ET AL. (1989) CD4-independent infection of human neural cells by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 63: 2674-9.
- (17) SCHWEIGHARDT, B.; SHIEH, J. T. AND ATWOOD, W. J. (2001) CD4/CXCR4-independent infection of human astrocytes by a T-tropic strain of HIV-1. *J. Neurovirol*. 7: 155-62.
- (18) HAROUSE, J. M. ET AL. (1991) Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science*. 253: 320-3.
- (19) LIU, Y. ET AL. (2004) CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J. Virol*. 78: 4120-33.

- (20) SABRI, F. ET AL. (1999) Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection of human fetal astrocytes: independence from CD4 and major chemokine receptors. *Virology*. 264: 370-84.
- (21) CANTO-NOGUES, C. ET AL. (2005) HIV-1 infection of neurons might account for progressive HIV-1-associated encephalopathy in children. *J. Mol. Neurosci*. 27: 79-89.
- (22) ALVAREZ LOSADA, S.; CANTO-NOGUES, C. AND MUNOZ-FERNANDEZ, M. A. (2002) A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells. *Neurobiol. Dis.* 11: 469-78.
- (23) ENSOLI, F. ET AL. (1995) HIV-1 infection of primary human neuroblasts. *Virology*. 210: 221-5.
- (24) ADLE-BIASSETTE, H. ET AL. (1999) Neuronal apoptosis does not correlate with dementia in HIV infection but is related to microglial activation and axonal damage. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25: 123-33.
- (25) ALBRIGHT, A. V.; SOLDAN, S. S. AND GONZALEZ-SCARANO, F. (2003) Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J. Neurovirol.* 9: 222-7.
- (26) XU, Y. ET AL. (2004) HIV-1-mediated apoptosis of neuronal cells: Proximal molecular mechanisms of HIV-1-induced encephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 7070-5.
- (27) GALEY, D. ET AL. (2003) Differential transcriptional regulation by human immunodeficiency virus type 1 and gp120 in human astrocytes. *J. Neurovirol.* 9: 358-71.
- (28) CORASANITI, M. T. ET AL. (1998) Requirement for membrane lipid peroxidation in HIV-1 gp120-induced neuroblastoma cell death. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 246: 686-9.
- (29) YEUNG, M. C. ET AL. (1998) Inhibition of HIV-1 gp120-induced apoptosis in neuroblastoma SK-N-SH cells by an antisense oligodeoxynucleotide against p53. *Aids*. 12: 349-54.
- (30) MACCARRONE, M. ET AL. (1998) Cytotoxic effect of HIV-1 coat glycoprotein gp120 on human neuroblastoma CHP100 cells involves activation of the arachidonate cascade. *Biochem. J.* 333: 45-9.
- (31) CORASANITI, M. T. ET AL. (1995) Death of cultured human neuroblastoma cells induced by HIV-1 gp120 is prevented by NMDA receptor antagonists and inhibitors of nitric oxide and cyclooxygenase. *Neurodegeneration*. 4: 315-21.
- (32) WHITE, F. A.; BHANGOO, S. K. AND MILLER, R. J. (2005) Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 4: 834-44.
- (33) HUIGEN, M. C.; KAMP, W. AND NOTTET, H. S. (2004) Multiple effects of HIV-1 trans-activator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Eur. J. Clin. Invest.* 34: 57-66.
- (34) PERUZZI, F. (2006) The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis. *Front. Biosci.* 11: 708-17.

- (35) NATH, A. (2002) Human immunodeficiency virus (HIV) proteins in neuropathogenesis of HIV dementia. *J. Infect. Dis.* 186: S193-8.
- (36) CHAUHAN, A. ET AL. (2003) Intracellular human immunodeficiency virus Tat expression in astrocytes promotes astrocyte survival but induces potent neurotoxicity at distant sites via axonal transport. *J. Biol. Chem.* 278: 13512-9.
- (37) HUDSON, L. ET AL. (2000) Detection of the human immunodeficiency virus regulatory protein tat in CNS tissues. *J. Neurovirol.* 6: 145-55.
- (38) KIM, B. O. ET AL. (2003) Neuropathologies in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 Tat protein under the regulation of the astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein promoter and doxycycline. *Am. J. Pathol.* 162: 1693-707.
- (39) PU, H. ET AL. (2003) HIV-1 Tat protein upregulates inflammatory mediators and induces monocyte invasion into the brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 24: 224-37.
- (40) LIU, X. ET AL. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat induces nitric-oxide synthase in human astroglia. *J. Biol. Chem.* 277: 39312-9.
- (41) Mattson, M. P.; Haughey, N. J. and Nath, A. (2005) Cell death in HIV dementia. *Cell. Death Differ.* 12: 893-904.
- (42) WOODMAN, S. E. ET AL. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 TAT protein induces adhesion molecule expression in astrocytes. *J. Neurovirol.* 5: 678-84.
- (43) KAUL, M.; GARDEN, G. A. AND LIPTON, S. A. (2001) Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature.* 410: 988-94.
- (44) MCCOIG, C. ET AL. (2004) Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of proinflammatory mediators in human immunodeficiency virus-infected children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23: 114-8.
- (45) FIALA, M. ET AL. (1997) TNF-alpha opens a paracellular route for HIV-1 invasion across the blood-brain barrier. *Mol. Med.* 3: 553-64.
- (46) WALLACH, D. ET AL. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 331-67.
- (47) WALLACH, D., ET AL. (1996) Exploring cell death mechanisms by analyzing signaling cascades of the TNF/NGF receptor family. *Behring Inst. Mitt.* 97: 144-55.
- (48) ROSSI, D. AND ZLOTNIK, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 217-42.
- (49) HESSELGESSER, J. AND HORUK, R. (1999) Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. *J. Neurovirol.* 5: 13-26.
- (50) BERGER, A. R., ET AL. (1999) Prevalence of peripheral neuropathy in injection drug users. *Neurology.* 53: 592-7.

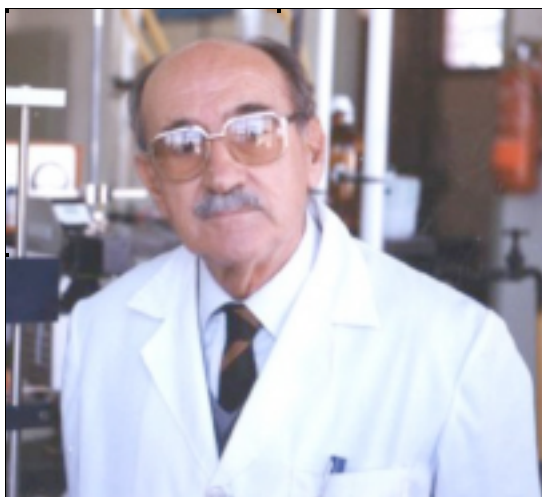
- (51) GORDON, C. J., ET AL. (1999) Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by the CC-chemokine RANTES is independent of the mechanism of virus-cell fusion. *J. Virol.* 73: 684-94.
- (52) CONANT, K., ET AL. (1998) Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 3117-21.
- (53) BLEUL, C. C., ET AL. (1996) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 184: 1101-9.
- (54) AIUTI, A., ET AL. (1997) The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185: 111-20.
- (55) LATAILLADE, J. J., ET AL. (2000) Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood.* 95: 756-68.
- (56) GLEICHMANN, M., ET AL. (2000) Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 12: 1857-66.
- (57) STUMM, R. K., ET AL. (2002) A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J. Neurosci.* 22: 5865-78.
- (58) KLEIN, R. S. AND RUBIN, J. B. (2004) Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol.* 25: 306-14.
- (59) BARDI, G., ET AL. (2006) Human immunodeficiency virus gp120-induced apoptosis of human neuroblastoma cells in the absence of CXCR4 internalization. *J. Neurovirol.* 12: 211-8.
- (60) KAUL, M., ET AL. (2007) HIV-1 coreceptors CCR5 and CXCR4 both mediate neuronal cell death but CCR5 paradoxically can also contribute to protection. *Cell. Death Differ.* 14: 296-305.
- (61) PENG, H., ET AL. (2004) Stromal cell-derived factor 1-mediated CXCR4 signaling in rat and human cortical neural progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* 76: 35-50.
- (62) BONAVIA, R., ET AL. (2003) Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicol. Lett.* 139: 181-9.
- (63) VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S. AND BOTTING, R. M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 97-120.

- (64) SMITH, W. L.; DEWITT, D. L. AND GARAVITO, R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 145-82.
- (65) WILLIAMS, C. S.; MANN, M. AND DUBOIS, R. N. (1999) The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.* 18: 7908-16.
- (66) GRIFFIN, D. E.; WESSELINGH, S. L. AND MCARTHUR, J. C. (1994) Elevated central nervous system prostaglandins in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann. Neurol.* 35: 592-7.
- (67) MIRJANY, M.; HO, L. AND PASINETTI, G. M. (2002) Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 494-500.
- (68) TAKADERA, T. AND OHYASHIKI, T. (2006) Prevention of rat cortical neurons from prostaglandin E2-induced apoptosis by glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Neurosci. Lett.* 400: 105-9.
- (69) VESCE, S., ET AL. (2007) Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int. Rev. Neurobiol.* 82: 57-71.
- (70) FLORA, G., ET AL. (2006) Cyclooxygenase-2 is involved in HIV-1 Tat-induced inflammatory responses in the brain. *Neuromolecular Med.* 8: 337-52.
- (71) ALVAREZ, S., ET AL. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein 120 induces cyclooxygenase-2 expression in neuroblastoma cells through a nuclear factor-kappaB and activating protein-1 mediated mechanism. *J. Neurochem.* 94: p. 850-61.
- (72) ALVAREZ, S., ET AL. (2007) HIV-1 envelope glycoprotein 120 induces cyclooxygenase-2 expression in astrocytoma cells through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Neuromolecular Med.* 9: 179-93.
- (73) KAUFMANN, W. E., ET AL. (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 2317-21.
- (74) O'BANION, M. K. AND YOUNG, D. A. (1991) Bovine papillomavirus type 1 alters the processing of host glucose- and calcium-modulated endoplasmic reticulum proteins. *J. Virol.* 65: 3481-8.
- (75) INIGUEZ, M. A., ET AL. (2000) An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 275: 23627-35.
- (76) ALVAREZ, S., ET AL. (2005) Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein 120 induces cyclooxygenase-2 expression in neuroblastoma cells through a nuclear factor-kappaB and activating protein-1 mediated mechanism. *J. Neurochem.* 94: 850-61.

- (77) BEZZI, P., ET AL. (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.* 4: 702-10.
- (78) ALLEN, N. J. AND ATTWELL, D. (2001) A chemokine-glutamate connection. *Nat. Neurosci.* 4: 676-8.
- (79) ZHU, H., ET AL. (2002) Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 3932-7.
- (80) LIU, T., ET AL. (2005) RSV-induced prostaglandin E2 production occurs via cPLA2 activation: role in viral replication. *Virology.* 343: 12-24.
- (81) RAY, N.; BISHOP, M. E. AND ENQUIST, L. W. (2004) Cyclooxygenase-1 and -2 are required for production of infectious pseudorabies virus. *J. Virol.* 78: 12964-74.

Necrológica

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Sr. Don Eduardo Primo Yúfera.



El Excmo. Señor Don Eduardo Primo Yúfera nació el 1 de abril de 1918 en Mazarrón, Murcia. Tomó posesión como Académico de Honor el día 12 de diciembre de 2002. Falleció el día 28 de octubre de 2007. La Sesión Necrológica se celebró el día 17 de abril de 2008, coordinada por la Excma. Sra. Dña. Ana M^a Pascual-Leone Pascual, Vicepresidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia, con la intervención de los señores D. José Pío Beltrán Porter, D. Vicente Conejero Tomás, D. Juan Juliá Igual y de la Excma. Sra. Dña. Ana M^a Pascual-Leone Pascual. Fue presidida por la Excma. Señora Doña María Teresa Miras Portugal, Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

El Profesor Primo Yúfera y la I+D+i.

José Pío Beltrán Porter.

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excma. Sra. Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Excmo. Sr. Rector Magnífico de la Universidad Politécnica de Valencia.
Excmas. y Excmos. Académicos.
Familiares y amigos de Don Eduardo Primo Yúfera.
Señoras y Señores.

El *Curriculum vitae* del Profesor Primo Yúfera, que fue Académico de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia, es de sobra conocido y de fácil acceso. Por esta razón, en mi intervención de hoy he preferido ceñirme a sus contribuciones a la I+D+i desde una óptica personal, perspectiva que ha ido dibujando en mi cabeza un retrato de Don Eduardo que hoy quisiera compartir con ustedes.

Conocí al Profesor Primo Yúfera, a Don Eduardo, siendo yo un adolescente, como consecuencia del traslado de mi familia a una vivienda sita en el número 9 de la calle Jaume Roig de Valencia. Se trataba de un edificio denominado, coloquialmente, la finca de los químicos, en cuya fachada permanece anclada una escultura de su Patrón, San Alberto Magno. No podía imaginar que Eduardo Primo, aquel químico que había cumplido la cuarentena y que era padre de mis amigos de escalera, Eduardo y Jaime, acompañaría, de una manera u otra toda mi vida profesional. De hecho, Primo Yúfera ocupa un lugar entre el puñado de profesores que han influido más en mi quehacer: José Beltrán Martínez, Catedrático de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia, Gary A. Strobel, profesor de la Montana State University y los profesores Heinz Saedler y Hans Sommer del Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung en Colonia.

Mis recuerdos sobre Primo Yúfera arrancan de aquella época. Por aquel entonces los bachilleres teníamos que superar las pruebas que se conocían como reválidas y que tenían lugar en los institutos de enseñanza media. Quizás influido por la seriedad de Don Pío Beltrán Villagrasa y por la dignidad de su profesión de catedrático de instituto, yo me vestía para aquellas pruebas de manera especial, como se hace para las ocasiones importantes. Recuerdo aquella mirada de Primo, incisiva y amable las más de las veces, mientras me preguntaba, no sin cierta guasa, dónde vas hoy “Petronio”, al verme vestido así en un día laborable; y recuerdo también su gesto de aprobación al conocer que era debido a la realización de un examen.

Supe que Primo Yúfera trabajaba sobre la química relacionada con los productos naturales en los sótanos de la Facultad de Ciencias, donde entonces se cursaban los estudios de Ciencias Químicas, y pronto escuché hablar del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Institución sita en Madrid a la que él pertenecía. De hecho fue el CSIC el que acabó con el solar de nuestros juegos de adolescentes, anejo a la finca de los químicos, para construir la que sería durante décadas la única sede física de la que dicha institución dispuso en Valencia: El Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, coloquialmente el IATA, que se inauguró en 1966. Para comprender la trascendencia que tuvo para Valencia la creación del IATA basta recordar que, en el momento de su creación, sólo era posible desarrollar una Tesis doctoral en los campos de la Química o de la Biología en un puñado de Departamentos universitarios, en general mal dotados y equipados, y tan solo en dos centros de investigación, el incipiente Instituto de Investigaciones Citológicas financiado por la caja de Ahorros de Valencia, dirigido por el profesor Jerónimo Forteza y dedicado a la investigación biomédica y, en segundo lugar, en el IATA. En pocas ocasiones, al hablar de “fundación” se unen tan íntimamente el fundador y lo fundado. El IATA fue producto en gran medida de la imaginación, concepción y consecución a nivel personal de los recursos materiales necesarios de su fundador Primo Yúfera.

Eduardo Primo fue discípulo del Premio Nobel de Medicina Tadeus Reichstein, a quién solicitó asesoramiento para la puesta en marcha del IATA que tomó modelo del Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel. La puesta en marcha del IATA y su concepción disciplinar, relacionando la Agroquímica y la Tecnología de los Alimentos treinta años antes de que fuera moneda corriente, sin duda constituyó la contribución más importante de Primo Yúfera al desarrollo de la I+D+i en el campo de la

Agroalimentación. En los laboratorios del IATA se desarrollaron investigaciones y avances tecnológicos con gran repercusión en las industrias agroalimentarias de los sectores de conservas vegetales, panadería o productos cárnicos. El IATA fue y es, escuela de iniciación a la investigación de un gran número de científicos y tecnólogos españoles y latinoamericanos. Baste recordar y tan solo de la época fundacional a miembros del IATA como Andrés Casas, Bernardo Lafuente, José Royo, Pascual Cuñat, Cristóbal Nebot, Luis Durán, Salvador Barber, Carmen Benedito, José Flores, Agustí Flors, Rafael Romero, Pedro Fito, Ignacio Fernández de Lucio, José Sala, José Luis Rubio, Vicente Conejero, José Luis García Martínez, Juan Carbonell, Ricardo Flores, Rafael Garro, Luis Navarro, Pedro Moreno, Joan Ribó o Sebastián Subirats entre otros muchos.

La gestión científico técnica del IATA estuvo inspirada por la de los Institutos Max-Planck, en los que dicha institución encomienda la total responsabilidad científica y económica a los directores de los institutos que ejercen toda la autoridad en la toma de decisiones, tanto en las cuestiones estratégicas como en las que se refieren al día a día. El profesor Primo tuvo la autoridad, la moral y la delegada, lo que le permitió dirigir las actividades del IATA con eficacia y éxitos sobresalientes.

Avanzado a su tiempo, Primo Yúfera investigó también la posibilidad de obtener energía para el transporte, lo que hoy llamamos biocombustibles, a partir de los residuos agrícolas y dedicó sus esfuerzos al estudio de la lucha biológica contra plagas, especialmente contra la mosca blanca de los cítricos; estudio que continuaría con éxitos notables hasta poco antes de su fallecimiento.

Personalmente, debo a la iniciativa de Primo Yúfera el haber tenido la posibilidad de iniciar una carrera científica sólida, ya que aceptó dirigir mi Tesis doctoral en el IATA sobre las alteraciones metabólicas ocasionadas por el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) y me situó bajo la directa responsabilidad de Juan Carbonell, discípulo de Alberto Sols, quien me enseñó las bases de la enzimología, así como de Vicente Conejero con quien aprendí los principios de la bioquímica de plantas.

De aquella época recuerdo dos anécdotas, una sucedió al principio y otra al finalizar mi Tesis doctoral. Unos meses después de mi incorporación al IATA fui llamado al despacho de Don Eduardo para comunicarme que me habían concedido una beca del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia. Escuetamente me dijo, para mi sorpresa e indignación en ese momento, que recibiría 10.000 pesetas al mes y *que me diera cuenta de que ese dinero no era suficiente para que buscara una novia y me casara, y añadió “sin embargo es más que suficiente para que te cortes el pelo y te afeites la barba”*. Eran los tiempos de las carreras delante de los “grises” por los recintos universitarios. Finalizada la Tesis y decidido el laboratorio americano donde quería realizar una estancia posdoctoral, solicité su opinión sobre si mi elección había sido la correcta, sobre todo pensando en la posibilidad de encontrar trabajo a mi vuelta. Me miró fijamente y me dijo, *“lo importante es que te especialices, que sigas aprendiendo, quién sabe a tu vuelta lo que será prioritario, ahora es más importante que no te equivoques al elegir esposa”*. De nuevo indignación por mi parte en ese momento. Este tipo de anécdotas constituyen los únicos recuerdos que tengo de haber recibido un trato especial por su parte, sin duda derivado del afecto que me tenía desde pequeño. Con el tiempo esos enfados se volvieron en agradecimiento de amigo.

Años después, a mi vuelta de Estados Unidos, Primo había dejado el IATA después de pasar por la Presidencia del CSIC y se había incorporado a la Cátedra de Bioquímica de la Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia. El director del IATA no consideró oportuno que diera un

seminario científico para explicar mis progresos americanos. Esta vez, tampoco me falló Primo, que aunque no me pudo ofrecer un trabajo sí que me escuchó atentamente, me felicitó por lo conseguido y se mostró dispuesto a que investigara en los laboratorios que había establecido en la Escuela de Agrónomos. No pude aceptar aquella oferta, ya que me dieron la oportunidad de incorporarme como Profesor No Numerario (PNN) al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València.

A principios de los ochenta tuve el honor de ser llamado para formar parte de un grupo de científicos jóvenes y entusiastas que, bajo la dirección de Juan Rojo Alaminos, Emilio Muñoz Ruiz y posteriormente del también bioquímico Roberto Fernández de Caleyá, tenían como objetivo implementar un sistema de evaluación científica y técnica de las solicitudes de fondos públicos de investigación. Es lo que primero se llamó nueva CAICYT y posteriormente Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva. Lo conseguimos, y España disfruta de un sistema prestigioso de evaluación científica, con alto reconocimiento nacional e internacional. Aquello, sin embargo, tuvo también su coste personal y emocional. De nuevo mi camino y el del profesor Primo Yúfera se encontraron, ésta vez en forma de choque de trenes. Sucedió que la CAICYT estableció unos criterios rígidos de incompatibilidades para la percepción de ayudas que contemplaban, entre otros aspectos científico-técnicos, las ayudas públicas de las que ya disponían los investigadores a la hora de solicitar las nuevas, y me encontré con una solicitud de Primo Yúfera que incumplía varios de esos criterios excluyentes. No hubo más remedio que denegar la solicitud, con gran disgusto por mi parte y también por la de Roberto Fernández de Caleyá, gran admirador de Primo Yúfera y que a buen seguro hoy nos acompañaría en este homenaje de no haber fallecido prematuramente. En la CAICYT actuábamos con luz y taquígrafos, así que recibí a Don Eduardo para explicarle los motivos del rechazo de su proyecto. Creo que nunca ví a Primo tan enfadado como lo estaba aquel día, aunque escuchó atentamente mis explicaciones. Veo que tienes tus razones me dijo, aunque no las comparto. Aquello supuso un alejamiento emocional que duró un par de años. Luego Primo, el Primo que yo he admirado tanto, me dijo un día *“José Pío comprendo lo que hicisteis en la CAICYT.... ¡¡¡pero hacérmelo a mí!!!”*. Nos reímos a gusto y continuamos con nuestra amistad que duró toda su vida. Todavía pienso que hicimos lo correcto, pero quizás, desde aquel día he pensado que no es bueno sujetarse a normas inflexibles, aunque sin duda en ocasiones sea conveniente. Y sin duda el Profesor Primo Yúfera era caso aparte, como lo ha demostrado a través de su larga trayectoria investigadora.

Su trayectoria profesional ha sido ejemplo e inspiración para muchos de nosotros. Del antiguo IATA surgió la energía para la creación de cuatro centros de investigación valencianos: el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPVCSIC), al cual pusimos su nombre como homenaje en vida, porque queríamos que él supiera que nosotros sabíamos la importancia real de su obra; el Instituto de Investigaciones sobre Desertificación (UVEG-CSIC-GVA); el Instituto de Biomedicina de Valencia y el nuevo IATA.

Primo Yúfera fue Presidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas desde finales del año 1974 a comienzos del año 1977. Si el aislamiento político era un lastre para España durante la dictadura, qué decir del aislamiento de una institución como el CSIC dedicada a la investigación científica, tarea que por su propia naturaleza no conoce fronteras. Primo Yúfera jugó un papel importante en la preparación del CSIC para la transición y tuvo que enfrentarse a la vez al desinterés de los gobiernos de turno -y eso que hubo hasta tres ministros de Educación y Ciencia durante su mandato-, y a los sectores inmovilistas de la Institución que habían hecho del CSIC su coto privado de

privilegios frente a las universidades. Desde la Presidencia del CSIC Primo impulsó la internacionalización del Organismo y especialmente la creación de infraestructuras y el desarrollo de investigaciones en las áreas de Bioquímica y Astrofísica. Cuando muchos años después, nuestros caminos se volvieron a acercar, cuando asumí con gusto la Vicepresidencia de Organización y Relaciones Institucionales del CSIC, pude comprobar la honda huella que el Profesor Primo Yúfera había dejado en la Organización Central del CSIC donde le adoraban por su dedicación, austeridad, modestia, y honestidad.

Primo Yúfera fue Catedrático de Bioquímica de la Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos de Valencia y cofundador de la Universidad Politécnica de Valencia. Fue un excelente e incansable profesor. Su curso de Doctorado “*Iniciación a la investigación*” era de los de mayor demanda en la Universidad Politécnica de Valencia a pesar de que Don Eduardo lo impartía en maratónicas sesiones de cuatro horas. En los últimos años se incorporó a la plantilla del Instituto de Tecnología Química que compartía edificio con el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas en la Universidad Politécnica de Valencia. Siguió investigando y enseñando hasta los últimos días de su vida.

Cristiano profundo se aplicó concienzudamente a sí mismo la parábola de los talentos. Recibió mucho talento y lo multiplicó y nos lo devolvió, de manera que somos sus deudores y, siguiendo su ejemplo, deudores somos también de los que nos siguen en el camino.

Primo Yúfera, del latín *primus*, el primero, también significa primoroso y excelente, o premio, o como los números primos Don Eduardo fue entero e indivisible, o solo divisible por sí mismo y por la unidad.

Cuanto honor hizo el profesor a su propio nombre.

He dicho.

Don Eduardo Primo, un maestro. Mi maestro.

Vicente Conejero.

Director del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas “Eduardo Primo Yúfera” (IBMCP), UPV-CSIC.

Excma. Sra. Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excmo. Sr. Rector Magnífico de la Universidad Politécnica de Valencia.

Excmos. Miembros de la Academia.

Familiares de Don Eduardo Primo.

Señoras y Señores.

Fue en octubre de 1960, en la apertura de curso de la nueva Escuela de Ingenieros Agrónomos de Valencia, la primera vez que vi a don Eduardo. Allí, en un aula de la antigua Estación Naranjera de Levante del INIA, situada en las afueras de

Burjasot, que había sido habilitada para alojarnos provisionalmente (con una provisionalidad de 7 años), estábamos quienes nos habíamos embarcado en la aventura de unos estudios -los correspondientes a la carrera de ingeniero agrónomo- que se implantaban por primera vez en provincias. Madrid, por aquel entonces, concentraba la práctica totalidad de las carreras técnicas superiores de España y no era fácil arrancar concesiones en aquella tendencia centripeta tan acentuada. Pero allí estábamos gracias a la iniciativa de dos hombres: don Eusebio González-Sicilia y don Eduardo Primo, primer director y jefe de estudios, respectivamente, de la nueva Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Don Eusebio era, a la sazón, director de la Estación Naranjera y don Eduardo, director del entonces Departamento de Química Vegetal del CSIC, que más tarde se convertiría en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.

Mientras esperábamos el comienzo de aquella apertura de curso, me asaltaron una serie de sensaciones y pensamientos negativos. Acostumbrado a la solemnidad y el empaque del paraninfo de la Universidad en la calle de la Nave o del Salón de Actos de la Facultad de Ciencias, no esperaba que pudieran producirse muchos milagros en un aula donde apenas cabían setenta personas, desnuda de tradición y falta de todo aquello que pudiera recordar al aura universitaria.

De pronto, delante de nosotros, se presentó, dispuesto a dar la conferencia inaugural, un hombre menudo de unos 40 años. Llevaba un cuaderno-archivador de tapas negras tamaño cuartilla con anillas que ya no le abandonaría jamás en sus clases (tenía uno para cada asignatura; eran los guiones del programa). Llevaba también un bigote característico de la época y tenía una calva más que incipiente. La primera impresión, desde luego, no era como para cambiar de opinión sobre lo que podría dar de sí todo aquello. Por fortuna para todos se trataba de don Eduardo Primo, un hombre tan rebotante de Universidad que iba a llenar de ella no sólo aquel aula, sino toda la escuela y cualquier lugar donde él estuviera.

Recuerdo que hizo una introducción muy breve y profunda acerca de la ciencia y la tecnología como motores de la sociedad. Después nos hizo una pequeña arenga en la que resaltó la importancia de aquel momento y de la tarea que teníamos por delante, así como el esfuerzo que tendríamos que realizar. Entonces, movido por la transcendencia del acto y coherente con sus convicciones religiosas y las de la mayor parte de la audiencia, nos invitó a rezar una oración, el Padre Nuestro, para que Dios nos ayudara en aquella andadura. Y sin más preámbulos, y, por supuesto, sin dejar la primera clase para el día siguiente, como todos esperábamos, dio la primera lección del programa: la estructura del átomo.

De esta manera se metió en mi vida don Eduardo Primo. Desde entonces, tuve el privilegio de tenerlo siempre cerca. Primero, como profesor de Química Orgánica, Bioquímica, Análisis Agrícola, Química Agrícola y Bromatología. Después, como Director de la Cátedra en donde me formé como profesor de Bioquímica en la ETSIA; también, como Director del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, donde guió mis primeros pasos como investigador con la ayuda inestimable de mi amigo el Dr. Pacual Cuñat, que luego sería, también director del IATA a quien quiero también rendir homenaje desde estas líneas. Posteriormente, como compañero de cátedra en el Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia hasta hace algo más de un año que fue arrancado de su trabajo por la enfermedad.

Han sido más de cuarenta años aprendiendo junto a un hombre honesto y generoso, inteligente, culto, claro, preciso en la exposición de sus ideas, imaginativo, enérgico (con un genio, por aquellos días, de mil demonios) y, a la vez, sensible, de humor socarrón, el propio de la gente sencilla, extraordinaria capacidad de trabajo,

organizado él mismo en sus cosas y capaz de organizar la propia Universidad si le hubieran dejado. Para muchos era y es una referencia. Para mí significó mucho más. Aunque no siempre estábamos de acuerdo, en las situaciones difíciles o cuando tenía que tomar una decisión importante, acudía a escuchar su consejo, siempre sabio y certero.

Don Eduardo me produjo un gran impacto desde el primer momento. Decía cosas a las que yo no estaba acostumbrado y con un lenguaje muy claro y directo. Iba con gran facilidad a la esencia de las cosas. Antes de conocerle, me habían hablado de conceptos, de teorías, de ciencia más o menos empírica, pero casi siempre con una visión alejada de la realidad y de su posible aplicación práctica. De cualquier forma, lo que aquel hombre nos decía en clase sonaba distinto. A él le preocupaba que los conceptos fueran introduciéndose en un orden lógico y que el conjunto tuviera intencionalidad y coherencia. Hay que tener en cuenta que algunas de las asignaturas que explicaba no eran en absoluto convencionales, sino un conjunto, muy tamizado por él, de conceptos que consideraba fundamentales para la formación química y bioquímica de un ingeniero agrónomo.

Cuántas veces hemos recordado todos los que tuvimos la fortuna de ser discípulos suyos, su gran maestría en poner los ejemplos adecuados para ilustrar una idea determinada. Aquello que parecía surgir con tanta facilidad en sus clases, luego pude comprobar, que era fruto de una preparación hecha con el mayor cuidado y precisión. Digo que lo pude comprobar porque don Eduardo fue quien guió mis comienzos como profesor. Guía que no se limitaba a dar buenos consejos, sino que para facilitar nuestros comienzos y para que hubiera uniformidad de criterios en todos los profesores de la Cátedra, él nos dejaba guiones de cada lección, esos cuadernos de anillas de los que ya he hablado. Allí se desmenuzaban los distintos epígrafes incluyendo detalles de cada apartado, ejemplos, diapositivas con la referencia exacta y la bibliografía, precisando hasta la página del libro o separata de la revista de donde habían sido tomadas. No obstante, aquella preparación tan minuciosa no mermaba la frescura y amenidad de sus clases.

Una de sus grandes obsesiones era elevar el nivel tecnológico de nuestro país. Y ello sólo podía lograrse formando buenos técnicos en todos los ámbitos. Era un hombre que creía en la ciencia como fundamento de la tecnología y en esta última, como motor del progreso económico y social. Pero no sólo había que creer en la ciencia y tecnología de los demás, de los países ricos de gran potencial industrial, que en eso no es muy difícil creer. Mucho más difícil es estar convencido de que nosotros podemos aspirar a crear nuestra propia riqueza, al menos en parte, con nuestra propia aportación científica y tecnológica.

Como hombre de acción, no se conformó nunca con permanecer en el mundo de las ideas y las hizo bajar al suelo. En un principio no podía aspirar a transformar toda la ciencia y la tecnología del país. Por ello, eligió una parcela que pensó debía ser potenciada y que sería adecuada para poner en práctica sus ideas. Don Eduardo Primo había nacido y había vivido en un entorno eminentemente agrícola. Su padre era maestro en Carlet, pueblo fruticultor de la Huerta de Valencia. Estudió la Licenciatura de Ciencias Químicas en la Facultad de Ciencias de Valencia y ya su tesis doctoral fue la aplicación de la Química al aislamiento y caracterización de unos componentes de las plantas de gran interés farmacológico: los glucósidos cardiotónicos de la digital. En aquel momento, la Química y la Bioquímica de las plantas era un campo muy poco explorado y por lo tanto lleno de posibilidades para la investigación. Parecía obvio que el futuro tecnológico de nuestra tierra debía descansar, en gran parte, en algo que era una fuente tan importante de riqueza para nosotros: la agricultura.

La clarividencia de su planteamiento básico era y sigue siendo innegable: la humanidad depende de la alimentación. Las plantas son directa o indirectamente (a través de la nutrición de los animales) la fuente más importante de alimentos y de materias primas para la industria, incluida la farmacéutica. Todo lo que contribuyera al conocimiento de las plantas -su estructura, composición y fisiología productiva en relación con el medio (el suelo, el agua, los insectos, los patógenos y agentes estresantes...) y la intervención tecnológica del hombre- presentaba para él un gran interés científico y tecnológico. Y más, en una tierra como la nuestra tan dependiente de la agricultura. Ese fue el objetivo fundamental de su vida de trabajo en sus dos aspectos fundamentales: la creación y la transmisión de ciencia y tecnología agrícolas. Sus logros en ambas dimensiones han sido muy importantes. Entre otros: la creación del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos con su Máster en Tecnología de Alimentos, ambos de gran prestigio dentro y fuera de nuestras fronteras, y la fundación, junto con don Eusebio González-Sicilia, de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Valencia. El prestigio de su labor al frente del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia le llevó a la Presidencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, el organismo que por aquel entonces (primera mitad de la década de los setenta) canalizaba el mayor esfuerzo del país en ciencia y tecnología. Por todo ello, y por sus trabajos de investigación en tecnología de alimentos, le fueron concedidos una larga lista de honores y condecoraciones entre los que quiero resaltar el haber sido elegido Miembro de Honor de esta Real Academia Nacional de Farmacia y que culminaron con el más alto reconocimiento que este país da a sus tecnólogos: el Premio Nacional de Investigación Tecnológica "Torres Quevedo". Y, más recientemente, el Premio Rey Jaime I a las Nuevas Tecnologías.

Supongo que quienes me estén escuchando y no tuvieron la fortuna de conocer a don Eduardo deben de pensar que estoy exagerando. No es fácil hacerlo cuando de él se trata. Don Eduardo superaba toda mi capacidad de exageración y de sorpresa (que no son pocas). Y si no, juzgue cada cual por sí mismo: un día había ido yo a su despacho a comentarle una serie de cuestiones relativas a nuestro traslado desde los laboratorios del Departamento de Biotecnología al que ambos pertenecíamos, a los don nuevos institutos de investigación que, bajo los auspicios del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad politécnica de Valencia, se habían construido en el campus de esta última. Él se iba al Instituto de Tecnología Química (ITQ) y yo, al de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), que llevó su nombre "Eduardo Primo Yúfera", desde su creación, como testimonio de reconocimiento de la trascendencia de su obra y de cariño al maestro, por parte de quienes nos embarcamos en aquella nueva aventura del IBMCP. Ambos institutos estaban emplazados en un mismo edificio, por cierto, y estábamos comentando cosas sobre esta nueva situación. Como ya he dicho antes, yo recurría a su sabio consejo en momentos de tribulación. Y aquel lo era porque, como director del IBMCP, yo tenía que negociar con el director del ITQ algunas cuestiones territoriales que siempre entrañan dificultad.

Pues bien, a sus setenta y cinco años, después de hacer de consiliario mío, se puso a hablar del traslado con la ilusión de un Postdoctoral de treinta y cinco, recién regresado a España de su aventura por esos laboratorios de Dios y dispuesto a comerse el mundo. Y ya el colmo fue cuando al preguntarle si nos podía ceder algo de espacio en su laboratorio del Departamento, en tanto nos trasladábamos al nuevo edificio, me contestó que sí, que los siete doctorandos que tenía con él habían terminado su trabajo experimental en el laboratorio y estaban ya en fase de redacción de la tesis. Es inaudito, pensaba yo. Aquel hombre que tenía sentado frente a mí parecía haber hecho un pacto, no con el diablo, sino con el Primer y Segundo Principio de la termodinámica: había

estado estos últimos años dirigiendo siete tesis doctorales a la vez; además, ha terminado y están para salir de la imprenta dos libros suyos (una *Química Orgánica Fundamental y Aplicada* para estudiantes de Ciencias y de Ingeniería y una *Introducción a la Investigación Científica y Tecnológica*), da las mismas o más horas de clase que yo, tiene una actividad pública importantísima, dedica gran atención a su entrañable familia... y le sobra tiempo para ser un documentadísimo melómano y asiduo impenitente del Palau de la Música, y también, para controlar las clases de Bioquímica de su nieta Diana y a mí que soy su profesor.

En aquellos momentos sentí algo muy especial: una mezcla de admiración y de sana envidia. Pero sobre todo, me sentía orgulloso y afortunado por haber tenido el privilegio de aprender, trabajar y convivir con un hombre como don Eduardo. Afortunadamente para todos, la historia continuó. Su energía y entusiasmo le dieron para trasladarse al ITQ, centro dirigido por nuestro querido e insigne profesor Avelino Corma y, después de varios años, se volvió a trasladar a unos laboratorios instalados provisionalmente en una zona de la Politécnica, lo suficientemente lejos del núcleo de la Universidad y tan poco atractivo, (debo decir que, actualmente, las cosas han mejorado) que sólo esforzados pioneros fueron allá, en espera de mejor suerte. Allí se instaló el Centro de Ecología Química Agrícola, dirigido por el Profesor Jaime Primo Millo, que nos honra con su presencia y prosiguió su actividad investigadora y profesoral, hasta que la enfermedad pudo más que él.

Y ahora, me gustaría completar esta breve semblanza de Don Eduardo, presentándoles, de un modo muy sucinto, como a él le hubiera gustado, con la ayuda de unas diapositivas, dos ejemplos de sus investigaciones en el campo de la Ecología Química Agrícola. Ambos, dirigidos a la lucha contra plagas. El primero, consiste en el aislamiento y caracterización de la estructura química y actividad biológica de un compuesto extraído de un hongo entomopatógeno (*Penicillium brevicompactum*), no descrito previamente, al que denominaron *brevioxima*. Fue la primera molécula aislada de este tipo de hongos con actividad antagonista de hormona juvenil y que interfiere, por lo tanto, la metamorfosis normal del insecto. El segundo, es el desarrollo de un sistema de atracción-esterilización para la lucha contra *Ceratitis capitata*, la mosca de las frutas, patente registrada en 2006 por la multinacional Syngenta (fusión de Novartis y Zeneca) y comercializado con el nombre de “Adress”, en muchos países productores de cítricos.

Hay muchas más cosas y anécdotas que podría contarles de Don Eduardo y de mi vida de aprendizaje con él, algunas, al margen de la Academia, reflejos de su caleidoscópica personalidad. ¡Ojalá que estos breves retazos hayan podido hacerle siquiera un poco de justicia! Mi intención ha sido traerlo aquí con nosotros, durante unos pocos minutos, para honrar su memoria.

Agradezco muy sinceramente a esta Real Academia el haberme brindado esta oportunidad y, a todos Uds., la atención que me han prestado.

Homenaje a D. Primo Yúfera.

Juan Juliá Igual.

Rector de la Universidad Politécnica de Valencia.

Excma. Sra. Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Señoras, señores,

Con emoción y ¿por qué no decirlo?, legítimo orgullo, he escuchado con verdadero interés sus exposiciones, en torno a la figura de nuestro querido profesor, don Eduardo Primo Yúfera.

Digo emoción, por el afecto y respeto al que se hizo acreedor tanto a título personal como institucional, el gran hombre, excelente profesor, destacadísimo investigador y en suma maestro, maestro con mayúsculas, que fue don Eduardo, siempre en el recuerdo, que ustedes con sus intervenciones han venido a reavivar, más todavía, si ello era posible.

Digo legítimo orgullo, porque tanto yo, como rector, como la Universidad Politécnica, en tanto que institución, sentimos el respaldo, el valor añadido, de ser el rector y la universidad del profesor Primo Yúfera, que tanto currículum de excelencia, tanto prestigio nos ha aportado.

El profesor Primo fue un maestro, en el más excelso sentido. Por eso mismo, fue también un referente, un modelo a seguir.

Cofundador de la Politécnica de Valencia, le imprimió ya desde los primeros pasos, -y no olvidemos que fue quien impartió la primera clase ordinaria-, mucho de su estilo personal.

Vocación; pasión por el trabajo; ilusión por asumir nuevos retos diarios; por adelantarse a su tiempo y hacer avanzar el tiempo de la ciencia; preparación intensa y continuada; servicio a los intereses de la sociedad en la que la UPV se inserta, son algunas y sólo algunas, de sus infinitas aportaciones a lo que hoy podríamos denominar cultura politécnica: una forma de ser, un estilo, una línea de ética, superación y eficacia, que afortunadamente nos son reconocidos y nos prestigian.

La Universidad Politécnica de Valencia hoy es así y tiene, como consecuencia, un gran reconocimiento, en muy buena medida porque el profesor Primo contribuyó a que así fuera.

Gran parte de esa impronta, esa manera de entender la docencia y la investigación como hechos difícilmente separables entre sí, y la investigación como un servicio a la sociedad en sus necesidades concretas, provienen del inmenso legado intelectual y humano del doctor Primo. Estos días, cumplimos como institución nuestros primeros 40 años. A lo largo de todo ese tiempo, menos estos últimos meses, el ejemplo y el trabajo con presencia diaria de don Eduardo, han sido el espejo en el que mirarnos y el alto listón que había que intentar alcanzar.

Él, nos hizo en muy buena medida como somos, o como aspiramos a ser.

El espíritu y el estilo de la Universidad Politécnica son, en considerable medida, el espíritu y la historia de don Eduardo Primo.

Por eso, me he tomado la licencia de sincerarme ante ustedes y decirles que había seguido el acto con emoción y legítimo orgullo.

En nombre de la Universidad Politécnica de Valencia.

En nombre de cuantos conformamos su comunidad universitaria.

En nombre propio y como rector, gracias.

Gracias, también, y me atrevo con ello a interpretar, el que estoy seguro sería su sentimiento, en nombre del profesor don Eduardo Primo Yúfera. Nuestro ejemplo.

Muchas gracias.

Vivencias en el Instituto del Dr. Primo Yúfera.

Ana M^a. Pascual-Leone Pascual.

Vicepresidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Excma. Sra. Presidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Excmo. Sr. Rector Magnífico de la Universidad Politécnica de Valencia.
Excmas. y Excmos. Académicos.
Señoras y Señores.

Ante todo quiero manifestar que para mi es un honor que agradezco a la Excma. Sra. Presidenta de esta Academia el que me haya designado para coordinar esta Sesión.

Y para finalizar este Acto en homenaje a la figura del Dr. Primo Yúfera voy a relatarles unas vivencias propias extraídas de mis recuerdos, y que tuvieron lugar los años anteriores a mi llegada a Madrid, en 1970. En esos años yo trabajé en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, fundado por él en Valencia. Centro Propio, entonces, del CSIC perteneciente al Patronato Juan de la Cierva. Mi intención es que ustedes, los que no le conocieron personalmente, puedan completar, a través de mi relato, la imagen del ser humano del cual estamos hablando, y la labor que fue capaz de realizar en tiempos, además, muy poco propicios para la investigación.

Mi afecto, mi cariño y mi respeto por el Dr. Primo Yúfera fueron el resultado directo de mis impresiones durante aquellos años de trabajo en su Centro Y por esos sentimientos y por el respeto que su figura me inspira, acogí con entusiasmo y con verdadero interés la propuesta de su entrada como Académico de Honor en esta Real Corporación. En la nota necrológica publicada en los Anales de esta Real Academia con ocasión de su muerte, relaté sus logros, sus muchos méritos, y de todo ello se traslucía la gran labor realizada por el Dr. Primo, toda ella en Valencia, como acaban de exponer los Ponentes que me han precedido. Mi tierra y la suya por adopción y cariño.

La primera vez que oí hablar de él hace mucho tiempo, nos remontamos al año 1947, cuando yo comencé en la Facultad de Ciencias de Valencia el primer curso de Farmacia, el curso común con Químicas, justamente el año antes de trasladarme a Barcelona a estudiar dicha Licenciatura en la Facultad de Farmacia catalana entonces era imposible seguir los estudios farmacéuticos en Valencia.

Los muy jóvenes alumnos de primero oímos hablar aquel año, de un profesor a quien la Facultad no facilitaba espacio para montar un laboratorio de investigación, y cómo, finalmente, lo instaló él en unos lavabos. D. Eduardo Primo Yúfera sería entonces un hombre joven, nunca lo conocí, ni le ví. Pero aquello me impactó y, por mis muchas conexiones con Valencia, pude seguir, y tuve interés en ello, su gran trabajo, sus esfuerzos. La creación, mucho más tarde del Instituto de Agroquímica, y la construcción en la calle Jaime Roig del edificio correspondiente, hoy ocupado por el Instituto de Biomedicina del CSIC.

En mis continuas visitas a mi familia y amigos pude constatar cómo su nombre era cada vez más conocido en Valencia y de forma obligada cuando se hablaba de

trabajo serio y bien realizado en vertiente de investigación. Durante tiempo la investigación en Valencia, si no estaba realizada por él, de alguna manera procedía de él o de su grupo.

Eran tiempos difíciles para investigar, cuando él comenzó. Cuando uno decía que quería investigar, o hablaba de investigación, incluso honorables profesionales, casi no terminaban de comprender de qué se estaba hablando. Los créditos eran muy escasos y muy escasas las becas y las ayudas. Evidentemente, no había grandes recursos después de una guerra, pero, además, había también que propiciar y preparar el ambiente y las mentalidades para poder comprender el alcance y la importancia del trabajo de investigar. Por ello, la labor realizada con seriedad por la gente de la generación de D. Eduardo, hay que ser viejo para, verdaderamente, comprenderla. Esas generaciones abrieron paso y prepararon las mentalidades para los que seguimos en dicho esfuerzo. No, no es verdad que era fácil, o más fácil entonces, como dicen algunos jóvenes. Nunca es fácil, pero en aquel tiempo hubo que prepararlo todo. Y hubo que hacerlo con gran esfuerzo y con honestidad.

Fue por los conocimientos míos sobre la investigación en Valencia por lo que después de mi formación en París y de haber sacado ya una plaza de entrada al Consejo, que se llamaba de Ayudante Científico, en el Patronato Alfonso el Sabio, el Patronato que abarcaba a todos los Centros Mixtos ubicados en la Universidad, llegué a Valencia en 1967-68 y pensé en trabajar en Agroquímica con el Dr. Primo.

Pero mi formación era en biomedicina, por ello tuve que pasar primero por la experiencia de trabajar en la Facultad de Medicina que tenía una delegación del Consejo. En donde yo, además, había realizado, al acabar mi carrera, mi Tesis Doctoral con el Prof. García-Blanco. Pero García-Blanco ya no estaba, se había jubilado y su laboratorio estaba totalmente desguarnecido. Yo, además, tenía, debido a mi reciente traslado a Valencia, toda una serie de problemas administrativos.

Problemas ficticios, derivados, en el fondo, de la gran escasez de vacantes en el Consejo, sobre todo en ciudades pequeñas situadas fuera de Madrid. En el Consejo las plazas, se otorgan a personas, a un currículum, y si esa persona se traslada o se muere no crea vacantes en el Centro donde trabaja, porque o se lleva la plaza, si le conceden el traslado o, si desaparece, pasa a un reservorio, y dicha plaza se cubrirá por otra persona con méritos suficientes, demostrados además en una oposición. En principio la plaza es a persona no a Centro.

Pero cuando hay muy pocas vacantes, muy pocas dotaciones, como entonces, aunque te concedieran el traslado, había problemas ficticios que creaban gentes del Centro que querían quedarse con tu plaza. En fin, la primera vez que visité a Primo y lo conocí en el Instituto de Agroquímica le pedí que quería trabajar en su Centro, ya que en Medicina era imposible hacer nada, y le conté, justificando la historia con documentos y currículum, mis problemas administrativos. Recuerdo perfectamente lo que me dijo: “lo que Vd. me cuenta de su plaza, lo que quieren hacer, no es legal y, por tanto, yo no lo voy a consentir en el Consejo. Si usted no puede trabajar en Medicina puede hacerlo aquí, que es un Centro Propio del CSIC. Vuelva la semana que viene”.

Cuando volví me dijo: “he estado en Madrid, ya le dije que lo de su plaza no es legal se arreglará, ¿pero quiere Vd. empezar a trabajar aquí mañana? el tiempo pasa...”. Y comencé en el Departamento de Investigación Fundamental, con Andrés Casas al frente de él. La mano derecha de Primo.

Siempre me entendí con D. Eduardo. Se tenía la sensación de hablar con alguien que inspiraba confianza porque decía la verdad, no perdía el tiempo, era eficaz.

En el Departamento de Investigación Fundamental nos llovían los problemas de todas las Secciones del Instituto: la tristeza del naranjo, los problemas del arroz

enriquecido con proteínas, la manera de distribuir los fertilizantes, los problemas de todas las vertientes estudiadas en el Instituto. Todo ello era un buen entrenamiento para un investigador joven como yo, que tenía que comenzar por hacer bibliografía de cada tema y cambiar continuamente de problema, y que, además, no tenía base Agroquímica sino tan sólo Bioquímica. Pero me fue muy útil.

Una vez me llamó D. Eduardo y me encargó, personalmente, que revisara el protocolo que estaban utilizando de distribución de un fertilizante con P 32. Dicho protocolo se había confeccionado dando por supuesto que la distribución del fertilizante era un problema de dilución isotópica. Yo tenía experiencia, conocía bien lo que realmente significaba la dilución isotópica de un isótopo, porque, además, acababa de realizar los cursos para usuario de isótopos en la Junta de Energía Nuclear, en Madrid. Estudié, profundamente, la cuestión y llegué a la conclusión de que aquello no era un problema de dilución isotópica. El día fijado para la reunión con D. Eduardo, con el Dr. Casas y con los de la Sección que tenían el problema, me decían “no digas que no es una dilución isotópica, se va a enfadar D. Eduardo, no le va a gustar nada”. Yo estaba algo tensa, tenía mi exposición sumamente preparada. Previamente, me habían hecho los compañeros todo tipo de recomendaciones: mi conveniencia o no de contradecir el protocolo, que si alguien no formado en el Instituto no podía ir a contar, y a decir, que aquello estaba equivocado; en fin, un buen preámbulo para estar tensa. Recuerdo aún su mirada penetrante cuando empecé a hablar en el encerado, y cuando comencé a exponer mis razones, y puse la fórmula de la dilución isotópica. Expliqué porqué creía que aquello no lo era. Finalmente, y después de un silencio, D. Eduardo dijo simplemente: “La chica tiene razón eso no es una dilución isotópica” y aceptó, absolutamente, mi propuesta de protocolo.

Primo Yúfera era ante todo un investigador en busca de la verdad en las cuestiones. Sin más recovecos, ni tensiones, D. Eduardo era un buscador de la verdad con honestidad. Por ello, y por su gran capacidad de trabajo, pudo realizar la gran labor que hizo en Valencia.

Unos meses antes de trasladarme a Madrid, D. Eduardo me llamó para decirme que si yo estaba de acuerdo él tenía la posibilidad de pedir una plaza de Colaborador para el Centro y yo podría presentarme a la oposición. Para mi era muy importante, yo estaba en Comisión de Servicio, subía de categoría y me quedaba en Valencia, pero mi marido y yo pensábamos ya pedir Madrid y venirnos. Por ello le contesté: “Para mi sería una gran oportunidad, pero no quiero que usted la pida, la saque y luego yo me vaya a Madrid. Creo que no engañaría a nadie, pero menos lo haría con usted”.

El Dr. Primo agradeció siempre mi gesto, que él evidentemente merecía. Cuando fue Presidente del Consejo, si yo pedía verle siempre encontró un momento para recibirme. D. Eduardo Primo Yúfera perteneció a una generación que trabajó muy duro, y en muy malas condiciones, y los que le seguimos tendremos siempre una deuda de gratitud con él. Su figura y su trabajo ahí están para manifestarlo.

La ciudad de Valencia le ha rendido, finalmente, muchos honores, pero los que le conocíamos, sabemos que son profundamente merecidos y ganados por él. Hoy, aquí, no hemos hecho más que manifestar nuestro afecto y tratar de destacar su figura en su contexto.

Evidentemente su familia, su esposa e hijos, pueden estar muy orgullosos de él y también lo puede estar la Real Academia Nacional de Farmacia por su acierto al elegirle Académico de Honor de esta Real Corporación.

He dicho



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
POLÍTICA SOCIAL Y DEPORTE

www.ranf.com

ISSN1697-4271