



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
CIENCIAS FISIOLÓGICAS

# Fisiología

Boletín Informativo de la SECF · Volumen 8 nº 3 Diciembre 2006

## • TITULARES

• **Invitación al XXXIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS. VALLADOLID, JULIO DE 2007.** Constanancio González.

• **'NUEVAS' SEÑALES EN REPRODUCCIÓN: PAPEL ESENCIAL DEL SISTEMA KISS-1/GPR54.** Manuel Tena-Sempere.

• **GLUCOLIPOTOXICIDAD: PERSPECTIVAS EN DIABETES TIPO 2.** Enrique Roche.

• **ACTIVIDAD MOTORA GASTROINTESTINAL: MECANISMOS INTRÍNSECOS REGULADORES.** Jordi Aleu y Marcel Jiménez.

• **DIFERENTE LONGEVIDAD ENTRE MACHOS Y HEMBRAS: LOS ESTRÓGENOS ACTIVAN GENES DE LONGEVIDAD.** José Viña, Consuelo Borrás, Juan Gambini, Juan Sastre y Federico V. Pallardó.

• **SALVEMOS EL LABORATORIO CHILENO DE MONTEMAR.** Ricardo Borges.

• **ARN INTERFERENTE: UN MECANISMO PRIMITIVO DE DEFENSA FRENTE A LOS VIRUS QUE PUEDE SERVIR PARA CURAR ENFERMEDADES.** José Miguel López Novoa.

## SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**Presidente:** Rafael Alonso (ralonso@ull.es).

**Presidente electo/Delegado FEPS:**

Constancio Gonzalez (constanc@ibgm.uva.es).

**Presidente Saliente:** Salvador González-Barón (sgonzalez@uma.es).

**Secretario:** Andrés Morales (andres.morales@ua.es).

**Tesorero:** Javier Salazar (salazar@um.es).

**Vocal:** Rafael Fernández Chacón (rfchacon@us.es). / Javier Cudeiro (jcud@udc.es).

Direcciones de contacto en [www.seccff.org](http://www.seccff.org) · D.L.:SE-321-2000.

## INSTRUCCIONES A LOS AUTORES.

### A. Remisión de originales.

La remisión de originales se hará exclusivamente por correo electrónico a la dirección del editor o de cualquiera de los miembros del comité editorial. Se puede utilizar cualquier procesador de texto, programa y formato gráfico, aunque es preferible remitir el manuscrito en formatos usuales. En todo caso deben indicarse en la carta de remisión los formatos empleados para texto, tablas, gráficos y fotografías. La utilización de formatos poco usuales retrasará la publicación. En caso de emplear algún sistema de compresión para fotografías o gráficos, debe comprobarse que la descompresión no deteriora la calidad de las imágenes. La carta de remisión debe incluirse en el cuerpo del mensaje electrónico y el original y las figuras en forma de archivos anexos. El texto del artículo debe adjuntarse como un único archivo, incluyendo la página con el título, el texto principal, bibliografía, etc. Cada tabla o figura debe remitirse en un anexo independiente, nombrando cada anexo con el nombre del primer autor y el número de tabla o figura que contenga (ejemplo: Cunqueiro-Fig.1).

### B. COMPOSICIÓN DE LOS ORIGINALES.

#### 1. Primera página.

Título, Autores, Filiación de los autores y Autor y dirección para correspondencia si procede (incluir números de teléfono y fax, y una dirección de correo electrónico).

#### 2. Segunda página.

Sumario, si procede, en una extensión no superior a 200 palabras, en el mismo idioma que el resto del artículo.

#### 3. Cuerpo del texto.

Los artículos no deberán sobrepasar las 2.500 palabras e irán en folios numerados. Deberán estar escritos en un estilo claro y con pretensión divulgativa, de forma que puedan ser entendidos por cualquier fisiólogo, independientemente de su área de especialización. El procedimiento más simple es tomar como ejemplo cualquier artículo publicado previamente en Fisiología. En caso de no disponer de ningún ejemplar, puede solicitarse a cualquiera de los miembros del comité editorial o a la Secretaría (andres.morales@ua.es) para ser incluido en la lista

#### · Editor ·

Ángel Nadal Navajas, Departamento de Fisiología e Instituto de Bioingeniería Universidad Miguel Hernández, Elx, Alicante 03202.  
Teléfono: 965 222 002, Fax: 966 658 511, e-mail: nadal@umh.es

#### · Comité editorial ·

Fernando de Castro (Salamanca, fdecastro@usal.es), Mónica de la Fuente (Madrid, mondelaf@bio.ucm.es), Esther Fuentes (Elx, efuentes@umh.es),  
Cristina Ripoll (Elx, ripollcr@umh.es), José E. Sánchez-Criado (Córdoba, fs1sarcj@uco.es), Javier Salazar (Murcia, salazar@um.es),  
Carlos Villalobos (Valladolid, carlosv@ibgm.uva.es).



Microscopio directo para experimentos de Patch-clamp

# ECLIPSE FN1

## Profundice más en su muestra

El microscopio Eclipse FN1 le permitirá llevar sus aplicaciones electrofisiológicas a nuevos horizontes

- El objetivo Plan 100x W (AN 1.1, WD 2.5mm) es el primer objetivo de inmersión en agua con anillo de corrección. Este anillo corrige la aberración esférica permitiendo compensar la variación de temperatura fisiológica y del espesor de la muestra. Asimismo mantiene una excelente transmisión en el infrarrojo.
- El nuevo objetivo de larga distancia de trabajo CFI75 LWD 16x W permite visualizar el área total de la muestra. En combinación con el módulo de magnificación es posible, de forma fácil, cambiar a altos aumentos y alta resolución sin cambiar el objetivo.

- El diseño del microscopio y de los objetivos, más finos y delgados, permite tener más espacio para el manejo de los electrodos.
- Todos los objetivos dedicados a patch-clamp están libres de aberración cromática desde el visible hasta la región del IR.
- Virtualmente desprovisto de ruido eléctrico y con manejo libre de vibraciones.



Ejemplo de sistema: configuración con equipo de manipulación Narishige

IZASA S.A.  
C/ Aragoneses 13, Polígono Industrial de Alcobendas  
28108 Alcobendas (Madrid)  
Tel.: 902 20 30 80 - Fax: 902 20 30 81

[www.izasa.es](http://www.izasa.es) - E-mail: [dac2@izasa.es](mailto:dac2@izasa.es)



de distribución. Alternativamente, consultar los artículos de los números anteriores en la página web <http://www.seccff.org>.

Los artículos podrán contener resultados ya publicados, siendo entonces responsabilidad exclusiva de los autores obtener los permisos correspondientes de las revistas o libros donde hayan sido publicados originalmente. Debido a la pretensión divulgativa, cada autor podrá organizar el texto en la forma que crea más oportuna, si bien se sugiere una división en secciones que facilite su lectura.

#### 4. Otros.

**a. Notas.** (si las hubiere) y agradecimientos.

**b. Bibliografía.** Las referencias, muy seleccionadas, se insertarán en el cuerpo del texto entre paréntesis (ejemplo: Chacón y Mairena, 1999). La relación completa de referencias bibliográficas deberá incluirse al final del texto, por orden alfabético y cronológico, de acuerdo a los formatos más habituales. Ejemplo: Gómez J, Belmonte J (1910) Deciphering bullfighting. *J Taurom* 57: 200-235.

**c. Pies de figuras.** Deberán incluirse a continuación de la bibliografía y en páginas aparte.

**d. Figuras.** Su número no deberá ser superior a 2-3 por artículo, y el tamaño máximo aceptado será el de una hoja impresa (DIN-A4). No se publicaran imágenes en color. En el caso de figuras previamente publicadas, si fuere necesario, deberá acompañarse autorización para su reproducción en *Fisiología*.

#### ¿Qué beneficios reporta ser miembro de la SECF?

La finalidad de la SECF es el cultivo y el fomento de todo lo que pueda contribuir al desarrollo de las Ciencias Fisiológicas en España, sin carácter lucrativo (artículo 2 de los estatutos). En consecuencia, ser miembro de la SECF reporta una serie de beneficios a todas aquellas personas que desarrollen actividades relacionadas con la Fisiología, entre los que cabe incluir:

- Descuentos en las cuotas de inscripción del Congreso.
- Ayudas para la organización de actividades científicas.
- Becas para la asistencia a Congresos Nacionales o Internacionales.
- Acceso on-line libre a la revista *Acta Physiologica*.
- Recibir 2 números/año de la revista "Fisiología", editada por la SECF.
- Recibir información periódica sobre congresos, ayudas y otras actividades nacionales y/o internacionales relacionadas con la Fisiología.
- Recibir los Boletines de la FEPS en versión electrónica.
- Acceso a materiales de libre disposición colgados por miembros de la SECF.
- Acceso a y distribución de información en la página web de la Sociedad sobre docencia, grupos de investigación y noticias de última hora, entre otras.

#### ¿Cómo hacerse socio de la SECF?

Hacerse socio de la SECF es tan simple como rellenar un formulario al que puede accederse a través de la página web de la Sociedad Española de Ciencias de Fisiología (<http://www.seccff.org/altasocio.php>).

Las solicitudes recibidas serán evaluadas por la Comisión de Admisión y la aprobación definitiva de los nuevos socios tendrá lugar en la Asamblea General de la SECF, que se celebrará durante el Congreso bianual de la Sociedad.

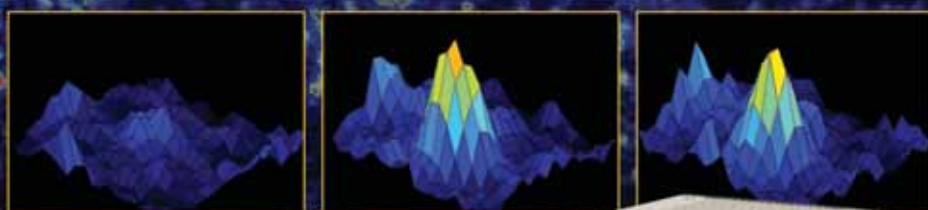
# HAMAMATSU

## Solutions for: Ultra Low Light Level

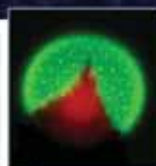
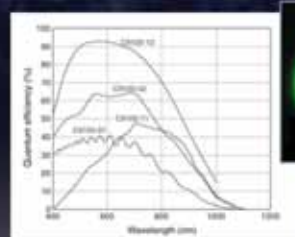
Brand New

# Megapixel EMCCD Camera

Did you ever dream of having really a 1k x 1k ultra high sensitive camera? Neither the distorted images from the image intensifiers nor the thumbnail sized images from the Electron Multiplying Cameras?



"Dr. G. I. Mashanov, MRC Natl. Inst. Med. Res. UK ("GMview" Image Processor), rec. with C9100-11."



## C9100-02

- Megapixel Resolution
- High Gain
- Very Low Read out Noise
- High Speed (More than 30 MHz Pixel Clock)
- High Quantum Efficiency

#### Additional features of these on-Chip Gain Cameras:

- Resistance against Overexposure
- High Image Repetition Rates
- Backthinned 512 x 512 Type available

#### Applications:

- Single Molecule Fluorescence
- Intracellular Imaging
- High Speed Fluorescence Imaging
- Intravital Microscopy

*Photon is our business*

Hamamatsu Photonics France S.A.R.L.

Spain-Portugal

Tel.: +34 (0) 93 582 44 30, Fax: +34 (0) 93 582 44 31

e-mail: [spain@hamamatsu.com](mailto:spain@hamamatsu.com), [www.hamamatsu.es](http://www.hamamatsu.es)



# XXXIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS.

Valladolid Julio de 2007.

Estimados colegas,

La Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF) celebra su XXXIV Congreso en Valladolid, del 3 al 7 de julio de 2007. Después del éxito cosechado en los anteriores congresos de la SECF, esperamos que el próximo Congreso de Valladolid proporcione el mejor foro para la presentación, discusión e intercambio de conocimientos recientes en el área de la Fisiología, y que los resultados presentados puedan generar nuevas ideas, colaboraciones y proyectos de investigación. En los últimos años, nuestro Congreso ha aumentado su carácter internacional, utilizándose el inglés como idioma oficial del mismo, al desarrollarse en estrecha colaboración con otras sociedades europeas de la FEPS (Federación Europea de Sociedades de Fisiología), particularmente con la Physiological Society. El XXXIV Congreso también se desarrollará en colaboración con la Physiological Society. El congreso espera reunir entre 400 y 500 participantes, incluyendo a Ole H. Petersen (Liverpool University), actual presidente de la Physiological

Society, y Carlos Romero (Mayo College of Medicine), quien recibirá el premio Juan Negrín 2007. Además de las habituales conferencias plenarias, comunicaciones orales y en forma de poster, se desarrollarán 12 simposios en los que se abarcará gran parte de las líneas de investigación en Fisiología, incluyendo también aspectos metodológicos, como las nuevas técnicas de imagen y el desarrollo de patentes y la propiedad intelectual.

El Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM, CSIC) y la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, que este año celebra su 600 aniversario, acogen con gran ilusión el reto de organizar este Congreso en el que, además de intercambiar nuevas ideas y conocimientos, esperamos podáis disfrutar de una ciudad histórica como Valladolid con su rico patrimonio monumental, cultural, enológico y gastronómico.

Desde aquí, queremos invitar cordialmente a todos los miembros de la SECF y otros colegas interesados del ámbito de la Biomedicina a acudir al Próximo Congreso de la SECF que se celebrará el próximo julio en Valladolid.

**Constancio González**

Presidente del XXXIV Congreso de la SECF  
Valladolid, 31 de octubre de 2006.

## EMCCD: CÁMARAS ULTRARRÁPIDAS Y ALTA SENSIBILIDAD

En aquellas aplicaciones con intensidades lumínicas muy bajas y que requieran amplio rango dinámico (microscopía de fluorescencia, biotecnología, astronomía...) ofrecemos la solución ideal proporcionando **cámaras de alta sensibilidad** (detección de fotón único) a elevadas frecuencias de imagen (hasta 35 MHz).

Andor Technology presenta su nueva cámara iXON con la innovadora tecnología **EMCCD** (Electron Multiplying Charge Coupled Device) basada en una multiplicación de electrones que intensifica la señal recibida en el CCD con ganancias desde 1 hasta 1000 manteniendo el ruido de lectura inapreciable. Con sellado hermético en vacío, alta eficiencia cuántica (>90%) y refrigeración termoeléctrica (-100°C) permitiendo largos tiempos de exposición con corriente oscura insignificante.



info@iberlaser.com  
www.iberlaser.com

**iberlaser, s.a.**  
Óptica-Óptica Científica e Industrial  
Instrumentación y Láseres

iXon se presenta en formatos de 1000x1000, 512x512 y 128x128 pixels.



**GRUPO TAPER, S.A.** se funda en junio de 1989 mediante la agregación de seis empresas que contaban con una experiencia de más de 25 años en la distribución de productos sanitarios y científicos.



Desde el año 2004, las actividades de las compañías que formaban el Grupo (Endoscopia Médica, Pacisa y Giralt, La Casa del Médico y Dissa) han sido absorbidas e integradas en un única empresa denominada Grupo Taper, S.A. Dentro de la estrategia de expansión del grupo, ha extendido sus actividades a Portugal, mediante la adquisición de tres empresas, lo que sitúa a GRUPO TAPER, S.A. entre las primeras compañías de distribución de productos sanitarios y científicos de la península ibérica, con un equipo de más de 140 profesionales y unos fondos propios de 24 millones de Euros.

Avda. Industria, 49 • Edificio Fresno. 2ª pl. – Pol. Ind. • 28108 **ALCOBENDAS (Madrid)**  
Teléfono: **916 596 520** – Fax: **916 610 084** / e-mail: [informacion@grupotaper.com](mailto:informacion@grupotaper.com)

[WWW.GRUPOTAPER.com](http://WWW.GRUPOTAPER.com)



# ACTUALIZACIÓN *Actualización*

Un número creciente de evidencias experimentales ha demostrado que los aspectos clave del desarrollo y función del eje reproductor tales como la pubertad, el control hormonal de la ovulación, la modulación de la secreción de gonadotropinas o la regulación de la reproducción por señales metabólicas y nutricionales, dependen de las neuronas KISS-1 hipotalámicas, que operan como auténticos integradores de los diversos factores que regulan la reproducción.

## 'Nuevas' Señales en Reproducción: Papel Esencial del Sistema KiSS-1/GPR54.

Manuel Tena-Sempere.



### RESUMEN

A pesar de constituir un área muy dinámica dentro de la Endocrinología Experimental y Clínica, existía la impresión generalizada de que las bases fundamentales de los mecanismos de control neuroendocrino de la función reproductora habían quedado ya bien definidas en las últimas décadas. Este 'plácido' panorama ha sufrido recientemente (desde finales de 2003) una auténtica convulsión con la identificación del papel absolutamente esencial del sistema KiSS-1/GPR54 en el control del desarrollo y función de sistema reproductor. De hecho, en los dos últimos años, un número creciente de evidencias experimentales han sustanciado el papel clave de este 'nuevo' sistema en la regulación de aspectos tan relevantes de la función reproductora como la pubertad, el control feedback de la secreción de gonadotropinas, la liberación pre-ovulatoria de la hormona luteinizante (LH) y el control metabólico de la reproducción. Por todo ello, se ha propuesto (probablemente sin exceso) que la identificación de la faceta reproductora del sistema KiSS-1/GPR54 representa el hallazgo más relevante en la Fisiología de la Reproducción desde la caracterización y aislamiento, a inicio de los años 70, de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). En esta puesta al día, se resume de modo somero algunos de los aspectos más destacados de este apasionante sistema fisiológico.

### INTRODUCCIÓN: CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA REPRODUCCIÓN

La reproducción, definida por la capacidad de generar gametos viables, posibilitar su fertilización, y sustentar la gestación y eventual lactancia, es la función biológica clave que asegura la supervivencia de las diversas especies. En mamíferos, los sistemas de control de la función reproductora son altamente sofisticados y presentan distintos niveles de organización funcional, englobando desde señales neuroendocrinas y hormonas sistémicas a factores producidos localmente. Desde el punto de vista neuroendocrino, la regulación de la capacidad reproductora es llevada a cabo por el eje endocrino de la reproducción o gonadotrópico. El elemento jerárquico clave en este sistema es el deca péptido hipotalámico GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas), que estimula potentemente la síntesis y liberación hipofisaria de las gonadotropinas, LH y FSH (hormona folículo-estimulante). Éstas, a su vez, actúan sobre receptores específicos a nivel gonadal, siendo esenciales tanto para la correcta producción de gametos maduros a partir de la pubertad (gametogénesis), como para la secreción de esteroides y otras hormonas gonadales (hormonogénesis) (Tena-Sempere & Huhtaniemi, 2003). Las hormonas gonadales, por su parte, participan en la regulación funcional del eje gonadotropo mediante circuitos feedback negativos y positivos. A pesar de que estos elementos básicos del sistema neuroendocrino de la reproducción son bien conocidos desde hace décadas, es ésta un área especialmente dinámica de la

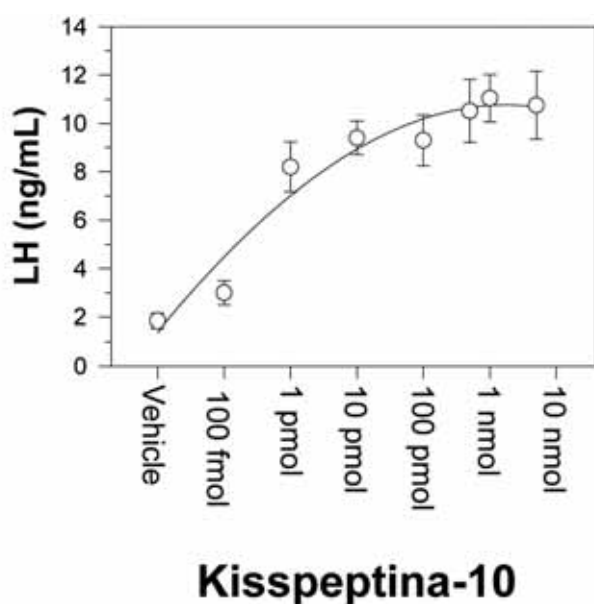
Endocrinología (tanto Clínica como Experimental), con numerosos estudios publicados en años recientes en facetas tan diversas como señalización intracelular y mecanismos moleculares de acción, interacción con otros sistemas endocrinos y posible disrupción por factores ambientales con actividad hormonal, entre otras.

Dada su posición jerárquica clave, numerosísimos reguladores del eje reproductor actúan primariamente sobre el generador hipotalámico de pulsos GnRH (Tena-Sempere & Huhtaniemi, 2003). Así, el sistema GnRH es considerado como el elemento integrador clave de moduladores centrales y periféricos del sistema reproductor, y la vía final común para la transferencia de señales a niveles 'inferiores' de este eje (hipófisis-gónadas) (Herbison & Pape, 2001). Un aspecto interesante del sistema GnRH es que su desarrollo y la adquisición de su capacidad secretora son muy anteriores a su plena activación en la pubertad. De otra parte, la expresión hipotalámica de GnRH parece considerablemente estable incluso en situaciones definidas por cambios muy sustanciales de la función del eje gonadotropo en el periodo adulto, tales como la gonadectomía o la subnutrición. Todo ello sugiere que son los cambios en los sistemas reguladores (centrales y/o periféricos) de su secreción los que determinan el estado de quiescencia o activación del generador de pulsos GnRH, y por extensión, del eje reproductor. Por todo ello, una buena parte de los esfuerzos investigadores acometidos en este área en los últimos años se ha encaminado a elucidar los sistemas y circuitos implicados en el control (activador e inhibidor) de la secreción de GnRH.

### SISTEMA KISS-1/GPR54: IDENTIFICACIÓN Y PRIMERAS FUNCIONES CONOCIDAS

El sistema KiSS-1/GPR54 es un sistema ligando-receptor, inicialmente identificado en el contexto de la biología del cáncer. Así, KiSS-1 fue clonado en 1996 como un gen supresor de metástasis cuya expresión aparecía suprimida en líneas celulares de melanoma con alta capacidad invasiva (Lee & Welch, 1997). El producto del gen KiSS-1 es una proteína precursora de 145 amino ácidos que por procesamiento proteolítico resulta en la generación de la metastina (54 amino ácidos) y otros péptidos de menor tamaño, tales como kisspeptina-14, kisspeptina-13 y kisspeptina-10, que forman la familia de las kisspeptinas (Ohtaki y cols., 2001; Kotani y cols., 2001). Por su parte, el GPR54 se identificó en 1999 como un receptor huérfano acoplado a proteínas G con siete dominios transmembrana y cierto grado de similitud con los receptores de Galanina (GalR1 45%, GalR2 44% y GalR3 45%) (Lee y cols., 1999). En términos funcionales, estudios en sistemas celulares heterólogos demostraron que este receptor emplea la ruta de los inositoles fosfato y calcio intracelular, resultando su activación en la producción de ácido araquidónico y la fosforilación de kinasas intracelulares, tales como ERK 1/2 y p38 kinasa (Kotani y cols., 2001). La demostración de que la metastina y otras kisspepti-

nas son los ligandos endógenos de GPR54 se produjo finalmente en 2001, momento en que se comprobó que la región de 10 aminoácidos del extremo C-terminal (kisspeptina-10) es suficiente para producir una máxima activación de GPR54. Como se ha indicado, las primeras funciones biológicas asignadas al sistema KiSS-1/GPR54 se relacionaron con su papel en la supresión de metástasis (de ahí el nombre de metastina). Así, diversos estudios experimentales demostraron la posible función anti-metastática de KiSS-1 en diversos tumores tales como melanoma, cáncer de mama, cáncer de tiroides y cáncer de páncreas, entre otros (Colledge, 2004). No obstante, la relevancia y/o el potencial uso terapéutico de las acciones anti-metastáticas de las kisspeptinas no se han esclarecido hasta la fecha. Junto a sus posibles efectos anti-tumorales, los análisis de expresión de KiSS-1 y GPR54 en tejidos humanos y de roedores permitieron identificar posibles sitios adicionales de localización de éstos, tales como la placenta y diversas áreas del sistema nervioso central (KiSS-1 y GPR54), así como la hipófisis, la médula espinal y el páncreas (GPR54) (Kotani y cols., 2001). Estas observaciones, unidas a las características estructurales de la proteína KiSS-1 (sugestivas de la generación de factores secretados), hicieron prever la posible implicación de este sistema en funciones biológicas adicionales, tales como el control de la secreción de oxitocina y la fisiología placentaria. Este último fenómeno es especialmente interesante dadas las similitudes entre la nidación placentaria y la invasión tumoral. Sin embargo, la importancia funcional del sistema KiSS-1 en el control de la invasión del trofoblasto es aún objeto de intenso debate.



**Figura 1:** Efecto de la administración intracerebroventricular de dosis crecientes de kisspeptina-10 (Kp-10) sobre la secreción de LH en ratas peripuberales. Las respuestas hormonales se monitorizaron a los 15 min tras la administración de un rango de dosis de Kp-10 (5 nmol, 1 nmol, 500 pmol, 100 pmol, 10 pmol, 1 pmol y 100 fmol). La dosis eficaz 50 (ED50) para Kp-10 en términos de respuesta de LH es aproximadamente 2 nmol. Tomado de Navarro y cols. 2005b, con modificaciones.

### SISTEMA KISS-1 Y CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN: NACE UNA 'ESTRELLA'

La existencia de una asociación entre el sistema KiSS-1/GPR54 y el control de la función reproductora fue puesta de manifiesto a finales de 2003, mediante la demostración de diversas deleciones y mutaciones inactivantes del gen GPR54 en pacientes con hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (IHH) (de Roux y cols., 2003; Seminara y cols., 2003). Simultáneamente, se demostró que los ratones genéticamente

modificados con inactivación de GPR54 presentan un fenotipo de hipogonadismo similar al observado en humanos (Seminara y cols., 2003). El análisis combinado de los modelos humano y murino demostró una profunda hipoplasia de los genitales internos y externos en los individuos con inactivación de GPR54, así como muy bajos niveles circulantes de esteroides sexuales y gonadotropinas (de Roux y cols., 2003; Seminara y cols., 2003). Por el contrario, la respuesta hipofisaria a GnRH estaba conservada en ausencia de GPR54, al igual que el contenido hipotalámico de este neuropéptido. Estas observaciones demostraron que la ausencia funcional de GPR54 no altera sustancialmente el proceso normal de migración de las neuronas GnRH desde la placoda olfatoria al hipotálamo en etapas tempranas del desarrollo, ni acarrea un defecto primario en los mecanismos de secreción de gonadotropinas a nivel hipofisario. Por el contrario, estos datos sugieren que la inactivación de GPR54 conlleva un fallo primario en los sistemas reguladores de la secreción de GnRH hipotalámico, poniendo de manifiesto un papel previamente insospechado, y absolutamente esencial, del sistema KiSS-1 en el control central del eje reproductor.

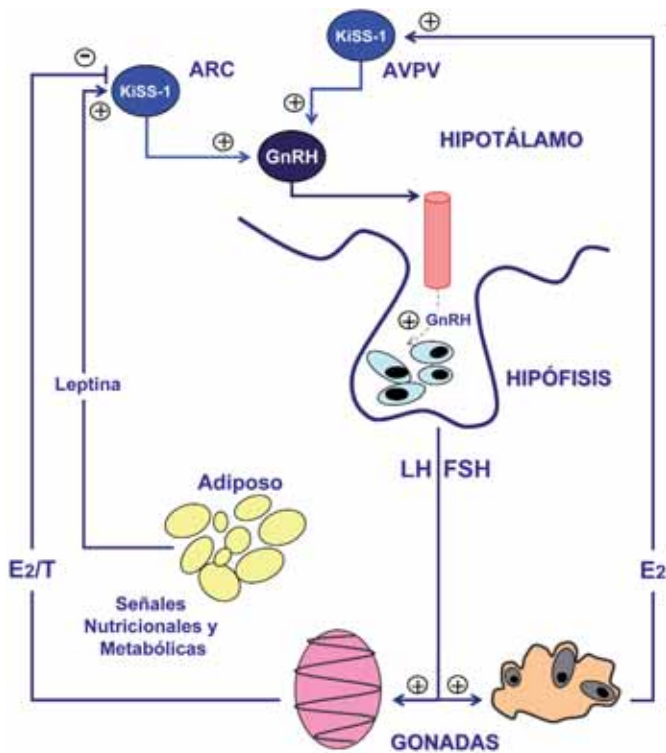
Estas observaciones experimentales atrajeron inmediatamente la atención de numerosos grupos de investigación (incluido el nuestro), que se 'embarcaron' en la caracterización del papel fisiológico del sistema KiSS-1/GPR54 en el control de la reproducción. Las evidencias experimentales acumuladas en los últimos dos años han confirmado plenamente la función crucial de KiSS-1, apuntada ya en los primeros estudios genéticos. Ejemplificaremos a continuación la importancia del sistema KiSS-1 mediante la revisión somera de su papel en aspectos tan relevantes de la función reproductora como la pubertad, el control feedback negativo de la secreción de gonadotropinas, la liberación pre-ovulatoria de LH y el control metabólico del eje gonadotropo.

### SISTEMA KISS-1 Y PUBERTAD

La demostración de ausencia de desarrollo puberal en humanos y ratones portadores de mutaciones inactivantes del GPR54 sugirieron ya un papel relevante de éste en el control de la pubertad (Seminara y cols., 2003). Los estudios experimentales realizados posteriormente han permitido sustanciar la función clave del sistema KiSS-1/GPR54 en la activación del eje gonadotropo asociada a la pubertad. Así, los primeros análisis de expresión en el hipotálamo de ratas macho y hembra a lo largo del desarrollo postnatal ya demostraron que los niveles de mRNA de KiSS-1 y GPR54 son relativamente bajos en el periodo prepuberal y aumentan coincidiendo con la llegada de la pubertad (Navarro y cols. 2004a). Observaciones similares se han obtenido en primates, confirmando que el incremento de la señalización KiSS-1/GPR54 es clave en el desencadenamiento de la pubertad (Shahab y cols., 2005). Más aún, la administración crónica de kisspeptina-10 en ratas prepuberales fue capaz de desencadenar pubertad precoz, estimada por un avance significativo en la edad de apertura vaginal y una elevación muy significativa del peso de útero y los niveles circulantes de LH, FSH y estradiol (Navarro y cols., 2004b). Adicionalmente, estudios en roedores han demostrado un incremento en la sensibilidad a las acciones estimuladoras de kisspeptinas en torno a la pubertad (Castellano y cols., 2006a). Todo ello sugiere que la activación peripuberal del sistema hipotalámico KiSS-1/GPR54 es un proceso altamente regulado, fundamental para el desencadenamiento de la pubertad en mamíferos.

### SISTEMA KISS-1 Y CONTROL DE GONADOTROPINAS: FEED-BACK NEGATIVO

Uno de los aspectos más destacados de las acciones de las kisspeptinas sobre el eje gonadotropo es su extraordinaria



**Figura 2:** Modelo tentativo del papel del sistema KiSS-1 en el eje neuroendocrino de la reproducción. Las neuronas hipotalámicas KiSS-1 operarían como integradores de numerosos reguladores centrales y periféricos, que incluyen los esteroides gonadales (Estradiol: E2; Testosterona: T), la hormona de origen adiposo, leptina, que por esta vía participaría en funciones tan relevantes como el control feed-back negativo y positivo de la secreción de GnRH/LH y la modulación de la función gonadal por señales metabólicas y nutricionales. Tomado de Tena-Sempere, 2006, con modificaciones.

potencia a la hora de inducir la liberación de LH y FSH. De hecho, la capacidad de kisspeptina-10 y metastina de estimular fuertemente la secreción de gonadotropinas fue una de las primeras facetas del sistema KiSS-1 caracterizada en detalle tras la identificación inicial del hipogonadismo asociado a inactivación de GPR54. Así, en el plazo de aproximadamente un año desde la publicación de los trabajos de Roux y Seminara (2003), diversos grupos demostraron de modo independiente la capacidad de las kisspeptinas de inducir la secreción de LH en diversas especies, tales como rata, ratón, oveja, mono y, más recientemente, humanos (revisado en Tena-Sempere, 2006). La evaluación comparativa de éstos y otros resultados previos (sobre la capacidad de diversos reguladores de estimular la secreción de gonadotropinas) permite afirmar que las kisspeptinas son el más potente estimulador del sistema GnRH/LH conocido hasta la fecha.

Una prueba adicional de la importancia fisiológica del sistema KiSS-1 en el control de la secreción de gonadotropinas fue aportada por los estudios de expresión hipotalámica del gen KiSS-1 tras la eliminación de señales gonadales inhibitorias mediante gonadectomía. En este modelo se produce, como es bien sabido, una drástica elevación de los niveles circulantes de LH y FSH, que se asocia a un aumento muy significativo en la expresión hipotalámica de KiSS-1 (y en menor medida de GPR54) en ratas macho y hembra. Esta elevación post-gonadectomía en los niveles hipotalámicos de KiSS-1 y circulantes de LH y FSH pudo ser bloqueada por el reemplazamiento hormonal con andrógenos o estrógenos (Navarro y cols., 2004a). Estas observaciones iniciales han sido recientemente ampliadas mediante análisis de hibridación in situ, que mostraron un incremento muy significativo del mRNA de KiSS-1 en el núcleo arcuato hipotalámico de ratones macho y hembra tras la gonadectomía, fenómeno que fue igualmente revertido por la administración sustitutiva de testosterona y estradiol (Smith y cols., 2005a; 2005b). Así, la estrecha correlación entre los niveles

circulantes de gonadotropinas y la expresión de KiSS-1 en núcleo arcuato sugiere que éste es un elemento clave en la regulación feedback negativa de la secreción de LH y FSH por esteroides gonadales (Tena-Sempere, 2005).

### SISTEMA KISS-1 Y LIBERACIÓN PRE-OVULATORIA DE LH: FEED-BACK POSITIVO

La extraordinaria potencia de KiSS-1 en la inducción de la secreción de LH hizo pensar desde un inicio en su posible implicación en la generación de la liberación de la secreción pre-ovulatoria de gonadotropinas característica del ciclo reproductor femenino. De hecho, recientemente se ha demostrado que la inmunoneutralización de la metastina previene la aparición del pico pre-ovulatorio en la rata cíclica (Kinoshita y cols., 2005). Sin embargo, estas observaciones no parecían corresponderse bien con el conocido papel de los estrógenos en la inducción de feedback positivo, ya que, como se apuntó en el párrafo previo, el estradiol suprime la expresión de KiSS-1 en el núcleo arcuato. Esta aparente contradicción ha sido recientemente resuelta al demostrarse mediante estudios de hibridación in situ la existencia de una segunda población de neuronas KiSS-1 hipotalámicas en la región anteroventral del núcleo periventricular (AVPV) en las que la gonadectomía reduce los niveles de expresión de KiSS-1, mientras que la administración de estradiol los aumenta (Smith y cols., 2005a; 2005b). Este patrón de respuesta es diametralmente opuesto al descrito previamente en el arcuato.

De hecho, el AVPV es un área hipotalámica que había sido previamente implicada en el control feedback positivo de gonadotropinas por el estradiol. El patrón de respuesta de las neuronas KiSS-1 a cambios en los niveles circulantes de estrógenos en el AVPV hace plausible que esta subpoblación neuronal participe en el desencadenamiento de la liberación pre-ovulatoria de gonadotropinas. En esta misma línea, datos experimentales muy recientes demuestran que en la rata se produce una activación de las neuronas KiSS-1 selectivamente en el AVPV, que no en el arcuato, en la tarde del proestro, coincidiendo con el pico pre-ovulatorio de LH (Smith y cols., 2006a). De este modo, el sofisticado sistema KiSS-1 participaría en la mediación de las acciones feed-back negativas (vía arcuato) y positivas (vía AVPV) de los esteroides sexuales sobre la secreción de gonadotropinas, aunque los mecanismos moleculares que subyacen a esta acción diferencial aún no han sido aclarados.

### SISTEMA KISS-1 Y CONTROL METABÓLICO DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

Además de su papel relevante en la pubertad y el control de la secreción de gonadotropinas, un número creciente de evidencias experimentales indica que el sistema hipotalámico KiSS-1 está igualmente implicado en el control de la función reproductora por señales metabólicas y nutricionales. En este sentido, es bien conocida la existencia de una estrecha relación entre la magnitud de los depósitos energéticos del organismo y su capacidad reproductora, que se apoya en complejos circuitos de integración neuroendocrina en los que participan, entre otras, la hormona leptina. Las primeras evidencias acerca de la participación de KiSS-1 en este fenómeno proceden de estudios de expresión hipotalámica de KiSS-1 en modelos de subnutrición o ayuno. Así, el ayuno produce una disminución de los niveles de mRNA de KiSS-1, que se asocia a un incremento moderado de los niveles de GPR54, lo que sugiere un cierto estado de sensibilización por disminución del tono KiSS-1 endógeno (Castellano y cols., 2005). Por otra parte, la administración repetida de kisspeptina a ratas subnutridas fue capaz de revertir (hasta en un 60% de los casos) la ausencia de apertura vaginal y de inducir (en un 100% de los casos) potentes respuestas de secreción de gonadotropinas y estradiol en ratas hembras peripuberales sometidas a una res-



tricción calórica del 30% (Castellano y cols., 2005). Estos datos sugieren que el mecanismo por el que un estado de insuficiencia energética suprime la función reproductora implica, al menos en parte, una inhibición central del sistema KiSS-1. Una situación similar ha sido recientemente descrita por nuestro grupo en un modelo de alteración metabólica (diabetes experimental inducida por streptozotocina) asociado a hipogonadismo, en el que se produce una disminución de la expresión central de KiSS-1 unida a una inhibición de la secreción de LH y testosterona, que puede ser revertida por la administración exógena de kisspeptina (Castellano y cols., 2006b). La hormona de origen adiposo leptina parece jugar un papel muy destacado en los mecanismos por los que se lleva a cabo el control metabólico/nutricional del sistema KiSS-1 hipotalámico, como lo sugieren el hecho de que las neuronas KiSS-1 poseen receptores a leptina (Smith y cols., 2006b), y que la administración central de leptina sea suficiente para normalizar los niveles relativos de expresión de KiSS-1 en ratas diabéticas hipoleptinémicas (Castellano y cols., 2006b). Estas observaciones, muy recientes, ponen de manifiesto la existencia de una conexión leptina-kisspeptina en el control del eje reproductor, contribuyendo a esclarecer los mecanismos neuroendocrinos por los que se lleva a cabo las acciones reproductoras de la leptina, bien conocidas desde hace más una década. Es de resaltar que las kisspeptinas no parecen ejercer un efecto regulador directo sobre la ingesta de alimentos a corto y largo plazo (Castellano y cols., 2005), lo que sugiere que, a diferencia de otras señales implicadas en el control conjunto del balance energético y la función reproductora, el sistema KiSS-1 es un regulador altamente selectivo del eje reproductor.

## CONCLUSIONES

A pesar de su reciente identificación, en los últimos 3 años el sistema KiSS-1 ha concitado un extraordinario interés en diversas áreas de la Endocrinología, siendo hoy reconocido unánimemente como un elemento esencial en el control de la función reproductora. De hecho, como se ha indicado en epígrafes previos, aspectos clave del desarrollo y función del eje reproductor, tales como la pubertad, el control hormonal de la ovulación, la modulación de la secreción de gonadotropinas o la regulación de la reproducción por señales metabólicas y nutricionales 'pasan' por las neuronas KiSS-1 hipotalámicas, que operarían como auténticos integradores de los diversos factores que regulan la reproducción. En la hipótesis más provocadora, las neuronas GnRH actuarían meramente como elemento efector de este sistema dinámico de integración, lo que cambiaría sustancialmente nuestra forma de entender los mecanismos neuroendocrinos de control de la reproducción. A buen seguro, ésta y otras cuestiones acerca de la fisiología del sistema KiSS-1 serán resueltas en los próximos años. En cualquier caso, la historia científica de las kisspeptinas es especialmente ilustrativa, ya que en ella se ejemplifica, entre otras, la importancia de la integración de diversas disciplinas científicas (el gen KiSS-1 se identificó en el contexto de la biología tumoral) y la relevancia de la interacción entre estudios clínicos y experimentales (el hipogonadismo en pacientes con inactivación de GPR54 permitió iniciar estudios experimentales en otras especies). Sea como fuere, la identificación de KiSS-1 (cuyo nombre es una coincidencia afortunada, teniendo en cuenta que se acuñó años antes de conocer su implicación reproductora) se considera ya el hallazgo más relevante en la Fisiología de la Reproducción desde el aislamiento del GnRH hace aproximadamente 35 años. Afortunadamente, aún queda mucho trabajo por hacer.

## REFERENCIAS

-Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, et al. (2005) Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition.

Endocrinology 146:3917-3925.

-Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castano JP, Malagon MM, Aguilar E, Dieguez C, Magni P, Pinilla L, Tena-Sempere M (2006a) Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 257-258:75-83.

-Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Roa J, Vigo E, Pineda R, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M (2006b) Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes* 55:2602-2610.

Colledge WH (2004) GPR54 and puberty. *Trends Endocrinol Metab* 15:448-453.

-de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E (2003) Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10972-10976.

-Herbison AE, Pape JR (2001) New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol* 22:291-308.

-Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K (2005) Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146:4431-4436.

-Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. (2001) The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276:34631-34636.

-Lee JH, Welch DR (1997) Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *Int J Cancer* 71:1035-1044.

-Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Chang R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF (1999) Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446:103-107.

-Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro M.L., Roa J, Sánchez-Criado J.E., Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (2004a) Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor GPR54 in rat hypothalamus and potent LH releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 145:4565-4574.

-Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, et al. (2004b) Advanced Vaginal Opening and Precocious Activation of the Reproductive Axis by KiSS-1 Peptide, the Endogenous Ligand of GPR54. *J Physiol* 561:379-386.

-Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G protein-coupled receptor. *Nature* 411:613-617.

-Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM (2005) Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2129-2134.

-Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierio JS, Shagoury JK, et al. (2003) The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl J Med* 349:1614-1627.

-Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA (2005a) Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146:2976-2984.

-Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA (2005b) Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146:3686-3692.

-Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA (2006a) Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 26:6687-6694.

-Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA (2006b) KiSS-1 neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 18:298-303.

-Tena-Sempere M, Huhtaniemi I (2003) Gonadotropins and gonadotropin receptors. En: *Reproductive Medicine - Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals* (Fausser BCJM, ed), pp 225-244, New York: Parthenon Publishing.

-Tena-Sempere M (2005) Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology* 146:3683-3685.

-Tena-Sempere M (2006) GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Update* 12:631-639.

Correspondencia: Manuel Tena-Sempere  
Sección de Fisiología.

Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.  
Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba  
Avda. Menéndez Pidal s/n  
14004 Córdoba  
FAX: +34-957-218288; E-mail: fi1tesem@uco.esd

**Las evidencias más recientes sugieren que ni la glucosa elevada ni los ácidos grasos elevados en solitario son dañinos para la célula  $\beta$ , ya que en ambos casos la célula activa mecanismos adaptativos y detoxificadores. En este sentido, el concepto de glucolipototoxicidad está emergiendo, ya que es el único que explica los efectos tóxicos sinérgicos que ambos nutrientes ejercen conjuntamente sobre la disfunción de la célula  $\beta$ .**

## Glucolipototoxicidad: Perspectivas en Diabetes Tipo 2.

Enrique Roche Collado

### SUMARIO

Las células  $\beta$  pancreáticas poseen un sistema acoplado de respuesta a estímulos que requiere el metabolismo de los nutrientes para inducir procesos eléctricos, metabólicos y de tráfico de membranas que desencadenarían la secreción de insulina. La glucosa es el principal secretagogo de la célula  $\beta$  y a través de su metabolismo genera señales intracelulares que están conectadas al proceso excitotónico. Los ácidos grasos pueden actuar potenciando la acción de la glucosa.

Por el contrario, las elevadas concentraciones circulantes de glucosa y ácidos grasos (típicas de la patología diabética) dan lugar a una disfunción en la célula  $\beta$ -pancreática caracterizada por un patrón alterado de la secreción de insulina estimulada por glucosa y cambios fenotípicos adicionales resultantes de un desorden poligénico inicial. En este proceso, las moléculas de señalización generadas por los nutrientes a lo largo del tiempo se convierten en metabolitos tóxicos que producen disfunción y muerte celular. En este contexto, el término *toxicidad a los nutrientes* implica alteraciones celulares irreversibles causadas por la exposición crónica a altas concentraciones de glucosa y ácidos grasos. Las recientes investigaciones que se citan en esta revisión, han permitido la disección molecular de este proceso y su relación con la diabetes tipo 2.

### INTRODUCCIÓN

La hiperglucemia fue considerada en una primera instancia como el evento promotor que desembocaba en efectos deletéreos sobre la célula  $\beta$ , lo que permitió acuñar el concepto de glucotoxicidad. Sin embargo, los estudios posteriores realizados en humanos y modelos animales y la alta asociación con la obesidad, reconsideraron a la diabetes tipo 2 como una patología de desorden lipídico, dando lugar a un nuevo concepto: lipotoxicidad. Sin embargo, las evidencias más recientes sugieren que ni la glucosa elevada ni los ácidos grasos elevados en solitario, sean dañinos para la célula  $\beta$ , ya que en ambos casos la célula activa mecanismos adaptativos y detoxificadores. En este sentido, el concepto de glucolipototoxicidad está emergiendo ya que es el único que explica los efectos tóxicos sinérgicos que ambos nutrientes ejercen conjuntamente sobre la disfunción de la célula  $\beta$  (Roduit y cols, 2000). La fase de adaptación-detoxificación implica cambios funcionales que aseguran una adecuada secreción para una demanda extracelular en exceso, que se evidencia por un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de secreción y otros cambios funcionales (Roche y cols, 1997). Los eventos moleculares, así como los cambios génicos que operan durante esta fase, no han sido totalmente caracterizados. En muchos casos, y dependiendo del sistema experimental, estos cambios eran atribuidos al proceso tóxico final más que a la respuesta adaptativa-detoxificadora. Esto implica además que durante la fase de adaptación existe una reversibilidad, es decir, es posible reestablecer la funcionalidad normal en la célula  $\beta$  normalizando las concentraciones circulantes de nutrientes. Esto significa también que existe un punto sin retorno que una vez traspasado no permite el reestablecimiento de la función celular, incluso en las condiciones extracelulares más favorables. Por lo tanto, la hiperglucemia y la hiperlipidemia conjuntas

convierten de forma progresiva a la célula  $\beta$  en insensible en términos de secreción de insulina estimulada por glucosa, y esta alteración está relacionada con el tipo de nutriente, concentración extracelular y tiempo de exposición. La adaptación degenera hacia un proceso de muerte celular que todavía no ha sido bien caracterizado dada la variedad de sistemas experimentales utilizados. Así por ejemplo, en cultivos celulares, en los que se puede trabajar con concentraciones muy elevadas de nutrientes, la toxicidad se desarrolla de una forma muy rápida (días). Sin embargo, en humanos los eventos postprandiales descontrolados como resultado de una intolerancia a la glucosa, nunca llegan a los niveles con los que se trabaja en sistemas celulares, pero pueden desencadenar toxicidad a los nutrientes durante periodos más largos de tiempo (años) (Robertson y cols, 2004). Como se ha comentado, el tipo de nutriente es también un punto a tener en cuenta, sobre todo en el caso de los ácidos grasos, en los que el efecto lipotóxico se ha atribuido sobre todo a los ácidos grasos saturados más que a los monoinsaturados (Maedler y cols, 2001, 2003) (Welters y cols, 2004).

En el contexto de la célula  $\beta$ , el concepto de glucolipototoxicidad implica que tanto la glucosa como los ácidos grasos son importantes moduladores de la expresión de determinados programas génicos. Además, la glucosa debe influir sobre el metabolismo lipídico y viceversa, ya que de hecho muchos de los efectos deletéreos atribuidos a la glucosa son en parte el resultado de la lipotoxicidad (Segall y cols, 1999). Esta conexión entre el metabolismo glucídico y lipídico se puede llevar a cabo a través de reacciones de anaplerosis y cataplerosis que permiten la salida de citrato del ciclo de Krebs mitocondrial y su incorporación a la ruta lipogénica citosólica (Farfari y cols, 2000). Sin embargo, esta no es la única conexión funcional existente entre ambos metabolismos, por ejemplo, ciertos intermediarios de la ruta glucolítica pueden ser utilizados como sustratos para la síntesis de triglicéridos y diacilgliceroles (Prentki y cols, 2002).

Aunque el proceso de adaptación de la célula  $\beta$  a altas concentraciones de glucosa y ácidos grasos por separado es operativo, no evita sin embargo que, si éstas perduran en el tiempo, se desarrollen procesos de glucotoxicidad y lipotoxicidad (Maestre y cols, 2003). Lo que ocurre es que estos eventos no son atribuibles exclusivamente a la diabetes tipo 2.

### GLUCOADAPTACIÓN-GLUCOTOXICIDAD-GLUCOAPOPTOSIS

Durante muchos años, la concentración elevada de glucosa ha sido reconocida como el factor desencadenante no sólo de la disfunción a nivel de la célula  $\beta$  pancreática, sino además de las complicaciones asociadas a la diabetes tipo 2. A ello han contribuido mucho los estudios realizados en modelos animales de hiperglucemia crónica, como los animales pancreatectomizados, el roedor *Psammomys obesus* y los sistemas de células cultivadas.

La fase de glucoadaptación incluye la activación de ciertos programas génicos y un incremento en el metabolismo, que conduciría a un aumento de la sensibilidad a la glucosa y a una secreción de insulina aumentada a concentraciones estimuladoras de glucosa (Roche y cols, 1997). Si las concentraciones



elevadas de glucosa persisten, el proceso degenera hacia la glucotoxicidad, donde la célula no es capaz de recuperar su función normal, presentando un metabolismo alterado y una pérdida de expresión del gen de la insulina. Finalmente, la última fase culmina con la activación de los programas de suicidio celular (glucoapoptosis) en la que participarían procesos de desequilibrio oxidativo y de lipotoxicidad (Roche y cols, 1998). Desde un punto de vista molecular, la adaptación de la célula  $\beta$  a la hiperglucemia implica la activación de importantes rutas metabólicas, tales como la glucólisis, anaplerosis-cataplerosis y lipogénesis, a través de la modulación de la expresión de ciertos genes y el control de diversas actividades enzimáticas (Roche y cols, 1997, 1998). Durante esta fase se produce la acumulación de los principales depósitos energéticos: glucógeno y triglicéridos (Roche y cols 1997, 1998). El flujo glucolítico aumentado debido a un incremento en ciertas actividades enzimáticas, da como resultado una mayor utilización y oxidación de la glucosa acompañadas de incrementos en los niveles de nucleótidos reducidos, que al reoxidarse en la mitocondria incrementan la producción de ATP. La anaplerosis a través de la piruvato carboxilasa, más que a través de la glutamato deshidrogenada, podría contribuir a incrementar el metabolismo mitocondrial.

Bajo estas condiciones, parte del esqueleto carbonado de la glucosa puede abandonar la mitocondria e incorporarse a la ruta lipogénica, en la cual la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y a la ácido graso sintetasa (FAS) están inducidas (Roche y cols, 1998). En esta situación, la oxidación de los ácidos grasos está inhibida como resultado de un incremento en los niveles de malonil-CoA, el producto de la reacción catalizada por la ACC. El malonil-CoA es el inhibidor fisiológico de la carnitina-palmitoil transferasa I (CPT-I), la enzima que cataliza el paso limitante en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. En estas circunstancias, el malonil-CoA es derivado hacia procesos biosintéticos gracias a la actividad incrementada de la FAS, un enzima cuya expresión es débil en células  $\beta$  cultivadas en condiciones de normoglucemia. En este punto, las evidencias experimentales que sugieren cómo continúa el proceso están menos desarrolladas, pero se ha postulado la síntesis de formas lipídicas complejas que activarían a ciertas isoformas de la proteína quinasa C o acilariarían a proteínas de la maquinaria secretora (Prentki y cols, 2001, 2002).

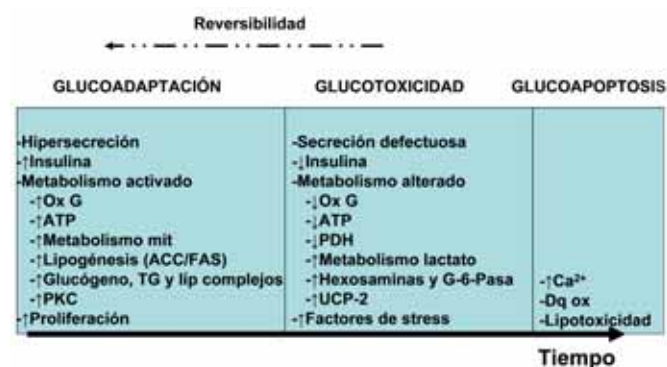
Todos estos cambios van acompañados de un aumento en la expresión del gen de la insulina, una secreción aumentada de la hormona y una elevada actividad proliferativa, que se evidencia sobre todo en los sistemas de células cultivadas (Roche y cols, 1997). Para ello es necesaria la inducción de genes de respuesta temprana, en la que muchos de ellos codifican factores de transcripción, que juegan un papel clave en la regulación del ciclo celular. En esta línea, estudios recientes realizados en células MIN-6 cultivadas en condiciones de hiperglucemia revelan que el 80% de los genes activados por glucosa, son activados también por KCl (Ohsugi y cols, 2004), sugiriendo que el incremento en el  $Ca^{2+}$  intracelular actúa de segundo mensajero en los procesos tempranos inducidos por este nutriente, como ya se sugirió previamente (Susini y cols, 1998). Además, en el mismo análisis se indica que el 71% de los genes activados por glucosa, lo son también por insulina, sugiriendo un interesante efecto auto-paracrino, que podría jugar un papel clave en los mecanismos de reparación celular (Ohsugi y cols, 2004). Incubaciones durante periodos más largos de tiempo en condiciones de hiperglucemia indican un efecto de la glucosa sobre genes que codifican enzimas del metabolismo intermediario, proteínas de rutas de señalización, factores de transcripción y componentes del aparato exocitótico (Bougnères, 2002).

Si la situación de hiperglucemia persiste a lo largo del tiempo, el metabolismo de la célula  $\beta$  se ve severamente afectado con una disminución en la producción de ATP, la oxidación de la glucosa, la actividad de la piruvato deshidrogenada y un incre-

mento en la expresión de la proteína desacopladora-2 (UCP-2). En estas condiciones, intermediarios del metabolismo de la glucosa se pueden acumular y activar rutas alternativas relacionadas con el desequilibrio oxidativo. Éstos incluyen la autooxidación del gliceraldehído como resultado de la inhibición de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada, la biosíntesis de diacilglicerol a partir de la dihidroxiacetona, lo que permitiría la activación de determinadas isoformas de la PKC y un flujo metabólico incrementado hacia la mitocondria, lo que favorecería la formación de radicales libres del oxígeno. La ruta de las hexosaminas también se activa en estas condiciones induciendo la glicosilación de proteínas y el desequilibrio oxidativo (Robertson y cols, 2004).

Además, se produce la activación de numerosos genes, que normalmente no se encuentran activados en la célula  $\beta$  madura. Estos genes codifican proteínas de estrés, enzimas del metabolismo del lactato y de la mitocondria y la glucosa-6-fosfatasa (Jonas y cols, 1999). Finalmente, la excesiva concentración de glucosa puede inducir lipotoxicidad, ya que al incrementar los niveles de malonil-CoA se favorecerían los procesos de esterificación lipídica y de deposición de triglicéridos (Roche y cols, 1998).

Todo esto viene acompañado de una inhibición de la expresión del gen de la insulina y errores en el procesamiento de la hormona. El proceso culmina con la activación de programas de apoptosis en los que el  $Ca^{2+}$  intracelular juega un papel clave, ya que la inhibición farmacológica de su entrada en el citosol reduce considerablemente el proceso de muerte celular programada. Un resumen del proceso queda esquematizado en la Figura 1.



**Figura 1.-** Principales eventos moleculares y celulares que ocurren en la progresión de la célula  $\beta$  pancreática desde la glucoadaptación hasta la glucoapoptosis, pasando por la glucotoxicidad. Se trata de un esquema hipotético que trata de recoger los principales eventos descritos por la literatura. Es importante indicar que esta transición es un proceso progresivo y continuo, en el que las fronteras entre las distintas fases no existen en la realidad. La flecha discontinua en la parte superior indica que, en algún momento, el proceso es reversible y la célula  $\beta$  puede recuperar su función. Ver texto para más detalles. Abreviaturas y símbolos utilizados: ACC: acetil-CoA carboxilasa, Dq ox: desequilibrio oxidativo, FAS: ácido graso sintetasa, G-6-Pasa: glucosa-6-fosfatasa, lip: lípidos, mit: mitocondrial, Ox G: oxidación de la glucosa, PDH: piruvato deshidrogenasa, PKC: proteína quinasa C, TG: triglicéridos, UCP: proteína desacopladora-2, ↑: proceso o actividad enzimática incrementados, ↓: proceso o actividad enzimática disminuidos.

## LIPOADAPTACIÓN-LIPOTOXICIDAD-LIPOAPOPTOSIS

Los lípidos son nutrientes clave modulando la función de la célula  $\beta$  pancreática. Una exposición aguda a concentraciones elevadas de ácidos grasos potencia la secreción de insulina estimulada por glucosa, lo que sugiere que estos compuestos generarían factores de acoplamiento intracelulares todavía por caracterizar. Se ha postulado que algunos de ellos podrían regular determinadas isoformas de la PKC, modular la actividad de canales de  $Ca^{2+}$  y la acilación de proteínas que participarían en el tráfico de membranas y en el proceso exocitótico (Yaney y Corkey, 2003). Al igual que con la glucosa, una exposición prolongada a altas concentraciones de ácidos grasos resulta en una secreción de insulina alterada y una disfunción

de la célula  $\beta$ . La curva de secreción también muestra el típico desplazamiento hacia la izquierda anteriormente señalado para la hiperglucemia, con una secreción aumentada a bajas concentraciones de glucosa y una pérdida de la sensibilidad a concentraciones estimuladoras del azúcar.

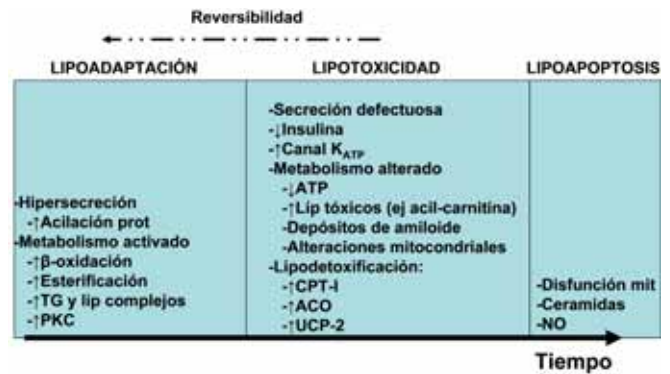
Al igual que se describió en el caso de la glucosa, el proceso lipotóxico viene precedido de una fase de lipoadaptación, caracterizada por la inducción de programas génicos específicos y mecanismos de detoxificación encaminados a eliminar el exceso de metabolitos lipídicos. En estas condiciones se induce la expresión temprana del gen que codifica la CPT-I, el enzima clave en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, y la acil-CoA oxidasa (ACO), el enzima limitante en la  $\beta$ -oxidación peroxisomal (Assimacopoulos-Jeannet y cols, 1997). Al mismo tiempo, se induce el gen que codifica la UCP-2 para desacoplar la producción mitocondrial de ATP (Lameloise y cols, 2001). Además, la expresión de la ACC se ve disminuida y con ella, la síntesis de malonil-CoA. Esta remodelación metabólica va principalmente encaminada a detoxificar el exceso de lípidos mediante la activación de las rutas lipolíticas y la inhibición de la lipogénesis. Sin embargo, estos sistemas detoxificadores funcionando durante largos periodos de tiempo pueden a la larga resultar dañinos para la célula  $\beta$ . Por ejemplo, la activación del metabolismo mitocondrial podría favorecer la producción de sustancias reactivas del oxígeno y la ACO genera  $H_2O_2$  como producto de la reacción que cataliza. Todo esto va unido a los bajos niveles de enzimas antioxidantes que se expresan en la célula  $\beta$ , favoreciendo la formación de desequilibrio oxidativo.

Estas condiciones, que desembocan en la lipotoxicidad, se caracterizan porque las células presentan un patrón secretor alterado, una apertura permanente del canal de potasio dependiente de ATP, baja producción de ATP por la inducción de la UCP-2 y una expresión reducida del gen de la insulina. En este punto, la naturaleza del ácido graso es clave. Así se ha descrito que los ácidos grasos saturados (por ejemplo palmitato) son los que verdaderamente ejercen el efecto lipotóxico, mientras que los monoinsaturados (por ejemplo palmitoleato, oleato) tendrían un efecto protector. La explicación de esta observación parece que tendría que ver con la facilidad con la que el oleato podría acumularse en forma de triglicéridos, mientras que el palmitato tendería a formar derivados más tóxicos como por ejemplo las palmitoil-carnitinas.

Sin embargo, si las concentraciones elevadas de ácidos grasos persisten, se entra en un proceso de disfunción mitocondrial, en el que todo tipo de ácido graso es igualmente tóxico (Maestre y cols, 2003). Además, el proceso culmina con la lipopoptosis en la que nuevamente la mitocondria juega un papel preponderante. Se ha propuesto también la participación de la ruta de las ceramidas, pero ésta sería sólo relevante en el caso de los ácidos grasos saturados. En estas circunstancias, proteínas localizadas en el interior de la mitocondria, como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF), son liberadas al citosol (Maestre y cols, 2003). Además la superficie mitocondrial se enriquece en proteínas proapoptóticas, como Bax, conjuntamente con alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial. El proceso culmina con la activación de caspasas, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y desencadenamiento de la apoptosis (Maestre y cols, 2003). Los ácidos grasos pueden además inducir el gen de respuesta temprana nur-77, para el que se ha descrito su participación en la apoptosis a través de su migración desde el núcleo a la mitocondria, aunque este aspecto no ha sido todavía analizado en la célula  $\beta$ . Conjuntamente, se ha descrito que la deposición de amiloide podría contribuir a desarrollar este proceso apoptótico. Un resumen del proceso queda reflejado en la Figura 2.

## GLUCOLIPOTOXICIDAD

Sin embargo, la patología diabética se caracteriza por tener simultáneamente elevadas las concentraciones circulantes de



**Figura 2.** Principales eventos moleculares y celulares que ocurren en la progresión de la célula  $\beta$  pancreática desde la lipoadaptación hasta la lipopoptosis, pasando por la lipotoxicidad. Se trata de un esquema hipotético que trata de recoger los principales eventos descritos por la literatura. Al igual que en el caso anterior, esta transición es un proceso progresivo y continuo, en el que las fronteras entre las distintas fases no existen en la realidad. La flecha discontinua en la parte superior indica que, en algún momento, el proceso es reversible y la célula  $\beta$  puede recuperar su función. Ver texto para más detalles. Abreviaturas y símbolos utilizados: ACO: acil-CoA oxidasa, Canal  $K_{ATP}$ : canal de potasio dependiente de ATP, CPT-I: carnitín-palmitoil transferasa-I, lip: lípidos, mit: mitocondrial, NO: óxido nítrico, PKC: proteína quinasa C, prot: proteínas, TG: triglicéridos, UCP: proteína desacopladora-2, ↑: proceso o actividad enzimática incrementados, ↓: proceso o actividad enzimática disminuidos.

glucosa y ácidos grasos. Esto hace que los procesos de adaptación y detoxificación funcionen defectuosamente en estas condiciones. Así, por ejemplo, la  $\beta$ -oxidación se ve reducida, a pesar de la inducción de la CPT-I, por los elevados niveles de malonil-CoA como resultado de las elevadas concentraciones de glucosa. Además la alta glucosa disminuye los niveles de expresión del factor de transcripción PPAR- $\alpha$  (receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales), que es clave para la inducción de la ACO y de la UCP-2 por los ácidos grasos. En otras palabras, la elevada glucosa evita que los mecanismos de lipodetoxicación actúen óptimamente (Roudit y cols, 2000). En este sentido, sería muy importante poder determinar los programas de expresión de genes que son activados y reprimidos en estas condiciones de glucolipotoxicidad con la idea de poder diseñar estrategias moleculares específicas con utilidad terapéutica en la diabetes tipo 2. Con esta idea, y aprovechando la tecnología de las micromatrices de ADN, nuestro grupo, en colaboración con el del Dr Marc Prentki (Universidad de Montreal), realizó un análisis del perfil de expresión génica de células INS832/13 cultivadas en condiciones de glucolipotoxicidad (20 mM glucosa + 0.3 mM palmitato).

Aunque se observaron cambios en más de 800 genes, es interesante señalar alteraciones importantes en el nivel de expresión de factores de transcripción, en genes codificadores de enzimas implicadas en procesos metabólicos, proteínas de la ruta de biosíntesis de insulina, factores del ciclo celular y en componentes de la maquinaria exocitótica y de señalización por incretinas y factores de crecimiento.

En resumen, los datos obtenidos proporcionan una valiosa información para continuar las investigaciones en las bases moleculares de la glucolipotoxicidad y algunos de los genes detectados podrían constituir dianas para futuras estrategias terapéuticas en diabetes tipo 2. Aún con todo, investigaciones complementarias en modelos más fisiológicos, como modelos animales de diabetes o células  $\beta$  humanas purificadas procedentes de donantes cadavéricos, serían necesarias para validar estos resultados preliminares.

## REFERENCIAS

- Assimacopoulos-Jeannet F, Thumelin S, Roche E, Esser V, McGarry JD, Prentki M (1997) Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic beta-cell line INS-1. *J Biol Chem* 272: 1659-1664.
- Bougnères P (2002) Genetics of obesity and type 2 diabetes. Tracking pathogenic traits during the predisease period. *Diabetes* 51 (Suppl 3): S295-303.
- Farfari S, Schulz V, Corkey B, Prentki M (2000) Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citra-



te shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49: 718-726.

-Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC (1999) Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274: 14112-14121.

-Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, Assimacopoulos-Jeannet F (2001) Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes* 50: 803-809.

-Maedler K, Spinas GA, Dyrant D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY (2001) Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 50: 69-76.

-Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY (2003) Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52: 726-733.

-Maestre I, Jordan J, Calvo S, Reig JA, Ceña V, Soria B, Prentki M, Roche E (2003) Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology* 144: 335-345.

-Ohsugi M, Cras-Meneur C, Zhou Y, Warren W, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA (2004) Glucose and insulin treatment of insulinoma cells results in transcriptional regulation of a common set of genes. *Diabetes* 53: 1496-1508.

-Prentki M, Roduit R, Lameloise N, Corkey BE, Assimacopoulos-Jeannet F (2001) Glucotoxicity, lipotoxicity pancreatic beta cell failure: a role for Malonyl-CoA, PPAR $\alpha$  and altered lipid partitioning. *Canadian Journal of Diabetes Care* 25: 36-46.

-Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R (2002) Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 (Suppl 3): S405-413.

-Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V (2004) Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53 (Suppl 1): S119-124.

-Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Witters LA, Perruchoud B, Yaney G, Corkey B, Asfari M, Prentki M (1997) Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J Biol Chem* 272: 3091-3098.

-Roche E, Farfari S, Witters LA, Assimacopoulos-Jeannet F, Thumelin S, Brun T, Corkey BE, Saha AK, Prentki M (1998) Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression. *Diabetes* 47: 1086-1094.

-Roduit R, Morin J, Masse F, Segall L, Roche E, Newgard CB, Assimacopoulos-Jeannet F, Prentki M (2000) Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene in the pancreatic beta -cell. *J Biol Chem* 275: 35799-35806.

-Segall L, Lameloise N, Assimacopoulos-Jeannet F, Roche E, Corkey P, Thumelin S, Corkey BE, Prentki M (1999) Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *Am J Physiol* 277: E521-528.

-Susini S, Roche E, Prentki M, Schlegel W (1998) Glucose and glucocorticoid peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic beta(INS-1) cells. *FASEB J* 12: 1173-1182.

-Welters HJ, Tadayon M, Scarpello JH, Smith SA, Morgan NG (2004) Mono-unsaturated fatty acids protect against beta-cell apoptosis induced by saturated fatty acids, serum withdrawal or cytokine exposure. *FEBS Lett* 560: 103-108.

-Yaney GC, Corkey BE (2003) Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46: 1297-1312.

#### AGRADECIMIENTOS

Financiado por la Consellería de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana GV06/334.

Correspondencia: Enrique Roche Collado. Área de Nutrición  
Departamento de Biología Aplicada · Universidad Miguel Hernández  
Avda de la Universidad s/n, 03202-Elche (Alicante)  
Tfno: 96-522-2029 · Fax: 96-665-8511 · e-mail: eroche@umh.es

**La motilidad gastrointestinal depende de una serie de mecanismos de control regulados por el sistema nervioso entérico (SNE). Otro elemento fundamental para el control del sistema gastrointestinal son las células musculares lisas, que presentan sus propios elementos de regulación de la actividad contráctil. Finalmente las redes de Células Intersticiales de Cajal (ICC) conforman el marcapasos intestinal y pueden constituir una interfase entre las motoneuronas del SNE y las células musculares lisas. En esta revisión se describe los mecanismos básicos de interacción celular entre las motoneuronas, el fenómeno marcapasos y la excitabilidad de la célula muscular lisa.**

## Actividad Motora Gastrointestinal: Mecanismos Intrínsecos Reguladores. *Jordi Aleu y Marcel Jiménez*

### INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal desempeña el complejo proceso de digestión de los alimentos dando nutrientes que, finalmente, deben ser absorbidos. Para poder cumplir esta función tiene que existir una buena coordinación entre las funciones de secreción, absorción y motilidad presentes a lo largo del tracto gastrointestinal. En los últimos 100 años, la motilidad gastrointestinal ha sido objeto de un gran número de estudios. La motilidad depende de una serie de mecanismos de control que, en gran medida, están situados a nivel de la pared intestinal y que son regulados por el sistema nervioso entérico (SNE), que se considera una división del sistema nervioso autónomo. A nivel del SNE hay 80-100 millones de neuronas que son responsables de la coordinación intrínseca de la actividad motora de gran parte del tracto gastrointestinal. Fenómenos como la peristalsis o la relajación esfinteriana son mecanismos que dependen fundamentalmente de la interacción entre los mecanismos de transducción de la señal a nivel del epitelio, el SNE y las células musculares lisas. No es sorprendente que las neuropatías del SNE cursen con graves afectaciones de la motilidad, alterando seriamente la calidad de vida de los pacientes. Además del SNE, existe otro elemento fundamental para el control del sistema gastrointestinal: las redes de Células Intersticiales de Cajal (ICC). Éstas conforman el marcapasos intestinal y pueden constituir una interfase entre las motoneuronas del SNE y las células musculares lisas.

Finalmente, están las células musculares lisas, quienes presentan sus propios elementos de regulación de la actividad contráctil. En este breve resumen nos centraremos en los mecanismos básicos de interacción celular entre las motoneuronas, el fenómeno marcapasos y la excitabilidad de la célula muscular lisa basándonos en la experiencia de nuestro laboratorio.

### VÍA MOTORA

La despolarización de las neuronas entéricas se produce por la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje. Ello conlleva la entrada de calcio a los terminales nerviosos y la posterior liberación de neurotransmisores. Entre los canales de calcio descritos hasta ahora, el subtipo N (neural) aparece como predominante. Esto se ha demostrado en experimentos realizados en intestino de cerdo y perro mediante el empleo de  $\Omega$ -conotoxina GVIA (bloqueante específico de canales de calcio de tipo N; Borderies et al., 1997). Sin embargo, este principio puede que no sea de aplicación universal puesto que, al menos en el intestino de rata, la presencia de  $\Omega$ -conotoxina GVIA no produce un bloqueo completo de la liberación de neurotransmisores, lo que sugiere o bien la participación de otros subtipos de canales de calcio o el ineficiente bloqueo de los canales de calcio de tipo N por parte de esta toxina en estas especies (Borderies et al., 1996). Una vez liberados, los neurotransmisores interactúan con los receptores específicos localizados en las células musculares lo



**Figura 1.**- Registro de ondas lentas y de potenciales de unión inhibitorios (IJP) en íleon de cerdo mediante electrodos intracelulares. Los IJPs son inducidos por estimulación eléctrica de campo a voltajes de estimulación creciente.

que conlleva unos cambios intracelulares que pueden modificar el potencial de reposo. Estos cambios pueden ser o bien potenciales de unión excitatorios (EJP), causando la despolarización y posterior contracción de las células musculares, o bien potenciales de unión inhibitorios (IJP) (figura 1), provocando la hiperpolarización de las células musculares que conllevaría una relajación de las mismas.

### Neurotransmisores excitatorios

Los principales neurotransmisores excitatorios en el sistema nervioso entérico son la Acetilcolina y la sustancia P. Éstos inducen la contracción muscular a través de la unión al receptor y la posterior despolarización de la membrana plasmática a valores de potencial situados por encima del valor umbral de la apertura de canales de calcio (potencial de unión excitatorio) y/o mediante la liberación directa de iones de calcio localizados en los almacenes intracelulares. En la célula muscular lisa, ambos mecanismos coexisten y se interrelacionan: la entrada de calcio a la célula produce la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático, fenómeno conocido como "calcium inducing calcium release"

### Neurotransmisores inhibitorios

Hoy en día se asume que la neurotransmisión inhibitoria es mucho más compleja de lo que se pensaba hace unos años y depende de una serie de neurotransmisores relacionados entre sí, obedeciendo a un fenómeno complejo de cotransmisión donde NO, ATP (Pluja et al., 1999) y otros neurotransmisores como el VIP/PACAP pueden ser liberados por las motoneuronas inhibitorias. Finalmente, se acaba de añadir a esta lista de neurotransmisores inhibitorios al CO y al H<sub>2</sub>S (Wu y Wang, 2005; Teague et al., 2002).

Desde la aparición de los transmisores endógenos nitrérgicos, se ha considerado al óxido nítrico como el principal neurotransmisor responsable de las respuestas inhibitorias en el tracto gastrointestinal (Bult et al., 1990). La formación de GMPc provoca la posterior activación de canales de potasio, produciendo hiperpolarización de la célula muscular y alejando a la célula del voltaje de apertura de los canales de calcio de tipo L. La falta de neuronas nitrérgicas es responsable de alteraciones graves de la motilidad intestinal, como por ejemplo la acalasia esofágica (Mearin et al., 1993). Sin embargo, inhibidores de la sintasa del óxido nítrico no bloquean los potenciales de unión inhibitorios; por tanto, dicha neurotransmisión no es únicamente nitrérgica.

Otro neurotransmisor responsable de la neurotransmisión inhibitoria es el ATP (Burnstock et al., 1970). Recientemente se han desarrollado antagonistas selectivos para algunos de los distintos subtipos de los receptores purinérgicos. Datos de

nuestro laboratorio, junto con estudios inmunohistoquímicos, sugieren que los receptores P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> serían los responsables de la hiperpolarización de la célula muscular lisa en el tracto gastrointestinal humano (Gallego et al., 2006).

Finalmente, es interesante tener en cuenta el papel, todavía hoy en día desconocido, del H<sub>2</sub>S. Datos preliminares de nuestro laboratorio sugieren que el H<sub>2</sub>S podría relajar el colon humano y de rata a través de canales de potasio sensibles a ATP y de canales de potasio de baja conductancia activados por calcio.

## MECANISMOS MARCAPASOS Y ONDAS LENTAS INTESTINALES

El músculo liso del intestino muestra despolarizaciones cíclicas denominadas ondas lentas (figura 1a y b). Los primeros registros de estas ondas se realizaron en 1922 con electrodos extracelulares (Álvarez y Mahoney, 1922), y en 1954 mediante registro intracelular (Bülbring, 1954). Las ondas lentas presentan una frecuencia constante cuyo valor varía en las diferentes áreas del tracto gastrointestinal. Durante la fase de meseta de las ondas lentas se alcanza el umbral de activación de los canales de calcio de las células musculares, lo que ocasiona su apertura y se produce una contracción de la célula. En dicho caso, cada onda lenta origina una contracción, siendo las frecuencias de la actividad espontánea mecánica y eléctrica equivalentes.

El origen de las ondas lentas se debe a la presencia de una red de células especializadas. Santiago Ramón y Cajal realizó su primera descripción en el plexo de Auerbach del sapo (Ramon y Cajal, 1892), lo que propició que, en su honor, se denominasen Células Intersticiales de Cajal. Dichas células fueron consideradas neuronas intersticiales hasta que Jacques Taxi las diferenció de las neuronas mediante el uso de microscopía óptica y electrónica (Taxi, 1965). En 1982 se estableció la relación entre las ICCs y la actividad marcapasos intestinal (Thuneberg, 1982).

Las ICCs tienen varias localizaciones: cercanas al plexo mientérico, al plexo submucoso, al plexo muscular profundo del intestino delgado, o bien intramusculares. En el intestino delgado, el marcapasos se localiza a nivel del plexo mientérico, aunque no se puede descartar una implicación de las ICCs del plexo muscular profundo (Jiménez et al., 1996). En el colon, el principal marcapasos está localizado a nivel de la red de ICCs cercanas al plexo submucoso, aunque bajo nuestro punto de vista existe un doble marcapasos que se correlaciona con la distribución de las ICCs cercanas al plexo submucoso y mientérico (Plujà et al., 2001). Todavía no se ha establecido la localización del marcapasos en el colon humano.

La principal particularidad de las ICCs es que estas células tienen capacidad de despolarización cíclica. El mecanismo es todavía hoy poco conocido, aunque se sospecha que interviene la liberación de calcio del retículo mediante la activación del receptor IP<sub>3</sub>. El incremento de calcio provocaría la activación de canales de cloruro activados por calcio, o bien la activación de un canal catiónico no selectivo, mediante un complejo mecanismo intracelular en el que intervendría la liberación de calcio por parte de las mitocondrias (Sanders et al., 2006).

Las ICCs pueden jugar, además, un papel crucial en la neurotransmisión. En varias áreas del tracto gastrointestinal, tanto la neurotransmisión excitatoria como la inhibitoria está desacoplada en ratones mutantes para el gen *c-Kit* carentes de ICCs intramusculares (Burns et al., 1996; Ward et al., 2000). Además, los terminales nerviosos están cerca de las ICCs intramusculares, que se conectan a su vez con las células musculares a través de uniones gap (Daniel y Posey-Daniel, 1984). Sin embargo, no creemos que deba descartarse la posibilidad de una comunicación directa entre motoneurona y célula muscular

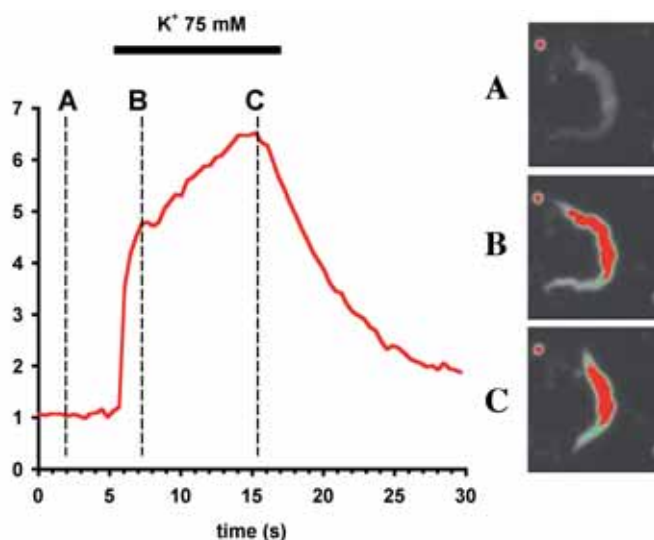


lisa, sobre todo en relación a la neurotransmisión purinérgica.

## CÉLULAS MUSCULARES

El acontecimiento iniciador de la contracción de la célula muscular lisa es el aumento de la concentración de calcio citoplasmático (figura 2). Uno de los elementos fundamentales para entender la contractilidad de la célula muscular lisa es el canal de calcio de tipo L (entre otros elementos i.e. liberación de calcio de los depósitos intracelulares). Si la célula muscular lisa alcanza un potencial superior a  $-40\text{mV}$ , bien sea por el marcapasos, por la activación de motoneuronas excitatorias o por la inhibición del tono neural inhibitorio, los canales de calcio se abren y se produce la contracción muscular. Por el contrario, cuando la célula muscular se aleja del potencial de apertura de los canales de calcio (hiperpolarización), se produce la relajación.

Estudios previos demuestran la independencia del canal de calcio de tipo L en el fenómeno marcapasos, puesto que en presencia de inhibidores de canales de calcio las ondas lentas se mantienen (Jimenez et al., 1999). Sin embargo, parece ser que en el colon humano, el mecanismo marcapasos es mucho más dependiente de los canales de calcio de tipo L puesto que al utilizar diversos antagonistas (nifedipina, verapamil, etc.), las ondas lentas desaparecen. Además estudios preliminares de nuestro laboratorio demuestran que el estiramiento incrementa la fuerza de contracción de las células musculares sin modificar el fenómeno marcapasos. Hay que tener en cuenta que fármacos selectivos que inhiben los canales de calcio de tipo L en la rata, como el bromuro de Otilonio, son fármacos susceptibles de ser utilizados como espasmolíticos en enfermedades intestinales como el síndrome del intestino irritable (Martín et al. 2004).



**Figura 2.-** Registro de fluorescencia de una célula muscular lisa de colon humano cargada con la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo4. Obsérvese la amplitud de la señal cuando dicha célula es estimulada con la aplicación extracelular de potasio de  $75\text{mM}$ . A la derecha se presentan las imágenes de la misma célula cargada con la sonda Fluo4 y adquiridas mediante microscopía de fluorescencia: A antes del estímulo; B justo tras el estímulo; C al final del estímulo. Se aprecia el incremento de la concentración de calcio citoplasmático así como el cambio de longitud de la célula.

Además de los canales de calcio de tipo L, se han identificado una serie de canales iónicos (canales de potasio y canales activados por estiramiento) que estarían regulando el potencial de membrana y la actividad contráctil de la célula muscular.

Los canales de potasio juegan un papel importante en la regulación de la excitabilidad del sincitio. Una célula de músculo liso gastrointestinal puede expresar diversas familias de canales de potasio y varios miembros de la misma familia. Se ha descrito

la presencia de canales de potasio activados por calcio, canales de potasio sensibles a ATP y canales de potasio de rectificación tardía.

Los canales de potasio sensibles a calcio de baja conductancia (SK) han sido caracterizados en estas células como voltaje-independientes, dependientes de calcio y con una conductancia de  $5,3\text{pS}$ . Estos canales transducirían las fluctuaciones de la concentración intracelular de calcio en cambios en el potencial de membrana y podrían, por tanto, regular la excitabilidad de la membrana y, lo más importante, la probabilidad de apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (Vogalis, 2000). La activación del receptor purinérgico  $\text{P}_2\text{Y}_1$  provocaría la liberación de calcio de los almacenes (receptores  $\text{IP}_3$ ), y el incremento de calcio activaría los canales SK provocando una hiperpolarización transitoria responsable del IJP (Gallego et al., 2006). En este sentido, una parte importante del IJP es sensible a apamina.

Los canales de potasio sensibles a ATP son miembros de la familia de canales de potasio que rectifican hacia adentro. Son voltaje-independientes y son inhibidos por el ATP citoplasmático. Estos canales tendrían un papel tónico en el mantenimiento del tono muscular en el colon (Plujà et al., 1998). Una de las hipótesis que actualmente barajamos es que estos canales sean en parte responsables de la hiperpolarización debida a  $\text{H}_2\text{S}$ .

Los canales de potasio de rectificación tardía influirían en los valores del potencial de membrana de reposo, del umbral del potencial de acción y en la geometría de las ondas lentas (Vogalis, 2000).

Por último, se ha descrito en las células lisas del tracto gastrointestinal canales de calcio, de cloruro y de potasio activados por estiramiento y/o volumen que estarían implicados en la regulación de la célula muscular. El canal de calcio activado permitiría a las células musculares lisas actuar como mecanotransductores y participar en la regulación del tono muscular y de la motilidad intestinal (Farrugia et al. 1999). El canal de cloruro activado por volumen estaría implicado en el control de la contracción bajo condiciones de estrés (Dick et al., 1998), mientras que el canal de potasio activado por tensión estabilizaría el potencial de membrana durante los cambios en la longitud de la célula (Koh et al., 2001).

## REFERENCIAS

- Alvarez WC, Mahoney LJ (1922). Action current in stomach and intestine. *Am. J. Physiol.* 58(3):477-482.
- Borderies JR, Jimenez M, Angel F (1996) Non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory junction potential in rat colonic circular muscle is partly sensitive to omega-conotoxin GVIA and resistant to L-, P- or Q-type calcium channel blockers. *Neurosci Lett.* 210(2), 91-94.
- Borderies JR, Gonalons E, Angel F, Vergara P, Jimenez M (1997). Effect of different calcium channel blockers on inhibitory junction potentials and slow waves in porcine ileum. *Life Sci.* 60(12):883-892.
- Bülbring E (1954). Membrane potentials of smooth muscle fibres of the taenia coli of the guinea-pig. *J. Physiol.* 125, 302-315
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345, 346-347.
- Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM (1996). Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(21), 12008-12013.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40, 668-688.
- Daniel EE, Posey-Daniel V (1984). Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol.* 246, G305-315.
- Dick GM, Bradley KK, Horowitz B, Hume JR, Sanders KM (1998). Functional and molecular identification of a novel chloride conductance in canine colonic smooth muscle. *Am J Physiol.* 275, C940-C950.
- Farrugia G, Holm AN, Rich A, Sarr MG, Szurszewski JH, Rae JL (1999). A mechanosensitive calcium channel in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 117(4), 900-905.
- Gallego D, Hernandez P, Clave P, Jimenez M (2006).  $\text{P}_2\text{Y}_1$  receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* in press.
- Jimenez M, Cayabyab FS, Vergara P, Daniel EE (1996) Heterogeneity in electrical activity of the canine ileal circular muscle: interaction of two pacemakers. *Neurogastroenterol Motil.* 8(4), 339-349.

-Jimenez M, Borderies JR, Vergara P, Wang Y, Daniel EE (1999). Slow waves in circular muscle of porcine ileum: structural and electrophysiological studies. *Am J Physiol* 276, G393-G406.

-Koh SD, Sanders KM (2001). Stretch-dependent potassium channels in murine colonic smooth muscle cells. *J Physiol*. 533, 155-163.

-Martin MT, Hove-Madsen L, Jimenez M (2004). Otilonium bromide inhibits muscle contractions via L-type calcium channels in the rat colon. *Neurogastroenterol Motil* 16, 175-183.

-Mearin F, Mourelle M, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moncada S, Malagelada JR (1993). Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. *Eur J Clin Invest* 23, 724-728.

-Pluja L, Yokoshiki H, Sperelakis N (1998). Evidence for presence of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat colonic smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 76, 1166-1170.

-Pluja L, Fernandez E, Jimenez M (1999). Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* 126, 883-892.

-Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thunberg L, Jimenez M (2001). Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G255-G266.

-Ramón y Cajal, S (1892). El plexo de Auerbach de los batracios. Nota sobre el Plexo de Auerbach de la rana. *Trab Lab Histol Fac Med Barcelona*, 23-28

-Sanders KM, Koh, SD, Ward SM (2006). Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol*. 68,307-343.

-Teague B, Asiedu S, Moore PK (2002). The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal

contractility. *Br J Pharmacol*. 137(2):139-145.

-Taxi J. (1965). Contribution a l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. (Contribution to the study of the connections of motor neurons in the autonomic nervous system). *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* 7, 413-674

-Thunberg L (1982). Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 71, 1-130.

-Vogalis, F (2000). Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. *J Auton Pharmacol*. 20(4), 207-219.

-Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoiyi M, Sanders KM (2000). Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci*. 20(4), 1393-1403.

-Wu L, Wang R (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev*. 57(4): 585-630.

Correspondencia: Jordi Aleu  
Laboratorio de Gastroenterología.  
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología  
Edificio V, Campus de Bellaterra  
Universidad Autónoma de Barcelona  
08193- Bellaterra (Cerdanyola del Vallés)  
Tel: 93-581 38 34  
Fax: 93-581 20 06  
jordi.aleu@uab.es

**La diferente longevidad entre sexos, es decir, el hecho de que las hembras vivan alrededor de un 10% más que los machos en numerosas especies, incluyendo la especie humana, ofrece una oportunidad única de estudiar aspectos fundamentales del envejecimiento. La ovariectomía elimina las diferencias entre machos y hembras, y la reposición con estrógenos revierte los efectos de la ovariectomía. Nuestra apuesta para el futuro es encontrar moléculas que posean los efectos beneficiosos del estradiol, sin sus efectos colaterales. En este sentido, hemos probado que los fitoestrógenos son una buena aproximación.**

## Diferente Longevidad entre Machos y Hembras: Los Estrógenos Activan Genes de Longevidad.

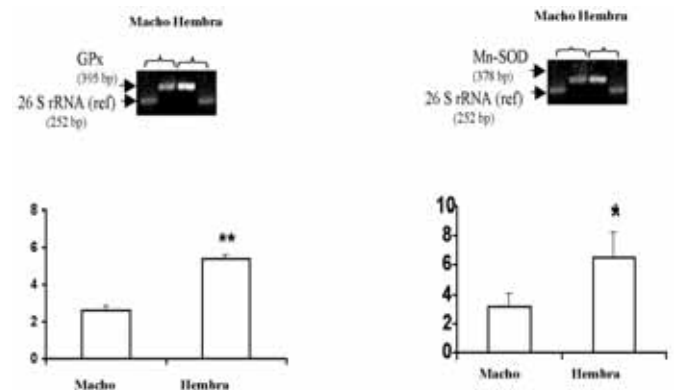
José Viña, Consuelo Borrás, Juan Gambini, Juan Sastre y Federico V. Pallardó

### SUMARIO

Las hembras viven más que los machos en numerosas especies, incluyendo los humanos. Este fenómeno natural puede explicarse a la luz de la teoría mitocondrial del envejecimiento. Las mitocondrias de las ratas hembra producen la mitad de radicales libres que las de los machos, y además, tienen mayores niveles de glutatión reducido. Ello es debido a que las hembras se comportan como dobles transgénicos que sobreexpresan enzimas antioxidantes. Los estrógenos se unen a receptores estrogénicos, que desencadenan la activación de la cascada de las MAP kinasas y NFκB, que induce la expresión de enzimas antioxidantes. Asimismo, la expresión del 16S rRNA, que decrece significativamente con la edad, es cuatro veces mayor en las hembras que en los machos de la misma edad cronológica, indicando que éstas tienen una menor edad biológica. Por el contrario, el daño oxidativo al DNA mitocondrial es cuatro veces mayor en los machos que en las hembras. La ovariectomía elimina las diferencias entre machos y hembras, y la reposición con estrógenos revierte los efectos de la ovariectomía. Nuestra apuesta para el futuro es encontrar moléculas que posean los efectos beneficiosos del estradiol, sin sus efectos colaterales. En este sentido, hemos probado que los fitoestrógenos son una buena aproximación, pues satisfacen los efectos beneficiosos sin efectos colaterales.

### INTRODUCCIÓN: ESTRÉS OXIDATIVO MITOCONDRIAL Y ENVEJECIMIENTO

Denham Harman propuso en 1956 y, de modo más elaborado en 1972, que los radicales libres (Harman, 1956; Harman, 1972), especialmente aquellos de origen mitocondrial (Miquel,

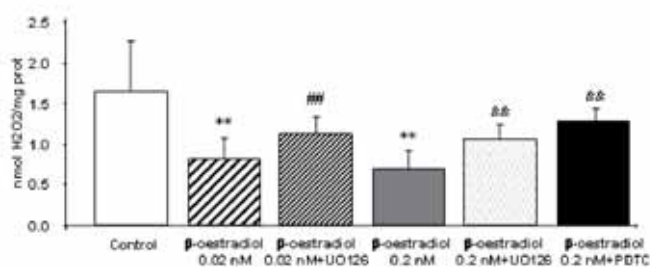


**Figura 1.-** Las hembras expresan más genes antioxidantes que los machos. La expresión de los genes de GPx y Mn-SOD se determinó mediante RT-PCR en hígado de ratas machos y hembras de 6 meses.

1980), están estrechamente relacionados con el proceso del envejecimiento (Beckman y Ames, 1998; Barja, 1999; Weindruch, 1997; Boveris, 1999; Navarro y Boveris, 2004). El envejecimiento es progresivo, lo cual supone que las causas que lo originan deben presentarse durante toda la vida, tanto en jóvenes como en viejos (Barja, 2002).

¿Cuál es la conexión entre el envejecimiento y el estrés oxidativo? La tasa de envejecimiento se correlaciona con la tasa de producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todas las investigaciones realizadas hasta la actualidad demuestran que la tasa de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de mitocondrias procedentes de tejidos postmitóticos (que son los relevantes en el envejecimiento) es menor en las especies más longevas, en comparación con las que viven menos (Ku, 1993; Barja, 1994).





**Figura 2.-** El efecto antioxidante del estradiol está mediado por MAP kinasas y NFκB. El estradiol disminuye los niveles de peróxidos en células; esto no ocurre en presencia de UO126 (inhibidor de MAP kinasas) o de PDTC (inhibidor de NFκB)

Ello ocurre en todas las especies homeotermas más longevas, independientemente de sus tasas de consumo de oxígeno, que son menores en mamíferos (de mayor tamaño) y mayores en pájaros (de menor tamaño). Se asume normalmente que en animales homeotermos, mayores tasas de consumo de oxígeno se asocian a menor longevidad. Sin embargo, hay una excepción, los pájaros poseen una tasa de consumo de oxígeno en reposo y en condiciones basales elevada, y a su vez son una especie longeva. Barja y colaboradores (Barja, 1994) estudiaron este problema y concluyeron que lo que ocurría era que las mitocondrias de los pájaros muestran una tasa de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> un orden de magnitud menor que las mitocondrias de las ratas. No obstante, esta hipótesis ha sido discutida en varias ocasiones, pues se ha observado que las mitocondrias de corazón de paloma poseen una tasa de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> similar a las de corazón de rata (Boveris y Chance, 1973; Cadenas y Boveris, 1980).

Nuestro grupo observó que el envejecimiento conlleva un aumento de la oxidación del glutatión mitocondrial (GSH), el cofactor de la glutatión peroxidasa, la cual cataliza la reacción de detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La oxidación del glutatión mitocondrial contribuye a los niveles totales de glutatión oxidado que se observan en la célula durante el envejecimiento (Asensi, 1994). Cabe destacar que fuimos capaces de realizar esta observación gracias a que desarrollamos un método para determinar los niveles de GSSG en muestras biológicas, evitando la autooxidación del glutatión reducido (GSH) (Asensi, 1994).

Existe además otro marcador mitocondrial estrechamente relacionado con el envejecimiento, los niveles de 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-dG) como indicador del daño oxidativo al DNA mitocondrial. Los niveles de 8-oxo-dG aumentan con el envejecimiento, y este aumento se correlaciona además con un aumento del GSSG (Asensi, 1994). La oxidación del glutatión y del DNA mitocondrial asociada al envejecimiento puede prevenirse mediante la administración de vitaminas antioxidantes (C y E) (Asensi, 1994) y también mediante el tratamiento con un extracto de Ginkgo biloba, rico en polifenoles (Sastre, 1998). Demostramos que las mitocondrias de los animales viejos están dañadas. Tanto en mitocondrias aisladas como en célula entera pudimos observar que éstas eran disfuncionales y que este hecho se relacionaba con una elevada tasa de producción de oxidantes y un contenido elevado de productos de la oxidación (Navarro y Boveris, 2004; Sastre, 1996; Hagen, 1997). La menor actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial se acompaña, además, de un mayor nivel de daño oxidativo al DNA mitocondrial (Shigenaga y Ames, 1991; Lezza, 1994).

Más del 97% del O<sub>2</sub> utilizado por las células aeróbicas se consume en las mitocondrias, y el 1% de ese O<sub>2</sub> no llega a la citocromo oxidasa para formar agua, sino que se escapa en forma de especies parcialmente reducidas del oxígeno, en concreto en forma de ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Boveris, 1999; Sastre, 1998;

Sastre, 1996; Chance, 1979). Este superóxido se convierte por medio de la enzima Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La continua generación mitocondrial de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a lo largo de la vida de la célula genera un "estrés oxidativo crónico" que incluye daño oxidativo al DNA mitocondrial, a proteínas y a lípidos (Navarro y Boveris, 2004; Sastre, 1998; Sastre, 1996; Shigenaga, 1991; de la Asunción, 1996; Benzi y Moretti, 1995) y que es fundamental en el envejecimiento celular.

## LAS MITOCONDRIAS DE LAS HEMBRAS PRODUCEN LA MITAD DE ESPECIES OXIDANTES QUE LAS DE LOS MACHOS.

La tasa de producción de especies oxidantes es menor en las mitocondrias aisladas de las hembras en comparación con las de los machos. Medimos la tasa de producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y encontramos que las mitocondrias de las ratas hembras producían aproximadamente la mitad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las de los machos. Ello ocurrió tanto en mitocondrias hepáticas como cerebrales, y tanto en ratas como en ratones (Borrás, 2003). Es más, fuimos capaces de separar mitocondrias cerebrales de las neuronas y de la glia, y comprobamos que las primeras, cuya tasa de regeneración es escasa, produjeron una cantidad de especies oxidantes considerablemente mayor que las segundas. Ello es una prueba más que apoya la idea de que las células post-mitóticas (con escasa tasa de regeneración) sufren un mayor daño oxidativo con el envejecimiento que aquellas cuya tasa de renovación es elevada.

Para determinar si las hormonas sexuales, como los estrógenos, estaban implicadas en las diferencias de estrés oxidativo observadas, determinamos el efecto de la ovariectomía y de la terapia hormonal con estrógenos sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La ovariectomía causó el aumento de la producción mitocondrial de peróxidos en hígado y en cerebro, siendo en este caso comparables a los obtenidos en las mitocondrias de los machos, es decir alrededor de un 60% más que los producidos por las mitocondrias de las hembras control. La terapia de sustitución con estrógenos devolvió a las hembras ovariectomizadas una producción de peróxidos similar a la de las hembras control (Borrás, 2003; Viña, 2005).

## LAS MITOCONDRIAS DE LAS RATAS HEMBRA ESTÁN MENOS DAÑADAS QUE LAS DE LAS RATAS MACHO.

Las mitocondrias de las hembras tienen unos menores niveles de daño oxidativo en moléculas clave como el DNA mitocondrial (DNAmt) o el glutatión, en comparación con las de los machos (Borrás 2003; Viña, 2003). El DNAmt es un componente fundamental en las mitocondrias (Wallace, 1994), y como ya se ha mencionado, su oxidación está directamente relacionada con el envejecimiento (Shigenaga, 2001; de la Asunción, 1996; Richter, 1988). La cantidad del marcador de daño oxidativo al DNA, 8-oxo-dG es alrededor de 4 veces mayor en el DNAmt de los machos que en el de las hembras (Borrás, 2003; Viña, 2003). Esta diferencia es la más notable observada en una situación fisiológica, y ello indica que la mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (crónica y continua), que está directamente relacionada con una mayor tasa de producción de daño por radicales libres en los machos, resulta en un marcado daño oxidativo en su DNAmt y en lesiones mutagénicas en el DNA (Kasai, 1986).

Centrándonos ahora en el glutatión, que es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células (Jocelyn y Kamminga, 1974), su concentración es similar a la de glucosa (Viña, 1978). Los niveles de GSH mitocondrial son el doble en las hembras en comparación con los machos. Los niveles intracelulares de su forma oxidada, GSSG, se consideran un biomarcador de envejecimiento (Hazelton y Lang, 1984), y nosotros observamos que los niveles de GSSG mitocondrial se relacionan con el daño asociado al envejecimiento (Sastre, 2000).

## LOS ESTRÓGENOS INDUCEN LA EXPRESIÓN MITOCONDRIAL DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Con el fin de tratar de dilucidar por qué las hembras tienen un menor estrés oxidativo mitocondrial que los machos, estudiamos las posibles diferencias de expresión y actividad de enzimas antioxidantes mitocondriales en función del género. Puesto que las concentraciones basales de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  dependen de su tasa de producción y su tasa de utilización, determinamos la actividad mitocondrial y la expresión de las enzimas Mn-SOD y glutatión peroxidasa (GPx) (Boveris y Cadenas, 2000). Ambas, la expresión (Figura 1) y la actividad enzimática de las dos enzimas fue aproximadamente el doble en las hembras en comparación con los machos. El hecho de que las hembras tenían una actividad GPx superior a la de los machos ya fue descrito en los años 60 (34), pero nunca se había relacionado con la diferente longevidad entre géneros. Hace unos años, Orr y Sohal (Orr y Sohal, 1994) observaron que las moscas *Drosophila* que sobreexpresaban bien la SOD o la catalasa (pues no tienen GPx) no tenían una longevidad mayor. Sin embargo, cuando se sobreexpresaban ambas conjuntamente, sí experimentaban un aumento en su longevidad. Nosotros hemos encontrado que las hembras sobreexpresan ambas enzimas antioxidantes mitocondriales, la Mn-SOD y la GPx, y como a continuación veremos, los estrógenos son los responsables de tal inducción.

## CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ESTRADIOL

La capacidad antioxidante del estradiol *in vitro* ha sido ampliamente demostrada (Ruiz-Larrea, 1997). Sin embargo, a concentraciones fisiológicas, no es posible que puedan actuar como tal, especialmente por su baja concentración en plasma. Un simple cálculo nos lo muestra: las dosis que se recomiendan de estradiol en la terapia hormonal sustitutiva son de 50  $\mu\text{g}/\text{día}$ , las de vitamina E de 500  $\text{mg}/\text{día}$ . Ello supone, que el estradiol debería ser 10.000 veces más potente que la vitamina E como antioxidante químico, lo cual no se justifica a la luz de su estructura química.

Sin embargo, estudios *in vivo* indican que los estrógenos poseen un potente efecto antioxidante: la producción mitocondrial de  $H_2O_2$  aumenta significativamente tras la ovariectomía (más del 50%) y la reposición hormonal con estrógenos de las ratas ovariectomizadas revierte completamente este incremento (para más detalle, consultar Lezza et al.). Por tanto, está claro que los estrógenos no actúan como antioxidantes químicos *in vivo*, sino que ejercen su acción antioxidante mediante la inducción de genes antioxidantes y enzimas antioxidantes.

Para corroborar esta hipótesis, cambiamos a un modelo *in vitro* y utilizamos cultivos de células de glándula mamaria, ricas en receptores estrogénicos, las MCF-7.

Al incubar estas células con estradiol a concentraciones fisiológicas, observamos una disminución de los niveles de  $H_2O_2$ . Al co-incubarlas con estradiol y tamoxifeno (un modulador de receptores de estrógenos que en este tejido actúa como antagonista) los niveles de  $H_2O_2$  celulares aumentaban hasta ser similares a los niveles control. Ello indica que los receptores estrogénicos están implicados en el efecto antioxidante del estradiol. Este efecto nos llevó a estudiar el mecanismo por el cual el estradiol induce la expresión de las enzimas antioxidantes mencionadas anteriormente. Un efecto genómico directo no podía ser la causa, puesto que ni la Mn-SOD ni la GPx tienen elementos de respuesta a estrógenos en la secuencia de su promotor. Por tanto pensamos que las cascadas de señalización celular debían estar implicadas. Medimos la activación de las MAP kinasas p44/p42 (ERK1/ERK2) y observamos que el estradiol la aumentaba. Utilizando un inhibidor de la fosforilación de estas MAP kinasas, el UO126, demostramos que el efecto antioxidante del estradiol estaba mediado por las mis-

mas, puesto que al medir los niveles de  $H_2O_2$  en células tratadas conjuntamente con estradiol y UO126, los niveles de peróxidos no se modificaban respecto el control. El siguiente paso lógico en el mecanismo que proponemos era medir la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB), puesto que las MAP kinasas son capaces de activarlo, y además nuestras dos enzimas tienen elementos de respuesta a NFkB en la secuencia de su promotor. El estradiol activa NFkB y éste media su efecto antioxidante, como se puede comprobar en la Figura 2, que muestra los niveles de  $H_2O_2$  cuando coincubamos el estradiol con un inhibidor de la activación de NFkB.

Finalmente, el estradiol induce la expresión de la Mn-SOD y de la GPx y evidencia cómo las vías de señalización de las MAP kinasas y NFkB están implicadas en este efecto.

Por tanto, el mecanismo antioxidante del estradiol es el siguiente: estradiol se une a receptores estrogénicos que activan la vía de las MAP kinasas, las cuales inducen la translocación de NFkB al núcleo, el cual se une a los promotores de las enzimas antioxidantes Mn-SOD y GPx aumentando su expresión. Éstas viajan a la mitocondria donde ejercen su efecto antioxidante haciendo disminuir los niveles de peróxidos (Borrás, 2005).

## LOS FITOESTRÓGENOS POSEEN LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS ESTRÓGENOS AL AUMENTAR LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES MITOCONDRIALES

El efecto del estradiol sobre la regulación de genes antioxidantes relacionados con la longevidad supone que su administración podría ser beneficiosa para aumentar la longevidad, especialmente en varones, que podrían alcanzar así una longevidad similar a la de las mujeres.

Sin embargo, ha sido ampliamente demostrado que la administración de estrógenos en la terapia hormonal sustitutiva puede tener serios efectos colaterales. Los fitoestrógenos constituyen una excelente alternativa. Sus efectos beneficiosos han sido



**Figura 3.** - Mecanismo propuesto para explicar la mayor longevidad de las hembras frente a los machos.

Abreviaturas utilizadas: MT: mitocondria; THS: Terapia hormonal sustitutiva; ROS: Especies reactivas de oxígeno

documentados en numerosas ocasiones (Munro, 2003; Mahn, 2005), sin haberse encontrado efectos indeseables. Así pues, nosotros probamos el efecto de 0.5  $\mu\text{M}$  de genisteína, el fitoestrógeno más abundante de la soja (Park, 2005), sobre los niveles de  $H_2O_2$  en células MCF-7. Esta concentración de genisteína se considera nutricionalmente relevante, pues es la concen-



tración plasmática que se encuentra en personas que consumen soja en su dieta habitual, es decir, en el este asiático. El resto de la población que no consume soja tan habitualmente posee unos niveles plasmáticos muy por debajo de éstos. La genisteína a tal concentración disminuye los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células MCF-7, y al igual que el estradiol, lo hace mediante la activación de receptores estrogénicos. Confirmamos que el mecanismo es el mismo que utiliza el estradiol: la genisteína se une a receptores estrogénicos, activa las vías de señalización de las MAP kinasas y de NFκB, e induce la expresión de la enzima antioxidante Mn-SOD (Borrás, 2006).

## PERSPECTIVAS

Encontrar buenos modelos de envejecimiento es crucial en gerontología. La diferente longevidad entre sexos, es decir, el hecho de que las hembras vivan alrededor de un 10% más que los machos en numerosas especies, incluyendo la especie humana, ofrece una oportunidad única de estudiar aspectos fundamentales del envejecimiento.

En el contexto de la teoría mitocondrial del envejecimiento, nuestro grupo ha encontrado que la producción mitocondrial de oxidantes es aproximadamente el doble en machos que en hembras. Demostramos que estas diferencias se deben a los estrógenos, que actúan mediante la activación de receptores estrogénicos, MAP kinasas, NFκB e inducción de la expresión de enzimas antioxidantes. La figura 3 resume el mecanismo propuesto para explicar las diferencias de longevidad entre machos y hembras.

La administración de estrógenos en la menopausia posee problemas clínicos y además, obviamente, no se puede administrar a los hombres. Los fitoestrógenos ofrecen una alternativa interesante: ejercen los mismos efectos antioxidantes que el estradiol, por el mismo mecanismo, sin poseer los efectos feminizantes del estradiol. Así pues, plantearse el empleo de estos compuestos para aumentar la longevidad de los machos hasta compararse con la de las hembras, es un hecho que debería considerarse seriamente.

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo realizado en este estudio ha sido subvencionado por las siguientes ayudas: CICYT (BFI-2001-2849 and SAF2004-03755 to J.V.), CICYT (SAF2002/00885 to F.V.P.) e Instituto de Salud Carlos III, RCMN (C03/08), Madrid, España. Agradecemos además la colaboración de M<sup>a</sup> Dolores Royo por su excelente aportación técnica.

## REFERENCIAS

- Asensi M, J. Sastre, F.V. Pallardo, J. Garcia de la Asuncion, J. Estrela & J. Vina: A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 217, 323-328 (1994)
- Barja G, S. Cadenas, C. Rojas, R. Perez-Campo, & M. Lopez-Torres: Low mitochondrial free radical production per unit O<sub>2</sub> consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic Res* 21, 317-327 (1994)
- Barja G: Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J Bioenergetics Biomembranes* 31, 347-366 (1999)
- Barja G: Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity. *Free Radic Biol Med* 33, 1167-1172 (2002)
- Beckman KB & B.N. Ames: The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581 (1998)
- Benzi G & A. Moretti: Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* 19, 77-101 (1995)
- Borrás C, Gambini J, Gomez-Cabrera MC, Sastre J, Pallard FV, Mann GE, Vina J. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFκB. *FASEB J*. 2006 Sep 11
- Borrás C, J. Gambini, M.C. Gomez-Cabrera, J. Sastre, F.V. Pallardo, G.E. Mann & J. Vina: 17β-estradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFκB cascade. *Aging Cell* 4, 113-118 (2005)
- Borrás C, J. Sastre, D. Garcia-Sala, A. Lloret, F.V. Pallardo & J. Vina: Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 34, 546-552 (2003)
- Boveris A & B. Chance: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716 (1973)
- Boveris A & E. Cadenas: Mitochondrial production of hydrogen peroxide regulation by nitric oxide and the role of ubiquinone. *IUBMB Life* 50, 245-250 (2000)
- Boveris A, L. E. Costa & E. Cadenas: In: Understanding the process of aging: the roles of mitochondria, free radicals, and antioxidants (Antioxidants in health and disease, 8). Eds: Cadenas, E. & Packer, L. (eds.), pp. 1-20 Marcel Dekker, New York (1999)
- Cadenas E & A. Boveris: Enhancement of hydrogen peroxide formation by prothophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria. *Biochem J* 188, 31-37 (1980)
- Chance B, H. Sies & A. Boveris: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59, 527-605 (1979)
- de la Asuncion JG, A. Millan, R. Pla, L. Bruseghini, A. Esteras, F.V. Pallardo, J. Sastre & J. Vina: Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 10, 333-338 (1996)
- Hagen TM, D.L. Yowe, J.C. Bartholomew, C.M. Wehr, K.L. Do, J.Y. Park & B.N. Ames: Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3064-3069 (1997)
- Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 2, 298-300 (1956)
- Harman D: The biological clock: The mitochondria. *Journal of the American Geriatrics Society* 20, 145-147 (1972)
- Hazelton GA & C.A. Lang: Glutathione levels during the mosquito life span with emphasis on senescence. *Proc Soc Exp Biol Med* 176, 249-256 (1984)
- Jocelyn PC & A. Kamminga: The non-protein thiol of rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 343, 356-362 (1974)
- Kasai H, P.F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama & H. Tanooka: Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7, 1849-1851 (1986)
- Ku HH, U.T. Brunk, & R.S. Sohal: Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med* 15, 621-627 (1993)
- Lezza AM, D. Boffoli, S. Scacco, P. Cantatore & M.N. Gadaleta: Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 205, 772-779 (1994)
- Mahn K, C. Borrás, G.A. Knock, P. Taylor, I.Y. Khan, D. Sugden, L. Poston, J.P. Ward, R.M. Sharpe, J. Vina, P.I. Aaronson & G.E. Mann: Dietary soy isoflavone induced increases in antioxidant and eNOS gene expression lead to improved endothelial function and reduced blood pressure in vivo. *FASEB J* 19, 1755-1757 (2005)
- Miquel J, A.C. Economos, J. Fleming, & J.E.J. Johnson: Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 15, 579-591 (1980)
- Munro IC, M. Harwood, J.J. Hlywka, A.M. Stephen, J. Doull, W.G. Flamm & H. Adlercreutz: Soy isoflavones: a safety review. *Nutr Rev* 61, 1-33 (2003)
- Navarro A & A. Boveris: Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R1244-R1249 (2004)
- Orr WC & R.S. Sohal: Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-1130 (1994)
- Park D, T. Huang & W.H. Frishman: Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiol Rev* 13, 13-17 (2005)
- Pinto RE & W. Bartley: The nature of the sex-linked differences in glutathione peroxidase activity and aerobic oxidation of glutathione in male and female rat liver. *Biochem J* 115, 449-456 (1969)
- Richter C, J.W. Park & B.N. Ames: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6465-6467 (1988)
- Ruiz-Larrea MB, A.M. Leal, C. Martin, R. Martinez & M. Lacort: Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes. *Rev Esp Fisiol* 53, 225-229 (1997)
- Sastre J, A. Millan, J. Garcia de la Asuncion, R. Pla, G. Juan, F. Pallardo, E. O'Connor, J.A. Martin, M.T. Droy-Lefaix & J. Vina: A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 24, 298-304 (1998)
- Sastre J, F.V. Pallardo & J. Vina: Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life* 49, 427-435 (2000)
- Sastre J, F.V. Pallardo, R. Pla, A. Pellin, G. Juan, J.E. O'Connor, J.M. Estrela, J. Miquel & J. Vina: Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 24, 1199-1205 (1996)
- Shigenaga MK & B.N. Ames: Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 10, 211-216 (1991)
- Vina J, C. Borrás, J. Gambini, J. Sastre & F.V. Pallardo: Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005, e17 (2005)
- Vina J, J. Sastre, F. Pallardo & C. Borrás: Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. *Antioxid Redox Signal* 5, 549-556 (2003)
- Vina J, R. Hems & H.A. Krebs: Maintenance of glutathione content is isolated hepatocytes. *Biochem J* 170, 627-630 (1978)
- Wallace DC: Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8739-8746 (1994)
- Weindruch R & R.S. Sohal: Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med* 337, 986-994 (1997)

Correspondencia: Dr. José Viña,  
Departamento de Fisiología · Universidad de Valencia  
Avda. Blasco Ibáñez 17 · 4610 Valencia · SPAIN  
TELÉFONO: 34-96-386465 · FAX: 34-96-3864642 · E-mail: jose.vina@uv.es

# OPINIÓN

Es en la falta de acicate, en la pérdida del deseo de imitación y en el poco reconocimiento social donde reside nuestra crónica carencia de vocaciones científicas. El científico ya no es admirado como lo fuera y en eso tenemos nosotros una buena parte de culpa. Sería importante mostrarles a los adolescentes y a los jóvenes científicos los lugares donde la ciencia nace y también el valor del coraje para vencer la dificultad a los científicos en agraz.



## SALVEMOS EL LABORATORIO CHILENO DE MONTEMAR.

Ricardo Borges

No conozco personalmente al Dr. Mario Luxoro (foto 1) aunque la impresión que me produjo la primera visita al laboratorio de Montemar hace unos años espoleara mi interés por acercarme a su figura y a la de una larga serie de científicos de primer orden que se dieron cita en aquel rincón del Pacífico hace cuarenta y tantos años (Bacigalupo y Kukuljan, 1997).

Cuando la Dra. Ana M<sup>a</sup> Cárdenas (Universidad de Valparaíso, Chile) me condujo a aquella modesta edificación, sita a escasos metros de los rompientes cercanos a las playas de Reñaca, no imaginaba que tras aquellas humildes paredes se albergaran los laboratorios responsables de uno de los mayores hitos científicos acaecidos en la historia de la América del Sur. Allí, y a lo largo de casi tres décadas, se realizaron contribuciones científicas de primer orden en el ámbito de la electrofi-

siología utilizando las poderosas armas que el océano les brindaba: los axones gigantes de las jibias (*Dosidicus Gigas*, foto 2) y la unión neuromuscular de los picorocos (*Megabalanus psittacus*, un marisco similar a una claca de gran tamaño). Aunque en realidad no es así, las armas principales que poseían fueron unas inteligencias preclaras y la tenacidad ilimitada para hacer frente a la mayor de las adversidades.

Cuando en una conversación con los colegas alguien se queja de su precariedad de medios, inconscientemente mis pensamientos me llevan hacia el olor a humedad de aquellas habitaciones donde las mesas antivibratorias, los estiradores de electrodos, los amplificadores y hasta los micromanipuladores fueron construidos por Luxoro y los suyos en aquel lugar tan apartado del mundo. Conozco muy bien lo que para un científico significa el aislamiento, y lo he sufrido. Nada que ver con lo que fue para ellos trabajar allí. Y sin embargo, la calidad de la producción científica y el poder de convocatoria que el laboratorio de Montemar llegó a reunir puede hoy día levantar más de una envidia, la mía sin ir más lejos.

Fue a principios de los sesenta cuando Mario Luxoro empleó parte del dinero de un proyecto que había traído de Estados Unidos para comprar una modesta casa de pescadores. Con el



Foto 1. Mario Luxoro extrayendo el axón de un calamar.



Foto 2. Jibias gigantes en Montemar

tiempo, una vieja bobina de cable dio origen a la mesa del comedor, unas tablas y unos cristales de dudoso origen permitieron agrandar el segundo piso. Utilizaron el reverso de un cartel de tráfico para convertirlo en la pantalla de proyección de la sala de seminarios. Cuando las autoridades académicas hostiles intentaron boicotearles cortando el suministro eléctrico del edificio, obtuvieron la luz "prestada" gracias a cables conectados a un poste del alumbrado público. Porque durante los siguientes años la casa alojó varios laboratorios, sirvió dor-



mitorio, cocina y comedor a varias decenas de científicos de Chile y del mundo.

Todavía hoy, casi diez años después de que allí se hicieran los últimos experimentos, la impresión que se lleva el visitante es que los investigadores acaban de salir a comer. Ello se debe a que José Soto, quien durante años salió a diario al Pacífico a pescar jibias, sigue viviendo allí y conservando el lugar. Sobrecoge ver los axones pegados en el techo adonde los tiraba Mitzy Canessa para celebrar un buen registro o ver el taller de mecánica donde Francisco "Pancho" Bezanilla y Julio Vergara construían piezas para sus microscopios. O el taller de electrónica donde Ramón Latorre y Cecilia Hidalgo construían un amplificador de fijación de voltaje (en aquellos años no eran comerciales). La biblioteca sigue estando rodeada de libros y de revistas científicas y en el aula de seminarios se percibe todavía el ambiente de discusión de Ichigi Tasaki con Clay Armstrong y de Sigmund Fischer con Peter Baker. Sobre la escalera aún está la trampilla que conduce al desván en donde más de uno hubo de ocultarse durante la larga noche de la dictadura de Pinochet.

Fue en Montemar desde donde Rojas y Luxoro demostraron la naturaleza proteica de las estructuras que trasegaban iones, hoy conocidos como canales (foto 3). A aquel pionero trabajo en *Nature* (Rojas y Luxoro, 1963), le siguieron otros en esa revista y en *Science* (Tasaki y Luxoro, 1964; Tasaki et al, 1965), *Journal of General Physiology* (Luxoro y Yáñez, 1968; Armstrong et al, 1973), *Journal of Physiology* (Bacigalupo et al, 1979), etc... ante la general indiferencia del país en el que vivían y la furia del mar cuando un tsunami les destruyó el laboratorio. Paul Ehrlich decía que el científico necesitaba las cuatro G: *Geschick, Geduld, Geld und Glück* (habilidad, paciencia, dinero y suerte) yo añadiría talento. Excepto de dinero, Montemar andaba sobrado de todo lo demás (Latorre, 2006). Cuando Luxoro y Rojas volvieron a Santiago para hacer la



Foto 3. Eduardo "Guayo" Rojas en los años 60 ante su "set-up"

reforma universitaria, dejaron en Reñaca a una segunda generación de científicos con una soberbia formación básica y se les brindó la oportunidad de demostrarlo. La revista *Nature* recibió un trabajo desde las playas de Montemar, era la obra prima de dos jóvenes doctorandos (Latorre e Hidalgo, 1969). Causa envidia observar cómo en los países del norte se dota de importancia a la historia de la ciencia y a los lugares donde ésta se forjó. Hoy se pueden visitar los laboratorios de Kelvin o de Cavendish en Gran Bretaña. En los países latinos de más al sur hemos reconocido el valor del arte y se pueden visitar las casas y los estudios de Dalí, de Manrique o de Lorca, también en Chile las casas de Neruda o de Gabriela Mistral. La



Foto 4. El edificio del laboratorio de Montemar visto desde la playa

ciencia nunca ha reivindicado ese lugar en nuestra sociedad. En España, los laboratorios de Cajal y de Negrín perecieron bajo el impacto de las bombas de la Guerra Civil. Hace un par de años supe que el Rectorado de la Universidad de Chile había decidido vender el laboratorio de Montemar y su entorno a una promotora para construir apartamentos. La zona es ahora un enclave turístico. El dinero resultante de una venta como esa no enjugará las deudas que tiene cualquier universidad. Por eso hemos comenzado a luchar (Borges et al, 2006) y a hacer fuerza dentro de Chile (Duery, 2006) hasta lograr que, de momento, la operación de venta se aplase al menos un año.

#### ¿Para qué puede servir el laboratorio de Montemar?

Los principales usos serían los de museo, lugar de reuniones científicas y, por qué no, poder seguir funcionando como laboratorio.

Durante el año el clima es, en general, plácido, pero las playas están vacías. El alojamiento en todas las playas al norte de Valparaíso es de calidad y, durante toda la temporada baja, muy barato. Montemar es entonces el lugar idóneo como sede de cursos y seminarios científicos. Hay paz frente al Pacífico y el lugar está a sólo dos horas de Santiago.

Durante el verano, las playas se llenan de veraneantes; entonces el lugar podría funcionar como museo. La municipalidad de Reñaca no ofrece muchas actividades para hacer fuera del pasear por las playas. El laboratorio podría ser visitado como tantos otros lugares de interés. Con unos vídeos y unos pocos paneles se explicaría la labor que se llevaba a cabo en aquellos laboratorios y por la que los electrofisiólogos chilenos fueron y son reconocidos en todo el mundo.

Finalmente, los axones del calamar o las uniones neuromusculares de los picorocos tienen aún mucho que enseñarnos. No había muchos lugares en el mundo en donde hacerlo en los años sesenta y no los hay ahora. Montemar sigue siendo un lugar muy atractivo porque los laboratorios no "pertenecen" a nadie en particular. Los científicos pueden seguir acudiendo al lugar cada año.

El edificio consta de dos plantas (foto 4). En la de abajo, están los cuatro laboratorios, el taller, la unidad de cultivos y los acuarios. Las obras de remozado no son caras. Nuestra idea es reacondicionar dos laboratorios tal y como estaban con los equipos de la época y dejar otros dos preparados para seguir siendo laboratorios activos de investigación en electrofisiología marina. La planta superior aloja hoy los dormitorios, los baños, la cocina, los despachos y el aula de seminarios. Se puede, sin demasiado esfuerzo, redistribuirla para hacer una gran sala mixta de seminarios y de proyecciones.

#### La enseñanza de Montemar

Es en la falta de acicate, en la pérdida del deseo de imitación

ya en el poco reconocimiento social donde reside nuestra crónica carencia de vocaciones científicas. El científico ya no es admirado como lo fuera y en eso tenemos nosotros una buena parte de culpa. Sería importante mostrarles a los adolescentes y a los jóvenes científicos los lugares donde la ciencia nace y también el valor del coraje para vencer la dificultad a los científicos en agraz.

Cuando le preguntan a Ramón Latorre por qué fue aquel laboratorio tan importante para el desarrollo de la Biofísica en Chile, él siempre responde: "porque los seniors hacían muy buena ciencia y dejaban a los jóvenes hacer lo que quisieran" y prosigue siguiendo a Prutz en que "la creatividad en la ciencia, como en el arte, no pueden ser organizadas"

En España llevaríamos a nuestros estudiantes a sitios como Montemar si los tuviésemos. En toda la América del Sur quedan pocos lugares como ése y ya es hora también de que los científicos reivindicamos nuestra contribución histórica a la humanidad. La ciencia es universal y es por ello que Montemar también es nuestro. Ni Chile ni nosotros podemos permitirnos el lujo de perder uno de los baluartes de la ciencia.

Envía tu carta de apoyo a: rlatorre@cecs.cl

#### AGRADECIMIENTOS

A Ana Cárdenas, O. Humberto Viveros, Juan Bacigalupo, José Soto, Mario Luxoro, Guayo Rojas, Ramón Latorre, Pancho Bezanilla, Julio Vergara y Pedro Verdugo.

#### REFERENCIAS

- Armstrong CM, Bezanilla F, Rojas E. (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J Gen Physiol.* 62: 375-391
- Bacigalupo J, Kukuljan M. (1997) Professor Mario Luxoro, honorary member of the Chilean Society of Physiological Sciences. *Biol Res.* 30: 91-94
- Bacigalupo J, Luxoro M, Rissetti S, Vergara C. (1979) Extracellular space and diffusion barriers in muscle fibres from *Megabalanus psittacus* (Darwin). *J*

*Physiol.* 288: 301-312.

- Borges R, Viveros OH, Latorre R. (2006) Save the Lab in Montemar, Chile. *Science* 311, 1866.
- Duery L. (2006) Adiós al laboratorio de Montemar. *El Mercurio*, 10 de Abril.
- Latorre R. (2006) On squids and the amazing Montemar laboratory. *Biol Res* (en prensa).
- Luxoro M, Rojas E, Wittig E. (1963) Effect of azide and Ca ion on the reversible changes of protein configuration in stimulated nerves. *J Gen Physiol.* 46: 1109-1121.
- Luxoro M, Yanez E. (1968) Permeability of the giant axon of *Dosidicus gigas* to calcium ions. *J Gen Physiol.* 51: 115S.
- Rojas E, Luxoro M. (1963) Micro-injection of trypsin into axons of squid. *Nature.* 199: 78-79.
- Tasaki I, Luxoro M, Ruarte A. (1965) Electrophysiological studies of chilean squid axons under internal perfusion with sodium-rich media. *Science.* 150: 899-901.
- Tasaki I, Luxoro M. (1964) Intracellular perfusion of chilean giant squid axons. *Science.* 145: 1313-1315

Ricardo Borges  
Unidad de Farmacología  
Facultad de Medicina  
Universidad de La Laguna.  
38071 La Laguna  
Tenerife

TELÉFONO: 34-922-319-346 · FAX: 34-922-655-995



## LA VENTANA DEL FISIÓLOGO.

### ARN Interferente: un Mecanismo Primitivo de Defensa Frente a los Virus que puede servir para Curar Enfermedades. José Miguel López Novoa

La regulación de la síntesis de proteínas en las células eucarióticas ocurre en varios niveles: a) transcripcional, en el que el ADN se transcribe a ARN mensajero (ARNm); b) procesamiento del ARN; c) traducción a proteínas, y d) procesamiento post-transduccional, sorting y degradación de estas proteínas. Hasta ahora, el nivel que había atraído menos atención por parte de los científicos era el del procesamiento del ARN, hasta que se descubrió el fenómeno del ARN interferente (ARNi). El ARNi consiste en trozos de ARN de doble cadena de aproximadamente 21 nucleótidos cada una, que se unen a un complejo enzimático denominado complejo silenciador inducido por ARN (CSIA). En este complejo, el ARNi proporciona la especificidad para el ARNm con secuencias complementarias al ARNi, lo que le permite unirse a él. El CSIA contiene una endonucleasa que rompe el ARNm específico en pequeños fragmentos que son entonces degradados por las ARNasas convencionales. El resultado final es una degradación específica del ARNm complementario del ARNi, con la consecuente disminución de la expresión de la proteína correspondiente.

Pero ¿cuáles son las funciones de ese mecanismo? Se cree que el ARNi sirve para defender a las células eucariotas de la infección por virus que contienen ARN. En relación con esto, algunos virus patógenos, como el de la gripe, son capaces de eliminar la respuesta basada en el ARNi, evitando con ello parte de la defensa celular. También sirve para regular ciertas funciones específicas de las células en el desarrollo, anulando específicamente la expresión de ciertos genes de forma post-transcripcional.

El ARNi lo hemos utilizado experimentalmente para "silenciar" de forma específica el ARNm de genes cuya función queremos estudiar. Este método, elegido por la revista *Science* como la tecnología del año 2002, es mucho más eficaz que otros utilizados hasta la fecha, como la transfección de ARN antisentido. Pero, además, existen unas claras perspectivas terapéuticas para el ARNi. Por ejemplo, la degeneración macular, la primera causa de ceguera en el mundo desarrollado, está causada por aumento de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) por parte de ciertas células de la coroides, lo que estimula el crecimiento descontrolado de vasos sanguíneos en el plexo coroidal (angiogénesis). El ARNi administrado al ojo es captado por estas células, disminuyendo la producción de VEGF y reduciendo de esta forma la angiogénesis.

Aunque los resultados preliminares del uso del ARNi en varias enfermedades experimentales son prometedores, todavía han de pasar bastantes años antes de asegurar su utilidad clínica. No obstante, estamos ante un sugerente camino científico por el que pueden discurrir futuras investigaciones.

José Miguel López Novoa  
Departamento de Fisiología y Farmacología  
Edificio Departamental. Campus Miguel de Unamuno  
37007 Salamanca  
Facultad de Medicina  
Universidad de Salamanca  
TELÉFONO: 34-923-294-472 · FAX: 34-923-294-669  
E-mail: jmlnovoa@usal.es



## áreas de aplicación

- fluorescencia inducida por láser
- microscopía de alta resolución
- microscopía de luminiscencia
- microscopía de electrones
- fluorescencia espectroscópica (NIR: Infrarrojo Cercano) bioluminiscencia
- quimioluminiscencia
- procesamiento de imagen con niveles de luz bajos
- procesamiento de imagen de biomarcadores (GFP: Proteína Verde Fluorescente)
- espectroscopía en tiempo resuelto
- análisis de spray
- hidrodinámica
- electroforesis
- espectroscopía de absorción y luminiscencia
- procesamiento de tintes potencialmente sensibles (Neurociencia)
- visión nocturna
- seguridad
- astronomía
- análisis de procesos de combustión
- procesamiento geles inyección de carburantes

## especificaciones

- excelente resolución (2048 x 2048 píxeles)
- rango dinámico de 14 bits
- grabación rápida de imagen - 160MB/s
- memoria de imagen en cámara (RAM hasta 4GB)
- bajo nivel de ruido:  $12e^-$  rms a 10MHz
- refrigeración termoeléctrica de  $-50^{\circ}\text{C}$  vs. temperatura ambiente
- interfaces estándar (IEEE 1394, camera link, ethernet)

## distribuidor oficial



vision hi-tech machines

www.vhtm.com

Distribuidor oficial de sistemas de visión artificial en España y Portugal

+34 91 601 13 68  
+34 605 81 37 51  
FAX 91 601 13 67  
info@vhtm.com

C/ Rosa de Luxemburgo nº 9  
Local 5 posterior  
28903 Getafe (Madrid)  
España



pco.  
imaging

pco.2000





Experience + Innovation

## Revealing the Future of Electrophoresis.

*Whether you work with RNA or proteins, Bio-Rad's new automated Experion™ system will change the way you look at electrophoresis.*

The Experion automated electrophoresis system is a powerful, compact, and affordable separation and analysis system that applies microfluidic technology to reinvent the way that you perform one-dimensional electrophoresis. The Experion system transforms the way you obtain your data through:

- Automated separation, detection, and analysis
- High resolution and sensitivity comparable to mini-gel results
- Fast, 30 minute batch runs of 10–12 samples
- Single-step sizing and quantitation
- Familiar data formats — electropherograms, gel views, and tables
- Minimal sample and reagent requirements

For more information, visit us on the Web at [www.bio-rad.com/ad/experion/](http://www.bio-rad.com/ad/experion/)

