

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y SUS
ESPECIALIDADES Y
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE
GASTRINA / COLECISTOKININA, Y SU
INTERACCIÓN CON LA MELATONINA EN EL
CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE
CÉLULAS HT-29 DE CANCER DE COLON**

**TESIS DOCTORAL
PRESENTADA POR
M^a CRISTINA GONZÁLEZ PUGA
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTORA EN CIRUGÍA**

Granada, 2000

ÍNDICE

	<u>Páginas</u>
I.- INTRODUCCIÓN	1
ADENOCARCINOMA COLORRECTAL	3
1. <u>Datos epidemiológicos</u>	3
2. <u>Factores de riesgo del cáncer colorrectal</u>	4
2.1 Predisposición genética	4
a) <u>Cancer de colon hereditario no polipósico</u>	4
b) <u>Poliposis adenomatosa familiar (PAF)</u>	5
c) <u>Defectos somáticos adquiridos</u>	6
2.2 Factores ambientales	8
a) <u>DIETA</u>	8
b) <u>EXPOSICIÓN A CARCINÓGENOS</u>	10
2.3 Transtornos premalignos	11
a) <u>Colitis ulcerosa</u>	11
b) <u>Enfermedad de Crohn</u>	11
3. <u>Prevención y detección temprana del cáncer colorrectal</u>	13
4. <u>Signos y síntomas del cáncer colorrectal</u>	15
5. <u>Diagnóstico y valoración</u>	16
6. <u>Etapa y pronóstico del cáncer colorrectal</u>	19
6.1 Factores de riesgo	19
6.2 Clasificación histopronóstica	21
7. <u>Tratamiento del cáncer colorrectal</u>	25
7.1 Tratamiento quirúrgico	26
7.2 Tratamiento adyuvante para el cáncer de colon	27

	<u>Páginas</u>
OTROS TUMORES MALIGNOS DEL COLON	30
CANCER COLORRECTAL Y GASTRINA	31
GASTRINA	40
1. <u>Síntesis y procesamiento de la gastrina</u>	41
2. <u>Expresión de gastrina</u>	46
3. <u>Liberación de gastrina</u>	46
4. <u>Acciones biológicas de la gastrina</u>	47
a) Secreción de ácido	48
b) Secreción de pepsinógeno, factor intrínseco y moco	51
c) Acciones tróficas	51
d) Otras acciones	54
COLECISTOQUININA	54
1. <u>Estructura de la colecistoquinina</u>	55
2. <u>Expresión de la colecistoquinina</u>	56
3. <u>Liberación de colecistoquinina</u>	57
4. <u>Acciones biológicas de la colecistoquinina</u>	57
RECEPTOR DE GASTRINA / COLECISTOQUININA	62
1. <u>Caracterización del receptor de gastrina / colecistoquinina</u>	63
a) Estructura biomolecular del receptor de gastrina	63
b) Segundo mensajero del receptor de gastrina	68
c) Genética receptor de gastrina	71
d) Receptor de gastrina y cáncer	71
e) Antagonistas del receptor de gastrina / CCK	73
- <u>PROGLUMIDA (XILAMIDA Ó CR242)</u>	74

	<u>Páginas</u>
- <u>LORGLUMIDA (CR 1409)</u>	75
- <u>BENZODIACEPINAS</u>	76
a) L365,260	76
b) L364,718 ó Devazepide ó MK-329	78
c) YM022	79
- <u>DIPEPTOIDES</u>	81
- <u>UREIDOACETAMIDAS</u>	82
- <u>OTROS ANTAGONISTAS CCK</u>	83
MELATONINA	83
1. <u>Fisiología y farmacología</u>	83
2. <u>Mecanismos de acción</u>	86
2.1 Receptores	86
2.2 Eliminación de radicales libres	88
2.3 Aumento de la función inmune	88
3. <u>Melatonina y cáncer</u>	89
APOPTOSIS	91
1. <u>Concepto de apoptosis</u>	91
2. <u>Cambios morfológicos durante la apoptosis</u>	94
2.1 Cambios morfológicos nucleares	94
2.2 Cambios morfológicos citoplásmicos	95
3. <u>Bioquímica del proceso de muerte celular programada</u>	97
4. <u>Agentes que pueden causar muerte celular programada</u>	101
4.1 Agentes que afectan a la superficie celular	102
a) <u>Ligandos para los receptores específicos</u>	102

	<u>Páginas</u>
b) <u>Agentes farmacológicos que afectan al flujo de solutos a través de las membranas</u>	103
4.2 Agentes que afectan al citoplasma, citoesqueleto y orgánulos	103
a) <u>Oxidantes intracelulares</u>	103
b) <u>Quelantes de metales</u>	103
c) <u>Moduladores de la fosforilación</u>	104
d) <u>Moduladores de la transducción de señales</u>	104
4.3 Agentes que afectan al citoesqueleto	105
4.4 Agentes que afectan al núcleo	105
a) <u>Inhibidores de la síntesis de proteínas</u>	105
b) <u>Agentes que dañan al ADN</u>	106
c) <u>Moduladores de la expresión genética</u>	106
5. <u>Alteraciones de apoptosis en patología humana</u>	106
II.- OBJETIVOS	111
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	115
CULTIVOS CELULARES	117
1. <u>Línea celular HT-29</u>	117
2. <u>Material</u>	117
3. <u>Procedimiento para trabajar con células congeladas</u>	118
4. <u>Mantenimiento del cultivo</u>	119
4.1 Preparación del medio de cultivo	119
4.2 Preparación de tampón de lavado	119
4.3 Cultivo de las células	119

	<u>Páginas</u>
4.4 Medida del ADN celular	120
ESTUDIOS DE INCORPORACIÓN DE [6-³H-TIMIDINA]	121
1. <u>Objetivos</u>	121
2. <u>Material</u>	121
3. <u>Procedimiento</u>	121
3.1 Medida de la incorporación de timidina marcada	122
3.2 Influencia de gastrina/CCK y antagonistas del	
receptor CCK sobre la proliferación celular	124
a) <u>GASTRINA</u>	124
b) <u>COLECISTOQUININA</u>	125
c) <u>PROGLUMIDA</u>	126
d) <u>LORGLUMIDA</u>	128
e) <u>PD 135,158</u>	129
f) <u>L 364,718 ó DEVAZEPIDE</u>	130
g) <u>L 365,260</u>	131
h) <u>MELATONINA</u>	133
i) <u>GASTRINA + MELATONINA</u>	134
j) <u>PROGLUMIDA + MELATONINA</u>	135
k) <u>LORGLUMIDA + MELATONINA</u>	137
l) <u>DEVAZEPIDE + MELATONINA</u>	140
DETERMINACIÓN DE NITRITOS	142
1. <u>Objetivo</u>	142
2. <u>Material</u>	142
3. <u>Método</u>	142

	<u>Páginas</u>
3.1 Preparación de las muestras	142
3.2 Preparación de los reactivos	143
a) <u>REACTIVO DE GRIESS</u>	143
b) <u>NaNO₂ ESTÁNDAR</u>	143
3.3 Determinación de los nitritos en los sobrenadantes	143
DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS	145
1. <u>Objetivos</u>	145
2. <u>Material</u>	146
3. <u>Preparación del cultivo celular</u>	146
4. <u>Preparación de las soluciones tampón</u>	148
5. <u>Preparación de las células</u>	149
6. <u>Citometría de flujo</u>	149
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	150
IV.- RESULTADOS	151
ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	153
1. <u>Efecto de agonistas y/o antagonistas de los receptores CCK-A / CCK-B</u>	153
1.1 Efecto de la colecistoquinina (agonista CCK-A)	153
1.2 Efecto de la gastrina (agonista del receptor CCK-B)	154
1.3 Efecto de la proglumida (antagonista CCK-A/CCK-B)	155
1.4 Efecto de los antagonistas CCK-A	156
a) <u>LORGLUMIDA</u>	156
b) <u>DEVAZEPIDE</u>	157
1.5 Efecto de los antagonistas CCK-B	158

	<u>Páginas</u>
a) <u>L 365,260</u>	158
b) <u>PD 135,158</u>	159
2. <u>Efecto de la melatonina</u>	160
3. <u>Efecto de la melatonina combinada con agonistas y antagonistas de los receptores CCK-A / CCK-B</u>	161
3.1 Efecto de la gastrina sobre la curva de inhibición de la melatonina	161
3.2 Efectos de la co-incubación de proglumida (antagonista CCK-A + CCK-B) y melatonina	162
a) <u>EFEECTO DE LA PROGLUMIDA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA MELATONINA</u>	162
b) <u>EFEECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA PROGLUMIDA</u>	164
3.3 Efectos de la co-incubación de lorlumida o devazepide y melatonina	165
a) <u>EFEECTO DE LA LORGLUMIDA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA MELATONINA</u>	165
b) <u>EFEECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA LORGLUMIDA</u>	166
c) <u>EFEECTO DEL DEVAZEPIDE SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA MELATONINA</u>	168
d) <u>EFEECTO DE LAQ MELATONINA SOBRE LA CURVA DE INHIICIÓN DEL DEVAZEPIDE</u>	169

	<u>Páginas</u>
4. <u>Resumen de los datos de IC₅₀ obtenidos en los experimentos anteriores</u>	170
DETERMINACIÓN DE NITRITOS	173
1. <u>Efecto de la lorglumida</u>	173
2. <u>Efecto del devazepide</u>	174
DETERMINACIÓN DE NECROSIS Y APOPTOSIS	175
1. <u>Grupo control</u>	175
2. <u>Efecto de antagonistas CCK-A y CCK-B</u>	176
2.1 Proglumida	176
2.2 Lorglumida	178
2.3 Devazepide o L364,718	181
3. <u>Efecto de la melatonina</u>	183
4. <u>Efecto de la melatonina + antagonistas CCK-A y CCK-B</u>	185
4.1 Melatonina + proglumida	185
4.2 Melatonina + lorglumida	187
4.3 Melatonina + devazepide	189
5. <u>Resumen de los porcentajes de apoptosis y necrosis obtenidos en experimentos anteriores</u>	191
V.- DISCUSIÓN	193
VI.- CONCLUSIONES	217
VII.- BIBLIOGRAFÍA	221

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

ADENOCARCINOMA COLORRECTAL

1. Datos epidemiológicos.

El carcinoma colorrectal afecta a más de 150000 personas/año en Europa, siendo la segunda causa de muerte por cáncer después del de pulmón en varones y la tercera en mujeres. Casi la mitad de los pacientes que sufren cáncer colorrectal fallecen por el mismo. Se admite que en la segunda mitad de siglo ha aumentado la frecuencia del mismo en las sociedades más industrializadas y con mayor nivel social (Landa García, 1996). Las tasas de dicho tipo de neoplasia varían mucho con el área geográfica. La enfermedad es frecuente en Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Escandinavia y Europa Occidental, y relativamente rara en Asia, África y Sudamérica (World Health Organization, 1990).

En 1995, hubo un estimado de 138200 casos de cáncer colorrectal en Estados Unidos, con 55300 muertes (Wingo y cols., 1995). La incidencia aumenta con la edad (Sandler, 1996), siendo raro antes de los 40 años y aumentando con rapidez las tasas de enfermedad después de los 50 años de edad; por otra parte, este trastorno afecta a ambos sexos por igual.

Se ha observado mejoría progresiva de la supervivencia y disminución de la mortalidad por cáncer colorrectal en Estados Unidos durante los últimos 20 años. Esto quizá se deba a mejorías de la técnica quirúrgica, quimioterapia coadyuvante, radioterapia y detección temprana. Ante enfermedad localizada, la supervivencia es de 86.7%, pero sólo de 5.3% en presencia de enfermedad a distancia, por lo que

el objetivo debe ser incrementar la proporción de cánceres que se encuentran a una etapa más temprana (Sandler, 1996).

2. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal.

Aunque no se conoce con precisión la causa exacta del cáncer de colon y recto, al parecer existen factores hereditarios y ambientales. Se sabe que algunos cánceres se deben a trastornos genéticos conocidos, algunos tienen tendencias familiares muy firmes y otros quizás se relacionan con enfermedades premalignas específicas.

2.1 Predisposición genética.

Se estima que el 10% de los cánceres colorrectales ocurre en pacientes con predisposición genética:

a) *Cáncer de colon hereditario no polipósico (síndromes de Lynch)*. Lynch y cols. describieron dos formas diferentes de cáncer de colon no polipósico hereditario. Estas afecciones que surgen de adenomas pueden causar 4 a 6% de las neoplasias malignas colorrectales. Las familias con esta afección son comúnmente definidas como aquellas en las cuales tres o más miembros tienen cáncer colorrectal, con uno de ellos diagnosticado antes de los 50 años de edad. El síndrome I de Lynch es un cáncer hereditario que suele ocurrir en colon proximal, es específico de sitio dentro de una familia afectada y suele ser el único tipo de tumor que presentan estos pacientes. En el 40% de los pacientes que se vigilan cuando menos 10 años puede desarrollarse un cáncer colorrectal metacrónico. Al parecer el síndrome es autosómico dominante y no se acompaña de gran número de pólipos de colon. En el síndrome II de Lynch, o "síndrome de cáncer familiar", hay cáncer colorrectal, renal, ureteral, de vejiga, de intestino delgado, de vías biliares, gástrico, de mama, de ovario y endometrial (Mecklin y Jdrvinen, 1991;

Kodner y cols., 1995). También es un síndrome autosómico dominante y puede relacionarse con una eliminación en el cromosoma 18. Los miembros de familias con estos síndromes deben estudiarse a una edad temprana en busca de pólipos y cáncer de colon (Kodner y cols., 1995).

b) *Poliposis adenomatosa familiar (PAF)*. Es un síndrome autosómico dominante que se diagnostica cuando un paciente tiene más de 100 pólipos adenomatosos en el colon o se descubre en un miembro de una familia con PAF la presencia de adenomas de colon. La PAF incluye una gama de síndromes con diversas manifestaciones extraintestinales, también incluye los síndromes de Gardner (quiste de inclusión epidérmica, osteomas óseos y pólipos de colon) y Turcot (pólipos de colon y tumores cerebrales), y poliposis familiar de colon. El defecto genético que causa la poliposis adenomatosa se describió en el brazo largo del cromosoma 5, cerca del locus q 21; el gen se ha denominado APC. La PAF ocurre en cualquier parte de 1 en 8000 a 1 en 29000 personas. La expresión común del síndrome es la presencia de pólipos múltiples en colon y manifestaciones extraintestinales concurrentes que incluyen quistes epidermoides, tumores desmoides en el abdomen, osteomas de los huesos y tumores cerebrales. La expresión del gen ocurre en 100% de pacientes con el defecto. La predominancia autosómica origina la expresión en 50% de la descendencia. Diez a 20% de enfermos con PAF al parecer alojan el defecto genético por mutación espontánea. Todas las personas con el gen defectuoso desarrollarán cáncer de colon si no se tratan. La edad promedio en que se descubre la PAF es a los 29 años y en quienes se diagnostica por primera vez un cáncer colorrectal relacionado con PAF es de 39 años. Las recomendaciones actuales indican que todos los familiares de un paciente con PAF deben valorarse de manera periódica

mediante colonoscopia desde los 10 hasta los 40 años de edad (Kodner y cols., 1995).

c) Defectos somáticos adquiridos. La alteración cromosómica en PAF es un defecto en la línea de células germen y se encuentra desde el nacimiento. La mayoría de pacientes con cáncer colorrectal no tiene un componente hereditario y la mutación genética inicial que origina el crecimiento neoplásico ocurre en una o un grupo de células de la mucosa. Estos tumores no son hereditarios, pero puede haber una predisposición familiar a su desarrollo. Lynch demostró que el riesgo de cáncer colorrectal es tres a nueve veces mayor si uno o más familiares de primer grado lo han padecido (Kodner y cols., 1995).

Mediante distintas técnicas se localizó en el cromosoma 2p15-16 el gen responsable del cáncer de colon familiar (Marx, 1993). Se ha descrito el defecto como un fallo en la replicación de DNA, secundario a la presencia de marcadores microsatélites de DNA. El gen del cáncer de colon familiar puede también jugar un papel en algunos cánceres colónicos esporádicos.

Los genes y sus cromosomas asociados, implicados en el desarrollo del cáncer de colon, además del gen del cáncer de colon familiar, son el APC en el cromosoma 5q, el myc en el cromosoma 8, el K-ras en el cromosoma 12, el p53 y neu/HER2 en el cromosoma 17 y el DOC en el cromosoma 18q. El K-ras, el neu/HER2 y el myc se conocen como oncogenes, mientras que el APC, el DOC y el p53 son genes supresores de tumores. La interacción entre estos genes y la secuencia de sucesos no se comprende totalmente en la actualidad, aunque parece haber una progresión de alteraciones en la secuencia adenoma-carcinoma (Chang y Bland, 1998).

Las pruebas disponibles sugieren que los adenomas de colon se desarrollan después de dicha mutación genética. El tejido adenomatoso contiene células de criptas con expresión genética atípica. El tumor puede resultar de más de una mutación. A medida que el adenoma o tumor progresa puede expresarse una mutación somática, acompañada de una hereditaria. Se piensa que esta última es tumorígena, pero quizás no se exprese o se detecte en el tumor. Para algunos autores una vez que se desarrolla el adenoma quizá se requiera una segunda mutación para que cambie a cáncer (Fearon y Vogelstein, 1990). En realidad durante el desarrollo de una afección maligna puede ocurrir una progresión de mutaciones. Los oncogenes actúan iniciando fenómenos que originan un crecimiento celular anormal y el desarrollo de tumores. Por ejemplo se ha encontrado la familia del gen *ras* en un 50% de cánceres colorrectales y adenomas mayores de 1 cm, pero en menos del 10% de los menores de 1 centímetro.

Conforme un tumor se desarrolla, una mutación subsecuente puede originar la eliminación de genes supresores. Esta pérdida suele ocurrir en los cromosomas 17, 18 y 5. Se piensa que estas mutaciones afectan las relaciones de una célula con otra en todos los tumores y en consecuencia también en el desarrollo de metástasis. Fearon y Vogelstein propusieron un modelo para los cambios genéticos que llevan al cáncer colorrectal. Primero los oncogenes inician una activación mutacional, concretamente el *ras*, que se acompaña de una inactivación mutacional de múltiples genes supresores (en particular de los cromosomas 5q,17p y 18q). Las mutaciones permiten el crecimiento no controlado en grados variables. Se requieren más mutaciones para el desarrollo de cáncer que de pólipos benignos. La evolución de alteraciones celulares de la mucosa hacia

adenoma y cáncer podría relacionarse con una progresión de mutaciones con el tiempo (Fearon y Vogelstein, 1990).

2.2 Factores ambientales.

a) DIETA. - Se ha propuesto que la dieta es un factor etiológico importante en el desarrollo del cáncer colorrectal y se ha sugerido que las grasas son tóxicas para la mucosa del colon. Las dietas altas en ácido oleico (que se encuentran en los aceites de oliva, coco y pescado) no aumentan la frecuencia de cáncer en animales. Al parecer los ácidos grasos monoinsaturados (omega 3 y omega 6) son menos carcinógenos que las grasas poliinsaturadas o saturadas. Estudios epidemiológicos de poblaciones que consumen una dieta con menos de 5% de grasa demuestran una frecuencia más baja de cáncer colorrectal, en tanto que en quienes las dietas incluyen 20% de grasa como aceites de maíz o cártamo la frecuencia de cáncer es mayor. En consecuencia al parecer las grasas animales y los aceites vegetales muy saturados pueden causar cierto fenómeno en la mucosa de colon que estimula el desarrollo del cáncer colorrectal (Kodner y cols., 1995).

Algunos autores sugieren que ciertos elementos de la dieta protegen contra el desarrollo de una neoplasia. El selenio, las ditioionas, los tioéteres (ajo, cebolla, puerro), terpenos (frutas cítricas) y carotenoides (zanahorias, ñame, sandía) pueden actuar como anticarcinógenos porque reducen los radicales libres de oxígeno en la superficie de la mucosa del colon. Otros anticarcinógenos incluyen fenoles de origen vegetal (uvas, fresas, manzanas), isotiocianatos, cumarinas, esteroides, ácido ascórbico y tocoferoles, todos los cuales tienen efectos en diversos puntos del proceso carcinogénico, así pueden inducir enzimas de detoxificación, inhibir la formación de nitrosamina, proporcionar sustrato para la formación de compuestos antineoplásicos.

Un aumento de la fibra dietética puede disminuir la frecuencia de cáncer en pacientes con dieta rica en grasas; sin embargo, los incrementos de estas últimas pueden evitar el efecto benéfico de la fibra. Se ha descrito tras distintos estudios epidemiológicos, que una dieta rica en fibra y pobre en grasas protege mejor contra neoplasias que la que no contiene grasas. Hay diversos mecanismos por los cuales la fibra podría inhibir la aparición de cáncer colorrectal, así la fibra puede aumentar el volumen de las heces lo que tiende a diluir los carcinógenos o acortar el tiempo de tránsito en el colon y, como resultado, disminuir el crecimiento de bacterias perjudiciales. También puede adsorber sales biliares, que son compuestos promocionales conocidos para cáncer colorrectal. La fermentación de la fibra por bacterias puede producir ácidos grasos de cadena corta que disminuyen el pH y crean un ambiente que favorece menos la aparición de cáncer. La fibra también puede inhibir la hidroxilación de ácidos biliares, y regular el ingreso de energía (Jacobs, 1988). Hasta la fecha estudios clínicos controlados muestran poca relación entre la fibra de la dieta y el cáncer de colon, pero en dichos estudios se utilizaron dosis relativamente bajas de fibra.

En 1982 el National Research Council estableció una línea provisional para recomendaciones dietéticas hasta que pudieran llevarse a cabo estudios definitivos; éstos incluyeron:

1. Disminuir la grasa en la dieta de 40 a 30% de calorías totales.
2. Aumentar el consumo de alimentos que contienen fibra.
3. Reducir alimentos curados con sal, encurtidos y ahumados.
4. Limitar aditivos de los alimentos que se ha comprobado que son posibles carcinógenos.

5. Establecer protocolos de investigación para detectar mutágenos en los alimentos.

6. Limitar el consumo de alcohol.

Estudios epidemiológicos indican que la dieta tiene un efecto en el desarrollo del cáncer de colon. Se ha observado que las personas de naciones menos industrializadas tienen una frecuencia baja de cánceres colorrectales. Las dietas de estas personas incluyen menos alimentos procesados y más fibra natural. Las personas de estos países que migran a Estados Unidos o al Reino Unido adquieren el riesgo alto de cáncer de colon que se encuentra en estos países industrializados (Kodner y cols., 1995).

Tras varios estudios epidemiológicos hay una fuerte evidencia de que tasas altas de grasa y carne en la dieta son factores de riesgo para el cáncer colorrectal en humanos, mientras que niveles altos de verduras y frutas están inversamente relacionados con el riesgo de carcinoma de colon (Ghadirian y cols., 1997).

b) EXPOSICIÓN A CARCINÓGENOS.- No se ha establecido una relación clara entre carcinógenos específicos y cáncer colorrectal, pero los posibles agentes que se investigan en la actualidad incluyen ácidos biliares (como el quenodesoxicólico), aditivos de los alimentos, alcohol y radiación ionizante. Cada uno de ellos puede actuar como promotor de alteraciones mutacionales en la mucosa del colon, pero no se ha demostrado claramente que algunos tengan efecto carcinógeno. Los radicales oxígeno, que son productos accesorios inestables del metabolismo del oxígeno, pueden servir como promotores o estimulantes químicos para el desarrollo de expresiones de gen alteradas. No es un efecto carcinógeno verdadero sino la creación de un "medio" que predispone al desarrollo de mutaciones (Kodner y cols., 1995).

2.3 Trastornos premalignos.

a) Colitis Ulcerosa. La frecuencia total de neoplasias en pacientes con pancolitis es de 1% anual después de 10 años; en consecuencia el riesgo acumulativo de cáncer es de 10% cuando la enfermedad ha durado 20 años. Se ha comprobado que la displasia que se identifica en la mucosa del colon en biopsias colonoscópicas repetidas es un precursor de cáncer. Los cánceres tienden a estar más avanzados porque es difícil detectarlos en una etapa temprana. Casi 35% son lesiones Dukes C o D. No hay acuerdo acerca de la implicación de los pólipos adenomatosos que se encuentran en pacientes con colitis ulcerosa crónica. No se sabe con seguridad si ello representa displasia y es una indicación para colectomía total o si es un pólipo benigno que surge de una mucosa inflamada.

El método más eficaz para prevenir el cáncer de colon en pacientes con colitis ulcerosa es extirpar el colon una vez que se identifica la displasia. El riesgo de cáncer en casos de displasia es de casi 30%.

b) Enfermedad de Crohn. La frecuencia total de cáncer en pacientes con enfermedad de Crohn es de un 7% en 20 años. Casi todos los cánceres intestinales se encontraron en los segmentos excluidos de pacientes que se trataron con derivación segmentaria. Los pacientes con estrecheces de colon tienen una frecuencia ligeramente más alta de adenocarcinoma en el sitio del estrechamiento fibroso. Los informes sobre el origen de estas neoplasias en el sitio de reconstrucción de una estenosis en intestino delgado indican que existe el riesgo de adenocarcinoma en estas lesiones. Por ello durante la reconstrucción de las mismas debe tomarse una biopsia de pared intestinal. También se ha reportado el desarrollo de cáncer de células escamosas y adenocarcinoma en fistulas crónicas (en especial del ano y el peritoneo) de pacientes con enfermedad de Crohn. En

total el riesgo de neoplasias en estos enfermos sólo es un poco mayor que el de la población general y ciertamente menor que en pacientes con colitis ulcerosa o poliposis adenomatosa familiar (Kodner y cols., 1995).

En un estudio realizado recientemente sobre los factores de riesgo del cáncer colorrectal en España, se llegó a la conclusión de que en nuestra población éste se relaciona con una ingesta elevada de grasas poliinsaturadas, vitamina D y alcohol, así como con una ingestión baja de calcio (la interacción entre calcio, ácidos biliares y ácidos grasos explica el efecto protector del consumo elevado de este nutriente) vitaminas C y E (por su efecto antioxidante) y potasio. El riesgo de esta patología también aumentó con concentraciones séricas altas de colesterol y sodio. La asociación entre consumo de fibra y cáncer observada responde, según parece, a un fenómeno de interrelación entre nutrientes, por lo que no tiene validez en este estudio. El uso frecuente de antiinflamatorios no esteroideos disminuyó el riesgo de cáncer colorrectal sin que se observara tendencia alguna con el uso de fármacos que provocan hipergastrinemia, tabaquismo o antecedentes de colecistectomía. El síndrome de Lynch fue el único factor de riesgo genético presente. La nuliparidad y la aparición de la menopausia después de los 50 años aumentaron notablemente el riesgo de cáncer colorrectal, esto se debería a una mayor exposición a estrógenos durante la vida. En cualquier caso, la regresión logística permitió observar que los factores hormonales son menos importantes a la hora de conferir riesgo que los factores genéticos o nutricionales (Boldó Roda y cols., 1999).

3. Prevención y detección temprana del cáncer colorrectal.

Aunque actualmente no hay un método efectivo disponible para la prevención del cáncer colorrectal en la población de riesgo asintomática, los controles

periódicos pueden llevar a la extirpación de pólipos precancerosos y detección del cáncer de colon en un estadio temprano. Las pautas propuestas por la American Cancer Society para el screening de los pacientes estadounidenses asintomáticos con un riesgo promedio, son las siguientes:

1) un examen de sangre oculta en heces anualmente a estadounidenses de 50 años de edad o más y 2) una sigmoidoscopia, preferentemente flexible, empezando en la misma población y repitiéndola cada 3 a 5 años a partir de entonces (Levin y Murphy, 1992).

En lo que respecta a los estudios de detección propuestos, se utilizó ampliamente el examen de sangre oculta en heces y parece ser efectivo. La tasa de falsos positivos es baja (0,5%), cuando se lo realiza adecuadamente. En grandes series de screening se reportó que la incidencia de resultados positivos se encuentra entre el 1 y el 4%. Aproximadamente, el 75% de los pacientes con cáncer colorrectal detectado por medio del examen de sangre oculta en heces tienen la enfermedad localizada. Se prevé que las tasas de supervivencia a los 5 años para el cáncer detectado de esta manera, serán mejores que las señaladas por las estadísticas nacionales de los Estados Unidos de mortalidad de cáncer de colon. También se han demostrado beneficios con la sigmoidoscopia en la detección de pólipos y del cáncer temprano (Chang y Bland, 1998).

El examen rectal debe formar parte de un examen físico general. Esto permite la detección de crecimientos rectales bajos y, probablemente, algunos de localización media. Actualmente los marcadores tumorales serológicos no son de valor en el estudio de detección del cáncer colorectal. Cuando alguno de estos procedimientos de detección es positivo, se indica una colonoscopia completa para definir el examen y establecer el diagnóstico tisular de una anomalía.

Cuando la colonoscopia no está disponible inmediatamente, una opción alternativa es un enema baritado con doble contraste. A aquellos individuos con riesgo aumentado se los sigue con programas diferentes. En ciertos individuos, la vigilancia debe empezar antes de los 50 años de edad y el seguimiento debe ser más frecuente. En los casos de poliposis colónica y de colitis ulcerosa activa de larga evolución, debe usarse la colonoscopia en lugar de la sigmoidoscopia en los estudios de detección. En estos individuos, el examen de sangre oculta en heces es inefectivo. El programa de vigilancia modificado para individuos con riesgo aumentado de desarrollar cáncer colorrectal es el siguiente:

· *En grupos con poliposis adenomatosa familiar y síndromes asociados, se debe realizar sigmoidoscopia flexible cada 6 a 12 meses desde la adolescencia, colonoscopia cada 3 años y colectomía si se encuentra poliposis.*

· *En pancolitis de larga evolución, se recomienda colonoscopia anual después de los 7 años y colectomía si se encuentra displasia progresiva o severa.*

· *En colitis del lado izquierdo de larga evolución, se hará colonoscopia anual después de los 15 años.*

· *En grupos con pólipos adenomatosos previos, se practicará una colonoscopia al año si los adenomas son de tipo vellosos o mayores de 1 cm. Si el examen es negativo, se repetirá cada 3 a 5 años. Además se realizará un examen de sangre oculta en heces anual.*

· *En el Síndrome de Lynch, se examinará la sangre oculta en heces anualmente y una colonoscopia cada 3 años a partir de la tercera década.*

· *En casos de irradiación pélvica, análisis de sangre oculta en heces anual y sigmoidoscopia flexible cada 3 años.*

·En casos de antecedentes de cáncer de mama, de endometrio o de ovario, se realizará un examen de sangre oculta en heces anual y examen rectal. Sigmoidoscopia flexible cada 3 años y estudio del tracto digestivo superior periódico (Chang y Bland, 1998).

4. Signos y síntomas de cáncer colorrectal.

Los signos y síntomas del cáncer colorrectal son variables e inespecíficos y están determinados por la localización y tamaño de la lesión. *Las lesiones sobre el lado derecho* tienden a ser voluminosas y ulcerosas. Los síntomas asociados más comunes son la anemia microcítica hipocroma y un dolor sordo en cuadrante inferior derecho. Las náuseas, la anorexia y una masa abdominal palpable en el mismo cuadrante, pueden ser otras manifestaciones del cáncer de ciego y del colon ascendente. La obstrucción es una forma de presentación poco frecuente. *El cáncer de colon transverso* se manifiesta frecuentemente mediante signos de obstrucción o con dolor en el sitio donde se halla el tumor. Otros síntomas que pueden presentarse son los efectos de masa de la fístula gástrica. *El colon izquierdo*, que comprende al colon descendente y sigmoide, con frecuencia alberga lesiones anulares y escirras. Los síntomas más comunes son la alteración del hábito intestinal y la reducción del calibre de las heces como resultado del estrechamiento de la luz colónica y la presencia de heces sólidas en el colon izquierdo. El moco y la sangre mezclados con el peristaltismo intestinal son otras complicaciones frecuentes. Pueden aparecer signos y síntomas de obstrucción o compromiso del tracto urinario. Se puede palpar una masa indolora en el cuadrante inferior izquierdo o en el área suprapúbica. El dolor lumbar, con ciática o sin ella, implica que la enfermedad se ha extendido localmente. Otras

complicaciones, tales como la caquexia, la pérdida excesiva de peso, ictericia o ascitis, son sugerentes de enfermedad metastásica.

Los hallazgos al examen físico en el cáncer de colon pueden incluir sangre oculta en material fecal positiva, una masa abdominal, un nódulo umbilical, hepatomegalia, ascitis... (Chang y Bland, 1998).

5. Diagnóstico y valoración.

Cuando se sospecha la presencia de un cáncer de colon, el estudio diagnóstico de elección es la colonoscopia. Este estudio permite el acceso para examinar el colon en su totalidad, favorece la polipectomía con propósitos terapéuticos y posibilita la realización de la biopsia de la lesión colónica. Los riesgos de la colonoscopia son : El examen, ocasionalmente incompleto, del colon derecho (del 5 al 10% de los casos) y la necesidad de intervenir quirúrgicamente las complicaciones importantes en el 0,1 al 0,3% de los estudios. En raros casos puede existir cierta mortalidad. Los procedimientos diagnósticos alternativos son el enema baritado con doble contraste y la proctosigmoidoscopia. La tasa de perforación por un enema baritado es baja y comprende entre 0,04 y 0,008%. Las desventajas de las imágenes radiográficas incluyen: que no son terapéuticas, no proveen diagnóstico tisular y pueden no evidenciar lesiones mucosas planas, que pueden representar un cáncer concomitante (Chang y Bland, 1998). En la ecografía, los cánceres aparecen en forma de masas parietales digestivas. Los cánceres de recto son accesibles con la ecografía endorrectal. En la tomografía, los cánceres recto-cólicos aparecen en forma de masas intraluminales o de engrosamientos de pared.

La resecabilidad está determinada por la extensión de la enfermedad. Una exploración tomográfica del abdomen y pelvis brindan información con respecto a

cualquier compromiso del hígado y a la extensión local del cáncer de colon sigmoide. En los tumores menos evolucionados, el examen escanográfico tiene menos interés para el diagnóstico de extensión local y la búsqueda de adenopatías. Su fiabilidad en el mejor de los casos es de un 50-70 %. En el cáncer de recto, la tomografía endorrectal y la ecografía endorrectal permiten un chequeo más preciso en las formas evolucionadas con invasión ganglionar importante. La infiltración de la grasa perirrectal no es específica (de un 20 a un 30% de imágenes de infiltración corresponden en realidad a lesiones inflamatorias) y la tomografía no puede juzgar el grado de invasión parietal. El 60% de las adenopatías tienen un tamaño inferior a 5mm, y por tanto no son detectadas por esta técnica. Al contrario, los ganglios de tamaño superior a 15mm son casi siempre metastásicos. La ecografía endorrectal permite explorar la pared rectal y el espacio perirrectal. Indispensable antes de toda decisión terapéutica, es hoy por hoy el examen de referencia para la evaluación de la extensión locorregional de los cánceres de recto; las comparaciones hechas entre los resultados ecoendoscópicos y anatomopatológicos muestran una precisión diagnóstica de un 83% de media. Para la extensión ganglionar, sin embargo, la precisión diagnóstica es mediocre, oscilando entre un 50-75% (Conroy y cols., 1994).

Una radiografía de tórax es suficiente para evaluar metástasis pulmonares en un paciente asintomático que no tiene evidencia de otras metástasis. Los tests que miden la función hepática han demostrado tener valor predictivo para las posibles metástasis hepáticas.

Los marcadores tumorales como el CEA, el CA19-9 y el CA-50 han sido utilizados en el seguimiento de los pacientes con cáncer colorrectal. El CEA ha demostrado ser muy útil como parte de las evaluaciones prequirúrgicas. Se

correlaciona bien con el estadio del tumor y con las predicciones de la supervivencia ulterior y la recurrencia. El CEA de individuos normales varía entre 0 y 2,5 ng/mL, aunque muchas condiciones benignas están asociadas a un CEA elevado (Chang y Bland, 1998). En general, es el valor de 5ng/mL el que es elegido como límite superior de la normalidad. Su sensibilidad varía de un 7 a un 64% según la extensión de la enfermedad. Es poco fiable en los estadios localizados, por lo que resulta poco útil para el despistaje. Al contrario, existe una fuerte correlación entre la concentración sérica de CEA y la masa tumoral. La elevación del CEA es, por tanto, un factor de pronóstico desfavorable. Tras resección de carácter curativo, el CEA debe regresar a la normalidad en menos de 6 semanas.

Las metástasis hepáticas se deben buscar de forma sistemática. Su frecuencia varía entre un 15-20%, pero un 29% de los pacientes las desarrollan en los dos años que siguen a la exéresis quirúrgica. Se puede considerar pues, que uno de cada dos pacientes es ya portador de metástasis en el momento del tratamiento inicial. La ecografía es la prueba diagnóstica de elección. La sensibilidad de la ecografía para lesiones de más de 15mm está en torno a un 92%, con una especificidad de un 96%. La sensibilidad de la tomografía es ligeramente superior. Una resonancia magnética nuclear o un portoescaner pueden ser útiles en caso de lesiones poco numerosas antes de decidir la exéresis quirúrgica de una metástasis. Durante la intervención, se podrá recurrir a la ecografía para constatar la ausencia de lesiones suplementarias y facilitar la localización de metástasis conocidas (Conroy y cols., 1994).

Un descubrimiento reciente en herramientas diagnósticas, utiliza anticuerpos radiomarcados dirigidos contra el tumor para evidenciarlo o

detectarlo. El desarrollo de la inmunocentellografía apunta a conseguir una imagen tumoral más sensible y más específica. Una glicoproteína, la TAG 72, es muy útil como antígeno blanco en el cáncer colorrectal. En el adenocarcinoma de colon la expresión de la TAG 72 fue del 94%. Un estudio que usa anti-TAG 72 marcado con indio 111 (^{111}In) para ver el cáncer de colon, mostró una sensibilidad del 70%, una especificidad del 90% y una precisión del 72%. Los efectos adversos de los anticuerpos de ratón radiomarcados son infrecuentes y reversibles. Las dos complicaciones máximas radican en que un gran porcentaje de pacientes que recibieron anticuerpos de ratón desarrollaron anticuerpos antirratón humanos y un 10% de los pacientes demostraron una falsa positividad. La cirugía radioinmunodirigida también utiliza los anticuerpos marcados para localizar tumores (Chang y Bland, 1998).

6. Etapa y pronóstico del cáncer colorrectal.

6.1 Factores de riesgo.

Cuando no existe enfermedad metastásica obvia sólo es posible determinar la etapa precisa del cáncer colorrectal después de la resección quirúrgica y el análisis histopatológico. A diferencia de otros tumores sólidos, el tamaño de la lesión primaria tiene poca influencia en el pronóstico del cáncer de colon (Kodner y cols., 1995). A partir de un examen de las piezas de exéresis, numerosos factores han sido reconocidos como tenedores de un valor pronóstico independiente. La extensión parietal del tumor y su extensión ganglionar son, de lejos, los factores más importantes: condicionan el riesgo ulterior de recidiva local y de evolución metastásica. La probabilidad de supervivencia disminuye con la extensión del tumor en la pared intestinal. Por convención, el límite de la pared está definido por la capa externa de la muscular. La invasión de la serosa (o de tejidos adiposos

perirrectales para cánceres de recto situados bajo la línea de reflexión peritoneal) es considerada como una extensión extraparietal, de pronóstico más desfavorable.

El descubrimiento de ganglios metastásicos agrava el pronóstico; esto es tanto aún más desfavorable si el número de ganglios afectados es elevado (en particular por encima de tres). Es útil separar las adenopatías situadas en la proximidad de los tumores de las adenopatías a distancia. Para estos dos grupos, el anatomopatólogo precisa el número de ganglios positivos relacionados con el número total de ganglios examinados. Es necesario de todas maneras, subrayar que la proporción de cánceres con extensión ganglionar aumenta con el número de ganglios recogidos; por tanto, se precisa contar al menos con seis ganglios sin invasión tumoral para determinar el estadio del cáncer con certeza.

La invasión venosa, la presencia de émbolos linfáticos, una mala diferenciación histológica del tumor (los que producen mucina y los de células en anillo de sello tienen peor pronóstico), la aneuploidía, son igualmente factores pronósticos peyorativos. También lo son una perforación del tumor, una extensión a un órgano vecino o la invasión de los límites de exéresis (Conroy y cols., 1994). La presencia de núcleos aneuploides ha despertado gran interés últimamente. La citometría de flujo permite valorar el contenido de ADN de las células de cáncer. Al parecer los tumores con predominio de núcleos diploides son menos propensos a dar metástasis que las neoplasias con núcleos aneuploides. Algunos estudios preliminares sugieren que el ADN de las células cancerosas puede proporcionar información pronóstica independiente de la etapa de la enfermedad (Kodner y cols., 1995).

6.2 Clasificación histopronóstica.

La clasificación de Dukes, originalmente descrita en 1932, comporta tres estados A, B y C, según la extensión parietal y la afectación ganglionar (**figura 1**).

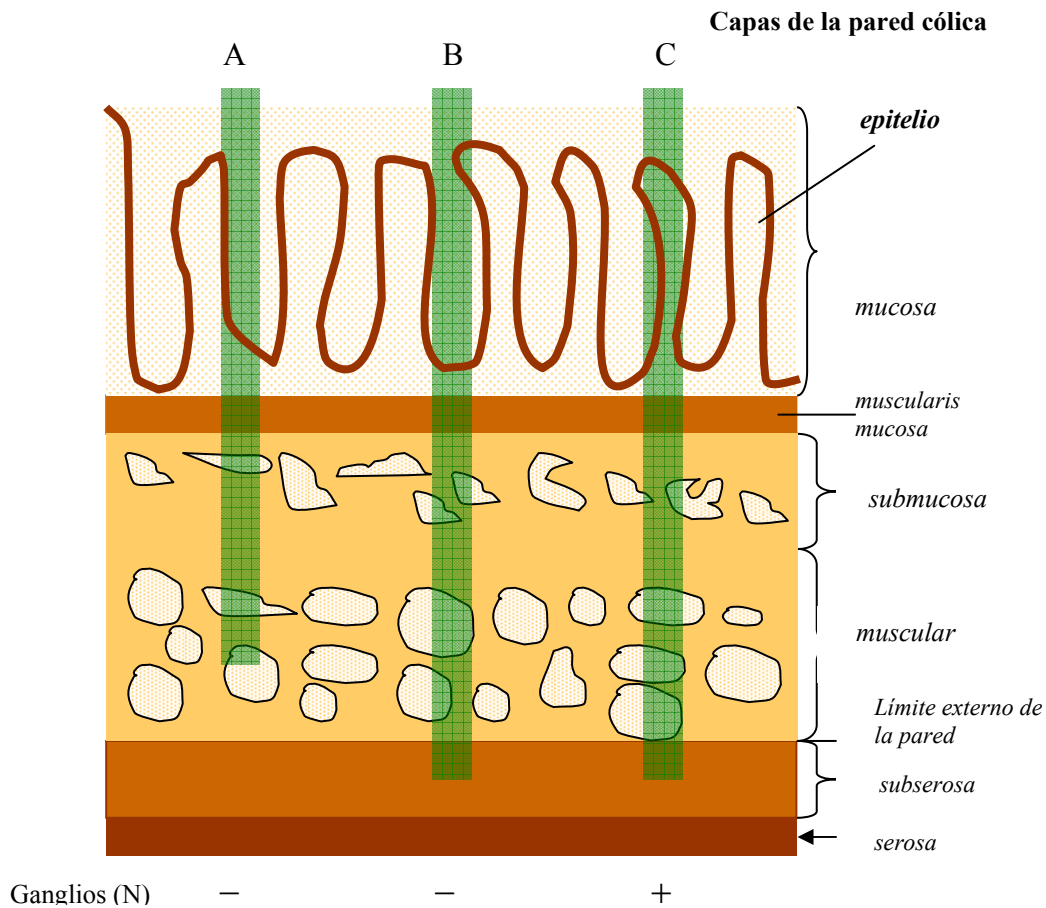


Figura 1: Clasificación de Dukes. Las barras verdes simbolizan la profundidad de penetración del tumor.

Un cáncer del tipo A de Dukes es un tumor que invade la pared intestinal pero sin atravesar la muscular propia, uno del tipo B de Dukes se refiere a una invasión transmural de la pared intestinal y un Dukes C, indica una invasión de la pared del intestino de cualquier grado con metástasis ganglionares. Aunque de gran valor pronóstico, actualmente esta división es menos utilizada pues no permite individualizar los diferentes niveles de extensión intraparietal del tumor. Tampoco diferencia en los casos con invasión ganglionar, estadios diferentes de extensión en la pared intestinal. Se han propuesto numerosas modificaciones. La más utilizada es la de Astler y Coller (**figura 2**).

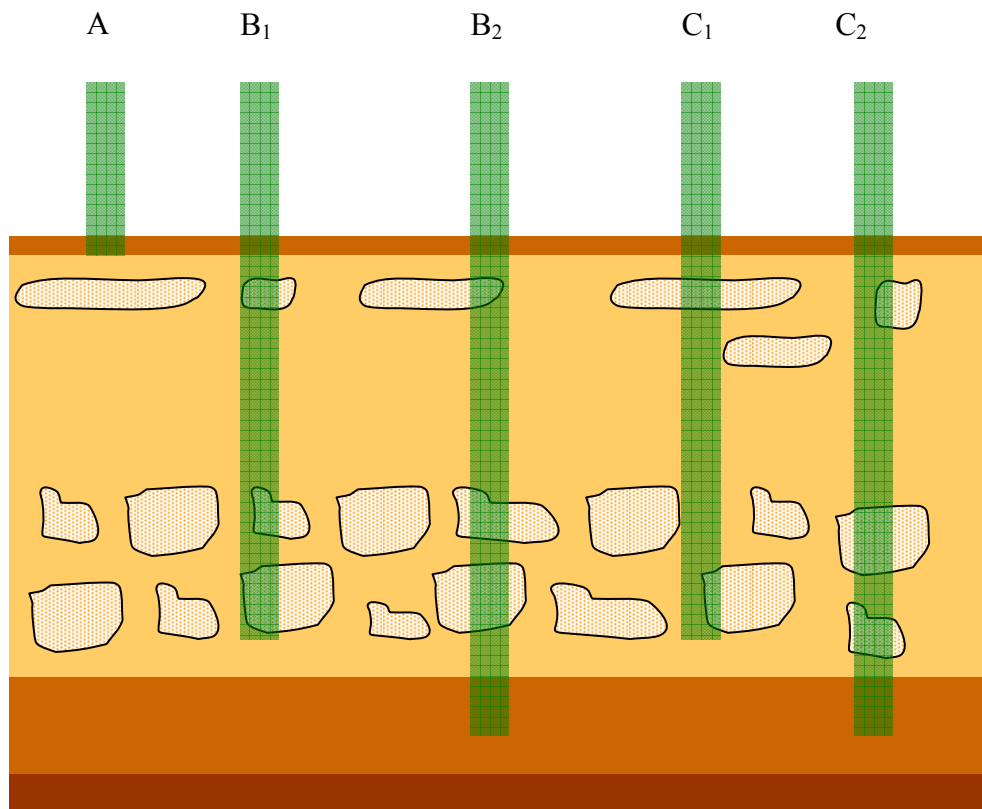


Figura 2: Clasificación de Astler y Coller.

Permite separar a los tumores limitados a la mucosa, de excelente pronóstico, de los tumores que invaden la muscular (B1), de pronóstico próximo al estadio A de Dukes. Al grupo B2 corresponderían aquellos casos con invasión de todas las capas de la pared intestinal. Así mismo, el pronóstico de Dukes C es distinto según que los ganglios afectados sean proximales (C1 de Astler y Coller) o distales (C2).

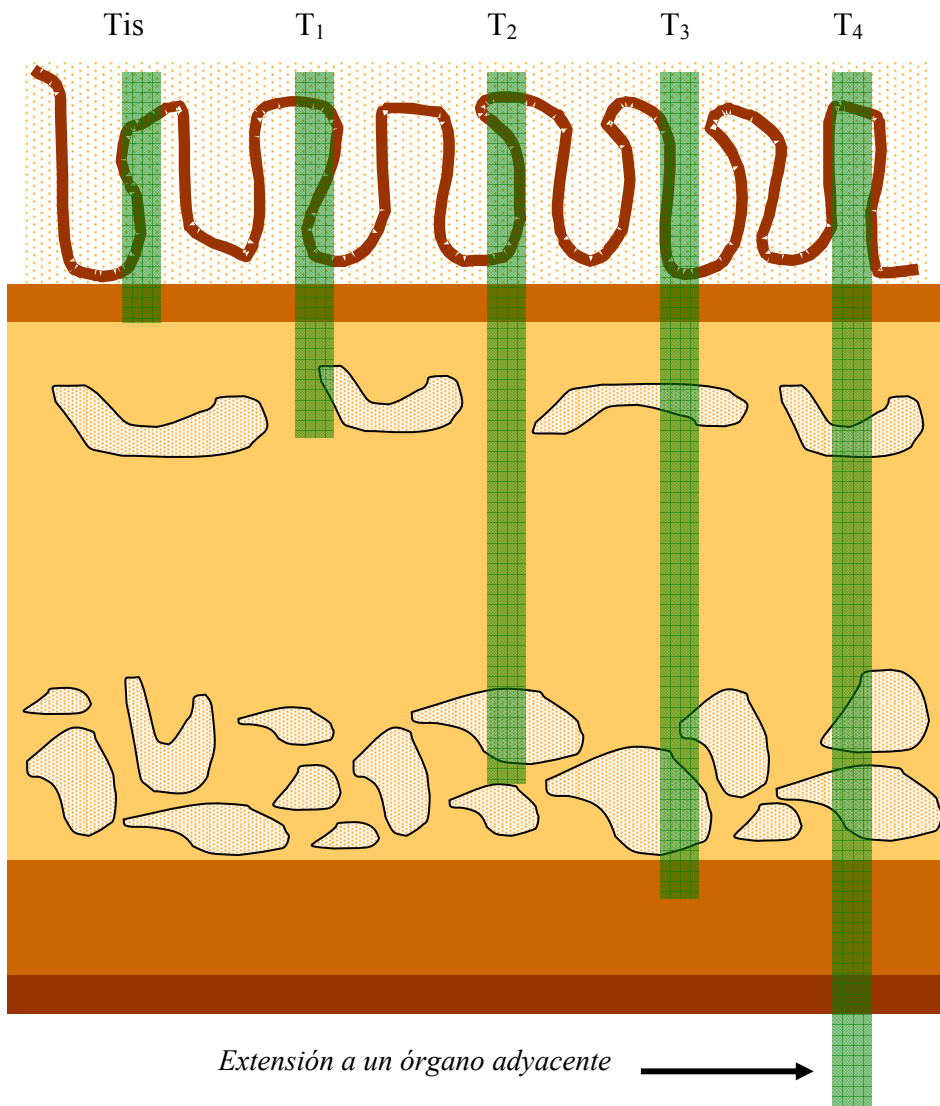


Figura 3: Clasificación TNM: penetración del tumor en la pared intestinal.

Esta clasificación permite separar mejor los casos que se pueden beneficiar o no de tratamientos adyuvantes a la cirugía. Gunderson y Sosin le han añadido los estadios B3 y C3, permitiendo identificar tumores que invaden otros órganos o estructuras vecinas por extensión directa y que pueden ser retirados por un mismo

acto quirúrgico curativo, y los estadios D correspondientes a una enfermedad metastásica.

La clasificación TNM es de lejos la mejor clasificación histopronóstica (**figura 3**). Distingue de forma independiente cinco estadios de invasión parietal y cuatro estadios de extensión ganglionar (Tabla I), en función del número y de la localización de los ganglios invadidos. Más precisa, permite apreciar mejor el pronóstico y las indicaciones terapéuticas. Está considerada como la clasificación internacional de referencia (Conroy y cols., 1994).

Clasificación TNM
Tumor primitivo (T)
<ul style="list-style-type: none">• Tx - No es posible valorar el tumor primario.• T0 - No existen pruebas del tumor primario.• Tis - Carcinoma "in situ".• T1 - Tumor que invade submucosa.• T2 - Tumor que invade muscular propia.• T3 - Tumor que invade, a través de la muscular propia, la subserosa o tejidos pericólicos o perirrectales sin peritoneo.• T4 - Tumor que perfora peritoneo visceral o invade de manera directa otros órganos o estructuras.
Ganglios linfáticos regionales (N)
<ul style="list-style-type: none">• Nx - No es posible valorar ganglios linfáticos regionales.• N0 - Ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales.• N1 - Metástasis en uno a tres ganglios linfáticos pericólicos o perirrectales.• N2 - Metástasis en cuatro o más ganglios linfáticos pericólicos o perirrectales.• N3 - Metástasis en cualquier ganglio linfático a lo largo del trayecto de un tronco vascular específico.
Metástasis a distancia (M)
<ul style="list-style-type: none">• Mx - No es posible valorar la presencia de metástasis distantes.• M0 - ausencia de metástasis distantes.• M1 - Metástasis a distancia.

Tabla I: Estadificación según el tumor / afectación ganglionar / metástasis (TNM).

Las etapas del sistema TNM están representadas en Tabla II y pueden correlacionarse con facilidad con el sistema de Dukes. La etapa I corresponde a la A de Dukes, la II a la B, la III a la C de Dukes y la IV a la D de Dukes.

La supervivencia a los cinco años demuestra claramente la importancia pronóstica de la etapa de la enfermedad. Los mejores resultados se relacionan con

la afección en la etapa I, con supervivencia de más del 90% de los pacientes a los cinco años. En la etapa II este índice es entre el 60 y 80%, y en pacientes con metástasis en ganglios linfáticos (etapa III) la supervivencia a los cinco años varía del 20 al 50%. Menos del 5% de los pacientes sobrevive cinco años cuando existen metástasis a distancia.

Etapas del sistema TNM			
• Etapa 0	Tis	N0	M0
• Etapa I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
• Etapa II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
• Etapa III	Cualquier T	N1	M0
	Cualquier T	N2, N3	M0
• Etapa IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla II: Etapas del sistema TNM.

7. Tratamiento del cáncer colorrectal.

Después de una cuidadosa evaluación de la salud del paciente y de la extensión del tumor, el próximo paso es el tratamiento. El tratamiento principal para el cáncer de colon es la resección anatómica, aunque es importante tener en cuenta la terapéutica adyuvante.

7.1 Tratamiento quirúrgico.- La extensión de la resección viene determinada por la ubicación del cáncer de colon primario, así como por la presencia o ausencia de invasión hacia estructuras adyacentes y por las metástasis a distancia. Cuando no hay evidencia de invasión colónica hacia los órganos

vecinos ni de metástasis, el tratamiento principal es la resección del segmento colónico. Los principios en los que se basa esta resección segmentaria incluyen la ligadura de los principales pedículos vasculares, la disección de ganglios linfáticos mesentéricos y el logro de márgenes libres de tumor. Cuando el cáncer de colon es localmente invasivo, es necesaria la resección de los órganos contiguos en aproximadamente un 10% de los casos. Los órganos más frecuentemente involucrados son la vejiga, el ovario, el uréter y la pared abdominal; los menos frecuentemente afectados son el intestino delgado, el bazo, el páncreas, el estómago y el útero. La cirugía de elección es la resección en bloque con márgenes libres en tejidos blandos. En los pacientes con enfermedad local avanzada, la irradiación prequirúrgica con 4500 cGy puede ser beneficiosa para aumentar la resecabilidad y obtener márgenes libres, sobre todo en pacientes con afectación pelviana. Otra opción que se puede encontrar durante la colectomía para la neoplasia de colon son las metástasis hepáticas. Si es aislada, se la puede extirpar mediante una resección en cuña con un margen. Si el número, las localizaciones y el tamaño de las masas hepáticas determinan una hepatectomía formal, generalmente se realiza con un intervalo de 6 a 12 semanas respecto a la intervención de colon.

El manejo del cáncer rectal se ha basado en la suposición de que el objetivo ideal del tratamiento para cualquier paciente con enfermedad neoplásica fuese la erradicación de la condición maligna, con la conservación del mayor grado de función anatómica y fisiológica posible. La elección del tratamiento se ha visto distorsionada por el hecho de que no existe un sistema de estadificación clínico exacto. Además, el recto está ubicado profundamente en la pelvis y está rodeado por la musculatura y las estructuras óseas pélvicas, lo cual dificulta el

acceso. El uso de altas dosis de tratamiento radiante de fuentes externas también ha sido limitado, porque es necesario atravesar tejido normal antes de que la radiación lesiva pueda afectar a las células malignas. Por otro lado, los factores importantes en la determinación del pronóstico y la selección del tratamiento del cáncer rectal tampoco han sido claramente definidos. Un detallado estudio de pacientes con cáncer rectal tratados en la Washington University, St. Louis, reveló que las variables importantes en la determinación del pronóstico eran el grado de fijación del cáncer, el compromiso de ganglios linfáticos pararrectales y el grado de diferenciación histológica. No se ha demostrado que el tamaño del tumor y la distancia desde la línea pectínea afecten la recurrencia o la supervivencia. Los cánceres que se cree que están invadiendo a través de la pared rectal o que muestran evidencias de una naturaleza histológica agresiva deben ser tratados quirúrgicamente, con conservación de la función esfinteriana anal, de ser posible, y con la consideración del empleo de radioterapia o quimioterapia adyuvante.

7.2 Tratamiento adyuvante para el cáncer de colon.- A partir de las estadísticas de supervivencia del cáncer de colon, está claro que la cirugía curativa por sí sola no es suficiente en individuos con un grado de recurrencia aumentado. La Conferencia para el Consenso del Tratamiento del Cáncer Colorrectal del Instituto Nacional de Salud sugirió que la clasificación de estadios patológicos es el determinante más importante del riesgo de la recurrencia y la supervivencia. Un cáncer de colon en estadio II con un CEA prequirúrgico elevado y un estadio III son indicaciones para la quimioterapia adyuvante. Los otros predictores como la ploidía y la fracción de fase S, no se usan como indicadores para este tratamiento. El cáncer de colon y el colorrectal son considerados de manera diferente con respecto al tratamiento adyuvante porque las causas del fracaso del tratamiento

son diferentes. El cáncer de colon tiende a recurrir en la cavidad peritoneal, en el hígado o en lugares distantes. El tratamiento adyuvante más común para el cáncer de colon es la quimioterapia. También se ha empleado la inmunoterapia, pero sólo de forma experimental.

El tratamiento adyuvante con 5-fluorouracilo (5-FU) y levamisol, ha demostrado ser efectivo en el cáncer de colon, en particular en el tipo Dukes C (Chang y Bland, 1998). A partir de los estudios existentes, en la actualidad parece razonable tratar a los pacientes con enfermedad en etapa III con una combinación de estos dos fármacos. Aún no se han observado beneficios claros en pacientes con enfermedad en etapa II, aunque existen múltiples estudios al respecto (Kodner y cols., 1995).

Se han estudiado otros tratamientos innovadores en pacientes con cáncer colorrectal, tales como la inmunoterapia adyuvante en su forma de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el tumor y vacunas tumorales autólogas, aunque aún no existen resultados claros.

La radiación adyuvante desempeña un papel más limitado en el tratamiento del cáncer colónico que en el del cáncer rectal. Según algunos estudios recientes la irradiación postoperatoria del lecho tumoral puede jugar algún papel en la disminución de las recurrencias intraabdominales. Otras indicaciones para la irradiación postquirúrgica pueden ser la obstrucción y la perforación (Chang y Bland, 1998).

La supervivencia total a los cinco años en el cáncer de recto no ha mejorado de 50% en muchas series. La mortalidad se debe a enfermedad metastásica distante o quizá, más importante, recurrencia de la enfermedad en la pelvis. Suele señalarse que esta última es entre 20 y 30%. Se ha aconsejado la radioterapia

adyuvante para controlar la diseminación del tumor a la periferia de los bordes de resección. Algunos autores prefieren aplicarla en el *postoperatorio* cuando hay alguna duda sobre lo adecuado de la resección del cáncer; otros eligen utilizar radioterapia *preoperatoria* para destruir el cáncer en la periferia antes de la disección quirúrgica, demostrando una frecuencia de recurrencia local muy baja y una supervivencia a los cinco años alta. Esta radioterapia preoperatoria origina muy pocas complicaciones, en tanto que se han descrito problemas importantes con la postoperatoria debidos fundamentalmente a la lesión del intestino delgado que se fija en la pelvis después de la intervención. La principal desventaja de la radiación preoperatoria es que se incluirán algunas lesiones favorables, que no requieren radioterapia adyuvante. Algunas instituciones han utilizado un término medio que denomina la técnica de "emparedado", en la que se administra en el preoperatorio un curso corto de radioterapia con una dosis postoperatoria adicional si la patología del cáncer es desfavorable; sin embargo no parece necesario el uso de esta técnica dado el riesgo bajo y los resultados buenos del régimen preoperatorio.

En el cáncer de recto, la conducta actual incluye el uso de quimioterapia adyuvante sistémica para mejorar la supervivencia a largo plazo al reducir la frecuencia de enfermedad metastásica distante. Informes recientes de la National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) sugieren que la leucovorina más 5-FU pueden ser ventajosos en ciertas situaciones, y un informe actual de múltiples instituciones sugiere una ventaja en la supervivencia a largo plazo y menos recurrencias locales por medio del uso del levamisol más fluorouracilo en los pacientes con lesiones C de Dukes. Existe un interés actual y pruebas importantes que demuestran que es posible lograr resultados incluso mejores mediante

combinaciones de radiación y quimioterapia sistémica adyuvantes (Kodner y cols., 1995).

OTROS TUMORES MALIGNOS DEL COLON

Además del adenocarcinoma, existen otros tumores malignos del colon bastante menos frecuentes como son el *carcinoide*, el *sarcoma* y el *linfoma*

El carcinoide se da con mayor frecuencia en apéndice y yeyuno-íleon, afectando al recto en el 18% de los casos y en pocas ocasiones al colon.

Los sarcomas de colon son muy raros y corresponden a menos del 0,1% de todos los tumores malignos colorrectales. Por otra parte, el linfoma primario del colon representa el 0,5% de los tumores malignos colónicos, localizándose el 70% de los casos en ciego (Chang y Bland, 1998).

Nuestro estudio se centra en el adenocarcinoma de colon, correspondiendo la línea celular empleada en nuestro estudio a este tipo histológico.

CÁNCER COLORRECTAL Y GASTRINA

Algunos autores han considerado como otro posible factor predisponente del carcinoma colorrectal la inhibición del ácido gástrico y su consecuencia hormonal: la hipergastrinemia.

A partir de los años cuarenta, la escuela de Lester Dragsted reintroduce la vagotomía troncular para el tratamiento de la úlcera gástrica, causando una alteración de la fisiología gástrica de consecuencias aún discutidas (Ritcher, 1994; Reina y cols., 1997). A partir de los años setenta, disminuyen las vagotomías, sustituidas progresivamente por los antagonistas de los receptores H₂ de la histamina en la célula parietal y, posteriormente, por los inhibidores de la bomba

de protones, a los que también se les acusa de producir hipergastrinemia como respuesta a la inhibición ácida. Cifras elevadas de gastrina en plasma también se pueden apreciar en casos de anemia perniciosa, gastritis atrófica o gastrinoma. Así es que si la hipergastrinemia predispusiera para el desarrollo de neoplasias colónicas, esto tendría profundas implicaciones en el manejo a largo plazo de pacientes con enfermedad péptica y en el screening, tratamiento y seguimiento de estos pacientes.

Existen observaciones que demuestran que la gastrina podría desempeñar un papel en el cáncer colorrectal. Aunque el aspecto principal en la bioactividad de la gastrina es su efecto secretorio ácido, su potente acción como agente trófico de la mucosa oxíntica gástrica está bien delineado (Mulholland y Debas, 1988). Además, se conoce desde hace años que la gastrina tiene un efecto trófico sobre la mucosa colónica y que también tiene un efecto mitógeno sobre las células cancerígenas de colon in vitro, así como sobre el crecimiento de tumores de colon en animales de experimentación. Además, estos efectos tróficos sobre el cáncer de colon en animales de experimentación pueden ser inhibidos mediante antagonistas de la gastrina como la proglumida, que actúa sobre receptores de gastrina (Bold y cols., 1996), receptores que también se ha demostrado que existen en los tumores colorrectales humanos (Upp y cols., 1989).

En estudios en animales utilizando antagonistas específicos y no específicos del receptor de gastrina, incluyendo proglumida, somatostatina, dibutiril guanosin monofosfato cíclico (cGMP), y suero antigastrínico, el crecimiento tumoral se ha retardado tanto in vivo como in vitro (Chicone y cols., 1989). Un aspecto interesante de esta inhibición tumoral es que ocurre (ambas, in vivo e in vitro) sin la administración gastrina, lo que sugiere una regulación autocrina del crecimiento

tumoral por gastrina (Hoosein y cols., 1990; Dy y cols., 1992). Todos estos estudios en animales se han completado y ampliado con trabajos realizados in vitro. Por ejemplo, las líneas celulares que responden a gastrina in vitro también crecen más rápidamente en animales con hipergastrinemia (Watson y cols., 1989; Imdahl y cols., 1989). Watson y colaboradores demostraron por xenografía que células cancerígenas humanas tenían respuesta a la gastrina en ratones sin pelo a los que se les administró gastrina respecto de otros a los que se trató con suero salino (Watson y cols., 1989). Los animales tratados con gastrina mostraban una duplicación del tamaño del tumor, además con una administración continua de gastrina presentaban un efecto más pronunciado que suministrándoles la misma dosis de forma dividida. Esta respuesta trófica fue inhibida utilizando distintos bloqueantes de los receptores de gastrina, tales como proglumida y benzotrip (Eggstein y cols., 1991; Imdahl y cols., 1989); otros grupos utilizaron análogos de la somatostatina (Dy y cols., 1992) obteniendo resultados similares. El mecanismo implicado se postula que es de naturaleza autocrina puesto que algunos tumores fueron inhibidos por estos agentes en ausencia de hipergastrinemia (Dy y cols., 1992). La exacta especificidad de tales compuestos es, sin embargo, una cuestión sin resolver. Además, en un animal sano, deben considerarse otra gran variedad de factores incluyendo el papel de los niveles basales de gastrina y los efectos de estos inhibidores en otros sistemas reguladores del crecimiento tumoral.

Pueden alcanzarse niveles elevados de gastrina en animales bien por administración exógena o procedimientos quirúrgicos que produzcan una exclusión antral del medio ácido del estómago. Karlin y colaboradores (1985) encontraron que la hipergastrinemia por sí misma no es carcinogénica en ratas.

Ellos proponen el papel de la gastrina como cocarcinógeno, haciendo al colon más susceptible al conocido carcinógeno dimetilhidracina. Otros investigadores, sin embargo, han demostrado que la administración exógena de gastrina, en dosis equivalentes, tiene un papel protector (Tatsuta y cols., 1983) o no tiene efecto (Tatsuta y cols., 1985) en carcinoma de colon en ratas inducido por nitrosaminas.

Estos resultados aparentemente dispares pueden explicarse simplemente por la respuesta individual de cada tumor a la gastrina. También es posible que la etiología de la hipergastrinemia sea importante para determinar la respuesta tumoral. Por ejemplo, el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de colon de ratón MC26 está acelerado por la administración exógena de gastrina tanto in vivo como in vitro (Winsett y cols., 1986). Sin embargo, en la hipergastrinemia inducida por omeprazol en ratones, no hay aumento del crecimiento de esta celular incluso con un incremento de hasta cinco veces de los niveles de gastrina en plasma (Graffner y cols., 1992).

La relación entre gastrina y neoplasias colónicas en humanos ha sido explorada de dos formas: primero, evaluando en los pacientes que se sabía que tenían hipergastrinemia el aumento en la incidencia de cáncer de colon, y segundo lugar comparando los niveles de gastrina en suero de individuos con cáncer de colon con sujetos sanos.

Los pacientes con hipergastrinemia incluyen aquellos con enfermedades como anemia perniciosa, otras formas de gastritis atróficas (Talley, 1989), y gastrinomas. Otros son individuos que han sufrido cirugía gástrica o vagotomía (Stern y Walsh, 1973), o aquellos que están recibiendo medicación inhibidora de la respuesta ácida (Richardson y cols., 1975). Los pacientes con anemia perniciosa y gastrinoma son los más útiles para este tipo de análisis, debido al alto porcentaje

que muestran una prolongada y mantenida hipergastrinemia (Talley, 1989). Sin embargo, los pacientes con cirugía gástrica han sido bien estudiados (Lundegardh y cols., 1990; Caygill y cols., 1987), los niveles de gastrina en estos pacientes son impredecibles y pueden variar desde la hiper a la hipogastrinemia dependiendo del tipo de cirugía (Stern y Walsh, 1973). En aquellos a los que se le ha practicado vagotomía troncular sin gastrectomía los niveles de gastrina están elevados durante varios años (Reina y cols., 1997). En dichos grupos no se ha evidenciado un incremento del cáncer de colon (Creutzfeldt y Lamberts, 1991).

Existen dos estudios de riesgo de cáncer en la anemia perniciosa (Talley y cols., 1989; Brinton y cols., 1989). El grupo de la Clínica Mayo (Talley y cols., 1989) estudió 150 pacientes con la enfermedad y hallaron en conjunto que no había un aumento del riesgo relativo de desarrollar cáncer de colon; encontraron una mayor incidencia en los primeros cinco años tras el diagnóstico de anemia perniciosa. En un estudio mucho más amplio del National Cancer Institute (Brinton y cols., 1989), más de 5000 pacientes fueron estudiados y no se detectó un incremento del riesgo de cáncer de colon. A la inversa, Elsborg y Mosbech no lograron identificar un aumento en la incidencia de anemia perniciosa entre pacientes que habían desarrollado cáncer de colon (Elsborg y Mosbech, 1979).

Sobhani y cols. (1993), evaluaron 23 pacientes con el síndrome de Zollinger-Ellison. Realizaron colonoscopias, determinaciones plasmáticas de gastrina y estudios cinéticos de células in vitro a todos los pacientes y controles. No se evidenció aumento de la incidencia de adenomas o carcinoma de colon; sin embargo, la proliferación celular en la mucosa colónica fue de un 23 a un 31% mayor en los pacientes con gastrinoma, midiéndolo mediante administración in vitro a biopsias de los especímenes de 5'-bromodeoxiuridina. Esta

hiperproliferación no estaba relacionada con los niveles de gastrina o la duración de la hipergastrinemia. Más aún, la distribución en conjunto de las células en las criptas permaneció normal, sin evidencia de replicación celular extendiéndose hacia la superficie (Sobhani y cols., 1993). Por otra parte, Biasco y colaboradores (1995) demostraron mediante biopsias rectales un mayor riesgo de cáncer colorrectal en seis pacientes con hipergastrinemia por síndrome de Zollinger-Ellison. Renga y colaboradores (1997) observaron que la hipergastrinemia endógena en pacientes con gastritis crónica autoinmune y síndrome de Zollinger-Ellison está asociada con defectos en la proliferación celular rectal, similares a los que se aprecian en condiciones de alto riesgo de cáncer de colon.

Estudios que evaluaron pacientes con neoplasia colónica han sido menos consistentes. Smith y colaboradores (1989 [I]) inicialmente describieron que los pacientes con adenoma o carcinoma de colon tenían niveles de gastrina basal en plasma significativamente mayores que un grupo control apareado con colonoscopia negativa, hipergastrinemia que se normalizaba por la resección del tumor. Otros estudios confirmaron estos resultados (Wong y cols., 1991; Seitz y cols., 1991; Charnley y cols., 1992). Wong y colaboradores (1991) describieron que los niveles de gastrina postprandiales, y no en ayuno, estaban elevados en pacientes con cáncer de colon y que los niveles se normalizaban tras la resección del tumor. La normalización postoperatoria de los niveles elevados de gastrina en ayuno se confirmó en otros dos estudios (Seitz y cols., 1991; Charnley y cols., 1992), aunque la concentración de gastrina en la vena mesentérica que drenaba el tumor no era mayor que la que había en venas periféricas (Charnley y cols., 1992).

Sin embargo, hay varias variables de confusión en estos estudios. Los niveles medios elevados de gastrina en suero fueron durante mucho tiempo atribuidos a

un pequeño número de pacientes en los grupos de tumor con gastrina sérica marcadamente elevada, mientras la mayoría de los pacientes con cáncer de colon tenían niveles normales de gastrina. En un estudio (Seitz y cols., 1991), el grupo control era aproximadamente 10 años más joven que el grupo con tumor. Una variable adicional escogida por Boland (1991) es que, si el tumor por sí mismo es el productor de gastrina y las muestras son extraídas tras lavado intestinal, puede resultar un nivel falsamente elevado. Parece ser que un grupo de pacientes pudiera tener tumores que produjeran bien gastrina o bien sustancias liberadoras de gastrina. Esto apoya aún más el concepto de un mecanismo autocrino o paracrino regulador del tumor relacionado con la hipergastrinemia. Además, se ha descrito la presencia de niveles detectables de precursores de la gastrina (Kochman y cols., 1992; Nemeth y cols., 1993) y ARNm de esta hormona (Van Solinge y cols., 1993) en células de cáncer de colon humano.

Otros estudios de pacientes con neoplasia colorrectal no han encontrado elevaciones de gastrina en suero (Creutzfeldt y Lamberts, 1991; Kikendall y cols., 1992). Según Penman y colaboradores, la gastrina sérica en pacientes con tumores de colon no se modifica, ni antes ni después de la cirugía (Penman y cols., 1994). En general, estos estudios han destacado casos con niveles inexplicablemente altos de gastrina; sin embargo, estos pacientes fueron uniformemente distribuidos entre todos los grupos, y no en el grupo con neoplasia sólo. Esta observación aumenta la posibilidad de sesgos de selección en los estudios previos o la existencia de alguna variable hasta ahora indefinida responsable de hipergastrinemia en un pequeño grupo de pacientes. La existencia de individuos con hipergastrinemia inexplicable o una exagerada respuesta hipergastrinémica a la terapia con inhibición ácida se conocía previamente. No existe explicación para

este fenómeno. Quizás una futura evaluación más detallada de esta hipergastrinemia en individuos con y sin neoplasia colónica podría aclarar mejor la etiología y las consecuencias de esta elevación.

En conclusión, existe una gran controversia a cerca de la relación entre hipergastrinemia y cáncer de colon. No hay una clara evidencia de que la hipergastrinemia endógena juegue un papel en la carcinogénesis colorrectal. En pacientes seleccionados con neoplasia colorrectal, la gastrina sérica elevada puede actuar como un regulador del crecimiento, pero el pequeño subgrupo de pacientes con riesgo específico aún no se ha definido claramente. Tampoco existe evidencia para apoyar la propuesta que la medida rutinaria de niveles de gastrina en individuos con bajos estados ácidos provean alguna información útil ni en la identificación del cáncer de colon ni en la predicción de su futuro desarrollo.

En los últimos años ha existido mucha polémica sobre un posible efecto cancerígeno de los fármacos inhibidores del ácido gástrico, cuando se administran de forma crónica, por su efecto elevador de la gastrina sérica (Biasco y cols., 1995), lo que resulta muy interesante, ya que parece demostrado que su efecto sobre la gastrina sérica es importante en los animales de experimentación y no sobre el humano, en el que no se han encontrado elevaciones importantes de la gastrina sérica en enfermos que toman crónicamente inhibidores del ácido gástrico.

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de receptores de gastrina en células tumorales de cáncer de colon y que su crecimiento puede estar estimulado por esta hormona y bloqueado por inhibidores específicos de los receptores de gastrina. Las implicaciones de esto en el tratamiento de la neoplasia, aunque puramente especulativas hasta ahora, se están barajando. Podría ser interesante la

medida rutinaria de receptores en el cáncer de colon e iniciar estudios de terapia hormonal en pacientes seleccionados apropiadamente. Incluso existe la posibilidad de identificar individuos con un incremento en el riesgo de padecer neoplasia colónica, pues los pacientes cuyos cánceres poseen receptores de gastrina tienen concentraciones similares de estos receptores en su mucosa colónica normal (Upp y cols., 1989). En lugar de un screening randomizado de pacientes con gastrina elevada, sin tener en cuenta la etiología, se podría tener un aprovechamiento del coste-beneficio más racional realizando biopsias rectales y un seguimiento estrecho de los pacientes con niveles elevados de receptores de gastrina.

Así, al inicio de 1996, el grupo de Townsend sugiere la posibilidad de una terapia hormonal del cáncer colorrectal al llegar a la conclusión tras varios estudios, de que la gastrina puede regular el crecimiento tumoral a través de receptores específicos de la membrana celular (Bold y cols., 1996). Con ello, proponen la posibilidad de utilizar hormonas inhibidoras y antagonistas específicos de la membrana celular para inhibir el crecimiento de estos tumores.

Últimamente, algunos investigadores han demostrado un papel importante de algunos intermediarios del procesamiento de progastrina en el crecimiento del cáncer de colon (Ciccotosto y cols., 1995). Incluso algunos laboratorios han demostrado experimentalmente que la gastrina-17 glicino terminal (G-Gly), tiene efectos biológicos y ejerce efectos mitógenos en células de cáncer de colon (Seva y cols., 1994; Singh y cols., 1994; Singh y cols., 1995), identificando incluso receptores en algunas líneas celulares de cáncer de colon que median el efecto estimulador del crecimiento de la G-Gly y distintos del receptor para la hormona madura (Singh y cols., 1995; Stepan y cols., 1996; Shulkes y Baldwin 1997;

Stepan y cols., 1999). Además, la G-Gly se encuentra en altas concentraciones durante el desarrollo de tumores intestinales. Todo esto permite sugerir un posible papel de estos péptidos intermedios en la diferenciación y el crecimiento intestinal.

GASTRINA

La existencia de una hormona producida en el antro gástrico denominada *gastrina* fue sugerida por primera vez por Edkins en el año 1905, al demostrarse que extractos crudos de mucosa procedentes de la región antral del estómago estimulaban la secreción ácida gástrica cuando eran administrados de forma intravenosa. El hallazgo de esta hormona no fue totalmente aceptado hasta que Komarok (1938) extrajo de la mucosa pilórica una sustancia proteica que ejercía un potente efecto secretagogo sobre las glándulas fúndicas. En 1964, Gregory y Tracy (1964) aislaron la gastrina "pura" de la mucosa antral y en ese mismo año se descubrió la secuencia de aminoácidos que formaban los dos péptidos gástricos aislados (gastrina I y gastrina II) e incluso uno de ellos, la gastrina I, pudo ser sintetizado (Anderson y cols., 1964). Las dos gastrinas aisladas por estos autores poseían un heptadecapéptido C-terminal idéntico y diferían únicamente por la presencia de un residuo de tirosina sulfatado en la gastrina II.

Pero si entre el pasado de la gastrina figura el hecho de ser el primer péptido gastrointestinal que se conoció íntegramente desde el punto de vista estructural, el presente y el futuro de esta hormona son mucho más inciertos. Con el perfeccionamiento del radioinmunoensayo (RIA) y con la localización del gen de gastrina se ha conseguido aislar esta hormona en tejidos tan variados como páncreas neonatal, neuronas vagales, células hipofisarias, células mucosas bronquiales e incluso espermatozoides humanos, aunque el significado biológico

que posee la presencia de gastrina en todos ellos, no está, ni mucho menos, claramente definido (Modlin y Tang, 1993).

Finalmente, debemos afirmar que la gastrina es la hormona gastrointestinal más familiar para el cirujano. Las acciones e influencias de esta hormona en determinados procesos patológicos han sido siempre un tema importante dentro de la patología quirúrgica. En este capítulo, esbozaremos algunos aspectos de la fisiología de la gastrina.

1. Síntesis y Procesamiento de la Gastrina.

El gen que codifica la gastrina ha sido aislado en el ADN humano. Está compuesto de 4100 pares de bases y determina la síntesis de un péptido de 101 aminoácidos, conocido como *preprogastrina* que constituye, como ocurre con otras hormonas gastrointestinales, un precursor del que, tras determinadas actuaciones enzimáticas, se liberará la secuencia peptídica biológicamente activa (Mulholland y Debas, 1988). La configuración de la preprogastrina se observa en la **figura 4**. En ella apreciamos como, de los 101 aminoácidos, 21 conforman el péptido principal, 33 aminoácidos el llamado péptido intermediario y los 34 siguientes conforman la molécula de la *gastrina-34* (G-34), también llamada "big-gastrin". Los 9 aminoácidos restantes configuran la extensión carboxi-terminal de la molécula de preprogastrina.

El péptido principal está constituido por una serie de aminoácidos hidrofóbicos que actúan facilitando el transporte - por el ARNm - de la preprogastrina al retículo endoplásmico (RE) de manera que, cuando se alcanza éste, el péptido principal se escinde y la molécula de preprogastrina queda transformada en *progastrina*.

La progastrina y otras proteínas secretoras son transportadas al aparato de Golgy, donde a menudo son sulfatadas en un residuo de tirosina (Tyr) por una tirosil-sulfotransferasa (Azuma y cols., 1987; Varro y Dockray, 1993). Este proceso, según algunos autores, confiere a la molécula de gastrina, no sólo un aumento en su actividad biológica sino también una mayor resistencia a la degradación (Modlin y Tang, 1993). Mientras que esta sulfatación es necesaria para la acción biológica de la colecistoquinina (CCK) sobre los receptores CCK-A localizados en la vía biliar y en el páncreas, el efecto sobre la secreción ácida de la gastrina en los receptores CCK-B no se ve influenciada por la presencia o ausencia de este residuo de tirosina sulfatado. En células neuroendocrinas bien diferenciadas, la progastrina es almacenada en el aparato de Golgy y en gránulos secretorios que contienen las enzimas necesarias para completar el procesamiento de progastrina (Dickinson, 1995).

En los gránulos secretores, una enzima convertasa corta las regiones amino- y carboxi-terminal obteniendo un residuo de arginina dibásica (Arg-Arg). Los aminoácidos básicos carboxy-terminales son entonces separados secuencialmente por una carboxipeptidasa H obteniendo *gastrina-34 glicino-terminal* (G34-Gly). Ésta, por acción de la peptidilglicina α -amidasa monooxigenasa (PAM), se transforma en G34-NH₂. Por acción de otra enzima convertasa, la G34-NH₂ es escindida a nivel del par lisina-lisina interno obteniendo el heptadecapéptido de gastrina amida, *gastrina17-NH₂* (Dickinson, 1995).

Estudios recientes, han demostrado que la mayoría de la gastrina-17 procede de esta conversión de G34- NH₂. Por otra parte, la G34-Gly también puede ser cortada a nivel de los residuos internos lisina-lisina por acción de una enzima convertasa y transformarse en *gastrina-17 glicino terminal* (G17-Gly) (Varro y

cols., 1995). Esta G17-Gly parece que no es afectada por la PAM, pudiendo tratarse de un producto final distinto en el procesamiento de progastrina en células G antrales.

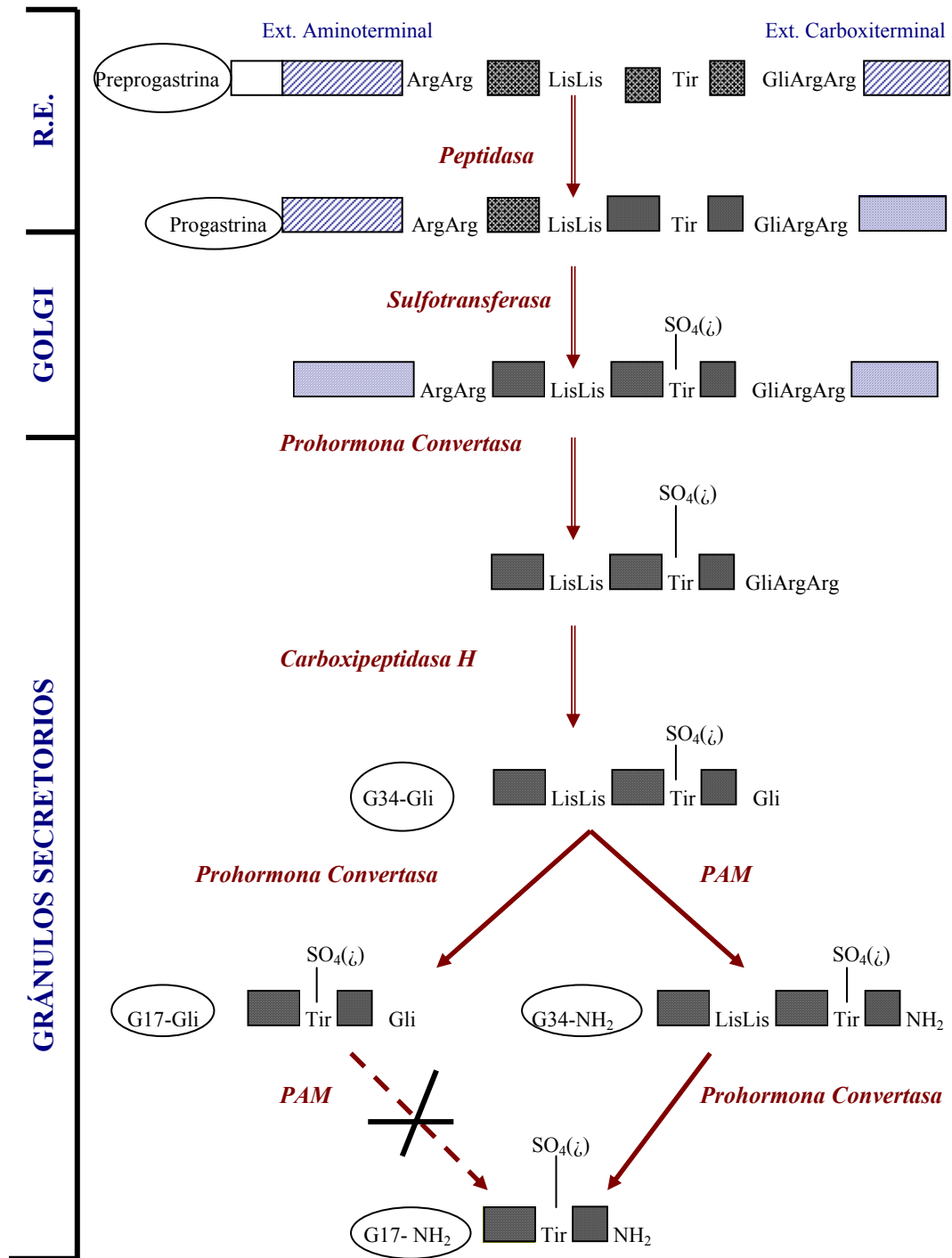


Figura 4: Pasos secuenciales en el procesamiento de la Preprogastrina.

En general, sólo las formas de gastrina G17- NH₂ y G17-Gly son producidas en las células neuroendocrinas. En cambio, la gastrina en células no endocrinas pobremente diferenciadas encontradas en cánceres de colon no sigue el procesamiento que tiene lugar en los gránulos secretores y es liberada en formas más grandes y no procesadas. La gastrina terminal usualmente se refiere a G17-NH₂, porque es la forma predominante de gastrina en el antro gástrico. Consecuentemente, la mayoría del suero antigastrina es específico para ésta, y no detecta las formas glicino-terminal u otras formas de gastrina no procesadas. Esto es de particular interés en el cáncer de colon, porque tejidos indiferenciados a menudo pierden la habilidad para completar el procesamiento de las prohormonas. Además, las células sin un mecanismo regulador de la secreción bien definido, como las de carcinoma de colon, no procesan la progastrina de forma eficaz por el mecanismo adecuado, y esto da lugar mayoritariamente a gastrinas no procesadas (Dickinson y cols., 1993).

En el antro, el heptadecapéptido de gastrina es la forma predominante (89%), mientras que en duodeno se aísla tanto G-34 como G-17 (43% para G-17 y 52% para G-34) (Lamers y cols., 1982). En sangre, la G-34 representa dos tercios del total de la gastrina circulante durante el estado basal, mientras que en el periodo postprandial este péptido supone algo menos de la mitad. Tanto en fase basal como estimulada, el resto de la gastrinemia viene determinada principalmente por la G-17 (Modlin Y Tang, 1993) (**figura 5**).

Existen además, otras formas de gastrina (G-14, G-6) que aunque determinadas químicamente, no han sido catalogadas desde el punto de vista fisiológico.



Figura 5: Composición de aminoácidos de la gastrina-17.

Se han aislado también moléculas "gigantes" de gastrina (big-big gastrins), pero la mayoría de ellas se consideran actualmente artefactos bioquímicos, careciendo pues de significación fisiológica importante (Mulholland y Debas, 1988). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que una de estas big-big gastrins, concretamente la G-71 (que es una gastrina tipo I), desempeña una actividad biológica completa, convirtiéndose así en la mayor molécula de gastrina con un papel fisiológico claramente establecido (Rehfeld y Johnsen, 1994).

Los péptidos gástricos son desactivados por la escisión del residuo fenilalanina C-terminal, proceso que al parecer es mediado por la encefalinasa (endopeptidasa neural ampliamente distribuida por todo el organismo) (Walsh, 1992). La vida media de la gastrina humana es de aproximadamente 6 minutos para la G-17 y de 18-30 minutos para la G-34.

Por otra parte, es importante recordar las semejanzas estructurales que la gastrina presenta con otros péptidos. Así, el pentapéptido C-terminal es idéntico al de la colecistoquinina (CCK) y al de la caeruleina (decapéptido presente en los anfibios). Algunos autores han sugerido que gastrina, CCK y caeruleina provienen de un péptido común, muy anterior en la escala evolutiva, que podría ser la *cionina* (neuropéptido aislado de la *Ciona intestinalis*) (Johnsen y Rehfeld, 1990).

2. Expresión de Gastrina.

Los genes de la mayoría de las hormonas intestinales están ampliamente expresados fuera del tracto digestivo, pero las prohormonas a menudo maduran en un tejido o célula de manera específica. Se han detectado péptidos de gastrina bioactivos precursores y/o ARNm de gastrina fuera de las células G-antroduodenales: en íleon distal, en colon fetal y páncreas, en pituitaria corticotropa y melanotropa. También hay hallazgos de expresión de gastrina en neuronas (hipotalámicas, pituitarias, cerebelares y vagales) y en cromosomas de células espermatozógenas humanas. Esto último puede tener interés en procesos de fertilización. Más recientemente, se han evidenciado componentes de la cascada de expresión genética de la gastrina en cánceres broncogénicos, pancreáticos, gástricos, colorrectales y ováricos. No está claro este efecto carcinogénico, pero es posible que la gastrina sea un factor de crecimiento de crucial importancia en un temprano estado hiperproliferativo del desarrollo del cáncer (Holst y cols., 1996).

3. Liberación de Gastrina.

La liberación de gastrina de las células G puede ser medida por elevaciones del AMPc, flujo de calcio o activación de la proteína-quinasa, por lo que en este proceso puede estar implicado el sistema de la adenilciclase o el de los fosfatidilinositoles (Campos y cols., 1990). La secreción de gastrina es controlada por una compleja interacción de factores estimulantes e inhibidores (Tabla III).

Además influyen otros factores como la *edad*, el *sexo* y los *ritmos circadianos*.

	<i>Estimulante</i>	<i>Inhibidor</i>
Luminal	<ul style="list-style-type: none"> ·Proteínas ·Aminoácidos ·pH alcalino ·Iones Ca 	·pH \angle 3
Neural	<ul style="list-style-type: none"> ·Reflejos vagales ·Bombesina / Péptido liberador de gastrina 	·Reflejos vagales
Paracrina	—	·Somatostatina
Endocrina	·Catecolaminas	<ul style="list-style-type: none"> ·Secretina ·Glucagón ·Péptido intestinal vasoactivo ·CCK

Tabla III: Regulación de la liberación de gastrina (Mulholland y Debas, 1988).

4. Acciones Biológicas de la Gastrina.

La gastrina tiene un amplio rango de acciones dentro del tracto gastrointestinal. El principal papel fisiológico de esta hormona radica en el estómago donde como sabemos, regula fundamentalmente la secreción de ácido y el crecimiento y proliferación de mucosa. La gastrina ejercerá además influencias a otros niveles del tracto gastrointestinal como serán esófago, páncreas, vesícula biliar y músculo liso entre otros.

a) Secreción de ácido.

La acción central de la “gastrina” es la estimulación de la secreción de ácido en el estómago y, de hecho, una fracción muy importante de la respuesta ácida del

estómago a la ingesta de alimentos es debida a esta hormona. En estudios realizados en ratas, basados en el empleo de anticuerpos monoclonales (anti-gastrina), se ha calculado que la gastrina es la responsable de al menos la mitad de la secreción ácida gástrica ocasionada por los alimentos (Goto y cols., 1986) y muchos autores le atribuyen hasta el 90% de esta respuesta (Chuang y cols., 1991).

El efecto principal de la gastrina sobre la secreción ácida gástrica se realizará tras la acción de esta hormona a dos niveles: sobre la célula parietal y sobre la célula enterocromafín-like (ECL) ya que ambos tipos celulares presentan los receptores de gastrina / CCK- tipo B (Cabero y cols., 1991; Chuang y cols., 1991; Wolfe, 1992; Modlin y Tang, 1993; Helander y Keeling, 1993). Esto está, aún en la actualidad, sometido a controversia dado que existen algunos autores (Sandvik y cols., 1991; Waldum y cols., 1991; Prinz y cols., 1993) que opinan que esta hormona actúa únicamente sobre las células ECL, las cuales liberan histamina que determina de forma indirecta, el potente efecto secretagogo realizado por la gastrina. Existen en realidad multitud de estudios que se encaminan en una u otra dirección. Así unos apuntan la existencia de una potenciación entre histamina y gastrina, fenómeno que, al no existir entre gastrina y acetilcolina, es interpretado como un efecto sumatorio de acciones directas –sobre células parietales- e indirectas –sobre células ECL- (Soll y Grossman, 1981). Abundando en esto, existen autores que propugnan que aunque la gastrina realiza un efecto directo sobre la célula parietal, requiere para ello de la presencia de histamina (Cabero y cols., 1991). Otros estudios, como el ya clásico realizado por Soll (1984), encuentran una elevada unión específica para la gastrina en preparaciones enriquecidas de células parietales e incluso existen algunos que, mediante otras

técnicas como el “cross-linking” o el uso de antagonistas (L365,260), caracterizan el receptor de gastrina en preparaciones de células parietales intactas (Matsumoto y cols., 1987; Roche y cols., 1991; Mantyh y cols., 1994). Determinados autores afirman no encontrar en algunas especies respuesta de las células parietales a la gastrina (Berglindh y cols., 1980) pero el mencionado estudio de Soll (1984) e incluso otros más antiguos demuestran de forma contundente, la existencia de esta respuesta. Se ha comprobado también la acción directa de la gastrina sobre las células oxínticas al observar que un 45% de la estimulación de la secreción ácida gástrica ocasionada tras administrar esa hormona, era debida a un incremento en la producción de Ca^{2+} dentro de estas células y sólo un 25% era debido a una acción dependiente de la histamina (Heldsinger y Vinik, 1984; Chew y cols., 1992). La existencia de una proliferación predominante de células ECL en situaciones de hipergastrinemia apunta a una actuación esencialmente centrada en este tipo celular (Tielemans y cols., 1994). Finalmente, apuntaremos que, aunque existen algunos trabajos que determinan una ausencia de actividad de los anti- H_2 ante hipergastrinemias muy marcadas (Zollinger-Ellison), hay otros que demuestran que dosis de cimetidina superiores a las utilizadas en clínica, sí son capaces de disminuir la secreción ácida gástrica en estas situaciones (Waldum, 1989).

La importante acción de la gastrina sobre las células ECL es un hecho que está hoy totalmente constatado. Para corroborarlo, a los estudios que demostraban que esta hormona producía en estas células un incremento en la actividad de la histidin descarboxilasa - enzima que convierte la histidina en histamina - y un incremento de la síntesis de ARNm (Chen y cols., 1994; Sandvick y cols. 1994) hay que

sumar otros más recientes, que demuestran que la gastrina ocasiona incluso, una estimulación del gen que codifica dicho enzima (Simon y cols., 1995).

Como resumen de todo lo expuesto hasta ahora podemos afirmar de manera rotunda que la opinión científica actual coincide en lo siguiente (Waldum y cols., 1991; Modlin y Tang, 1993; Belaiche y cols., 1993; Marvik y cols. 1994; Tari y cols., 1994; Sandvik y cols., 1994; Simon y cols., 1995; Hersey y Sachs, 1995):

- las acciones secretagogas ejercidas por la gastrina sobre la secreción ácida gástrica se fundamentan en una acción dual: *directa* –sobre la célula parietal- e *indirecta* –liberando histamina al interactuar con las células ECL-
- ambos tipos celulares poseen receptores para la gastrina
- la acción fundamental, la predominante, es la indirecta (es decir, la que ejerce sobre las células ECL).

La gastrina ejerce además un autocontrol de sus acciones biológicas. Para empezar, la acidificación luminal inhibe la liberación de la propia hormona. Posteriormente, este mecanismo de feed-back es completado por la propia gastrina, al interactuar de forma directa con las células D de la mucosa gástrica provocando la liberación de somatostatina (Schulkes y Read, 1991). Otro factor que regula la secreción de ácido inducida por la gastrina es la concentración de glucosa en la vena porta (Sakaguchi y cols., 1994).

La gastrina realiza otro tipo de acciones biológicas sobre la secreción gástrica. Parte de la estimulación ejercida sobre la secreción ácida gástrica puede ser debida a un aumento del flujo sanguíneo en la mucosa fúndica, acción que es atribuida por algunos autores (Gerber y Payne, 1992) a la secreción de histamina ocasionada por esta hormona, aunque otros estudios abogan por un papel mediador de las prostaglandinas en este proceso (Holm y Jagare, 1992).

b) Secreción de pepsinógeno, factor intrínseco y moco.

Además de la secreción de ácido, la gastrina estimula la secreción de pepsinógeno y la del factor intrínseco si bien, no se sabe si estos efectos son debidos a actuaciones directas o a los incrementos del flujo sanguíneo (Mulholland y Debas, 1988).

Recientemente, se ha demostrado que la gastrina ocasiona un aumento en la secreción de moco y que dicho efecto lo realiza de forma directa, al interactuar con receptores específicos (gastrina / CCK-B) (Ichikawa y cols., 1993).

c) Acciones tróficas.

La gastrina posee un claro efecto trófico sobre la mucosa oxíntica. Este efecto se ejerce sobre todas las células de la mucosa, pero con especial intensidad sobre las células parietales y sobre las células ECL siendo precisamente sobre estas últimas, donde la gastrina despliega su acción trófica de forma más efectiva.

El mecanismo íntimo mediante el cual la gastrina ocasiona la hiperplasia de las células de la mucosa gástrica no es conocido del todo. Se sabe no obstante, que las células de la mucosa oxíntica responden a esta hormona de una forma conocida como "pleiotípica", que implica una serie de fenómenos como son el aumento de la síntesis, tanto de ADN como de ARNm (Walsh, 1990).

Es de especial importancia destacar la gran sensibilidad de las células ECL a las situaciones de hipergastrinemia (Tielemans y cols., 1994). En estudios realizados en ratas, se ha comprobado que en situaciones de hipergastrinemia mantenida, estas células primeramente se hipertrofian y posteriormente se hiperplasian, alcanzando incluso un número de células cinco veces mayor que el que existe en condiciones normales. El crecimiento de las células ECL se produce por un aumento en el índice de replicación, que se detecta tan pronto como se

inicia la hipergastrinemia, alcanzando sus valores máximos dos semanas después. Posteriormente, el aumento en el índice de replicación de las células ECL sufre una paulatina regresión a partir de la 20ª semana, pudiendo incluso alcanzar valores normales (Hakanson y cols., 1992). En otras investigaciones, el mismo autor (Hakanson y cols., 1993) informó que la proliferación de las células ECL ascendió hasta la 3ª semana de hipergastrinemia para, a partir de ese momento, realizar una regresión paulatina hasta la semana 10ª, en la que se detectaban ya niveles de proliferación normales.

El mantenimiento de gastrinemias elevadas puede dar lugar a que, de una hiperplasia de las células ECL, pasemos a una *neoplasia* de las mismas. Este hecho, demostrado claramente en animales de experimentación, se hallaba confinado en humanos a pacientes afectados de gastritis atrófica severa o anemia perniciosa (Modlin y Nangia, 1992; Belaiche y cols., 1993). Sin embargo, se ha descubierto la existencia de estos cambios en enfermos sometidos a potentes tratamientos antisecretores, lo que ha ocasionado (Lamberts y cols., 1993). Al parecer, aunque la transformación neoplásica de las células ECL hiperplasiadas es un hecho frecuente en roedores, en humanos sólo se manifiesta con cierta significación en pacientes afectados de un gastrinoma en el contexto de un MEN tipo I (neoplasia endocrina múltiple) y que además, están tratados con farmacoterapia inhibidora, es decir en aquellos sujetos que, además de la hipergastrinemia, presentan una predisposición genética (Modlin y Nangia, 1992).

Se han realizado estudios usando cultivos de células ECL que demuestran que la acción trófica de la gastrina es ejercida a través de un receptor tipo CCK-B. Sin embargo, la afinidad de este receptor por la gastrina parece ser algo mayor que la del receptor que origina la liberación de histamina. Más aún, la respuesta trófica -

y no la liberación de histamina - es inhibida por la *genisteina*, un inhibidor de la tirosin-protein quinasa. Estos hallazgos podrían suponer, o bien la existencia de dos clases de receptores, o bien la presencia de un mismo receptor pero con diferentes afinidades (Hersey y Sachs, 1995). Otros trabajos apuntan también a una acción diferencial trófica/secretagoga de la gastrina. En ellos, se observa que el PD136,450 - potente antigastrínico - impide, a una determinada dosis, la proliferación de las células ECL, sin afectar a la secreción de ácido (Simon y cols., 1995).

La gastrina, según muchos autores, no posee en condiciones normales efectos tróficos sobre otros tejidos (intestino delgado, páncreas...) (Walsh, 1990). No obstante, sí se han encontrado receptores de gastrina en ciertas estirpes de tumores de colon (Bold y cols., 1994; Singh y cols., 1985; Singh y cols., 1987; Chicione y cols., 1989) y en células de mucosa colónica (Narayan y cols., 1992), por lo que se piensa que la gastrina pudiera poseer efectos tróficos sobre ellos. Estudios realizados en humanos han demostrado que la gastrina estimula el crecimiento del carcinoma de colon que posee la línea celular HT29, aunque no afecta a las líneas T84, HCT116 ni 3T3-L1 y que el tratamiento de los tumores sensibles con antagonistas de la gastrina (L365,260), puede inhibir el crecimiento de los mismos (Mauss y cols., 1994). De todas formas, no todos los autores están de acuerdo en este tema (Pinson y cols., 1995), existiendo opiniones muy diversas con respecto al mismo, por lo que son necesarias más investigaciones para llegar a una conclusión firme (Begos y Modlin, 1994).

Además de en el colon, también se ha informado de la posibilidad de que la gastrina estimule el crecimiento celular de tumores originados en otros órganos como páncreas (Smith y cols., 1994 [II]) o pulmón (Sethi y cols., 1993).

d) Otras acciones.

Estas acciones son extragástricas y se observan solamente cuando la hormona es administrada de forma exógena. Las implicaciones fisiológicas de estos efectos son dudosas, pero se ponen de manifiesto en situaciones de hipergastrinemia mantenida.

La gastrina estimula la contracción del músculo liso e incluso, a elevadas dosis, puede contraer el esfínter esofágico inferior o el antro gástrico. También estimula la secreción pancreática (tanto exo como endocrina) y la contracción de la vesícula biliar (Mulholland y Debas, 1988).

COLECISTOQUININA

La colecistoquinina (CCK) es una hormona estrechamente relacionada con la gastrina y su receptor. La historia de la CCK es bastante antigua. Alrededor del 1856 Claude Bernard en París, notó que el ácido hidrocloclorhídrico en el duodeno estimulaba el flujo de bilis. La respuesta persistía después de suprimir la inervación vagal y simpática. Sin embargo, no se tuvo evidencia de un control hormonal de la vesícula biliar hasta 1928. En este año, Ivy y Oldberg descubrieron que las grasas a nivel del intestino y especialmente en los primeros tramos del intestino delgado, estimulaban la liberación de una sustancia que producía la contracción de la vesícula biliar; esta sustancia fue denominada "colecistoquinina" (Ivy y Oldberg, 1928). Posteriormente, Harper y Raper (1943) postularon que una hormona liberada por la mucosa duodenal estimulaba la secreción del páncreas y la llamaron "pancreozimina". Se pensó que estas dos sustancias eran hormonas distintas hasta 1960, en que Jorpes y Mutt (1968) purificaron un péptido intestinal colecistocinético compuesto por 33 aminoácidos (CCK-33) y

demonstraron que también estimulaba la secreción del páncreas, por lo que se consideró como una única sustancia.

1. Estructura de la Colecistoquinina.

Se trata de un polipéptido de 33 aminoácidos (aa) sintetizado por las células "I" de las porciones más proximales del intestino delgado. También se encuentra en el sistema nervioso central (corteza cerebral y sistema límbico) y en el sistema nervioso periférico que inerva el intestino. Presenta una secuencia de 5aa, en el extremo carboxi-terminal (C-terminal) idéntica a la de la gastrina y un residuo tirosil-sulfato en posición 7 C-terminal cuya pérdida (de forma artificial) le reporta un patrón de actividad semejante a la misma. Precisamente, el fragmento mínimamente activo de la CCK es este heptapéptido C-terminal (Johnson, 1991) (**figura 6**). La biogénesis de la CCK implica complejas y variadas modificaciones de una molécula, llamada pro-CCK, lo que conlleva una heterogenicidad molecular, es decir, a la existencia, además de la CCK "clásica" de multitud de moléculas, conocidas como *péptidos-CCK*, todas ellas con el mismo heptapéptido activo y que pueden desempeñar papeles de neurotransmisores tanto a nivel central como periférico (Rehfeld, 1994). Así, en los tejidos productores de CCK se ha aislado una gran cantidad de péptidos-CCK (CCK-83, -58, -39, -33, -22 y -8) los cuales varían ampliamente según las especies. En el hombre, aunque en un principio se sugirió que la CCK-8 era la molécula más abundante en plasma (Walsh y cols., 1982), estudios más recientes abogan por el predominio de moléculas más grandes. Así Rehfeld (1994) reporta el CCK-33 como el péptido más abundante, seguido del CCK-8, CCK-22 y CCK-58 en orden decreciente. El CCK-8 es la forma molecular presente en mayor cantidad en las neuronas

(Hutchinson y cols., 1981) aunque curiosamente, también se encuentra muy aumentada en el suero de los pacientes con cirrosis (Gores y cols., 1986).

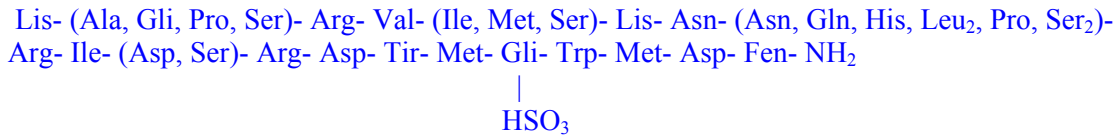


Figura 6: Composición de aminoácidos de la Colecistoquinina.

2. Expresión de la Colecistoquinina.

Como las restantes hormonas gastrointestinales, los péptidos-CCK se expresan ampliamente fuera del tracto digestivo. Un rasgo particular de la CCK es su importantísima expresión en el cerebro. Las regiones neocorticales del sistema nervioso central sintetizan más péptidos-CCK que el intestino. La CCK también se expresa en neuronas periféricas - particularmente abundantes en nervios de la zona distal del tracto digestivo. En mamíferos normales, los péptidos-CCK también se presentan en células endocrinas específicas de la pituitaria (coticotropas), de la glándula tiroides (células-C), y de la médula adrenal (Holst y cols., 1996).

3. Liberación de Colecistoquinina.

La liberación de la CCK por las células "I" es estimulada por la entrada de alimento (sobre todo ácidos y grasas) al intestino delgado. En esta estimulación, se han propuesto como mediadores, algunos péptidos secretados a la luz intestinal tales como el péptido regulador pancreático (PRP) o un posible péptido liberador

de CCK (Miyasaka y cols., 1989). Además de los factores luminales, algunos autores han apuntado un papel importante de péptidos como péptido liberador de gastrina (GRP) o bombesina como estimulantes de la liberación de CCK (Lundell y cols., 1987; Jansen y cols., 1990). En cuanto al papel del vago en la liberación de CCK, existen controversias en la literatura, aunque los estudios más recientes apuntan a que la estimulación vagal ejerce una influencia escasa o nula sobre los niveles basales o estimulados de CCK (Lundell y cols., 1987). Curiosamente, lo que sí se ha demostrado es un aumento de la "sensibilidad" a la CCK de alguno de sus tejidos diana (concretamente la vesícula biliar) tras la denervación vagal (Maschler y cols., 1990).

Por otra parte, la CCK está sujeta a un mecanismo de retroalimentación negativo activado principalmente por los ácidos biliares intraduodenales y en menor medida, por las enzimas pancreáticas. Esto ha sido demostrado por el dramático aumento de la CCK postprandial en plasma tras la administración de MK-329 (Schmidt y cols., 1991).

4. Acciones Biológicas de la Colecistoquinina.

Las acciones de las CCK son complejas y a varios niveles. Actúa tanto a nivel del sistema nervioso central como a nivel gastrointestinal, por lo que posee implicaciones en aspectos tan dispares como la sensación de saciedad, ansiedad, percepción del dolor, motilidad gastrointestinal y por supuesto, procesos secretorios gastrointestinales.

Para comprender las acciones de la CCK es necesario realizar una breve reseña sobre su modo más íntimo de actuación. Esta hormona interacciona con un receptor de membrana y a través de la proteína G realiza la estimulación de la fosfolipasa C (Williams y cols., 1993). Existen dos tipos de receptores para la

CCK: un receptor de *tipo A* (o alimentario) y un receptor *tipo B* (o cerebral), aunque ambos están presentes tanto en el sistema nervioso central como en el aparato gastrointestinal. Los dos receptores han sido diferenciados basándose en las diferentes afinidades por agonistas y antagonistas. El receptor tipo A presenta 1000 veces más afinidad por la CCK que por la gastrina, mientras que el tipo B es, según muchos autores, idéntico al receptor de gastrina (Pisegna y cols., 1992; Wank y cols., 1992; Lee y cols., 1993; Mantyh y cols., 1994). Según algunos estudios, el receptor CCK-A tiene alta afinidad el octapéptido sulfatado de colecistoquinina (CCK-8S), mientras que los ligandos específicos del receptor CCK-B son la gastrina, el tetrapéptido de colecistoquinina CCK-4 y el octapéptido CCK-8 (Moran y colaboradores, 1986; Ballaz y colaboradores, 1997). Ciertos antagonistas selectivos para uno u otro receptor también ayudan a diferenciarlos tanto estructural como funcionalmente; el receptor tipo A presentará un antagonista benzodiazepínico, el llamado MK-329 (o L-364,718) mientras que el tipo B / gastrina requiere como antagonista benzodiazepínico el L-365,260 (Chang y cols., 1986; Lotti y cols., 1989). Este tema se desarrollará más ampliamente en el capítulo dedicado a los receptores de gastrina / CCK.

La distribución de estos receptores en el tramo gastrointestinal es sumamente interesante a la hora de explicar las acciones de esta hormona y especialmente, para diferenciar los papeles de la CCK y gastrina en la secreción ácida gástrica. Estudios recientes realizados en perros por Mantyh y colaboradores (1994) reportan la existencia de receptores para la CCK a varios niveles del estómago y duodeno. Así los receptores de tipo A se expresaron en la mucosa cardial y en la zona basal de la mucosa fúndica, mientras que el receptor tipo B / gastrina se localizó en la región media y apical de la mucosa fúndica y en las capas

musculares y plexos mientéricos de región cardial, fundus y, en menor medida, de zona antropilórica (Mantyh y cols., 1994).

De acuerdo con esto, podemos afirmar que las acciones de la CCK en la fisiología gástrica se traducen en un efecto inhibitorio tanto de la secreción ácida gástrica (SAG) como de la liberación de gastrina y que este efecto, es mediado por los receptores CCK-A (Konturek y cols., 1993). Asimismo, la CCK ejercerá una acción estimuladora de la secreción de pepsinógeno, igualmente mediada por receptores de tipo A (Mantyh y cols., 1994). Partiendo de estas premisas podemos analizar de manera más detallada el papel de la CCK en la regulación de la SAG. El mecanismo de acción de esta hormona parece tener un carácter dual. Un componente de esta acción es *estimulador*, siendo de escasa potencia e implicando a los receptores tipo B. Sin embargo, "in vitro" este efecto, lejos de ser de escasa intensidad, es equipotente a la escasa estimulación ocasionada por la gastrina, ya que es debido a la activación del mismo receptor utilizado por ésta sobre la célula parietal y posiblemente, a la actuación de la CCK sobre un receptor del mismo tipo que se encuentra en las células ECL (Sandvik y cols., 1992). Por el contrario en condiciones "in vivo", el componente predominante de la actuación de la CCK es el *inhibitorio* y es mediado fundamentalmente, por receptores tipo A presentes en las células D, las cuales responderían secretando somatostatina, de conocidos efectos inhibitorios sobre la SAG. Este último extremo ha sido demostrado mediante la abolición casi completa del efecto inhibitorio de la infusión exógena de CCK tras la adicción de loxiglumida, antagonista A-selectivo (Konturek y cols., 1993; Konturek y cols., 1994), y también, por la caracterización de receptores A en las células D. No obstante también se han determinado receptores B / gastrina en las células productoras de

somatostatina, mediante los cuales la gastrina ejerce un mecanismo de autorregulación de sus propios efectos (Del Valle y cols., 1993).

Estos hallazgos son plenamente compatibles con la distribución de los receptores descrita anteriormente (Mantyh y cols., 1994). Así, la localización de los receptores tipo "A" en las zonas basales de la mucosa, se correlaciona perfectamente con el predominio de las células principales en esta misma zona. Igualmente, las células parietales u oxínticas se sitúan fundamentalmente, en los dos tercios medios y superiores de la mucosa, donde predominan los receptores tipo B (CCK / gastrina). Las células D, que se distribuyen en todo el espesor de la mucosa, explicarían el hallazgo de cierta cantidad de receptores "A" en regiones más apicales y las células ECL, localizadas en la parte baja, justificarían el pequeño componente de unión detectado para los receptores tipo B en las zonas más basales de la mucosa.

Otro aspecto sobre el que la CCK ejerce su influencia es el *vaciamiento gástrico*. Esta hormona es considerada hace tiempo como una *inhibidora o enlentecedora* del mismo, lo que han confirmado estudios posteriores (Konturek y cols., 1994). Este trabajo propugna que esta acción de la CCK probablemente sea debida a una estimulación directa de las contracciones pilóricas y a una supresión de la motilidad antroduodenal.

El efecto "princeps" de la CCK, es el que le da nombre: *el estímulo de la contracción de la vesícula biliar*. Otras acciones de la CCK son: la inducción de la secreción de enzimas pancreáticos, el aumento de la secreción de bicarbonato, el incremento del flujo de la arteria mesentérica superior, la estimulación de las glándulas de Brünner, el aumento de la motilidad intestinal y la modulación de las concentraciones plasmáticas de otras hormonas intestinales.

Parece que la colecistoquinina presenta *efectos tróficos* sobre algunas líneas celulares de tumores gastrointestinales (Smith y cols., 1991). El desarrollo de antagonistas de CCK muy específicos puede llevar a regular el crecimiento de ciertos tumores humanos que comúnmente expresan receptores de CCK; aunque hasta ahora ningún estudio ha demostrado un efecto útil (Geoghegan y Pappas; 1997).

Por su probada implicación en *la regulación de la saciedad*, ha despertado gran interés su aplicación en la regulación del comportamiento alimentario, aunque es preciso el estudio del sitio de acción de la CCK en la saciedad y el subtipo de receptor implicado.

Parece que la CCK también interviene en la *génesis de estados de pánico y ansiedad* a nivel del sistema nervioso central. Este campo puede generar otras posibles aplicaciones clínicas para los antagonistas de CCK (Geoghegan y Pappas; 1997).

RECEPTOR DE GASTRINA / COLECISTOQUININA

Un receptor es un elemento de la célula diana que, tras reconocer e interactuar con "su hormona", desencadena una serie de procesos que determinan modificaciones importantes del funcionamiento celular. El primer paso pues en esta interacción es la unión *reversible* de la hormona con su receptor, el cual, según cada caso, se situará en una u otra parte de la célula. El resultado final de esta cadena de eventos celulares será conocido como "respuesta o acción" hormonal (**figura 7**) (Gardner, 1979).

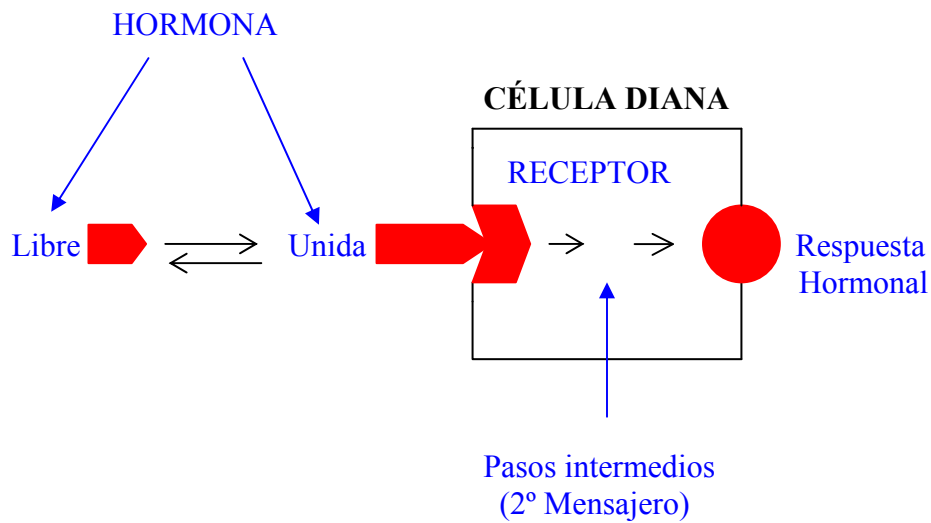


Figura 7: Interacción hormona-receptor (Gardner, 1979).

1. Caracterización del Receptor de Gastrina / Colecistoquinina.

a) Estructura biomolecular del receptor de gastrina.

La gastrina, la colecistoquinina (CCK) y los péptidos relacionados forman una familia de hormonas que presentan como rasgo común la existencia de un pentapéptido carboxiterminal idéntico en todas ellas, aunque la gastrina presenta sulfatación del 6º residuo de tirosina y la CCK del 7º (Chang y Lotti, 1986; Wank y cols., 1992). Fueron aisladas originalmente en el tracto gastrointestinal de mamíferos, y de los primeros péptidos descubiertos en el cerebro, donde la forma molecular predominante, el octapéptido de colecistoquinina (CCK-8), existe en

formas sulfatadas y desulfatadas (Rehfeld y cols., 1985). Basándose en la afinidad por diferentes antagonistas, se ha comprobado que este grupo de hormonas interactúa con dos tipos de receptores:

- *Un receptor llamado periférico, alimentario o tipo "A"* que se encuentra en páncreas, vesícula biliar y en algunos puntos del SNC y que presenta una afinidad 1000 veces mayor por la CCK que por la gastrina. En general, presenta una afinidad de 500 a 1000 veces mayor por los análogos sulfatados, sobre todo el octapéptido sulfatado de colecistoquinina (CCK-8s).

- *Un receptor llamado cerebral o tipo "B"* que se encuentra en cerebro, músculo liso y mucosa oxíntica. Este receptor posee afinidad fundamentalmente por gastrina, el tetrapéptido CCK-4 y el octapéptido CCK-8 (Innis y Snyder, 1980; Moran y cols., 1986; Chang y Lotti, 1986; Wank y cols., 1992; Ballaz y cols., 1997).

Pues bien, actualmente se considera que este último tipo de receptor (el tipo B) y el receptor de gastrina, causante de todas las importantes acciones de la misma, *son la misma estructura*. En definitiva, cuando en adelante nos referimos al receptor de gastrina debemos saber que al mismo tiempo, estamos hablando del receptor tipo B de la CCK (Kopin y cols., 1992; Lee y cols., 1993; Wolfe y Tseng, 1993; Miyake y cols., 1994; Wank y cols., 1994; Schmassmann y cols., 1994; Ito y cols., 1994).

El receptor de gastrina / CCK pertenece a la gran familia de receptores que se acoplan, de diferentes formas, a una proteína reguladora de la unión del nucleótido de guanina: proteína G (Wank y cols., 1992; Miyake y cols., 1994).

La estimulación del crecimiento y los efectos secretorios de la gastrina en el estómago parece que son mediados directamente por la interacción de esta

hormona con los sitios de unión específicos de alta afinidad presentes en las células de la mucosa fúndica (Johnson; 1982). Se han descrito receptores de gastrina de al menos dos o más tamaños moleculares, con un rango entre 30-200 kDa en la mucosa fúndica y en las membranas pancreáticas de varias especies de roedores y cerdos (Baldwin y cols., 1986; Ramani y cols., 1989), siendo la forma predominante la de 70-80 kDa. Se han determinado únicamente proteínas de unión de gastrina de 70-75 kDa en células parietales del estómago del perro (Matsumoto y cols., 1987). Este receptor, localizado en la membrana basolateral de la célula en la mucosa gástrica del perro, fue estudiado por Kopin y colaboradores (1992). Se trata de una *glicoproteína* de 76000 dalton de peso molecular (Pm). Su componente proteico, de 48518 dalton, presenta 453 aminoácidos muchos de los cuales - aunque no la secuencia amino-terminal - son comunes a la mencionada familia de receptores (Kopin y cols, 1992). Como muchos de los receptores de este grupo, el de gastrina presenta 7 segmentos hidrofóbicos, que corresponden a otros tantos puentes transmembrana y el último de ellos es, según algunos autores, el sitio de actuación de algunos inhibidores no-peptídicos como el L365,260 (Mantamadiotis y Baldwin, 1994).

La CCK demuestra una afinidad equivalente para proteínas de unión de gastrina (GBP) en células parietales (Soll y cols., 1984) y en células pancreáticas acinares (Chevner y cols., 1988). El CCK-A es un lugar de unión para CCK con mucha mayor afinidad que para gastrina, y se encuentra fundamentalmente en células pancreáticas acinares (Yu y cols.,1990). Por otra parte, las proteínas de unión de gastrina (GBP) en células de cáncer de colon demuestran poca afinidad por la CCK (Chicione y cols., 1989; Singh y cols., 1987 [I]), y algunos

antagonistas del receptor CCK representan sitios de unión que no corresponden a los receptores CCK-A ni CCK-B (Singh y cols., 1987 [I])

En estudios en ratas y perros con agonistas de los receptores CCK, como gastrina y CCK-8, y antagonistas de los mismos como L364,718 y L365,260, se han evidenciado receptores tanto CCK-A como CCK-B con distintos tipos de afinidad para CCK-8: alta, baja y muy baja afinidad. Parece que esta cualidad es una propiedad intrínseca de la molécula del receptor CCK (Huang y cols., 1994).

Otros estudios ponen en duda la existencia de una sola clase de receptores de gastrina. El cultivo de células ECL aisladas, ha demostrado que existe un receptor tipo CCK-B que presenta más afinidad por la gastrina que el receptor "clásico" implicado en la liberación de histamina. Este "nuevo" receptor, que al parecer está relacionado con acciones puramente tróficas, es bloqueado por una sustancia, la *genisteina*, que no posee efecto alguno sobre la liberación de histamina dependiente de la gastrina. Los autores sin embargo, dejan abierta la posibilidad de que se trate del mismo receptor pero con diferentes eventos intracelulares (Hersey y Sachs, 1995).

Además, se ha detectado un receptor CCK en células humanas de cáncer pancreático que está relacionado con las funciones tróficas, no apareciendo en células pancreáticas normales. Este receptor, que tiene un peso molecular de 40 kD, se ha denominado *CCK-C* ó *receptor de "cáncer"* debido a su relación con la neoplasia pancreática humana (Smith y cols., 1998).

Todo esto indica que las diferentes formas moleculares de las proteínas del receptor pueden estar presentes en diferentes células diana de la mucosa gastrointestinal. En líneas celulares de cáncer de colon (que posiblemente representan una población más homogénea de células diana que responden al

crecimiento), se ha demostrado únicamente la presencia de proteínas de unión de gastrina de aproximadamente 33-40 kDa (Chicione y cols., 1989), a pesar de la existencia de múltiples formas moleculares de estos receptores en tejidos diana normales. Estas células de mucosa colónica responden a los efectos de la gastrina sobre el crecimiento celular in vitro (Sirinek y cols., 1985). Narayan y colaboradores (1992) demostraron la existencia de un número significativo de lugares de alta afinidad ($K_d = < 1\text{nM}$) para la gastrina/péptidos CCK en membranas de mucosa colónica de cerdo, la mayoría de los cuales están presentes en una banda de aproximadamente 45 kDa. Es posible que estas proteínas de unión estén presentes en células que controlan la respuesta al crecimiento, mientras otras formas de este receptor se expresen en otras poblaciones celulares de la mucosa colónica. También encontraron bastantes receptores de baja afinidad ($K_d \cong 1\text{-}3\ \mu\text{M}$) para la unión de gastrina, denominándose estos receptores respectivamente Tipo I y Tipo II. Ambos son aparentemente específicos para la unión de péptidos tipo gastrina/CCK, pudiendo así explicar los efectos biológicos de estas hormonas en células de la mucosa colónica.

Imdahl y colaboradores (1995), investigaron una posible acción proliferativa autocrina de gastrina en carcinomas de colon, así como el receptor responsable de esta acción. Confirmaron la presencia de fragmentos de progastrina en carcinomas colorrectales, lo que se podría explicar por un posible efecto proliferativo autocrino de los mismos. Además, encontraron que la proteína de unión envuelta en esta actuación era más similar al receptor de baja afinidad gastrina/CCK-C que al gastrina/CCK-B. También Biagini y colaboradores (1997), estudiaron células de tejido colónico normal y tumoral

así como muestras de metástasis hepáticas encontrando que el ARNm de gastrina se expresaba en el 86'5% de los tumores investigados y que el receptor envuelto en esta hipotética acción proliferativa autocrina era probablemente el CCK-C, ya que su ARNm se expresaba tan frecuentemente como el de gastrina en estos tumores colónicos. Otros autores, han encontrado receptores para gastrina glicino terminal que median este efecto trófico en líneas celulares de cáncer de colon humano (L₀V₀ y HT-29), pudiendo ser los responsables del crecimiento en el cáncer de colon (Stepan y cols., 1999).

Por otra parte, el receptor de gastrina presenta similitudes estructurales con otros receptores lo que sin duda debe tener implicaciones fisiológicas importantes no aclaradas por el momento. Así, presenta un 35% de identidad con el receptor del neuropéptido YY, un 28% con el receptor D₄ de la dopamina, un 27% con el de serotonina y un 26% con el receptor β₂ humano (Kopin y cols., 1992).

b) Segundo mensajero del receptor de gastrina / CCK.

El segundo mensajero del receptor de gastrina es el Ca^{2+} intracelular (Roche y cols., 1991; Wilkes y cols, 1991; Kopin y cols., 1992; Miyake y cols., 1994).

Para la activación de la bomba de protones el receptor debe acoplarse a través de una proteína de unión localizada en la membrana (la proteína Gq) a la fosfolipasa C. La proteína G utilizará el GTP (guanósín trifosfato), al que está unido, para activar a dicha enzima impulsándose así el *sistema de los fosfatidilinositoles*, que consiste en obtener a partir de fosfolípidos de membrana (fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4 fosfato y fosfatidilinositol 4,5 difosfato - PIP₂ -) una serie de compuestos que producen un incremento el Ca^{2+} citoplásmico. Estas sustancias que son el diacilglicerol, el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y el

producto de fosforilación de este último, el inositol 1, 3, 4, 5 tetrafosfato (IP₄), se elevan inmediatamente después de la unión de la gastrina con la molécula del receptor (Roche y cols., 1991). El inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) obtenido difundirá desde la membrana plasmática (donde es liberado) al retículo endoplásmico rugoso (RER) donde activa una bomba de Ca²⁺ / K⁺ que provoca un flujo rápido de calcio desde el interior del RER al citoplasma, en el cual existe un receptor intracelular para este ion, la *calmodulina*, responsable de la activación de una fosforilasa (la *protein-kinasa C*) que ejercerá su acción sobre determinadas proteínas que finalmente, van a ocasionar la activación de la bomba de protones (Mulholland, 1988). En cuanto al otro compuesto liberado de la escisión de los fosfatidil-inositoles, el diacilglicerol, utilizará procesos enzimáticos diferentes para la liberación del calcio intracelular (Graaf, 1990) ejerciendo posiblemente una activación menos intensa pero más sostenida que la obtenida por el IP₃ (**figura 8**).

En el caso concreto de la célula ECL, la gastrina también produce un aumento bifásico del Ca²⁺ intracelular. Según algunos estudios, la última elevación del Ca²⁺ intracelular es la responsable de la liberación de histamina, aunque el mecanismo íntimo de este proceso es desconocido por el momento (Hersey y Sachs, 1995).

La comprobación experimental de diferentes afinidades por el mismo antagonista (YM022) entre receptores del cerebro y de la mucosa oxíntica se atribuye, por algunos autores, a diferencias intracelulares. Más concretamente, se han situado estas diferencias a nivel de la proteína G, identificando mediante el uso de toxina pertussi, tres tipos de proteína G: G₁ y G_o, que son sensibles a ella y G_q que no lo es (Miyake y cols., 1994).

En cuanto a la acción trófica de la gastrina, parece que estimula el crecimiento de células de cáncer de estómago a través de un mecanismo que requiere el incremento de los niveles intracelulares de calcio (Ishizuka y cols., 1992). Sin embargo, las vías específicas de traducción de la señal por las que la gastrina regula el crecimiento de células de cáncer de colon puede cambiar y podría ser importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en pacientes con cáncer de colon.

Ishizuka y colaboradores (1994), observaron que la gastrina-17 estimulaba la producción de AMPc en células de cáncer de colon humanas como las L₀V₀, COLO320 y HCT116 (presenta un efecto estimulador del crecimiento en las dos primeras e inhibidor en la última), mientras que provocaba la hidrólisis de fosfatidil-inositol y la movilización del calcio intracelulares en células HT-29. Concluyeron que la gastrina-17 parece regular el crecimiento de células de cáncer de colon humano a través de receptores ligados a vías de traducción de la señal que son específicas para cada tipo celular.

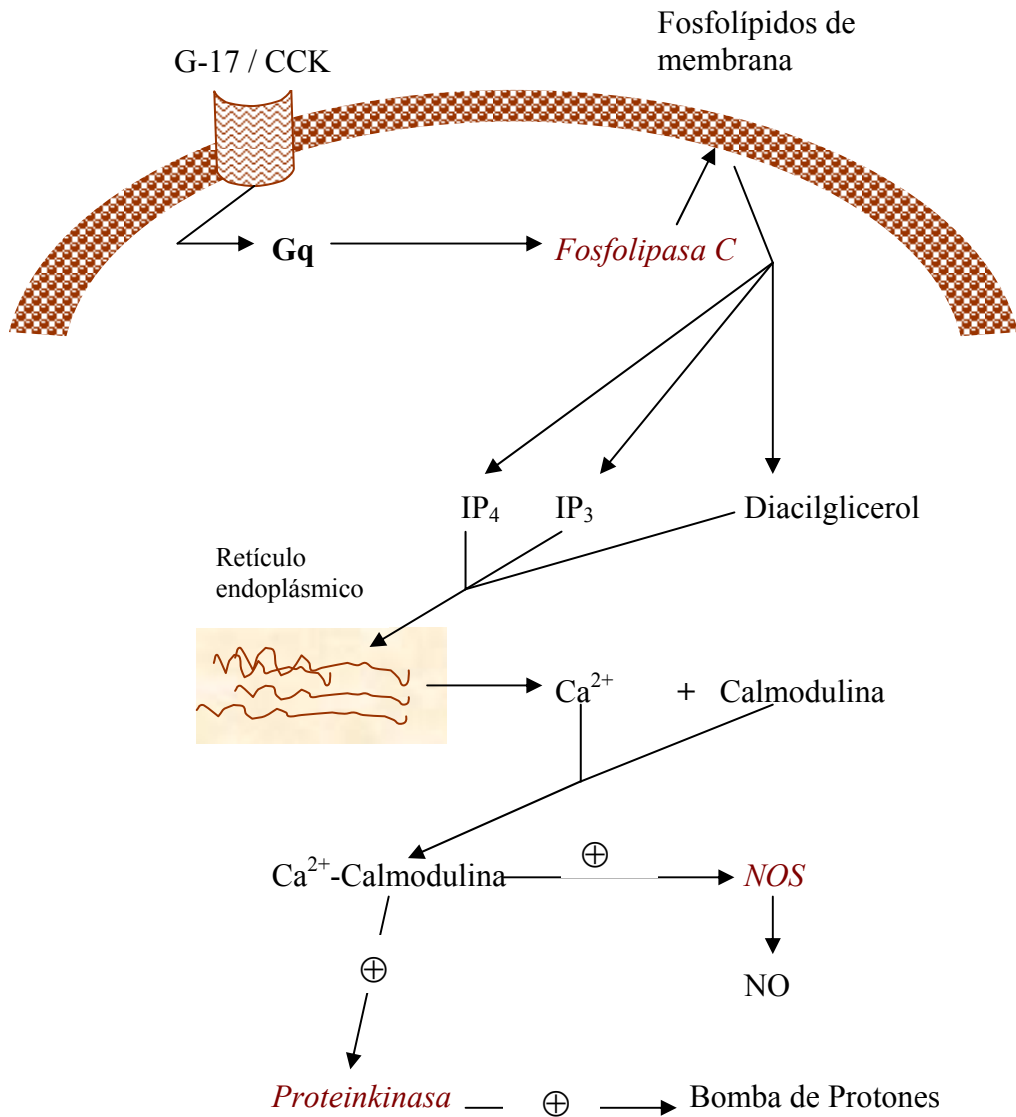


Figura 8: Segundos mensajeros del receptor de gastrina.

c) Genética del receptor de gastrina.

Se ha aislado el gen que codifica el receptor de gastrina humana (hGRg). Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 11, entre las bandas p 15.5 y 15.4, aunque algunos autores lo sitúan definitivamente en la 15.4 (Song y cols., 1994; Zimonjic y cols., 1994).

La principal importancia de este hallazgo es que, el lugar donde se encuentra el hGRg, es asiento de los más variados marcadores genéticos. Entre ellos se encuentra el loci de la neoplasia endocrina múltiple tipo I (MEN I), un gen relacionado con el tumor de Wilms y los genes que codifican algunos marcadores tumorales recientes, como el HRAS1 o el IGF2. Todo esto, junto al descubrimiento reciente de receptores CCK-B / gastrina en determinadas estirpes de cáncer de colon, páncreas o pulmón nos hace sospechar un importante, aunque desconocido, papel de la gastrina como factor trófico en el crecimiento tumoral.

d) Receptor de gastrina y cáncer.

A principios de los años 80 se atribuyó a la gastrina un papel trófico en el cáncer de colon (Winsett y cols., 1982). Posteriormente, se detectaron receptores de gastrina en líneas celulares cultivadas procedentes de cáncer de estómago, de colon y en menor medida, duodeno y páncreas (Singh y cols., 1995). A partir de aquí se han creado multitud de controversias en este sentido.

Respecto al *cáncer de colon*, Chicione y colaboradores (1989) estudiaron, como hemos señalado anteriormente, la presencia de receptores de gastrina en células de cáncer de colon humano y de ratón, encontrando que de las diferentes especies moleculares de estas proteínas presentes en las células de la mucosa fúndica normal, sólo se expresa una forma en células de cáncer de colon, siendo ésta más pequeña en masa molecular (aproximadamente 33-40 kDa) y mostrando una afinidad menor por la unión a CCK que a gastrina. Por otra parte, los dos tipos de sitios de unión (I y II) para gastrina/péptidos CCK descritos por Narayan y colaboradores (1992) en células de mucosa colónica, se han descrito también en líneas celulares de cáncer (Singh y cols., 1987 [II]; Weinstock y Baldwin, 1988) y células de cáncer de colon humano (Upp y cols., 1989).

Muchos estudios descritos en la literatura establecen que la gastrina estimula el crecimiento de algunas líneas celulares de cáncer de colon (Kusyk CJ y cols., 1986; Watson y cols., 1988; Smith y Solomon, 1988; Watson y cols., 1989; Guo y cols., 1990; Hossein y cols., 1990; Mauss y cols., 1994; Bold y cols., 1994). Este fenómeno puede indicar que algunas líneas celulares tengan sitios de unión específicos para gastrina, mientras otras no (Singh y cols., 1985; Mauss y cols., 1994). Así, Mauss y colaboradores (1994) encontraron que la gastrina-17 I puede estimular el crecimiento en la línea celular HT-29, que presenta sitios específicos de unión para este compuesto, mientras que otras líneas celulares que no los poseen no se afectaban. Así sus antagonistas, como L365,260, pueden ocasionar cierto efecto beneficioso. Sin embargo, la verdadera naturaleza de la relación existente entre la acción trófica de la gastrina y su posible efecto carcinogénico no está demasiado clara y se necesitan más estudios para establecer un planteamiento terapéutico correcto (Begos y Modlin, 1994). Como ya hemos señalado anteriormente, se está investigando en la actualidad, sobre los distintos receptores que pueden estar implicados en este efecto trófico de gastrina, colecistoquinina y péptidos intermedios como la gastrina glicino-terminal.

Además de en el cáncer de colon, se han identificado receptores de gastrina en otros tumores, como el de *páncreas* (Smith y cols., 1994; Smith y cols., 1998), *pulmón* (Sethi y cols., 1993; Behr y cols., 1999) y *cáncer medular de tiroides* (Behr y cols., 1999).

e) Antagonistas del receptor de gastrina/CCK.

La CCK, una hormona peptídica, es un regulador de la motilidad gastrointestinal y de la secreción exocrina del páncreas. La CCK está ampliamente distribuida en el cerebro y puede funcionar como un neurotransmisor o

neuromodulador en el sistema nervioso central (SNC). Las actividades biológicas de la CCK son compartidas por el octapéptido carboxiterminal CCK-26-33 (CCK-8), que parece ser la forma predominante de CCK en el SNC. Existe una gran variedad de antagonistas del receptor de gastrina/CCK que se agrupan, según su estructura química, en varias categorías:

- Derivados de nucleótidos cíclicos, como el dibutilil guanosina 3'-5' (Bt₂-cGMP).
- Secuencias parciales de la región C-terminal de CCK, como el carbobenzoxi-CCK (Cbz-CCK-27-32).
- Derivados del ácido glutarámico (proglumida, phenoxi-proglumida, etc.).
- Derivados del triptofano, como benzotript, carbobenzoxi-triptofano, etc.
- Derivados de fuentes microbiológicas, como la aspercilina.
- Derivados benzodiazepínicos (Makovek y cols., 1987).
- α -Metil-(R)-triptofano dipeptoides (Schmassmann y cols., 1994).
- Ureido-acetamidas (Bertrand y cols., 1994).
- Otros antagonistas.

· PROGLUMIDA (XILAMIDA o CR 242).

El [ácido (\pm)-4-(benzoilamino)-5-(dipropilamino)-5-oxopentanoico] (Palmer y Solomon, 1988), es un derivado del ácido glutarámico que tiene un peso molecular de 334 Kdalton y posee una estructura similar al extremo carboxi-terminal de la gastrina (Rovati, 1969; Rovati, 1976). La proglumida es un antagonista selectivo, aunque no demasiado potente, de los receptores de gastrina y colecistoquinina, que ejerce su acción de forma competitiva, aunque algunos

autores (Hahne y cols., 1980) reportan cierto comportamiento no competitivo. Su efecto antagónico lo ejerce, no sólo en la célula parietal, sino también a nivel de las células D, ECL y, fuera ya de la mucosa gástrica, a nivel de los acinis pancreáticos, músculo liso (gástrico e intestinal) e incluso sobre los receptores de gastrina localizados en las terminaciones nerviosas intramurales. La proglumida, a la que algunos estudios atribuyen cierto efecto citoprotector gástrico (Tariq y cols., 1987), es un fármaco seguro y libre de efectos adversos, aunque desgraciadamente, se muestra inefectivo para inhibir tanto la secreción basal como la estimulada por acetilcolina e histamina (Loewe y cols., 1985).

La utilización de la proglumida en clínica para el tratamiento de la úlcera péptica no ha dado buenos resultados. Más recientemente, se está investigando su uso como terapia coadyuvante en el tratamiento del cáncer gástrico y colorrectal, dado el comprobado efecto trófico ejercido por la gastrina en ambas neoplasias, (Beauchamp y cols., 1985; Singh y cols., 1987 [II]; Smith y cols., 1988; Harrison y cols., 1990); en cualquier caso, su potencia como antagonista de estos receptores es pequeña (Makovec y cols., 1987).

· LORGLUMIDA (CR 1409).

Los derivados del ácido 5-(dipentilamino)-5-oxo-pentanoico son una clase de antagonistas no peptídicos de colecistoquinina. El componente más potente, varios miles de veces más que proglumida, es la lorglumida [ácido D,L-4-(3,4-diclorobenzoilamino)-5-(dipentilamino)-5-oxo-pentanoico]. Es obtenida por síntesis orgánica, y tiene una estructura molecular simple, no-peptídica y no-nucleotídica. Tiene gran afinidad por los receptores pancreáticos (periféricos) de CCK, siendo ésta baja por los receptores centrales. Es un antagonista competitivo,

específico, reversible y potente para CCK-8 en varios modelos “in vitro” e “in vivo”; así, actúa en el músculo liso de la vía biliar y el ileon de cerdos guineanos y en la secreción de CCK inducida por amilasa de los acini pancreáticos. En vivo, lorglumida antagoniza la contracción provocada por CCK-8 o caeruleína de la vía biliar de cerdos guineanos y del perro. También anula los efectos de saciedad que provoca el CCK-8 en la rata y protege contra la pancreatitis inducida por caeruleína y dieta. Se trata, por tanto, de una herramienta farmacológica eficaz para estudiar las funciones de CCK. La forma farmacológicamente activa es el D-enantiómero, mientras que el L-enantiómero es prácticamente inactivo, aunque cabría esperar lo contrario al ser derivada de aminoácidos. Lo contrario ocurre con otro antagonista muy potente de CCK, el L364,718, un derivado benzodiazepínico en el que la forma activa es el L-enantiómero.

De gran importancia práctica es el hecho de que lorglumida sea biodisponible y farmacológicamente activa después de su administración oral. Esta propiedad permite desarrollar experimentos de larga duración sobre el efecto trófico de CCK sobre el páncreas o tumores dependientes de CCK.

Igualmente importante es su relativamente baja toxicidad, que permite considerar a esta sustancia como un agente terapéutico potencial cuando se sospeche que CCK es un factor patógeno, por ejemplo en desórdenes de la motilidad del tracto biliar, del píloro o del colon, cuando disminuye el apetito, en desórdenes de la secreción exocrina del páncreas, en tumores dependientes de CCK o que secretan CCK y en pancreatitis agudas y crónicas (Makovek y cols., 1987).

· BENZODIACEPINAS.

Estas sustancias son inhibidoras del receptor de gastrina y presentan una estructura no peptídica.

a) L365,260.

La 3- (acilamino)- benzodiazepina ó L365,260 es un derivado sintético de la *asperlicina* (fermento natural del *aspergillus*) obtenido cuando un grupo de investigadores experimentaba con antagonistas de la colecistoquinina (Chang y Lotti, 1986). Se trata del siguiente compuesto: 3R(+)-N-(2,3-dihidro-1-metil-2-oxo-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepina-3-yl)-N'-(3-metil-fenil)-urea (Meyer y cols., 1996). Es un antagonista del receptor CCK-B/gastrina que actúa de forma competitiva y que goza de gran potencia y afinidad. Esta sustancia presenta además, cierta acción sobre otros receptores como los adrenérgicos, dopaminérgicos, benzodiazepínicos e incluso por el tipo CCK-A. Por este último, exhibe una afinidad 1000 veces menor que su homólogo, el L364,718, por lo que ambas sustancias son la base experimental para la distinción entre los receptores A y B / gastrina de la colecistoquinina (Lotti y Chang, 1989; Roche y cols., 1991 [II]).

Una de las peculiaridades del L365,260 es que presenta una excelente absorción al ser administrado vía oral, alcanzando sus niveles máximos a los 60-100 minutos de ingerida la dosis. El fármaco posee una vida media de 8 a 10 horas y parece actuar directa y exclusivamente, pues no se detectan metabolitos activos (Murphy y cols., 1993).

El efecto del L365,260 sobre la mucosa oxíntica se ha comprobado tanto en animales de experimentación como en humanos. Así, estudios experimentales realizados en conejos informan de una potente acción de esta sustancia tanto

frente a las células parietales (ROCHE y cols., 1991 [I]), como sobre las células ECL y D (Roche y cols., 1991 [II]). Posteriormente se ha comprobado en ratas, que el L365,260 previene o disminuye la agresión de la mucosa gástrica ocasionada por la aspirina, el etanol y la cisteamina lo que es atribuido íntegramente a su efecto antisecretor ya que a diferencia de la proglumida, esta sustancia carece de efecto citoprotector alguno (Pendley y cols., 1993).

La administración de L365,260 en humanos supone una disminución clara de la *secreción ácida gástrica estimulada*, aunque no tiene efecto sobre la *secreción basal* lo que por otra parte, coincide con los primeros estudios (sobre ratas) realizados por Lotti y Chang (1989). La traducción de estas actuaciones en la clínica no es muy esperanzadora. De hecho, la dosis máxima de este antagonista (50 mg) es equivalente a 5 mg de famotidina lo que supone una efectividad muy modesta (Murphy y cols., 1993).

Pero el L365,260 presenta otra posible aplicación clínica ya que, al igual que la proglumida, puede representar un tratamiento adyuvante para aquellas neoplasias que expresan receptores de gastrina (GR[+]). En este sentido, existen estudios que confirman que este fármaco detiene la proliferación de determinadas estirpes tumorales, sobre todo a nivel del colon (Mauss y cols., 1994).

Finalmente, y dada la reciente implicación de la gastrina / CCK-B en el desarrollo de determinadas neurosis, esta sustancia está siendo utilizada en el tratamiento de trastornos relacionados con la ansiedad y el pánico.

b) L364,718 ó Devazepide ó MK-329.

El 3S(-)-N-(2,3-dihidro-1-metilo-2-oxo-5-fenilo-1H-1,4-benzodiazepina-3-ilo) -1H-indole-2-carboxamida (Chany y Lotti, 1986; Meyer y cols., 1996) es también, un derivado sintético de la *asperlicina*.

La asperlicina es un producto natural aislado del hongo *Aspergillus alliaceus* (Goëtz y cols., 1985). Desde un punto de vista químico, esta droga integra tres diferentes sistemas heterocíclicos: una benzodiazepina, una quinazolinona y un anillo indol. La simplificación de la estructura de esta compleja molécula conduce hacia dos direcciones principales en la investigación de antagonistas de CCK. La primera deriva del anillo benzodiazepínico y obtenemos antagonistas del receptor CCK-B como L365,260, y un selectivo y muy potente antagonista del receptor CCK-A (Evans y cols., 1987) como el devazepide. La segunda dirección se basa en la estructura con núcleo heterocíclico de quinazolinona (Yu y cols., 1991), lo que nos proporciona potentes antagonistas del receptor CCK-B (Yu y cols., 1992).

El devazepide es un antagonista de los receptores periféricos de CCK extremadamente potente, competitivo y específico. Chang y Lotti (1986) demostraron que interactúa de forma competitiva con los receptores de colecistoquinina pancreáticos de la rata y que su afinidad por los receptores de CCK tanto pancreáticos como de la vía biliar excede a otros antagonistas no-peptídicos de CCK, siendo ésta similar a la de la propia hormona. “In vitro”, estudios funcionales que utilizan CCK para provocar contracciones en colon e ileon de cerdos guineanos, demuestran que el L364,718 actúa como un antagonista competitivo de CCK. Además en estos estudios se demuestra que L364,718 presenta una gran selectividad por receptores periféricos de CCK en comparación con receptores cerebrales, receptores de gastrina y otros receptores peptídicos y no-peptídicos. “In vivo”, dosis bajas de devazepide antagonizan marcadamente la contracción de la vía biliar en el cerdo guineano. Administrado oralmente, tiene gran efectividad como antagonista en la inhibición del vaciado gástrico provocado por gastrina en ratones. Las propiedades farmacológicas y

bioquímicas de esta sustancia, su biodisponibilidad oral y su larga duración de acción hacen de ella una poderosa herramienta para la investigación de las acciones fisiológicas y farmacológicas de CCK, y de su posible papel en desórdenes gastrointestinales (Chang y Lotti, 1986). Seva y cols. (1990) encontraron que se trataba de un potente antagonista del receptor pancreático CCK³, con la misma afinidad que el péptido sintético CCKg. Se usa a concentraciones micromolares.

c) YM022.

{(R)-1-[2,3-dihydro-1-(2'-methylphenacyl)-2-oxo-5-phenyl-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]-3-(3-methylphenyl)urea} es un nuevo antagonista sintetizado por Nishida y cols. (1994 [I]) que goza de propiedades farmacológicas similares al L365,260 aunque entre ambos, existen algunas diferencias de interés. La más importante es que el L365,260, debido a su centro asimétrico, presenta configuraciones S o R, mientras que el YM022 posee únicamente una *configuración R* lo que al parecer, aumenta la afinidad y potencia de este último ya que según estudios más recientes, el receptor de gastrina presenta una gran preferencia estereoquímica por las formas isométricas R (Nishida y cols., 1994 [I]).

Esta benzodiazepina, ejerce sobre el receptor CCK-B / gastrina una inhibición de tipo competitivo, con una afinidad dos veces mayor que la del L365,260 y, a excepción del CCK-A (por el que presenta una afinidad 930 veces menor que por el B), no interacciona con otro tipo de receptores, lo que le confiere una *selectividad* muy importante.

En definitiva, el YM022 realiza un bloqueo del receptor de gastrina tanto a nivel de la célula parietal como de la célula ECL, lo que en la práctica se traduce

en una gran inhibición, tanto de la secreción ácida gástrica basal como de la estimulada por la pentagastrina (542 veces mayor que la obtenida tras la administración de L365,260).

En estudios realizados en ratas, se ha demostrado que la administración oral de YM022 inhibe las lesiones de la mucosa gastroduodenal inducidas de forma experimental, con una potencia comparable a la famotidina. Este efecto lo realiza mediante su acción *antisecretora* y en menor medida, a través de un efecto *citoprotector* posiblemente mediado por las prostaglandinas. Una ventaja adicional del YM022 es que a diferencia de otras drogas antisecretoras, protege a los pacientes sometidos a tratamientos largos, de los efectos tróficos indeseables ocasionados por una hipergastrinemia mantenida (Nishida y cols., 1994 [II]).

En cualquier caso, el papel de este fármaco en la clínica, bien sea en el tratamiento de la úlcera péptica o en la terapia adyuvante de procesos tumorales GR[+], está aún por demostrar.

· DIPEPTOIDES.

Esta familia agrupa a una serie de *antagonistas no peptídicos* del receptor de gastrina que contienen una molécula del grupo α -metil-(R)- triptófano. Todos realizan sobre este receptor una inhibición de tipo competitivo, con una potencia variable según el compuesto en cuestión (Schmassmann y cols., 1994).

Los dipeptoides constituyen un numeroso grupo de sustancias que, como las benzodiazepinas, presentan una excelente absorción por vía oral. Entre ellas se encuentra el **CAM-1279**, el **PD 135-308** (o **CI988**), el **PD 135-667**, el **PD 135-158** (o **CAM-1028**) y el más recientemente descubierto, **PD 136-450.**, que es considerado por algunos autores, como el antagonista CCK-B / gastrina más potente de todos los conocidos hasta el momento (Blevins y cols., 1994). Estos

compuestos gozan “in vivo” de un marcado efecto inhibitor de la secreción ácida estimulada y en concreto el PD 135-450, ejerce su antagonismo hasta el punto de impedir la proliferación de células ECL en situaciones de hipergastrinemia mantenida (Schmassmann y cols., 1994).

Sin embargo, además de los efectos antagónicos sobre el receptor de gastrina, estas sustancias poseen un curioso efecto *agonista* CCK-A, que se traduce en una estimulación de la secreción pancreática al ser administrada vía oral (Höcker y cols., 1993; Blevins y cols., 1994; Schmassmann y cols., 1994). Pero, no acaba aquí la vertiente agonista de los dipeptoides, ya que estudios más recientes demostraron que el PD 136-450, no sólo ejerce un potente efecto inhibitor de la secreción ácida gástrica estimulada, sino que posee además, una tenue acción *estimuladora* de la secreción ácida basal que se realiza por un *agonismo parcial* sobre los receptores CCK-B / gastrina (Schmassmann y cols., 1994).

La fórmula química del PD 135158 es 4-{[2-[[3-(1H-indol-3-yl)-2-methyl-1-oxo-2[[[1.7.7.-trimethyl-bicyclo[2.2.2]hept-2-yl-oxy]carbonyl]amino]propyl]amino]-1-phenylethyl]amino-4-oxo-[1S-1a.2β[S*(S*)]4a]}butanoate N-methyl-D-glucamine; bicyclo system 1S-endo. Es un antagonista del receptor CCK-B/gastrina, ejerciendo una acción ansiolítica en ratas y ratones por inhibición específica de la unión de CCK al receptor cerebral CCK-B. Muestra también cierta acción como agonista del receptor pancreático CCK-A en ratas (Höcker y cols., 1993).

Al igual que los anteriores antagonistas, la aplicación clínica de los dipeptoides en los padecimientos pépticos o cancerosos no está aún claramente establecida. Por otra parte, estos fármacos están siendo utilizados dentro del

ámbito neuropsiquiátrico, concretamente en trastornos relacionados con la ansiedad, el pánico, la percepción del dolor y la saciedad.

· UREIDOACETAMIDAS.

Se trata de una serie de inhibidores no peptídicos, que contienen los grupos acetil-amida y ureido en su molécula. En esta familia se agrupan los antagonistas CCK-B / gastrina de más reciente adquisición, entre los que destacamos tres fundamentalmente - en orden de potencia - : **RP-72540**, **RP-69758** y **RP-71483** (Bertrand y cols., 1994).

Provocan una inhibición de tipo competitivo, de potencia comparable al PD 135-308 y ocasionan disminuciones apreciables de la secreción ácida gástrica estimulada. Poseen cierto grado de afinidad por el receptor tipo A (sobre todo el RP-69758) pero no actúan sobre ningún otro receptor, lo que les confiere una selectividad aceptable.

La característica fundamental de las ureidoacetamidas es que, en relación a los anteriores, presentan una mayor afinidad para atravesar la barrera hematoencefálica por lo que son muy útiles para distinguir funcionalmente los receptores CCK-B “cerebrales” de los periféricos (Bertrand y cols., 1994).

· OTROS ANTAGONISTAS CCK.

Incluimos aquí a determinados compuestos, como el **DBcGMP** (dibutiril guanosina 3'-5' monofosfato) y el *benzotrip*, que son antagonistas CCK-B/ gastrina, pero de tan escasa potencia y selectividad, que no son usados como tales.

Existe también una familia de sustancias, las *difenilpirazolidinonas*, a las que se les ha atribuido efectos antagonistas frente al receptor CCK-B, pero se han estudiado principalmente por sus efectos en el SNC (Rasmussen y cols., 1993).

MELATONINA

1. Fisiología y Farmacología.

En humanos la glándula pineal se encuentra situada en el centro del cerebro, detrás del tercer ventrículo. Esta glándula contiene dos tipos de células: *pinealocitos*, que predominan y producen indolaminas (sobre todo melatonina) y péptidos (como arginina, vasotocina), y *células de neuroglia*. Además, la glándula está muy vascularizada.

La melatonina, ó N-acetil-5-metoxitriptamina, fue identificada en principio en extractos pineales bovinos por su habilidad para agregar gránulos de melanina y por abrillantar el color de la piel de la rana (Lerner y cols., 1958). En la biosíntesis de la melatonina, el triptofano es primero convertido por la triptofán hidroxilasa en 5-hidroxitriptofano, que es decarboxilado a serotonina. La síntesis de melatonina desde serotonina es catalizada por dos enzimas (arylalkylamina N-acetiltransferasa e hidroxindol-O-metiltransferasa) que están confinadas en la glándula pineal (Axelrod y cols., 1960; Coon y cols., 1995).

La glándula pineal de los mamíferos es un transductor neuroendocrino. La información fotógena desde la retina es transmitida a la glándula pineal a través del núcleo supraquiasmático del hipotálamo del sistema nervioso simpático. A la glándula entra norepinefrina, y sale melatonina. La síntesis y liberación de melatonina es estimulada por la oscuridad e inhibida por la luz. Durante las horas de luz, las células fotorreceptoras de la retina son hiperpolarizadas, lo que inhibe la liberación de norepinefrina. El sistema retinohipotalámico-pineal es quiescente, y se secreta un poco de melatonina. Con el comienzo de la oscuridad, los fotorreceptores liberan norepinefrina, activándose el sistema, y aumentando el número de receptores α_1 - y β_1 - adrenérgicos. La actividad de la arylalkylamina N-

acetiltransferasa, la enzima que regula la velocidad de síntesis de melatonina, es incrementada, iniciando la síntesis y liberación de melatonina.

Como la síntesis de melatonina se incrementa, la hormona entra en el torrente sanguíneo a través de difusión pasiva. En humanos, la secreción de melatonina se incrementa poco después del comienzo de la oscuridad, alcanza un pico en la mitad de la noche (entre las 2 y las 4 a.m.), y gradualmente cae durante la segunda mitad de la noche. Las concentraciones séricas de melatonina varían considerablemente dependiendo de la edad. Los niños menores de 3 meses secretan muy poca melatonina. La secreción de melatonina aumenta y se hace circadiano en niños mayores, y los picos nocturnos son mayores desde el primer al tercer año, después va disminuyendo gradualmente. En adultos jóvenes normales, el promedio diario y los picos nocturnos son 10 y 60 pg por mililitro respectivamente.

La melatonina es rápidamente metabolizada, principalmente en el hígado, por hidroxilación (a 6-hidroximelatonina) y después de conjugarla con ácido sulfúrico o glucurónico, es excretada en la orina. La excreción urinaria de 6-hidroximelatonina depende de las concentraciones séricas de melatonina. La biodisponibilidad de la melatonina administrada oralmente es variable. Dosis relativamente bajas (entre 1-5 mg), que están ahora disponibles en tiendas en EEUU, dan lugar a concentraciones séricas que son 10 a 100 veces mayores que los picos nocturnos habituales a la hora aproximadamente de la ingestión, seguido de un declive en los valores basales en cuatro u ocho horas. Dosis muy bajas (entre 0.1 a 0.3 mg) administradas durante el día dan lugar a un pico sérico que está dentro del rango nocturno normal.

No se han encontrado efectos secundarios o riesgos asociados a la ingestión de melatonina. Los efectos fisiológicos dosis-dependientes de la hormona, sin embargo (por ejemplo, hipotermia, falta de sueño, disminución de la alerta, y posibles efectos reproductivos), no han sido aún adecuadamente evaluados en gente que toma dosis altas por periodos prolongados de tiempo. A pesar de la ausencia de una marcada acción endocrina, se ha observado una disminución en suero de la concentración de hormona luteinizante y un incremento de concentraciones séricas de prolactina tras la administración de dosis farmacológicas de melatonina en sujetos normales (Brzezinski, 1997).

2. Mecanismos de acción.

2.1 Receptores.

Se han identificado en mamíferos dos sitios de unión de la melatonina a la membrana celular pertenecientes a grupos distintos farmacológicamente y cinéticamente. *ML1* (alta afinidad [picomolar]) y *ML2* (baja afinidad [nanomolar]) (Morgan y cols., 1994; Dubocovich, 1995). La activación de receptores *ML1* de melatonina, que pertenece a la familia de proteínas de unión guanosino trifosfato (receptores acoplados a la proteína G) (Ebisawa y cols., 1994), resulta de la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa en células diana. Estos receptores están envueltos probablemente en la regulación de la función retinal, ritmos circadianos, y reproducción. Los receptores *ML2* están acoplados a la estimulación de hidrólisis fosfoinositídica, pero su distribución no se ha determinado aún. Con el uso de la reacción en cadena polimerasa (PCR), se han clonado de varios mamíferos (incluyendo humanos), dos formas de receptor de

melatonina de alta afinidad, que han sido designadas Mel 1a y Mel 1b. El receptor Mel 1a se expresa en la “pars tuberalis” y el núcleo supraquiasmático (los supuestos sitios de las acciones reproductiva y circadiana de la melatonina, respectivamente). El receptor Mel 1b de la melatonina se expresa fundamentalmente en la retina y, en menor extensión, en el cerebro.

La melatonina también puede actuar intracelularmente. A través de la unión a la calmodulina citosólica, la hormona puede influir directamente en la señal de calcio al interactuar con enzimas diana como la adenilato ciclasa y fosfodiesterasa, así como con proteínas estructurales. Es una molécula lipofílica que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y su acumulación nuclear así como lugares de unión en el núcleo fueron descritos antes del descubrimiento de los receptores RZR/ROR (Acuña Castroviejo y cols., 1993, 1994; Menendez-Pelaez y Reiter 1993; Menendez-Pelaez y cols., 1993). Los receptores RZR/ROR fueron clonados de forma independiente por dos grupos diferentes (Becker-Andre y cols., 1993; Giguere y cols., 1994), recibiendo dos nombres: receptor Z de retinoides (RZR) y receptor del ácido retinoico relacionado con los receptores huérfanos (ROR). Hasta ahora se conocen tres genes que codifican los subtipos α , β y γ así como cuatro variantes del subtipo alfa (Becker-Andre y cols., 1993; Carlberg y cols., 1994, 1997; Hirose y cols., 1994; Giguere y cols., 1994). Se ha visto que la melatonina activa específicamente los receptores RZR/ROR a concentraciones bajas en el rango nanomolar (Becker-Andre y cols., 1994; Wiesenberg y cols., 1995; Missbach y cols., 1996), y se ha sugerido que los receptores RZR/ROR son los receptores nucleares de la melatonina que median funciones básicas de la hormona, especialmente las relacionadas con el control del crecimiento y diferenciación celulares.

La autorradiografía y ensayos con radiorreceptor han demostrado la presencia de receptores de melatonina en varias regiones del cerebro humano y en intestino, ovarios, y vasos sanguíneos. Los receptores neurales (por ejemplo, los presentes en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo) son probablemente los que regulan los ritmos circadianos. Los receptores de melatonina no neurales (como aquellos localizados en la “pars tuberalis” de la pituitaria) probablemente regulen la función reproductiva, especialmente en especies que se reproducen estacionalmente, y los receptores localizados en tejidos periféricos (por ejemplo, arterias) pueden estar envueltos en la regulación de la función cardiovascular y de la temperatura corporal (Brzezinski, 1997).

En células tumorales en cultivo se ha descrito un posible papel biológico del receptor MT₂ en la inhibición de la proliferación (Shiu y cols., 1999).

2.2 Eliminación de radicales libres.

Tanto estudios “in vitro” (Tan y cols., 1993 [I]) como estudios “in vivo” (Tan y cols., 1993 [II]), han demostrado que la melatonina es un potente eliminador de radicales hidroxilo altamente tóxicos y otros radicales oxidativos, lo que sugiere que tiene acciones no mediadas por receptores (Reiter, 1995). En un estudio, la melatonina parece ser más efectiva que otros antioxidantes conocidos (por ejemplo, manitol, glutatión, y vitamina E) en la protección contra el daño oxidativo (Reiter, 1995). Por lo tanto, la melatonina puede proveer protección contra enfermedades que causan daños degenerativos o proliferativos por blindaje de macromoléculas, como el ADN, frente a éstos. Sin embargo, estos efectos antioxidantes requieren concentraciones de melatonina que son mucho mayores que el pico nocturno que se alcanza su concentración en suero. Así, los efectos

antioxidantes de melatonina en humanos probablemente tienen lugar sólo a concentraciones farmacológicas.

2.3 Aumento de la función inmune.

La melatonina puede ejercer ciertos efectos biológicos (como la inhibición del crecimiento tumoral y contrarrestar la inmunodepresión inducida por estrés) por aumento de la respuesta inmune (Maestroni, 1993). Estudios en ratones han demostrado que la melatonina estimula la producción de Interleukina-4 en células T-helper de la médula ósea y de factor estimulante de colonias de granulocito-macrófagos en células estromales (Maestroni y cols., 1994 [I]); protege, además, las células de la médula ósea de la apoptosis inducida por componentes citotóxicos (Maestroni y cols., 1994 [II]). El supuesto efecto de la melatonina en el sistema inmune es apoyado por el hallazgo de receptores de melatonina de alta afinidad (K_d : 0'27 nM) en linfocitos T humanos (células CD4), pero no en linfocitos B (Gonzalez-Haba y cols., 1995).

3. Melatonina y cáncer.

Hay evidencia por estudios experimentales de que la melatonina influye en el crecimiento espontáneo e inducido de tumores en animales. La pinealectomía intensifica el crecimiento tumoral, y la administración de melatonina revierte este efecto o inhibe la tumorogénesis causada por carcinógenos (Tamarkin y cols., 1981).

Hay algunos puntos de controversia en la relación entre melatonina y oncogénesis, pero la mayoría de los informes apuntan hacia una acción protectora. Se han encontrado concentraciones bajas de melatonina en suero y una excreción baja de metabolitos de melatonina en orina en mujeres con cánceres de mama

receptor estrogénico positivos y en hombres con cáncer de próstata (Bartsch y cols., 1989; Bartsch y cols., 1992).

El mecanismo por el cual la melatonina puede inhibir el crecimiento tumoral aún no es conocido. Una posibilidad es que la hormona tiene actividad antimitótica. Concentraciones fisiológicas y farmacológicas de melatonina inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama (particularmente MCF-7) (Hill y Blask, 1988) y líneas celulares de melanoma maligno (M-6) de forma dosis dependiente (Ying y cols., 1993). Este efecto puede ser el resultado de la regulación intranuclear disminuyendo la expresión de un gen o inhibiendo la liberación y actividad de factores estimuladores del crecimiento. La melatonina puede también modular la actividad de varios receptores de células tumorales. Por ejemplo, disminuye significativamente tanto la unión estrogénica como la expresión de receptores estrogénicos de forma dosis dependiente y tiempo dependiente en células de cáncer de mama MCF-7 (Molis y cols., 1994). Otra posibilidad es que la melatonina tenga una actividad inmunomoduladora. En estudios en animales, la melatonina intensifica la respuesta inmune mediante un incremento en la producción de citoquinas derivadas de las células T-helper (Interleukina-2 e Interleukina 4) (Maestroni, 1993), y como vimos anteriormente, en ratones la melatonina protege las células de la médula ósea de la apoptosis por aumento de la producción de factor estimulador de colonias por granulocitos y macrófagos (Maestroni y cols., 1994 [II]). Por último, como potente eliminador de radicales libres, la melatonina puede proteger contra el crecimiento tumoral por blindaje de moléculas, especialmente ADN, frente al daño oxidativo (Reiter, 1995). Sin embargo, los efectos antioxidantes de la melatonina tienen lugar sólo a concentraciones muy altas.

Los efectos de la melatonina han sido estudiados en algunos pacientes con cáncer, sobre todo en sujetos con enfermedad avanzada. En estos estudios, la melatonina fue administrada generalmente en altas dosis (20 a 40 mg por día oralmente) en combinación con radioterapia y quimioterapia. En un estudio de 30 pacientes con glioblastomas, los 16 pacientes tratados con melatonina y radioterapia vivieron más tiempo que los 14 pacientes tratados con radiación sólo (Lissoni y cols., 1996). En otro estudio por los mismos investigadores, la adición de melatonina al tratamiento con tamoxifeno en 14 mujeres con metástasis de cáncer de mama pareció enlentecer la progresión de la enfermedad (Lissoni y cols., 1995). En un estudio de 40 pacientes con melanoma maligno avanzado tratado con altas dosis de melatonina (superiores a 700 mg por día), 6 tuvieron descensos transitorios en el tamaño de la masa tumoral (Gonzalez y cols., 1991). Se pretende que la adición de melatonina a la quimioterapia o radioterapia atenúa el daño de las células sanguíneas y además, hace el tratamiento más tolerable (Lissoni y cols., 1994). Todos estos resultados preliminares deben ser confirmados en grupos mayores y por períodos más largos de tiempo.

APOPTOSIS

En los últimos años, el interés por la apoptosis se ha desarrollado extraordinariamente. Este proceso fisiológico parece jugar un papel fundamental en la historia natural de la práctica totalidad de las células del organismo y, por ende, en el funcionamiento de todos los órganos y sistemas. Diversos estudios han puesto de manifiesto que las alteraciones de la apoptosis pueden explicar mecanismos patogénicos de gran trascendencia en numerosas enfermedades, no sólo en modelos experimentales, sino también en patología humana. Ya que se

trata de un proceso de reciente descripción, las expectativas futuras son enormes, tanto en el campo de la comprensión de la etiopatogenia como en el de la terapéutica de numerosas enfermedades de muy distinta índole.

1. Concepto de apoptosis.

Ya en 1858, Virchow introduce el concepto de muerte celular como un proceso desencadenado por una lesión o daño. En la actualidad se distingue dos tipos diferentes de muerte celular, uno conocido con el nombre de *necrosis* (que coincidiría con el concepto introducido por Virchow) y otro, denominado *muerte celular programada*.

El hecho de que la muerte celular pueda ocurrir como un proceso normal en animales sanos y que estos procesos jueguen un papel fundamental durante el desarrollo embrionario se puso de evidencia hace más de 40 años (Glücksmann, 1951).

Durante el desarrollo embrionario (Saunders, 1966; Pierce y cols., 1989) y la metamorfosis en insectos y anfibios (Kerr y cols., 1974) un gran número de células siguen procesos de muerte celular programada.

La muerte celular programada tiene lugar durante el proceso de homeóstasis en tejidos adultos sanos y órganos de mamíferos en condiciones normales; entre estos caben destacar los centros germinales linfoides, el córtex tímica, el hígado (Kerr y cols., 1972), el córtex adrenal (Wyllie y cols., 1973) y la próstata (Kerr y Searle, 1973). Además, en aquellos tejidos sometidos a regulación endocrina, un descenso de los niveles hormonales en sangre provoca un aumento en el número de células que sufren este tipo de muerte (Kyprianou y cols., 1988).

En 1971, Kerr denomina a este tipo de muerte celular "necrosis por contracción " (shrinkage necrosis) para distinguirla de la necrosis, aunque más tarde, en 1972 Kerr y colaboradores introducen el término **apoptosis** para definir las características morfológicas que presenta el proceso de muerte celular programada.

Aunque la apoptosis se conoce desde hace relativamente poco tiempo, parece que constituye la forma más frecuente de muerte de células en los organismos vivos. La diferencia entre este proceso y la necrosis no es sólo bioquímica y morfológica, sino también conceptual (Tabla IV). En la necrosis, la célula muere por el efecto nocivo directo de un agente externo químico (por ejemplo, anoxia, alteraciones del equilibrio hidroelectrolítico del medio, etc.) o físico (hipertermia intensa, etc.), que ocasiona una alteración en su homeostasis y la ruptura de la membrana celular. Por el contrario, en la apoptosis la célula muere a consecuencia de una orden que parte de sí misma; así, si en la necrosis podríamos decir que la célula muere "asesinada", en la apoptosis se "suicida". La necrosis es siempre un proceso imprevisto e indeseable para la célula y el sistema donde se halla y provoca una reacción inflamatoria. En cambio, cuando una célula muere por apoptosis lo hace porque, al menos en principio, este acto supondrá un beneficio para el correcto desarrollo y funcionamiento del órgano y del sistema donde se encuentra. La apoptosis es, por ejemplo, responsable del *turn-over* (recambio) celular que experimentan células como los neutrófilos o las células embrionarias y de la eliminación de células potencialmente nocivas como las células T que reaccionan contra antígenos propios. El concepto de "muerte celular programada" resulta evidente en el caso de los neutrófilos u otras células de vida media corta, en las que la apoptosis se produce en la célula en un tiempo más o

menos predecible. De hecho, el término apoptosis procede de la palabra griega que significa "caída de las hojas de los árboles" o " de los pétalos de las flores".

Sin embargo, la apoptosis no es, ni mucho menos, un fenómeno fijo e inmutable como podría indicar el calificativo "programada", y por este motivo actualmente se tiende a abandonar esta expresión. Además de las importantes variaciones entre distintas estirpes celulares, el que una célula entre o no en apoptosis depende de numerosos factores, extracelulares e intracelulares, algunos de ellos con efecto estimulador y otros con efecto inhibitor sobre la apoptosis (Vivancos y cols., 1995).

	NECROSIS	APOPTOSIS
Causa	Agente letal directo	Orden intracelular
Membrana celular	Rota prematuramente	Preservada, bullosa
Citoplasma	Hinchado	Contraído
Núcleo	Cariolisis o picnosis	Picnosis
Rotura del ADN	Aleatoria e irregular	Fragmentos regulares
Orgánulos	Dañados	Indemnes
Inflamación	Sí	No

Tabla IV: Principales diferencias entre necrosis y apoptosis.

2. Cambios morfológicos durante la apoptosis.

La apoptosis afecta principalmente a células aisladas y no a un conjunto de células situadas en el mismo área de un tejido, como ocurre en el caso de la necrosis. En 1980 Wyllie y cols. describen la secuencia de características morfológicas que se producen durante el proceso de apoptosis. Estas pueden

ordenarse en el tiempo y clasificarse en cambios nucleares y cambios citoplásmicos.

2.1 Cambios morfológicos nucleares.

En una fase temprana del proceso, la cromatina se dispone en masas granulares compactas alrededor de la envoltura nuclear. El contorno nuclear se hace irregular y el volumen disminuye (picnosis nuclear). En un estado más avanzado, llega a ser difícilmente identificable y comienzan a aparecer fragmentos nucleares. El nucleolo aparece con un tamaño mucho mayor de lo habitual y en algunas ocasiones pueden apreciarse finos gránulos, situados en el centro del núcleo de origen desconocido. A pesar de las transformaciones citadas, siguen apreciándose poros nucleares. Finalmente, el núcleo acaba rompiéndose en un número variable de fragmentos, algunos de ellos rodeados de la membrana nuclear y otros en los que no se observa ésta (**figura 9**).

2.2 Cambios morfológicos citoplásmicos.

Al mismo tiempo que se producen estos cambios nucleares, en el citoplasma tienen lugar otro conjunto de modificaciones. El citoplasma normalmente comienza a condensarse; los microvilli, si existiesen, desaparecen y la superficie celular emite una serie de protuberancias. En los tejidos epiteliales las estructuras desmosómicas se desestructuran. La *contracción celular progresiva* se traduce en una concentración de los orgánulos en el interior del citosol, aunque estos mantienen su estructura intacta.

En ningún caso se rompe la membrana plasmática de la célula, lo cual implica que no existe una alteración muy intensa de los equilibrios osmóticos e iónicos de la misma. Esta, es una de las características que distingue el proceso de apoptosis de una muerte accidental como la necrosis, ya que en este caso, la alteración de la

membrana plasmática de las células y los desequilibrios osmóticos consecuentes se traducen finalmente en un aumento de volumen de la célula, hecho que marca claramente las diferencias morfológicas con el proceso de apoptosis hasta ahora descrito.

Al microscopio óptico, todas estas características se traducen en una intensa basofilia celular que permite distinguir fácilmente qué células mueren por apoptosis en un tejido empleando colorantes basófilos como el azul de toluidina o el azul de metileno.

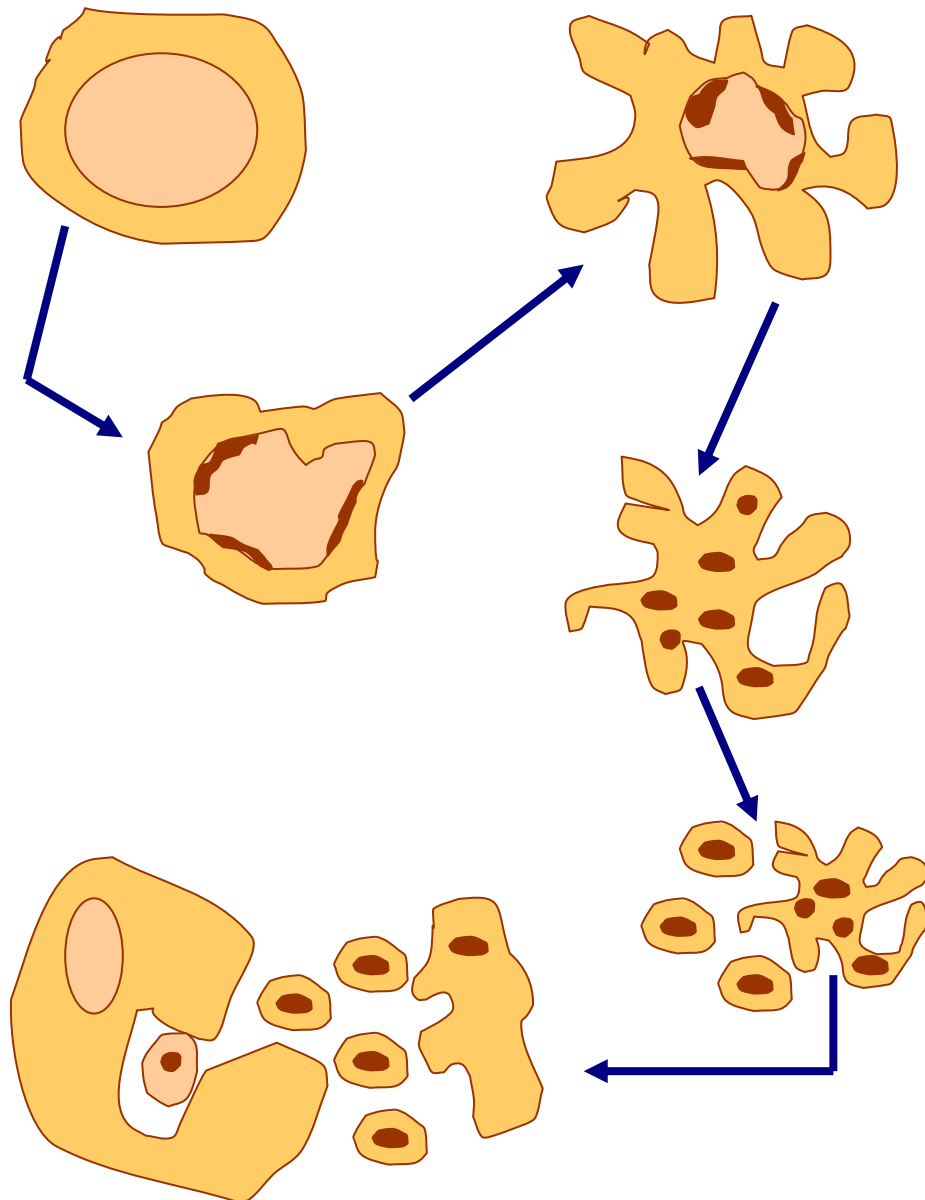


Figura 9: Proceso de muerte celular por apoptosis.

Finalmente, las protuberancias superficiales se separan de la célula arrastrando parte del citosol y de los orgánulos; formando unas estructuras esféricas llamadas **cuerpos apoptóticos**, que pueden llevar o no algún fragmento nuclear; la membrana siempre queda indemne, lo que explica la ausencia de

inflamación acompañante. Estos cuerpos aparecen dispersos por el tejido y normalmente son liberados a los lúmenes más cercanos, en el caso de las glándulas exocrinas por ejemplo, o fagocitados por macrófagos o neutrófilos, o bien por células vecinas.

3. Bioquímica del proceso de muerte celular programada.

En 1980, Wyllie demostró que la muerte celular que se producía en los timocitos in vitro, cuando incubaban con glucocorticoides tenía las características morfológicas de la apoptosis. Demostró además, por electroforesis en geles de agarosa, que la cromatina de estas células estaba fragmentada y seguía un patrón de fragmentación que resultó ser de 180 pares de bases y múltiplos sucesivos. Este patrón, a modo de escalera, ya había sido descrito anteriormente por Williamson (1970), como debido a la acción de una endonucleasa endógena que se encontró en algunas células, especialmente en hepatocitos. Esta endonucleasa puede activarse en núcleos aislados incubados en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Más tarde, Cohen y Duke (1984), demostraron su existencia en núcleos aislados de timocitos, observando además que este patrón de fragmentación de la cromatina se producía cuando los núcleos se incubaban con dexametasona y corticosterona. Posteriormente, se observó también que esta endonucleasa era inhibida por otro ión divalente, el Zn^{2+} . No obstante, en algunos tipos celulares que tienen todas las características de muerte por apoptosis, incluyendo los cambios morfológicos nucleares descritos anteriormente no se observó una fragmentación internucleosomal del ADN. En estos casos se observó algún tipo de alteración en el ADN, por ejemplo alto grado de daño en una de las dos cadenas de la doble hélice del ADN, sin apenas observarse rupturas en ambas cadenas. No hay un consenso sobre el papel que juega en último término la fragmentación del ADN,

aunque sí parece claro que las incubaciones con ácido aurin-tricarboxílico, un inhibidor de las nucleasas, inhibe todos los tipos de apoptosis conocidos; éste es también un inhibidor de otros muchos procesos intracelulares que en último término podrían ser los responsables directos (Cohen, 1993 [I]).

Otra de las características bioquímicas importantes de la muerte celular programada es la necesidad de síntesis proteica y de ARN de novo. Incubaciones con actinomicina D (inhibidor de la síntesis de ARN) y cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) previenen la apoptosis de timocitos en presencia de glucocorticoides (Cohen y Duke, 1984).

La maquinaria genética implicada en la apoptosis no está completamente aclarada. No obstante, hay muchos genes que han sido relacionados claramente con este proceso y que pueden ser marcadores bioquímicos a emplear en la apoptosis. Se pueden distinguir por un lado genes cuya modulación afecta inhibiendo o desencadenando el proceso de apoptosis como por ejemplo el protooncogen *c-myc* que juega un papel regulador tanto en la muerte como en la proliferación celular. Fibroblastos que sobreexpresan *c-myc* sufren en ausencia de suero apoptosis y en hibridomas de células T el empleo de sondas antisentido contra *c-myc* puede inhibir el proceso de muerte celular desencadenado por reacción cruzada con antígenos específicos (Cohen, 1993). Otro gen cuya modificación afecta a los procesos de apoptosis es el gen *Fas*, cuya proteína es semejante al APO-1 de la superficie de las células humanas. Este gen codifica para una proteína de membrana, semejante a los receptores para el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), que cuando reacciona vía anticuerpos específicos puede desencadenar el proceso de apoptosis. Además ratones *lpr* deficientes en *Fas* tienen una acumulación exagerada de

células linfoides debida en último término a un menor grado de muerte celular (Watanabe-Fukunaga y cols., 1992).

Uno de los genes relacionados con la apoptosis que merece la pena destacar es el gen supresor de tumores *p53*. Éste inhibe la proliferación celular y promueve la diferenciación en distintos tipos celulares (Levine y cols., 1991). En algunas líneas celulares, diferenciación significa muerte, siendo el *p53* capaz de causar apoptosis en líneas mieloides o epiteliales. Fundamentalmente lo que se puede destacar del *p53* es que es capaz de detener el ciclo celular en G1 cuando existe algún daño en el material genético de la célula, dirigiendo a aquellas células que tratan de oponerse a esta parada hacia un programa de suicidio (Lane, 1992). Su capacidad para detener el ciclo celular permite la reparación del material genético de las células si fuese necesario antes de la replicación y si el daño no fuese reparable, da tiempo a la célula para desencadenar la apoptosis, lo cual impediría la promoción del daño a las células hijas. Un error en la función del *p53* puede desencadenar un proceso tumoral (Hollstein y cols., 1991).

También cabe destacar la función de la familia del gen *bcl-2*, el cual se considera un gen claramente antiapoptótico. Este gen es, hasta el momento, el único capaz de bloquear el proceso de apoptosis desencadenado por diferentes factores (Korsmeyer, 1992). El *bcl-2* es un gen que se encuentra sobreexpresado en algunos tipos de procesos proliferativos malignos (Finke y cols., 1992); su nombre viene de "B-cell leukemia" y se le asigna por haber sido descubierto en el punto de traslocación t(14;18) (q32;q21) en leucemias de células B humanas. Este gen codifica para una proteína localizada en la membrana interna mitocondrial, membrana del retículo endoplásmico y membrana nuclear (Hockenbery y cols., 1990; Jacobson y cols., 1993) y que se distribuye frecuentemente en aquellos

tejidos que sufren de forma habitual procesos de apoptosis (Hockenbery y cols., 1991). La función del *bcl-2* como inhibidor de la muerte celular programada se demostró en diferentes modelos experimentales, poniéndose además de manifiesto tanto a nivel morfológico como bioquímico (Korsmeyer, 1992). La cadena de procesos bioquímicos intracelulares en los cuales se encuentra implicada esta proteína no está totalmente aclarada, ni delimitada. En la actualidad, se asume que juega un papel inhibidor de la apoptosis a través de una ruta antioxidante. Hockenbery y colaboradores (1993), proponen un modelo en el cual el *bcl-2* a través de interacciones proteína-proteína con algunos enzimas antioxidantes, tras la generación de O_2^- en la célula y su conversión en peróxidos, podría focalizar y regular una ruta antioxidante en los sitios de generación de radicales libres como puede ser la mitocondria.

Por otro lado, existen genes que se expresan en células que se mueren por apoptosis, aunque no se conoce con detalle su función en el proceso. En primer lugar está el *TRPM-2* o *SGP-2*, que se expresa en numerosos tejidos y en especial en el tracto urogenital durante el proceso de muerte celular (Buttayan y cols., 1989); y en segundo lugar están el *RP-2* y el *RP-8* en timocitos, tejidos linfoides y durante la morfogénesis en el sistema nervioso central, que también aumentan su expresión durante la apoptosis o muerte celular programada (Owens y Cohen, 1992).

En la actualidad, el control molecular de los procesos de muerte celular programada no se conoce con detalle, aunque goza de una importancia crucial. Un desajuste de la maquinaria de control de este proceso parece tener consecuencias patológicas muy serias, incluyendo enfermedades autoinmunes, degenerativas o incluso generando la aparición de cánceres (Williams, 1991; Thompson 1995).

Por otro lado son extremadamente interesantes las posibilidades terapéuticas que podría proporcionar un conocimiento exhaustivo de los procesos moleculares que controlan la muerte celular programada (Cohen, 1992).

4. Agentes que pueden causar muerte celular programada.

Habitualmente la señal desencadenante de la muerte celular programada proviene del ambiente que rodea a las células, como puede ser la privación de factores de crecimiento y hormonas, la aparición o desaparición de citoquinas e incluso cambios en las interrelaciones con las células vecinas. En otros casos la célula puede tener un reloj autónomo interno que controla este programa. Las señales que inducen apoptosis son muy variadas, y algunas veces éstas pueden inducir proliferación o diferenciación celular. Por esto, la decisión final entre muerte celular o proliferación y diferenciación depende del contexto intracelular en el que se traduce la señal, como el tipo celular y sus características de expresión genética, el estado de maduración y el desarrollo o la fase del ciclo celular en la que se encuentre (Williams y Smith, 1993).

Aunque los desencadenantes sean diferentes, los tipos celulares sean diferentes y la transducción de la señal sea diferente, el mecanismo final y las características básicas convergen en algún punto en común (Cohen, 1993 [II]).

Numerosos estudios se han centrado en inducir muerte celular programada para tratar de dilucidar el programa intracelular que dirige este proceso. Estos experimentos incluyen tratamientos con diversos agentes químicos, eliminación de factores de crecimiento y exposición a condiciones adversas como isquemia o radiación. La mayor parte de los inductores de muerte celular programada pueden ser divididos en una serie de categorías teniendo en cuenta la localización subcelular que tienen como diana (Wertz y Hanley, 1996).

4.1 Agentes que afectan a la superficie celular.

a) Ligandos para receptores específicos: El TNF es quizás el ejemplo típico de mediador responsable de la muerte celular que se asocia a procesos autoinmunes, antitumorales y de inflamación. Clásicamente se pensó que la interacción TNF con su receptor de superficie (TNFR) estaban asociados a una muerte necrótica, pero hoy en día se sabe que se trata, en su mayor parte, de procesos de muerte celular con las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis. La muerte celular inducida por TNF necesita de la presencia de un tipo de proteasas denominadas *enzimas convertidores de interleuquina 1 β (ICE)* (Steller, 1995). Algunos ejemplos más de interacción con un receptor de superficie lo protagonizaron las excitotoxinas neuronales. Algunas neuronas, en particular las del sistema nervioso central, son sensibles a estímulos que no afectan a otras células, en especial la hiperestimulación del receptor de glutamato por ácido glutámico o algunos análogos de éste pueden inducir necrosis neuronal y en algunos caso muerte neuronal programada (Götz y cols., 1994). El mecanismo por el cual actúan no está totalmente dilucidado, pero se ha sugerido la participación del Ca^{2+} intracelular (Orrenius y Nicotera, 1994) e, incluso, el desacoplamiento del metabolismo del glutation (Verity, 1994).

b) Agentes farmacológicos que afectan al flujo de solutos a través de las membranas: La modificación del transporte de iones y solutos a través de la membrana plasmática puede inducir muerte celular programada, siendo un ejemplo los ionóforos de Ca^{2+} como A23187 (Martín y cols., 1994). La desregulación de la homeóstasis del calcio es un hecho común en muchos tipos celulares y en muchos tipos de muerte celular programada. Inhibidores del transporte $\text{Na}^{2+}/\text{H}^{+}$ también inducen apoptosis en líneas celulares

hematopoyéticas, en algunos casos estos efectos se han relacionado con las variaciones intracelulares de pH (Cáceres-Cortés, 1994).

4.2 Agentes que afectan al citoplasma, al citoesqueleto y los orgánulos celulares:

a) Oxidantes intracelulares.

La menadiona, responsable de la transformación de oxígeno molecular a radical superóxido, puede inducir muerte celular programada en células FL5.12 y en células T 2B4. Los daños celulares tan variados que pueden provocar las sustancias que generan estrés oxidativo sugieren que su papel en la muerte celular programada puede ser definitivo en todos los tipos celulares (Hockenberry, 1995).

b) Quelantes de metales.

Los quelantes de Zn^{2+} como el TPEN (N,N,N',N' tetraquis [2-piridil-metil] etilenediamina) inducen apoptosis en timocitos. Los mecanismos propuestos hasta ahora para explicarlo incluyen el hecho de que el Zn^{2+} es un inhibidor de la endonucleasa que participa en la fragmentación del ADN característica de la apoptosis, que existen algunos enzimas implicados en la apoptosis que emplean el zinc como cofactor y por último que el Zn^{2+} es un antioxidante (Jiang y cols., 1995).

c) Moduladores de la fosforilación.

El ácido okadaico es un promotor de tumores que inhibe las fosfatasas PP-1 y PP-2^a. Este ácido provoca un incremento de la fosforilación de proteínas y puede desencadenar muerte celular en numerosos tipos celulares como por ejemplo en células HL-60 o U937 (Ishida y cols., 1992). Otro ejemplo es la inhibición de la fosforilación por estaurosporina. La estaurosporina es un inhibidor de serin / treonin quinasas. Ésta induce apoptosis en muchos tipos celulares, proponiéndose

un mecanismo en el que actuaría bloqueando las señales intracelulares desencadenadas por factores de supervivencia (Jacobson y cols., 1993).

d) Moduladores de la transducción de señales.

El AMP cíclico es el segundo mensajero de muchas de las cascadas de transducción de señales intracelular. El tratamiento con análogos del AMPc como el 8-bromo-AMPc provoca un aumento de los niveles intracelulares de AMP que puede inducir apoptosis. En algunos tipos celulares, niveles moderados de AMPc pueden provocar diferenciación, mientras que el tratamiento con altas concentraciones promueve la muerte celular (Aharoni y cols., 1995). Por otro lado, agentes como la flutamida que inhibe la interacción entre hormona y receptor de andrógenos en la próstata, puede desencadenar muerte celular en células dependientes de andrógenos (Furuya y cols., 1994).

Todos los esfingolípidos tienen ceramidas como componente hidrofóbico. El TNF actúa a través de ceramidas y estos segundos mensajeros son también capaces de inducir fragmentación del ADN y cambios morfológicos de apoptosis, posiblemente a través de una cascada de fosforilación vía protein-quinasas (Ji y cols., 1995). Por último, hay que mencionar el hecho de que el óxido nítrico es también un importante inductor de la apoptosis. El mecanismo por el cual éste desencadena la apoptosis es desconocido, pero se especuló que podría amplificar la transcripción génica inducida por Ca^{2+} en células neuronales (Messmer y cols., 1995).

4.3 Agentes que afectan al citoesqueleto.

El taxol es un quimioterápico que afecta a la polimerización de tubulina inhibiendo el ciclo celular. Recientemente se ha demostrado que el taxol es capaz de inducir muerte celular programada (Liu y cols., 1994). Por otro lado las

citocalasinas, metabolitos que se unen a la actina siendo capaces de inhibir su polimerización, son también capaces de inducir muerte celular en líneas celulares de linfoma (Kolber y cols., 1990).

4.4 Agentes que afectan al núcleo.

a) Inhibidores de la síntesis de proteínas.

La actinomicina D es un inhibidor de la síntesis de ARN. La transcripción es un fenómeno necesario para el desarrollo de la muerte celular programada en muchos tipos celulares, no obstante los tratamientos con actinomicina D también pueden producir muerte celular en algunos casos. Esto puede ser explicado como el resultado del descenso de proteínas esenciales o de la inhibición de la síntesis de proteínas que normalmente detienen la activación espontánea de la apoptosis (Martín y cols., 1994).

b) Agentes que dañan el ADN.

Los agentes quimioterapéuticos como el 5-fluorouracilo y el etopósido son inhibidores de la timidilato sintetasa y de la ADN topoisomerasa II respectivamente. En ambos casos se produce una reducción de la capacidad para la síntesis de ADN y su reparación. Esto provoca un daño del ADN que en la mayor parte de los casos desemboca en un proceso de muerte celular programada (Tew y cols., 1993).

c) Moduladores de la expresión genética.

Los glucocorticoides fueron los primeros agentes que se demostró que inducían muerte celular con características de apoptosis en timocitos. Los glucocorticoides actúan vía receptor nuclear desencadenando una modificación de la expresión génica. Hasta el momento se desconoce si estos actúan induciendo la

síntesis de proteínas que desencadenan la muerte celular o bien inhibiendo la síntesis de proteínas que inhiben la misma (Hickman,1992).

5. Alteraciones de la apoptosis en patología humana.

Sin lugar a dudas, el mayor interés del estudio de la apoptosis radica en la búsqueda de explicaciones sobre la etiopatogenia de numerosas enfermedades y en su posible repercusión sobre la terapéutica. Si la apoptosis es un mecanismo por el cual las células se suicidan por el bien de la colectividad, cabe suponer que cualquier alteración, sea por defecto o por exceso, puede producir un desequilibrio, por excesiva muerte o proliferación de un determinado tipo celular, que conduzca a un determinado tipo patológico. A pesar de hallarse todavía en fases precoces, las investigaciones realizadas hasta la fecha ya han empezado a dar sus frutos y hay varias enfermedades en las que existen evidencias o al menos sospechas de una participación decisiva de estos mecanismos (Tabla V).

<p>Enfermedades neoplásicas y paraneoplásica</p> <ul style="list-style-type: none"> Tumores sólidos Linfoma de células B Otros síndromes linfoproliferativos y mieloproliferativos Hipertrofia prostática Focos hepáticos preneoplásicos Resistencia a la quimioterapia <p>Enfermedades autoinmunes</p> <ul style="list-style-type: none"> Lupus eritematoso sistémico Síndrome de Sjögren Glomerulonefritis Diabetes tipo I <p>Enfermedades infecciosas</p> <ul style="list-style-type: none"> Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida Infecciones víricas Disentería por Shigella <p>Enfermedades neurológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> Accidentes isquémico cerebrales Enfermedad de Alzheimer Esclerosis múltiple Ataxia-telangiectasia Enfermedades por priones <p>Enfermedades cardíacas</p> <ul style="list-style-type: none"> Cardiopatía isquémica Miocardopatía por citostáticos <p>Miscelánea</p> <ul style="list-style-type: none"> Enfermedad inflamatoria intestinal Poliquistosis renal Diarrea por radiaciones y Virus de la Inmunodeficiencia Humana
--

Tabla V: Enfermedades en cuya patogenia se han implicado hasta el momento alteraciones de la apoptosis.

Dado el tema de nuestro estudio, interesa fundamentalmente la implicación de este mecanismo en el **cáncer**.

El mantenimiento del número normal de un tipo celular requiere un balance entre el nivel de división y de muerte celular. El crecimiento incontrolado en las

neoplasias puede explicarse, pues, por una excesiva proliferación, por una reducida muerte celular o por ambas.

Los principales hallazgos a este respecto son los que se han obtenido del estudio de algunos genes implicados en la apoptosis. De hecho, los genes que, de forma fisiológica, bloquean la apoptosis y, por tanto, favorecen la proliferación, como el *bcl-2*, entran en la categoría de protooncogenes, mientras que los que la estimulan, como el *p53*, se denominan antioncogenes. Cuando un protooncogén se expresa excesivamente o un antioncogén defectuosamente, en general a causa de mutaciones, se transforman en oncogenes. Desde este punto de vista se pueden distinguir tres tipos de oncogenes: tipo I, los que estimulan la proliferación; tipo III, los que inhiben la apoptosis; y tipo II, los de mecanismo mixto.

El antioncogen *p53* posee una potente capacidad para frenar la división celular y activar la apoptosis. Este efecto desaparece cuando sufre una mutación que lo hace ineficaz. Estos mutantes de *p53* han sido identificados en numerosos tumores humanos y animales, que de esta forma pueden considerarse como auténticos oncogenes de tipo III. Por ejemplo, el conocido poder carcinogénico de la aflatoxina B1 en el hepatoma reside precisamente en su capacidad para originar mutaciones en el gen *p53*.

El gen *rb*, inhibidor de la división celular, puede también sufrir una mutación que lo convierta en oncogén de tipo I, como de hecho sucede en el retinoblastoma.

Por el contrario, el protooncogen *bcl-2* tiene un intenso efecto inhibidor de la apoptosis. De esta manera, la excesiva expresión de la proteína por él codificada se traduce por una tendencia a la proliferación descontrolada, como se observa en muchos casos de linfomas de células B, sobre todo de tipo folicular; esta sobreproducción de *bcl-2* se debe a una traslocación, en concreto t(14;18), que se

encuentra de forma característica en determinados procesos linfoproliferativos. En ocasiones, esta sobreproducción de *bcl-2* se asocia a otra de *Myc*; en este caso *Myc* actúa estimulando la proliferación, pues *bcl-2* bloquea el efecto apoptótico de *Myc*. Los linfomas con esta doble presencia de oncogenes muestran una gran agresividad. Finalmente, *bcl-2* se halla sobreexpresado en algunos casos de otras neoplasias hematológicas, como linfomas inmunoblásticos, mielomas y leucemias crónicas, en estos casos no acompañados de traslocación.

De gran interés en cancerología, por su implicación en numerosos tumores sólidos y hematológicos, es la familia del protooncogen *ras*. Su expresión, que ocasiona división celular, sólo se produce ante estimulación por factores de crecimiento. Sin embargo, las formas mutantes de estos genes son capaces de ser activadas autónomamente, aun en ausencia de dichos estímulos, originando proliferación descontrolada y por tanto neoplasias (Vivancos y cols., 1995).

Para Meterissian (1997), es especialmente importante el aspecto de la progresión tumoral de los adenocarcinomas gástricos y sobre todo colorrectales, y su relación con el número de apoptosis en las células tumorales, cuya determinación por métodos, ya al alcance de laboratorios clínicos, puede incluso servir para la clasificación y el seguimiento clínico pos quirúrgico de estos tumores en un futuro inmediato. En este aspecto de la progresión tumoral es también conveniente considerar que uno de los mecanismos implicados en la apoptosis de las células neoplásicas son las células citotóxicas del sistema inmunológico, como las células "natural-killer" (NK), las "killer" (K) o algunas de las células T citotóxicas. Pero quizá, por su aplicación clínica, resulta todavía más interesante el aspecto de que tanto la quimio como la radioterapia pueden tener su máxima eficacia antineoplásica en la capacidad que tengan de producir apoptosis

en las células neoplásicas y no en el resto de las células neoplásicas del organismo; sin embargo, tanto las acciones de la quimioterapia como de la radioterapia son estimuladas o inhibidas por una serie de oncogenes presentes o ausentes en las células neoplásicas, como ya hemos visto. Por otra parte, es muy interesante la posibilidad de que un pH ácido en el interior de la célula pueda desencadenar la apoptosis, lo que pondría de manifiesto la importancia de un mecanismo ácido-básico intracelular que generaría la energía necesaria para que se produjera el suicidio celular y justificaría que diversas sustancias (como levostatín, edelfosina, etc.) ejercieran su efecto antineoplásico a través de una inhibición del mecanismo de membrana antiportador $\text{Na}^{2+}/\text{H}^+$ que da lugar a la acidificación de la célula (Harguindey y cols., 1997). Así pues, estos aspectos de la apoptosis, en el campo de la oncología, ponen de manifiesto para el cirujano clínico la importancia de este mecanismo como un marcador pronóstico y, sobre todo, para prever las posibilidades de éxito de una determinada quimio o radioterapia en cada caso (Meterissian, 1997; Harguindey y cols., 1997). De acuerdo con Meterissian (1997), dentro de pocos años, cuando se quiera conocer la agresividad de un tumor, nos preguntaremos no sólo por el porcentaje de células que se hallan en fase S sino también el grado de apoptosis que presentan.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

CULTIVOS CELULARES

1. Línea celular HT-29.

Esta línea celular procede de un adenocarcinoma de colon humano grado II de una mujer blanca de 44 años.

Se ha obtenido a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, suministrada por la European Collection of Cell Cultures (ECACC), ECACC número: 91072201.

Las células HT-29 tienen morfología epitelial y crecen adheridas en monocapa. Su cariotipo es $2n=46$, hipertriploide; se caracterizan por ser productoras de antígeno carcinoembrionario (CEA) y de inmunoglobulina A (IgA) (Fough y Trempe, 1975).

2. Material.

· Frascos de poliestireno tratado con colágeno tipo I para cultivo de células anclaje dependientes. Los tamaños empleados son de 25 cm² y 75 cm² Falcon, Becton Dickinson.

· Medio de cultivo RPMI 1640 (R-7509, Sigma Química, España).

· L-glutamina 200 mM, solución tampón Hepes 1M, suero bovino fetal y anfotericina B 250 µg/ml. (Sigma Química, España).

· Penicilina (Penilevel) 100.000 UI/l, gentamicina Gobens 50 mg/l.

- Tripsina/EDTA (10X) con 5g de tripsina porcina y 2g de EDTA (Sigma Química, España).
- Solución tampón salina fosfatada Dubelcco, sin cloruro cálcico ni magnésico (D-5652, Sigma Química, España).
- Cámara de flujo laminar para trabajar en condiciones de esterilidad.
- Cámara hemocitométrica.
- Microscopio óptico.
- Estufa con control de temperatura, humedad y concentración de CO₂.
- Pipetas y puntas para pipetas (Biolink).
- Frascos esterilizables para preparar las disoluciones, el medio y el tampón de lavado.

3. Procedimiento para trabajar con células congeladas tras su recepción.

Una vez recibida la muestra de células, si no se va a descongelar inmediatamente, se mantiene en nitrógeno líquido. Para descongelar las células se procede del siguiente modo:

- 1.- Se debe trabajar con cuidado porque ocasionalmente la ampolla que contiene las células puede explotar al someterla al calor.
- 2.- Poner la ampolla a temperatura ambiente durante 1 minuto y transferir a un baño de agua a 37° C durante 1-2 minutos, hasta que se descongele. No sumergir totalmente la ampolla.
- 3.- Limpiarla con alcohol de 70% antes de abrirla.

4.- Pipetear 0'5 ml de medio previamente calentado a 37° C en la ampolla y transferir todo el contenido a un tubo estéril. Llenar con medio y centrifugar durante 5 minutos a 80-100 g.

5.- Resuspender las células en el volumen apropiado de medio de cultivo e incubar en las condiciones apropiadas.

4. Mantenimiento del cultivo.

4.1 Preparación de medio de cultivo.

A un litro de medio RPMI se añaden 0,3 g de L-glutamina, 20 ml de tampón Hepes, penicilina G sódica 100.000 UI/l, 50 mg/l de gentamicina y 10 ml de anfotericina B.

Tras descomplementar el suero bovino fetal (manteniéndolo durante 60 minutos a 56° C), se incorpora al medio antes preparado a la concentración volumen/volumen (v/v) que se requiera.

Alicuotar y almacenar entre 2 y 8° C de temperatura.

4.2 Preparación de tampón de lavado (PBS).

A temperatura ambiente (15-20° C), en un litro de agua milliQ disolver el contenido de un frasco de “solución tampón salina fosfatada Dubelcco” (9,6g) , con lo cual se obtendrá una disolución compuesta por:

- Cloruro sódico (ClNa) 8 g/l
- Cloruro potásico (ClK) 0'2 g/l
- Fosfato disódico (PO₄HNa₂) 1'15 g/l
- Fosfato monopotásico (PO₄H₂K) 0'2 g/l

Ajustar el pH entre 7-7'4 empleando ácido clorhídrico (HCl) 1 N o bien hidróxido sódico (NaOH) 1 N.

Tras esterilizarlo, almacenar entre 2 y 8° C de temperatura.

4.3 Cultivo de las células.

Empleando una cámara hemocitométrica, contamos las células en suspensión para conocer el número de células por mililitro. La cámara consta de cuatro áreas con cuadrículas grandes que son las que empleamos para el cálculo. El volumen en cada una de estas áreas bajo el cubreobjetos es de 10^{-4} ml; es por ello por lo que hay que multiplicar por 10.000 para obtener el número de células / ml.

En cada frasco de cultivo, sembramos entre $3-5 \times 10^5$ células y añadimos 10 ml de medio de cultivo con suero fetal al 10%. El procedimiento consiste en incubar a 37° C en atmósfera con 5% CO₂. El medio de cultivo se cambia al 4° día.

En el 7° día, cuando el cultivo ya está confluyente, se despegan las células tratando con 5 ml de una solución de tripsina/EDTA que contenga 0'25% peso/volumen (p/v) de tripsina y 0'1% (p/v) de EDTA (Sigma Química, España) durante 10 minutos a 37° C.

Una vez despegadas (lo que se comprueba visualizándolas en microscopio invertido), neutralizamos la tripsina con 5 ml de medio con suero fetal al 20% y centrifugamos a 1.200 rpm 10 minutos. A continuación, tras desechar el sobrenadante, se resuspende el botón en 1 ml de medio y se vuelven a sembrar en Falcon nuevos.

4.4 Medida del ADN celular mediante fijación con etanol.

Determinamos la fase del ciclo celular en que se encuentran las células antes de realizar los distintos experimentos, comprobando que a las 48 horas de cultivo éstas estaban confluentes, y que en estos cultivos confluentes las células están sincronizadas fundamentalmente en fase G₀-G₁ del ciclo celular (Guo y cols., 1990).

Tras 48 horas de cultivo, el medio con suero fetal se reemplaza por medio sin suero fetal y se añade timidina fría 1mM. A las 24 horas de exposición a timidina, las células se lavan y se despegan del modo descrito (Watson y cols., 1988; Guo y cols., 1990).

Se prepara una suspensión de células en 200 µl de PBS. Añadimos etanol al 70 % helado y las dejamos al menos 30 minutos a - 4° C. Posteriormente las células se centrifugan a 1200 r.p.m. y se resuspenden en 800 µl de PBS. Agregamos 100 µl de RNasa (1mg/ml) y 100 µl de ioduro de propidio (400 µg/ml). Incubamos a 37° C durante 30 minutos.

Para la medida del ADN usamos un citómetro de flujo.

ESTUDIOS DE INCORPORACIÓN DE [6-³H-TIMIDINA]

1. Objetivo.

· Determinar de forma indirecta la proliferación celular mediante la cuantificación de la incorporación de timidina marcada con un isótopo radiactivo (tritio) durante el proceso de síntesis del ADN.

· Investigar las modificaciones que se producen en la proliferación de las células HT-29 al tratarlas con gastrina y antagonistas de los receptores CCK-A y CCK-B/gastrina, así como con melatonina.

2. Material.

- [*Leu*¹⁵]-*Gatrin* I no sulfatada (G9145), obtenida de Sigma-Aldrich, España.
- *Colecistoquinina: CCK-8 sulfatado* (C2175), obtenida de Sigma-Aldrich, España.
- *Proglumida* en forma de sal de sodio (M-006), suministrada por Research Biochemicals International (RBI). Es antagonista de los receptores CCK-A y CCK-B.
- *Lorlumida* en forma de sal de sodio (L-109) de Research Biochemicals International (RBI). Es antagonista del receptor CCK-A.
- *L 364,718, Devazepide ó MK-329* donado por ML Laboratories, antagonista de los receptores CCK-A.
- *L 365,260* donado por ML Laboratories, antagonista de los receptores CCK-B.
- *PD 135,158 ó CAM 1028*. Usamos PD 135,158 N-methyl-D-glucamine (P-157) de Research Biomedicals International (RBI). Es antagonista de los receptores CCK-B y agonista débil de los CCK-A.
- *Melatonina* (M-5250) de Sigma-Aldrich, España.
- Células HT-29.
- Placas de poliestireno para cultivo de 96 pocillos (Falcon, Lincoln Park, NY).
- Medio de cultivo con suero fetal al 2,5% volumen/volumen (v/v).
- 6-³H-timidina (actividad específica 24 Ci/mmol). Suministrada por Amersham Life Science.
- Báscula de precisión.
- Aparato de filtración LKB, modelo 1295-Cell Harvester.
- Papel de filtro de fibra de vidrio de 102 x 258 mm.

- Tubos para contador de centelleo beta.
- Líquido de centelleo
- Contador de radiactividad beta.

3. Procedimiento.

3.1 Medida de la incorporación de timidina marcada en cultivos de células HT-29.

- Despegar y resuspender las células de un falcon que esté confluyente de forma similar que para el mantenimiento del cultivo anteriormente descrito.
- Contar las células en la cámara hemocitométrica.
- Sembrar en cada pocillo de la placa 15.000 células.
- Añadir medio con suero fetal al 2'5% hasta un volumen final de 200 μ l/pocillo e incubar 24 horas a 37° C en CO₂ 5% para que se adhieran a la placa. A las 24 horas tirar el sobrenadante y lavar con PBS a temperatura ambiente. Esto debe hacerse con cuidado para evitar despegar las células por arrastre.
- Añadir 180 μ l de medio con suero fetal al 2'5% y 20 μ l de una disolución de timidina en el mismo medio que contenga 0'125 μ Ci (calculando 1 μ Ci para cada 8 pocillos).
- Incubar 48 horas en las mismas condiciones antes referidas.
- Tirar el sobrenadante y lavar dos veces con PBS a temperatura ambiente para eliminar restos de timidina no fijada.
- Tratar con 100 μ l de tripsina/EDTA durante 10 - 15 minutos a 37°C.
- Comprobar en el microscopio invertido que las células se han despegado.
- Neutralizar con medio con suero fetal al 20% (100 μ l).
- Filtración del contenido de cada pocillo bajo presión negativa.

- Secar el papel de filtro, ya colocado en sus respectivos tubos, en estufa a temperatura entre 50 y 60° C durante 30 minutos.
- Cuando se enfríe, añadir líquido de centelleo a razón de 4 ml por tubo.
- Colocar en el contador beta y proceder a la cuantificación de la radiación.

3.2 Estudios de la influencia de gastrina/CCK y antagonistas de receptores CCK sobre la proliferación celular.

a) GASTRINA.

Sembramos, en una placa de 96 pocillos, 15.000 células por pocillo con 200 µl de medio con suero fetal al 2'5%; incubamos las células en atmósfera de CO₂ al 5% a 37° C durante 24 horas, con esto conseguimos que se fijen adecuadamente a los pocillos.

Transcurridas las 24 horas se cambia el medio sobrenadante y se añade gastrina a concentraciones 4 X 10⁻⁹ M, 4 X 10⁻¹⁰ M, 4 X 10⁻¹¹ M, 4 X 10⁻¹² M, 4 X 10⁻¹³ M, teniendo en cuenta que Mauss y colaboradores (1994) encuentran estimulación en el crecimiento de este tipo de células a concentraciones entre 1 nM y 1 pM.

Preparación de las diluciones de gastrina:

PM: 2098'2

Se disuelve 1 mg de gastrina en 10 ml de agua destilada. La conservamos congelada a -70°C en alicuotas que contienen 50 µl de la dilución (5µg de gastrina/50 µl). Se obtiene cada concentración por dilución de estas alicuotas en medio con suero fetal al 2'5%.

Dosificación de la placa:

Añadir a cada pocillo 200 μ l de la concentración correspondiente según la distribución que se indica en la Tabla VI.

Posteriormente agregar 0'125 μ Ci de timidina tritiada por pocillo.

Incubar 48h en incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se procesan de la misma forma que se describe en el apartado anterior.

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	4 X 10 ⁻¹³ M	4 X 10 ⁻¹² M	4 X 10 ⁻¹¹ M
Fila B	4 X 10 ⁻¹⁰ M	4 X 10 ⁻⁹ M		
Fila C	Control	4 X 10 ⁻¹³ M	4 X 10 ⁻¹² M	4 X 10 ⁻¹¹ M
Fila D	4 X 10 ⁻¹⁰ M	4 X 10 ⁻⁹ M		

Tabla VI: Distribución de las distintas concentraciones de gastrina en la placa de 96 pocillos.

b) COLECISTOQUININA (CCK-8).

Sembrar las células en la placa como en el experimento anterior e incubar durante 24 horas. Las concentraciones del producto que utilizamos son: 1 X 10⁻⁷ M, 1 X 10⁻⁶ M, 1 X 10⁻⁵ M, 2 X 10⁻⁵ M, 5 X 10⁻⁵ M. Previamente se realizó un experimento con dosis desde 1 μ M a 1 nM, sin obtener ningún resultado.

Preparación de las diluciones:

PM: 1143'3

Se disuelven 250 µg de CCK-8 en 2 ml de medio sin suero fetal. Lo conservamos congelado a -70° C en alícuotas que contienen 100 µl de la dilución (0'011 µmoles). Se obtiene cada concentración por dilución de estas alícuotas en medio con suero fetal al 2'5%.

La distribución en la placa es la siguiente:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10-12
Fila A	Control	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M
Fila B	2×10^{-5} M	5×10^{-5} M		
Fila C	Control	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M
Fila D	2×10^{-5} M	5×10^{-5} M		

Tabla VII: Distribución de las distintas concentraciones de CCK-8 en la placa de 96 pocillos.

Añadir a cada pocillo 0'125 µCi de timidina tritiada.

Incubar 48h en incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se procesan de la misma forma que se describe en el apartado anterior.

c) PROGLUMIDA (C₁₈H₂₅N₂O₄Na).

Sembrar las células en la placa como en el experimento de gastrina e incubar durante 24 horas. Las concentraciones del producto que utilizamos son: 8×10^{-2} M, 4×10^{-2} M, 2×10^{-2} M, 1×10^{-2} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-4} M y

5×10^{-5} M, teniendo en cuenta que Mauss y colaboradores (1994) determinaron que la proglumida inhibía el crecimiento de todas las líneas celulares con una dosis 50 (IC 50) entre 3'2 mM y 7'5 mM, y que con dosis de 100 mM las células se desprendían.

Preparación de las diluciones:

PM: 356'4

0'3564 mg/ml = 1 mM // 3'564 mg/ml = 10 mM. // 28'512 mg/ml = 80 mM.

Para conseguir una concentración 80 mM en un volumen final de 1ml, se pesan 28'512 mg.

Esta sustancia se disuelve directamente en el agua, por lo que a esta cantidad de producto se añade 1ml de medio con suero fetal al 2'5%. Preparar el resto de las concentraciones a partir de ésta diluyendo proporcionalmente, según la fórmula $C \times V = C' \times V'$.

La distribución en la placa es la siguiente:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	5×10^{-5} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M
Fila B	1×10^{-3} M	1×10^{-2} M	2×10^{-2} M	4×10^{-2} M
Fila C	8×10^{-2} M			
Fila D	Control	5×10^{-5} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M
Fila E	1×10^{-3} M	1×10^{-2} M	2×10^{-2} M	4×10^{-2} M
Fila G	8×10^{-2} M			

Tabla VIII: Distribución de las distintas concentraciones de proglumida en la placa de 96 pocillos.

Añadir 0'125 μ Ci de timidina por pocillo.

Incubar en las mismas condiciones y procesar igual que en el experimento anterior.

d) LORGLUMIDA ($C_{22}H_{31}Cl_2N_2O_4Na$).

Sembrar las células en la placa como en experimentos anteriores e incubar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo tirar el sobrenadante, lavar con PBS y añadir lorglumida a las siguientes concentraciones: 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M.

Preparación de las diluciones:

PM: 481'41

0'48141 mg/ml = 1 mM. Para conseguir una concentración 1mM en un volumen final de 5 ml, pesar 2'40705 mg.

Este producto hay que disolverlo en 100 μ l de metanol y después añadir el resto de medio con suero fetal al 2'5% hasta llegar al volumen de 5000 μ l.

Obtener el resto de las concentraciones a partir de ésta diluyendo proporcionalmente, según la fórmula $C \times V = C' \times V'$.

De cada una de ellas poner 200 μ l por pocillo según la distribución en la placa IX.

Añadir 0'125 μ Ci de timidina por pocillo.

Incubar 48h en incubadora humidificada a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se procesan de la misma forma que se describe en apartados anteriores.

Realizamos controles con metanol para cada una de las concentraciones de proglumida, según la cantidad del mismo empleado para cada dilución.

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	1 X 10 ⁻⁶ M	1 X 10 ⁻⁵ M	5 X 10 ⁻⁵ M
Fila B	1 X 10 ⁻⁴ M	5 X 10 ⁻⁴ M	1 X 10 ⁻³ M	
Fila C	Control	1 X 10 ⁻⁶ M	1 X 10 ⁻⁵ M	5 X 10 ⁻⁵ M
Fila D	1 X 10 ⁻⁴ M	5 X 10 ⁻⁴ M	1 X 10 ⁻³ M	
Fila E	C. metanol	C. metanol	C. metanol	C. metanol
Fila F	C. metanol	C. metanol	C. metanol	C. metanol
Fila H	C. metanol	C. metanol	C. metanol	C. metanol

*Tabla IX: Distribución de las distintas concentraciones de lorglumida en la placa de 96 pocillos. * C. metanol indica "Control de metanol".*

e) PD 135,158 ó CAM 1028.

Sembrar 15.000 células por pocillo en la placa como en los experimentos anteriores e incubar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo tirar el

sobrenadante, lavar con PBS y añadir PD 135,158 a las siguientes

concentraciones: 1×10^{-9} M, 5×10^{-9} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M.

Preparación de las diluciones:

PM: 811'98; 0'81198 mg/ml = 1 mM. Para conseguir una concentración 1 mM disolviendo los 5 mg de que disponemos, añadimos 6'1577871 ml de agua destilada. Se almacena en alicuotas de 500 μ l a una temperatura de -70° C. Se preparan 10 ml de solución 1 μ M diluyendo una de estas alicuotas 1:1000.

Obtener el resto de las concentraciones a partir de ésta diluyendo proporcionalmente, según la fórmula $C \times V = C' \times V'$. De cada una de ellas poner 200 μ l por pocillo según la siguiente distribución en la placa:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	1×10^{-9} M	5×10^{-9} M	1×10^{-8} M
Fila B	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M		
Fila C	Control	1×10^{-9} M	5×10^{-9} M	1×10^{-8} M
Fila D	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M		

Tabla X: Distribución de las distintas concentraciones de PD135,158 en la placa de 96 pocillos.

Añadir 0'125 μ Ci de timidina tritiada por pocillo y procesar como en los experimentos anteriores.

f) L 364,718 ó MK-329 ó DEVAZEPIDE.

Sembrar 15.000 células por pocillo en la placa como en los experimentos anteriores e incubar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo tirar el sobrenadante, lavar con PBS y añadir devazepide a las siguientes concentraciones: 1×10^{-9} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, teniendo en cuenta la dosis 50 (IC 50) obtenida por Reubi y colaboradores (1997).

Preparación de las diluciones:

PM: 408'46.

$0'40846 \text{ mg/ml} = 1 \text{ mM}$. Preparamos 5ml de solución, disolviendo 2'0423 mg en 100 μl de etanol y añadiendo 4.900 μl de medio con suero fetal al 2'5%.

Preparar el resto de las concentraciones a partir de ésta diluyendo proporcionalmente, según la fórmula $C \times V = C' \times V'$. De cada una de ellas poner 200 μl por pocillo según la siguiente distribución en la placa:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	1×10^{-9} M	1×10^{-8} M	1×10^{-7} M
Fila B	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M	Control	1×10^{-9} M
Fila C	1×10^{-8} M	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M
Fila D	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila E	C. etanol			

*Tabla XI: Distribución de las distintas concentraciones de L364,718 en la placa de 96 pocillos. * C. etanol indica "Control de etanol".*

Empleamos controles de etanol según las distintas concentraciones de devazepide. Añadir 0'125 µCi de timidina por pocillo, incubar y procesar.

g) L 365,260.

Sembrar las células en la placa e incubar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo tirar el sobrenadante, lavar con PBS y añadir las distintas diluciones: 5 X 10⁻¹⁰ M, 1 X 10⁻⁹ M, 1 X 10⁻⁸ M, 2 X 10⁻⁸ M, 1 X 10⁻⁷ M, 1 X 10⁻⁶ M, 1 X 10⁻⁵ M, basándonos en los resultados obtenidos por Bertrand y colaboradores (1994), para los que la IC₅₀ es 21 nM, y los conseguidos por Reubi y colaboradores (1997) en meningiomas (IC₅₀: 250 nM) y carcinoma de mama (IC₅₀: 20 nM).

Preparación de las diluciones:

PM: 398'47.

0'39847 mg/ml = 1 mM. Por tanto, a 0'39847 mg del producto le añadimos 1 ml de medio con suero fetal al 2'5%, con lo que tenemos 1 ml de solución 1 mM. A continuación, la diluimos 1:100 para obtener una concentración 1 µM: para un volumen final de 5 ml, tomamos 50 µl de la dilución 1mM y añadimos 4.950 µl de medio con suero fetal al 2'5%. Obtenemos las concentraciones restantes diluyendo a partir de aquí, así la placa queda:

	Pocillo	Pocillo	Pocillo	Pocillo
	1 - 3	4 - 6	7 - 9	10 - 12

Fila A	Control	5×10^{-10} M	1×10^{-9} M	1×10^{-8} M
Fila B	2×10^{-8} M	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M
Fila C	Control	5×10^{-10} M	1×10^{-9} M	1×10^{-8} M
Fila D	2×10^{-8} M	1×10^{-7} M	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M

Tabla XII: Distribución de las distintas concentraciones de L365,260 en la placa de 96 pocillos.

Añadir 0'125 μ Ci de timidina por pocillo.

Incubar en las mismas condiciones y procesar igual que en el experimento anterior.

h) MELATONINA.

Sembrar en una placa de 96 pocillos, 15.000 células por pocillo con 200 μ l de medio con suero fetal al 2'5%. Incubamos en atmósfera humidificada con CO₂ al 5% a 37°C durante 24 horas. Trascorridas las 24 horas se tira el medio sobrenadante y se añade melatonina a concentraciones $1'7 \times 10^{-9}$ M, $2'8 \times 10^{-8}$ M, $2'25 \times 10^{-7}$ M, 9×10^{-7} M, $3'9 \times 10^{-6}$ M, $3'12 \times 10^{-5}$ M, $12'5 \times 10^{-5}$ M, 25×10^{-5} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2×10^{-3} M, 4×10^{-3} M.

Preparación de las diluciones:

PM: 232'3; para preparar 10 ml de la solución 4 mM, se pesan 9'28 mg. En un tubo universal estéril se disuelven los 9'28 mg de melatonina en 250 μ l de etanol absoluto y se añaden 9750 μ l de medio con suero fetal al 2'5%. Preparamos el resto de las concentraciones a partir de ésta, diluyendo proporcionalmente según la fórmula $C \times V = C' \times V'$. Preparamos diluciones de etanol similares a las de

cada concentración para la curva control.

Añadimos a cada pocillo 200 µl de la concentración correspondiente según la distribución que se indica en la tabla XIII.

Ponemos otra placa control con la misma distribución, pero en este caso añadimos al medio sólo etanol, diluído de igual modo que en las distintas concentraciones de melatonina.

Añadimos a cada pocillo 0'125 µCi de timidina tritiada, incubamos durante 48 horas en incubadora humidificada a 37° C y atmósfera con 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se procesan de la misma forma que se describe en el apartado anterior.

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	1'7 X 10 ⁻⁹ M	2'8 X 10 ⁻⁸ M	2'25 X 10 ⁻⁷ M
Fila B	9 X 10 ⁻⁷ M	3'9 X 10 ⁻⁶ M	3'12 X 10 ⁻⁵ M	12'5 X 10 ⁻⁵ M
Fila C	25 X 10 ⁻⁵ M	5 X 10 ⁻⁴ M	1 X 10 ⁻³ M	2 X 10 ⁻³ M
Fila D	4 X 10 ⁻³ M			
Fila E	Control	1'7 X 10 ⁻⁹ M	2'8 X 10 ⁻⁸ M	2'25 X 10 ⁻⁷ M
Fila F	9 X 10 ⁻⁷ M	3'9 X 10 ⁻⁶ M	3'12 X 10 ⁻⁵ M	12'5 X 10 ⁻⁵ M
Fila G	25 X 10 ⁻⁵ M	5 X 10 ⁻⁴ M	1 X 10 ⁻³ M	2 X 10 ⁻³ M
Fila H	4 X 10 ⁻³ M			

Tabla XIII: Distribución de las distintas concentraciones de melatonina en la placa de 96 pocillos.

i) GASTRINA + MELATONINA.

Se utilizan dosis fijas de gastrina a 4×10^{-10} M y 4×10^{-9} M con distintas dosis de melatonina: $6,25 \times 10^{-5}$ M, $12,5 \times 10^{-5}$ M, 25×10^{-5} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2×10^{-3} M, 4×10^{-3} M.

Se realizan las diluciones de cada producto por separado de modo similar a lo ya expuesto, pero se prepara el doble de cada dosis a usar, añadiendo posteriormente a cada pocillo 100 μ l de la solución de gastrina y otros 100 μ l de la solución de melatonina correspondiente. Posteriormente se agrega la timidina procediendo de la misma forma que en experimentos anteriores:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	$6,25 \times 10^{-5}$ M	$12,5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila B	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M
Fila C	Control	$6,25 \times 10^{-5}$ M	$12,5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila D	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M
Fila E	Control	$6,25 \times 10^{-5}$ M	$12,5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila F	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M
Fila G	Control	$6,25 \times 10^{-5}$ M	$12,5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila H	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M

*Tabla XIV: Distribución de las distintas concentraciones de melatonina + gastrina en la placa de 96 pocillos. * Las cuatro primeras filas tienen una concentración fija de*

gastrina 4×10^{-10} M. Las cuatro últimas filas tienen una concentración fija de gastrina 4×10^{-9} M.

Ponemos otra placa control con la misma distribución, pero en este caso añadimos al medio sólo etanol, diluido de igual modo que para las distintas concentraciones de melatonina.

j) PROGLUMIDA + MELATONINA.

· Realizamos dos tipos de estudios, uno usando una dosis fija de proglumida 1×10^{-2} M y distintas dosis de melatonina: $6,25 \times 10^{-5}$ M, $12,5 \times 10^{-5}$ M, 25×10^{-5} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2×10^{-3} M, 4×10^{-3} M. En éste también preparamos las diluciones de cada producto por separado de modo similar a lo ya expuesto, pero se prepara el doble de cada dosis a usar, añadiendo posteriormente a cada pocillo 100 µl de la solución de gastrina y otros 100 µl de la solución de melatonina correspondiente. Posteriormente se agrega la timidina procediendo como en experimentos anteriores. Determinamos grupos controles con etanol, diluido de igual modo que para las distintas concentraciones de melatonina.

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	$6,25 \times 10^{-5}$ M	$12,5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila B	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M
Fila C	Control	$6,25 \times 10^{-5}$ M	$12,5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila D	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M
Fila E	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol

Fila F	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila G	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila H	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol

*Tabla XV: Distribución de las distintas concentraciones de melatonina + proglumida en la placa de 96 pocillos. Se administra una dosis fija de proglumida (10 mM) en todos los casos, excepto en los controles. * C. etanol indica "Control de etanol".*

· En otro tipo de estudio empleamos dosis fijas de melatonina 25×10^{-5} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2×10^{-3} M y distintas dosis de proglumida: 4×10^{-2} M, 2×10^{-2} M, 1×10^{-2} M, 8×10^{-3} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M. Se utilizan cuatro placas de 96 pocillos y se coloca en cada una, una dosis fija de melatonina con las distintas concentraciones de proglumida:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	8×10^{-3} M
Fila B	1×10^{-2} M	2×10^{-2} M	4×10^{-2} M	C. etanol
Fila C	Control	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	8×10^{-3} M
Fila D	1×10^{-2} M	2×10^{-2} M	4×10^{-2} M	C. etanol

*Tabla XVI: Distribución de las distintas concentraciones de proglumida + melatonina en la placa de 96 pocillos. Para cada dosis fija de melatonina, se coloca un control con la misma cantidad de etanol empleada para su dilución. * C. etanol indica "Control de etanol".*

k) LORGLUMIDA + MELATONINA.

De nuevo llevamos a cabo dos tipos de experimento:

· En uno se toma una dosis fija de lorglumida 75×10^{-6} M junto con distintas dosis de melatonina: $6'25 \times 10^{-5}$ M, $12'5 \times 10^{-5}$ M, 25×10^{-5} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2×10^{-3} M y 4×10^{-3} M. La cantidad de metanol en los controles corresponde a la dilución de lorglumida 75×10^{-6} M y la de etanol depende de las distintas concentraciones de melatonina. La tabla que representa la distribución por pocillos de las diferentes concentraciones de estos compuestos es la siguiente:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	$6'25 \times 10^{-5}$ M	$12'5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila B	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M
Fila C	Control	$6'25 \times 10^{-5}$ M	$12'5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila D	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M
Fila E	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol
Fila F	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol

Fila G	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol
Fila H	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol

Tabla XVII: Concentraciones de melatonina + lorglumida en la placa de 96 pocillos.

* C. etanol + metanol indica "Control de etanol + metanol".

· En la siguiente tabla, representamos otro tipo de estudio:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	1×10^{-6} M	10×10^{-6} M	50×10^{-6} M
Fila B	75×10^{-6} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M	
Fila C	Control	1×10^{-6} M	10×10^{-6} M	50×10^{-6} M
Fila D	75×10^{-6} M	1×10^{-4} M	5×10^{-4} M	
Fila E	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol
Fila F	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol

Fila G	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol
Fila H	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol	C. etanol + metanol

*Tabla XIX: Distribución de las distintas concentraciones de lorglumida + melatonina en la placa de 96 pocillos. Se utilizan controles con la cantidad de etanol correspondiente a la dilución fija de melatonina y metanol según las distintas concentraciones de lorglumida. * C. etanol + metanol indica "Control de etanol + metanol".*

En este caso, la concentración fija será la de melatonina (25×10^{-5} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2×10^{-3} M) y cambiarán las de lorglumida: 1×10^{-6} M, 10×10^{-6} M, 50×10^{-6} M, 75×10^{-6} M, 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M. Se utilizan cuatro placas de 96 pocillos y se coloca en cada una, la correspondiente dosis fija de melatonina con las distintas concentraciones de lorglumida.

1) DEVAZEPIDE + MELATONINA.

Siguiendo el mismo modo de actuación, se realizan ensayos de dos tipos:

· En unos se toma una dosis fija de devazepide 7×10^{-6} M y distintas dosis de melatonina: $6,25 \times 10^{-5}$ M, $12,5 \times 10^{-5}$ M, 25×10^{-5} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2×10^{-3} M y 4×10^{-3} M.

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	$6,25 \times 10^{-5}$ M	$12,5 \times 10^{-5}$ M	25×10^{-5} M
Fila B	5×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-3} M	4×10^{-3} M

Fila C	Control	$6'25 \times 10^{-5} \text{ M}$	$12'5 \times 10^{-5} \text{ M}$	$25 \times 10^{-5} \text{ M}$
Fila D	$5 \times 10^{-4} \text{ M}$	$1 \times 10^{-3} \text{ M}$	$2 \times 10^{-3} \text{ M}$	$4 \times 10^{-3} \text{ M}$
Fila E	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila F	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila G	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila H	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol

Tabla XX: Distribución de las distintas concentraciones de melatonina + devazepide en la placa de 96 pocillos. La cantidad de etanol de cada control corresponderá a empleada para la dilución fija de devazepide $7 \times 10^{-6} \text{ M}$, más las distintas concentraciones de etanol usadas para la cada dilución de melatonina..

Por otra parte, usamos una concentración fija de melatonina ($25 \times 10^{-5} \text{ M}$, $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $2 \times 10^{-3} \text{ M}$) y se combinará con distintas de devazepide: $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, $7 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, $1 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1 \times 10^{-9} \text{ M}$. Se utilizan cuatro placas de 96 pocillos y se coloca en cada una, una dosis fija de melatonina con las distintas concentraciones de devazepide:

	Pocillo 1 - 3	Pocillo 4 - 6	Pocillo 7 - 9	Pocillo 10 - 12
Fila A	Control	$1 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1 \times 10^{-7} \text{ M}$
Fila B	$1 \times 10^{-6} \text{ M}$	$7 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1 \times 10^{-5} \text{ M}$	$2 \times 10^{-5} \text{ M}$
Fila C	Control	$1 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1 \times 10^{-7} \text{ M}$
Fila D	$1 \times 10^{-6} \text{ M}$	$7 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1 \times 10^{-5} \text{ M}$	$2 \times 10^{-5} \text{ M}$

Fila E	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila F	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila G	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol
Fila H	C. etanol	C. etanol	C. etanol	C. etanol

*Tabla XXI: Distribución de las distintas concentraciones de devazepide + melatonina en la placa de 96 pocillos. * Los controles con etanol se realizarán teniendo en cuenta la cantidad del mismo empleada para la dilución de la dosis fija de melatonina y a la cantidad usada para la dilución de cada concentración de devazepide.*

DETERMINACIÓN DE NITRITOS

1. Objetivo.

Determinar la modificación que se produce en células HT-29 tras el tratamiento con los antagonistas de receptores CCK estudiados en la producción de nitritos, índice de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS).

Para comprobar la concentración de nitritos en el medio de cultivo se emplea el método estándar de Griess adaptado a una placa de 96 pocillos (Chang y cols., 1996).

2. Material.

- Naphtyl-etil-enediamina (NEDA), Sigma-Aldrich, España.
- Sulfanilamida, Sigma-Aldrich, España.
- Ácido ortofosfórico (H₃PO₄).
- NaNO₂, Sigma-Aldrich, España.
- Balanza analítica de precisión. A&D Company.
- Agitador Heidolph.
- Ultracentrífuga Beckman Optima™TL.

- Placa de 96 pocillos (EL-340: Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT).
- Espectrofotómetro. Microplate Autoreader EL-309, Bio-Tek Instruments.

3. Método.

3.1 Preparación de las muestras.

Para llevar a cabo estos experimentos las células se sembraron y trataron con el mismo método que en los estudios de proliferación. Las sustancias empleadas en este caso fueron Iorglumida y L 364,718. Concluido el período de incubación se procedió a tomar muestra de los sobrenadantes y a contar las células de cada muestra.

3.2 Preparación de los reactivos.

a) REACTIVO DE GRIESS.

- NEDA 0'1%.

Para un volumen final de 25 ml, pesar 25 mg de NEDA y disolverlo en 25 ml de agua bidestilada (milliQ). Proteger de la luz y almacenar a + 4° C. Es estable dos meses.

- SULFANILAMIDA 1% en H₃PO₄ 5% (v/v).

Para un volumen final de 25 ml, diluir 1'25 ml de H₃PO₄ en 23'75 ml de agua milliQ. En segundo lugar, pesar 250 mg de sulfanilamida que se añadirá a la dilución ya preparada. Almacenar igualmente a + 4° C un máximo de dos meses.

- Para preparar la SOLUCIÓN DE TRABAJO, mezclar las diluciones 1 y 2 en proporción 1:1 (v/v). De este modo se consigue el Reactivo de Griess con una composición final: 0'05% NEDA, 0'5% de sulfanilamida y 2'5% de ácido ortofosfórico. Este reactivo es estable durante 12 horas a 4° C, protegido de la luz.

b) NaNO₂ ESTÁNDAR.

Pesar 6'9 mg de nitrito sódico y disolverlo en 10 ml de agua destilada para una

concentración 10 mM. Se puede alicuotar y almacenar a -20° C.

Para conseguir una concentración 10 µM diluir al 1:10 tres veces.

3.3 Determinación de nitritos en los sobrenadantes.

En las dos primeras filas de la placa, se ponen distintas cantidades de la disolución de nitrito sódico, con lo que se conseguirá una curva patrón. Esta curva es la que se emplea como estándar de concentraciones de nitritos conocidas, siendo la referencia para la cuantificación de nitritos.

En las siguientes filas, ponemos el mismo volumen de la muestra problema, siempre por duplicado:

Muestra	NaNO ₂ (10 µM)	H ₂ O	Reactivo de Griess	Muestra problema	pmol en 140 µl
B		140 µl	140 µl		0
S ₂	5 µl	135 µl	140 µl		50
S ₃	10 µl	130 µl	140 µl		100
S ₄	20 µl	120 µl	140 µl		200
S ₅	40 µl	100 µl	140 µl		400
S ₆	60 µl	80 µl	140 µl		600
S ₇	80 µl	60 µl	140 µl		800
S ₈	100 µl	40 µl	140 µl		1000
S ₉	140 µl		140 µl		1400

Problema			140 μ l	140 μ l	¿?
----------	--	--	-------------	-------------	----

Tabla XXII: Cuantificación de nitritos según técnica de Griess.

En la columna de la derecha se relacionan los pmol / 140 μ l de nitritos de la curva patrón. Una vez iniciada la reacción al administrar el reactivo de Griess, se incuba a temperatura ambiente 20 minutos, procediendo a continuación a medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

La absorbancia de fondo del medio sin células se resta a cada uno de los valores del experimento.

Los datos obtenidos se procesan mediante una regresión lineal, comparando con las absorbancias de las diluciones estándares de concentraciones de nitrato sódico en agua, para obtener finalmente los picomoles de nitritos presentes en el medio. Los datos resultantes son pmol / 140 μ l de sobrenadante, por lo que habrá que calcular los pmol / ml. Finalmente los datos se expresan en picomoles por millón de células.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS/NECROSIS EN CÉLULAS HT29

1. Objetivos.

Deseamos estudiar los procesos de muerte celular, apoptosis y necrosis, que tienen lugar en nuestras células HT29, para lo que empleamos un kit de detección de apoptosis, el Genzyme TACSTM Annexin V (R&D Systems). Éste utiliza Anexina V conjugada para citometría de flujo con el fin de identificar los cambios que se producen precozmente en la superficie celular durante los procesos de apoptosis. Este kit se puede utilizar para identificar apoptosis precoz, que precede

a la fragmentación del ADN y a la rotura de la membrana celular. El conjugado Anexina V-FITC facilita una detección fluorimétrica rápida de las células apoptóticas.

La anexina V es una proteína anticoagulante que se encuentra normalmente ligada a los fosfolípidos cargados negativamente. Al principio del proceso de apoptosis, se rompe la asimetría fosfolipídica permitiendo la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana citoplásmica. Parece que esto es importante para que los macrófagos reconozcan las células que están sufriendo apoptosis (Fadock y cols., 1992; Tait y Gibson, 1992). La unión de la Anexina V con fosfatidilserina es calcio dependiente, reversible, y ocurre con una constante de disociación de aproximadamente 5×10^{-10} M (Tait y Gibson, 1992). Se estima que una molécula de Anexina V se une aproximadamente a 50 de los monómeros fosfolipídicos expuestos (Meers y Mealy, 1993).

2. Materiales.

El kit de Anexina V-FITC de Genzyme incluye Anexina V conjugada a FITC a concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, una solución tampón que favorece la unión y yoduro de propidio (IP) a concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, permitiendo un procedimiento simple en tres etapas. Las células primero se recogen y se lavan. A continuación se incuban 15 minutos con Anexina V y IP y se analizan por citometría de flujo. La combinación de Anexina V y IP permite la diferenciación entre células apoptóticas precoces (Anexina V positivas), células apoptóticas tardías y/o necróticas (Anexina V y IP positivas) y células viables (no teñidas).

Otros materiales que se requieren para llevar a cabo el ensayo son:

- PBS
- papel de aluminio

- tubos de microcentrífuga
- un citómetro de flujo
- una microcentrífuga
- pipetas ajustables (1-20 μL , 20-200 μL , y 200-1000 μL).

3. Preparación de cultivo celular.

Realizamos cultivos celulares de la forma descrita anteriormente, poniendo 2.000.000 de células en cada falcon de 25 cm^2 , y añadiendo 10 ml de medio con suero fetal al 10%. Incubamos durante 24 horas a 37° C y 5% de CO_2 , con lo que conseguimos que las células se adhieran a la placa. Pasadas 24 horas, se tira el medio de cultivo tras comprobar que las células están adheridas y confluentes, se lava con PBS y se añade a cada falcon 10 ml de la solución del producto a estudiar en medio con suero fetal al 2'5%. Se incuban durante 18 horas, pues la fuga de fosfatidilserina es un suceso precoz en la apoptosis y puede preceder a la fragmentación del ADN en varias horas. Cuando se analizan las células empleando este método, deben investigarse las primeras horas después del tratamiento.

Se procesan entre 10^5 y 10^6 células por cada 100 μl de reactivo de incubación de Anexina V. Realizamos el estudio por triplicado de células tratadas con:

- Proglumida a concentraciones 1×10^{-3} M, 1×10^{-2} M, 2×10^{-2} M.
- Lorglumida a concentraciones 25×10^{-6} M, 75×10^{-6} M, 15×10^{-5} M.
- Devazepide a concentraciones 1×10^{-6} M, 7×10^{-6} M, 1×10^{-5} M.
- Melatonina a concentraciones 5×10^{-4} M, 1×10^{-3} M, 2×10^{-3} M, 4×10^{-3} M.
- Grupo control tratado únicamente con medio con suero fetal al 2'5% y

la cantidad de cada uno de los disolventes empleados para las distintas dosis de cada producto.

- Proglumida junto con melatonina a las siguientes dosis:
 - Proglumida 1×10^{-3} M + Melatonina 1×10^{-3} M.
 - Proglumida 1×10^{-2} M + Melatonina 1×10^{-3} M.
 - Proglumida 1×10^{-3} M + Melatonina 2×10^{-3} M.
- Lorglumida junto con melatonina a las siguientes dosis:
 - Lorglumida 1×10^{-6} M + Melatonina 2×10^{-3} M.
 - Lorglumida 1×10^{-5} M + Melatonina 1×10^{-3} M.
 - Lorglumida 75×10^{-6} M + Melatonina 1×10^{-3} M.
- Devazepide junto con melatonina a las siguientes dosis:
 - Devazepide 1×10^{-8} M + Melatonina 2×10^{-3} M.
 - Devazepide 1×10^{-7} M + Melatonina 1×10^{-3} M.
 - Devazepide 7×10^{-6} M + Melatonina 1×10^{-3} M.

4. Preparación de las soluciones tampón.

Preparar 100 μ l de reactivo de incubación de Anexina V para una muestra de entre cien mil y un millón de células de la siguiente forma:

10X tampón de unión	10 μ l
Ioduro de propidio	10 μ l
Anexina V-FITC	1 μ l
Agua Milli-Q*	79 μ l
	Total 100 μ l**

Preparar 500 μ l de 1X tampón de unión para la muestra diluyendo 50 μ l de

10X tampón de unión (proporción 1:10) en 450 µl de agua Milli-Q. Conservar en frío (entre 2° y 8° C).

* El agua destilada desionizada es equivalente al agua con 18 mΩ, por ejemplo agua destilada con el sistema milli-Q.

** Es necesario preparar suficiente cantidad de reactivo para procesar todas las muestras. Este reactivo es estable durante al menos 2 horas, manteniéndolo en frío (a 4° C) y en oscuridad. La Anexina V-FITC y el IP son fotosensibles y deben mantenerse en la oscuridad el mayor tiempo posible. Se deben cubrir los tubos con papel de aluminio o ponerlos en un lugar al abrigo de la luz durante la incubación. Mantener las células en una habitación oscura después de la clasificación y durante la microscopía. Una exposición breve a la luz (30 segundos) durante el pipeteo es aceptable.

5. Preparación de las células.

Recoger las células mediante centrifugado a aproximadamente 1000 x g de 5 a 10 minutos y a temperatura ambiente (18-24° C). Previamente se liberan de su sustrato utilizando tripsina, aunque es conveniente mantener las células tripsinizadas en presencia de un 2% de albúmina de suero bovino (BSA) para prevenir posibles daños en el proceso.

Se lavan las células resuspendiéndolas en 500 µl de 1X PBS frío (entre 2-8° C) y se vuelven a centrifugar a 1000 x g de 5 a 10 minutos y a temperatura ambiente.

Se resuspenden las células, con cuidado, en el reactivo de incubación de Anexina V ya preparado, a una concentración de entre 10⁵ y 10⁶ células por cada 100 µl. Se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-24° C) en oscuridad.

Por último, se añaden 400 µl de 1X tampón de unión a cada muestra y se

procesan mediante citometría de flujo dentro de la primera hora para obtener la máxima señal de fluorescencia.

6. Citometría de flujo.

En el eje X se representa el logaritmo de la fluorescencia de Anexina V-FITC y en el Y debe aparecer la fluorescencia del IP.

Las propiedades diferentes de refracción de la luz que son distintas según las células apoptóticas, deben compensarse durante la citometría de flujo. Las células no clasificadas o no tratadas deben aparecer en el cuadrante inferior izquierdo de la representación.

Cuando se inicie un experimento, se debe calibrar el citómetro para evitar el solapamiento de espectro entre los dos canales de los tubos Fotomultiplicadores (PMT). Las células tratadas deben teñirse separadamente con Anexina V-FITC e IP para definir el límite de cada población. Las células apoptóticas clasificadas con Anexina V-FITC deben aparecer en la parte inferior derecha de la representación, sin nada en los cuadrantes superiores.

Los resultados obtenidos con las células apoptóticas deben mostrar una población de células distintas que se han ligado con Anexina V (cuadrante inferior derecho de la representación). Estas células son de apoptosis precoz. Las células Anexina V positivas que también captaron IP son células apoptóticas tardías o necróticas (cuadrante superior derecho de la representación). Además, puede darse una población de células que sean Anexina V y IP negativas (cuadrante inferior izquierdo). Estas células son viables normales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como la media \pm error estándar (ee) de al menos tres

experimentos realizados por triplicado. Para el cálculo de los valores de IC_{50} se utilizó el programa Pharms-PCS, basado en el “Manual of Pharmacological Calculations with Computer Programs” (Tallarida, R.J., Murray, R.B., eds., Springer-Verlag, New York, 1986). El análisis estadístico incluye además el análisis de la varianza (ANOVA) de una y dos vías.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Expondremos los resultados divididos en tres partes. Teniendo en cuenta que estas células tratadas con medio de cultivo con suero fetal al 2'5% (según lo señalado en el Material y Métodos) experimentan en 48 horas un crecimiento tal que prácticamente duplican su número, los datos se refieren a los resultados obtenidos a ese tiempo.

Un *primer* apartado se dedicará a la exposición de los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación celular sobre los cultivos de células HT-29 tratados con los agonistas de los receptores CCK-A (CCK-8) y CCK-B (gastrina), los antagonistas de los receptores CCK-A y/o CCK-B, y con melatonina.

El *segundo* apartado se referirá a los niveles de nitritos procedentes del tratamiento de estas células con lorglumida y devazepide (antagonistas CCK-A).

Un *tercer* apartado que hará referencia a los resultados obtenidos de los estudios de apoptosis en estos mismos cultivos tratados de la misma forma.

Todos los experimentos se han realizado al menos por triplicado y por tanto, los valores representan la media \pm error estándar de los tres valores obtenidos.

ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR

1. Efecto de agonistas y/o antagonistas de los receptores CCK-A/CCK-B.

1.1 Efecto de la Colecistoquinina (agonista del receptor CCK-A).

La **figura 10** representa los resultados de la incubación de las células HT-29 con CCK-8 a las siguientes concentraciones: 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 2×10^{-5} M y 5×10^{-5} M. Los resultados están expresados en porcentaje del número de células que crecen en el control con medio con suero fetal al 2'5% sin gastrina. Tras 48 horas de tratamiento, se aprecia una estimulación significativa de la proliferación celular con dosis entre 2×10^{-5} M y 5×10^{-5} M.

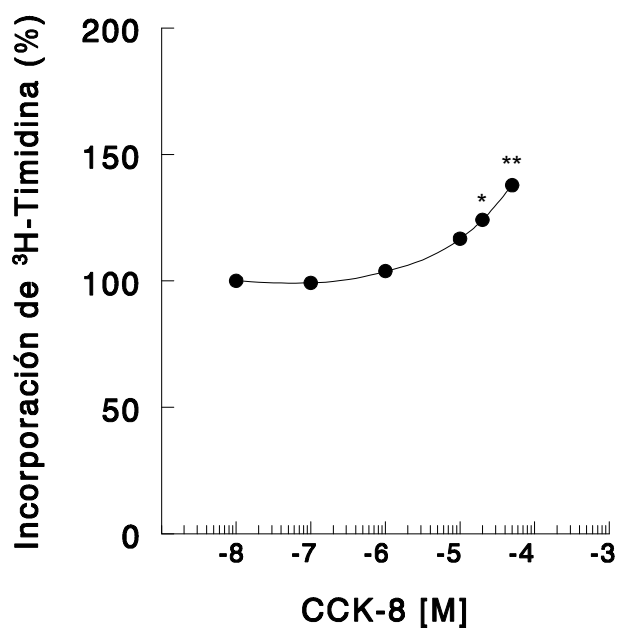


Figura 10: Efecto de CCK-8 sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de [³H] Timidina. * $p < 0.05$ vs control. ** $p < 0.001$ vs control.

1.2 Efecto de la Gastrina (agonista del receptor CCK-B).

La figura 11 representa los resultados correspondientes a los experimentos realizados tras tratar las células HT-29 con [Leu¹⁵]-Gastrina I a las siguientes concentraciones: 4×10^{-13} M, 4×10^{-12} M, 4×10^{-11} M, 4×10^{-10} M y 4×10^{-9} M. Los resultados están expresados en porcentaje del número de células que crecen en el control con medio con suero fetal al 2.5% sin gastrina. Tras 48 horas de tratamiento, no se aprecia estimulación en el crecimiento basal celular con ninguna de las dosis. La gastrina no tuvo ningún efecto significativo sobre el crecimiento basal de las células.

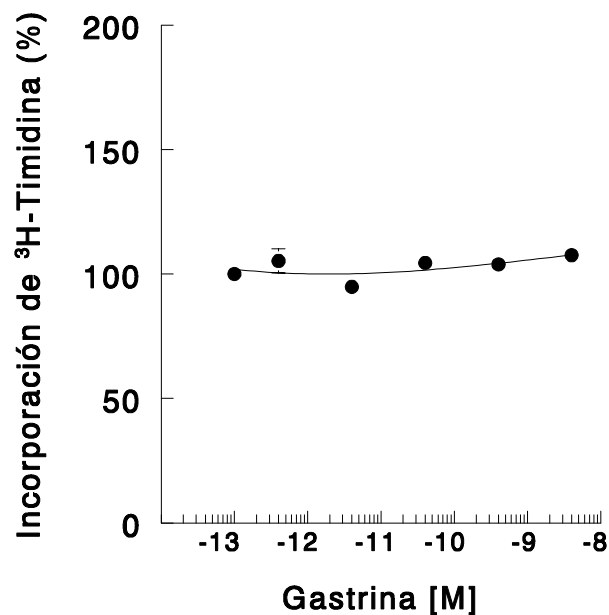


Figura 11: Efecto de $[Leu^{15}]$ -Gastrin-17 I sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de $[^3H]$ Timidina.

1.3 Efecto de la Proglumida (Antagonista CCK-A + CCK-B).

Hemos estudiado el efecto de la proglumida a concentraciones comprendidas entre 5×10^{-5} M - 8×10^{-2} M en el crecimiento de las células HT-29. Este compuesto afecta su crecimiento basal de forma dosis-dependiente. Las células fueron sembradas en pocillos. Después de 24 horas, se cambió el medio y las células fueron incubadas con medio que contenía proglumida en las concentraciones indicadas. Tras 48 horas de incubación se determinó la incorporación de $[^3H]$ Timidina. Los resultados están expresados en porcentaje del número de células que crecen en el control con medio con suero fetal al 2'5%. La

proglumida inhibió el crecimiento celular con una IC_{50} entre 6.5×10^{-3} M y 7×10^{-3} M (figura 12).

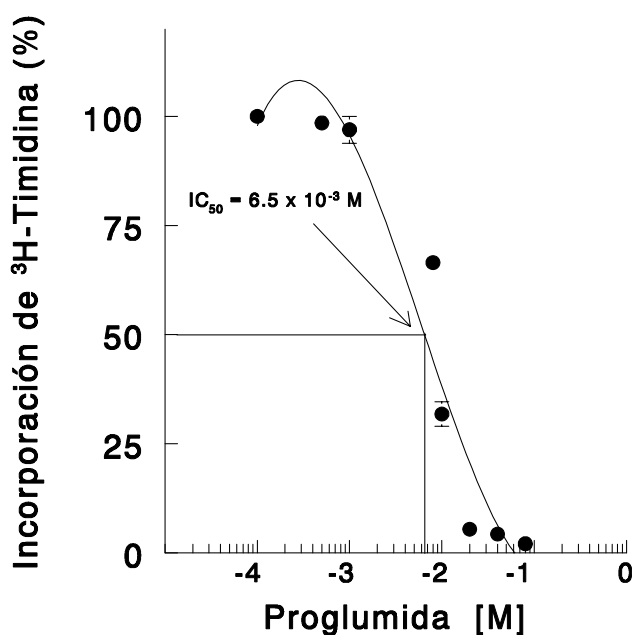


Figura 12: Efecto de proglumida sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de [^3H] Timidina.

1.4 Efecto de los antagonistas CCK-A.

a) LORGLUMIDA.

El tratamiento de las células HT-29 con lorglumida a concentraciones entre 1×10^{-6} M – 1×10^{-3} M, demostró una inhibición significativa dosis-dependiente de su crecimiento. Las células fueron sembradas en pocillos, a las 24 horas se cambió el medio y se incubaron con medio que contenía lorglumida en las concentraciones indicadas. A las 48 horas se determinó la incorporación de [^3H] Timidina. Los resultados están expresados en porcentaje del número de células

que crecen en el control con medio con suero fetal al 2'5%. La lorglumida inhibió el crecimiento de la línea celular con una IC_{50} de $69 \times 10^{-6} \text{ M}$ - $75 \times 10^{-6} \text{ M}$, lo que induce una mayor potencia que en el caso anterior (**figura 13**).

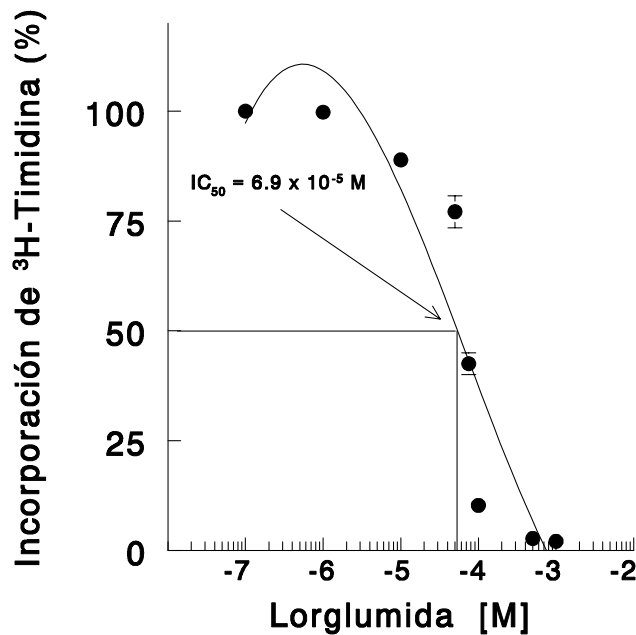


Figura 13: Efecto de lorglumida sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de [^3H] Timidina.

b) DEVAZEPIDE.

Analizamos en este caso el efecto del L364,718 ó devazepide en el crecimiento basal de células HT-29 mediante la medida de incorporación de [^3H] Timidina. Los resultados están expresados en porcentaje del número de células que crecen en el control con medio con suero fetal al 2'5%. Se usaron concentraciones de este antagonista CCK-A entre $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ y $1 \times 10^{-5} \text{ M}$,

obteniendo una inhibición dosis-dependiente en el crecimiento celular con una IC_{50} de entre 5×10^{-6} M y 5.5×10^{-6} M (**figura 14**).

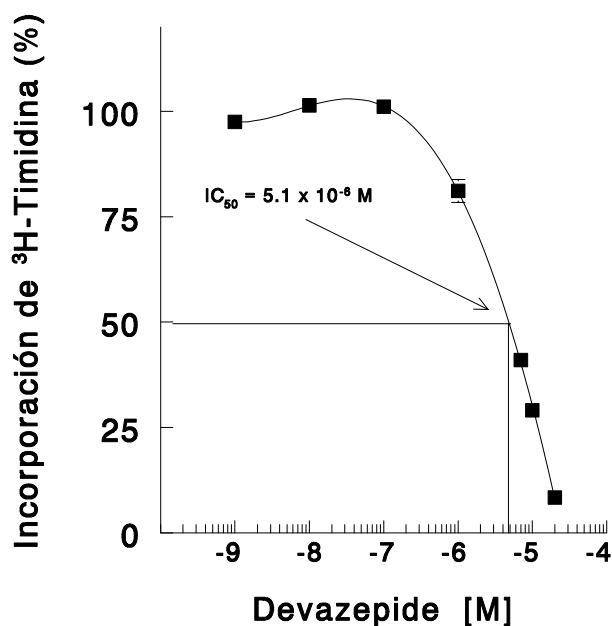


Figura 14: Efecto de devazepide sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de [^3H] Timidina.

1.5 Efecto de antagonistas CCK-B.

a) L 365,260.

En nuestras condiciones, el L365,260 no tuvo ningún efecto sobre las proliferación celular a concentraciones entre 5×10^{-10} M y 1×10^{-5} M. Las células HT-29 fueron sembradas en pocillos. Después de 24 horas, se cambió el medio y se incubaron con el L365,260. Tras 48 horas se determinó la incorporación de [^3H] Timidina (**figura 15**).

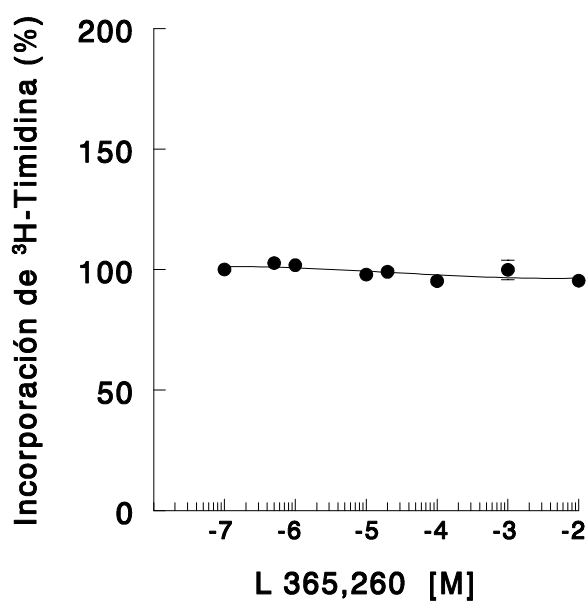


Figura 15: Efecto de L365,260 sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de [³H] Timidina.

b) PD135,158.

El PD135,158 tiene una acción antagonista del receptor CCK-B y cierta acción agonista CCK-A. Aunque por su acción agonista CCK-A podría pensarse un efecto estimulante del crecimiento celular, al igual que ocurría con el CCK-8, en nuestras condiciones, sin embargo, el tratamiento de nuestra línea celular con este compuesto a concentraciones entre 1×10^{-9} M y 1×10^{-6} M no ha modificado el crecimiento basal celular respecto al grupo control (**figura 16**).

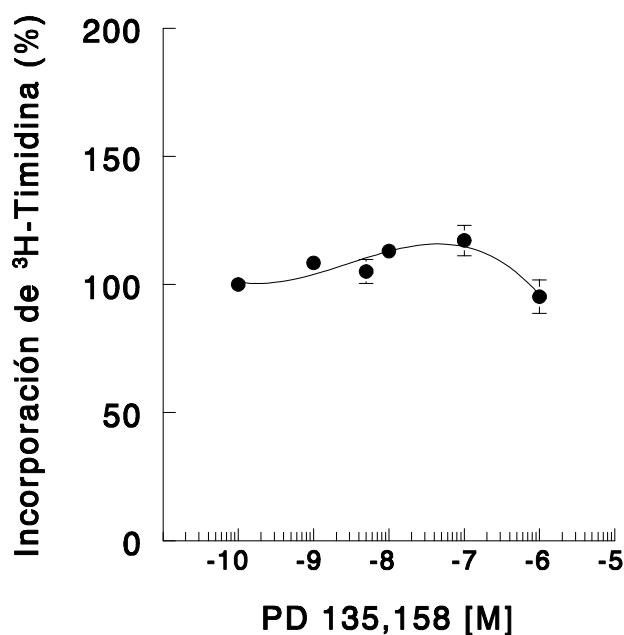


Figura 16: Efecto de PD 135,158 sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de [³H] Timidina.

2. Efecto de melatonina.

La presencia de melatonina en el medio de incubación de las células HT-29 induce una disminución significativa de la proliferación de las mismas. Estas células se cultivaron en medio con suero fetal al 2'5% durante 24 horas y posteriormente se incubaron con concentraciones de melatonina entre $1'7 \times 10^{-9}$ M y 4×10^{-3} M. La melatonina inhibe la incorporación de [³H] Timidina de forma dosis-dependiente. La IC₅₀ de la melatonina se encuentra entre $1'6 \times 10^{-3}$ M y $1'8 \times 10^{-3}$ M, no habiéndose apreciado efecto sobre el crecimiento celular por debajo de 25×10^{-5} M (figura 17).

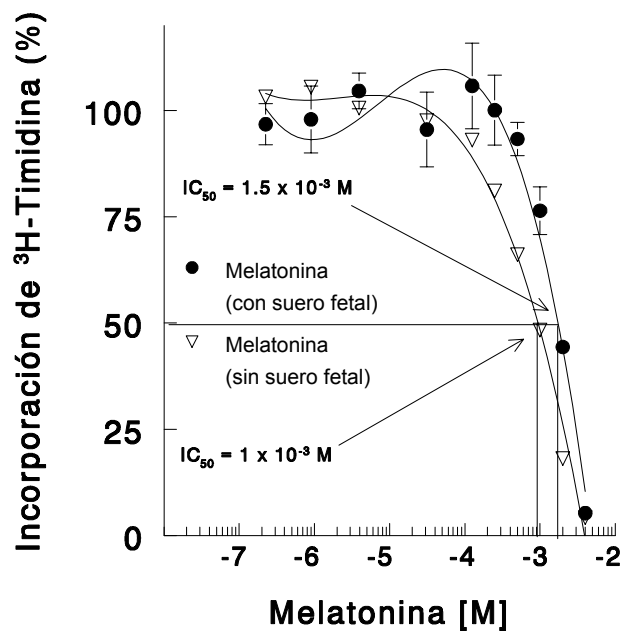


Figura 17: Efecto de melatonina sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de [³H] Timidina.

3. Efecto de la melatonina combinada con agonistas y antagonistas de los receptores CCK-A Y CCK-B.

3.1 Efecto de la gastrina sobre la curva de inhibición de la melatonina.

La **figura 18** representa el porcentaje de incorporación de [³H]-Timidina a células HT-29 tratadas con distintas concentraciones de melatonina (entre $6,25 \times 10^{-5}$ M y 4×10^{-3} M) junto con [Leu¹⁵]-Gastrina I a dos concentraciones fijas de 4×10^{-10} M y 4×10^{-9} M, respectivamente. Tras 48 horas de tratamiento, se apreció un efecto similar al de la melatonina sola sobre el crecimiento celular basal. La curva es muy similar a la obtenida tras el tratamiento con melatonina, no variando

el rango para la IC_{50} ($1,6 \times 10^{-3}$ M - $1,8 \times 10^{-3}$ M) y no detectándose diferencias significativas con cada una de las distintas concentraciones de gastrina.

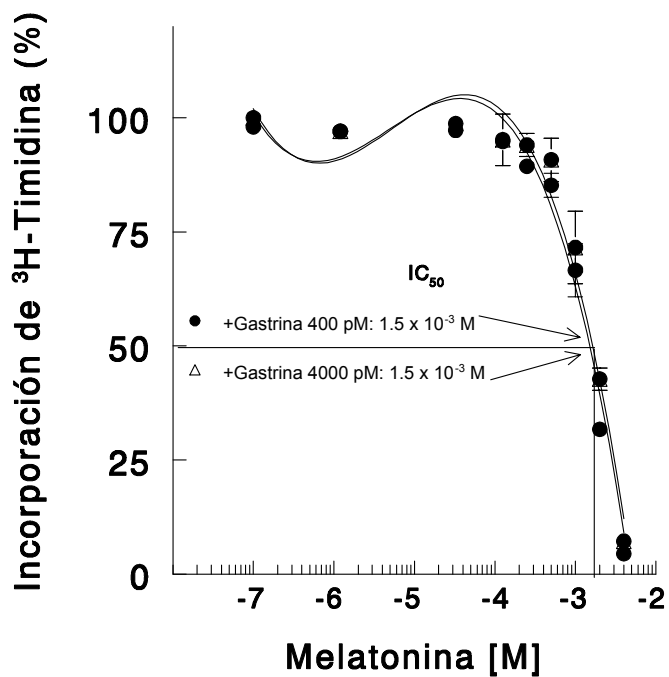


Figura 18: Efecto de melatonina + gastrina sobre el crecimiento basal de células HT-29, mediante la determinación de la incorporación de [^3H] Timidina.

3.2 Efectos de la co-incubación de proglumida (antagonista CCK-A+B) y melatonina.

a) EFFECTO DE LA PROGLUMIDA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA MELATONINA.

Estudiamos en primer lugar los cambios en el crecimiento celular basal de células HT-29 tras tratarlas con melatonina a distintas dosis ($6,25 \times 10^{-5}$ M - 4×10^{-3} M) en presencia de una concentración fija de proglumida aproximadamente igual a su IC_{50} (1×10^{-2} M), mediante la medida de incorporación de [3 H-Timidina] (**figura 19**). Se puede apreciar una importante inhibición por parte de la melatonina sobre el crecimiento celular, mucho más acusada que cuando empleamos cada sustancia por separado. En este caso la IC_{50} para la melatonina desciende a $4,3 \times 10^{-5}$ M.

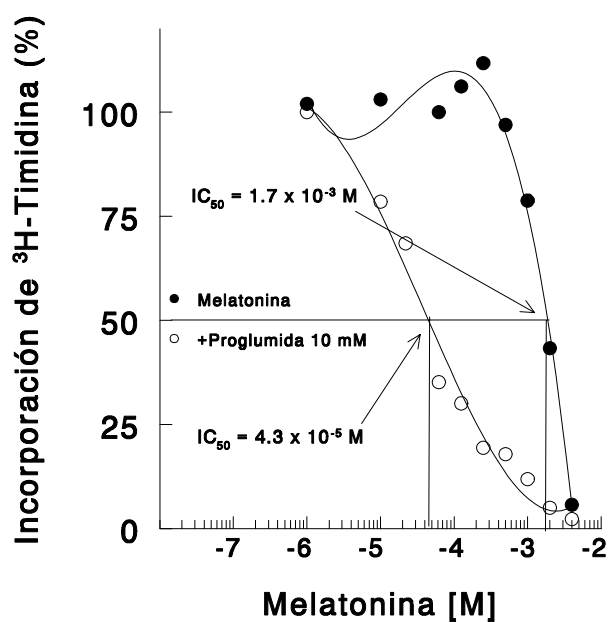


Figura 19: Efecto de proglumida 1×10^{-2} M y melatonina a distintas concentraciones ($6,25 \times 10^{-5}$ M - 4×10^{-3} M) sobre el crecimiento celular basal de HT-

29. *El efecto inhibitorio de proglumida y melatonina juntas es mucho más acusado, sumándose la acción de ambas.*

b) EFEECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA PROGLUMIDA.

En un experimento inverso, y para clarificar el efecto potenciador de la proglumida y melatonina sobre el crecimiento celular, estudiamos el efecto de distintas dosis de melatonina sobre la curva de inhibición de la proglumida. La **figura 20** muestra el resultado de tratar la línea celular con proglumida a concentraciones variables entre 5×10^{-4} M y 4×10^{-2} M, en presencia de melatonina a concentraciones fijas de 2×10^{-3} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M y $2,5 \times 10^{-4}$ M.

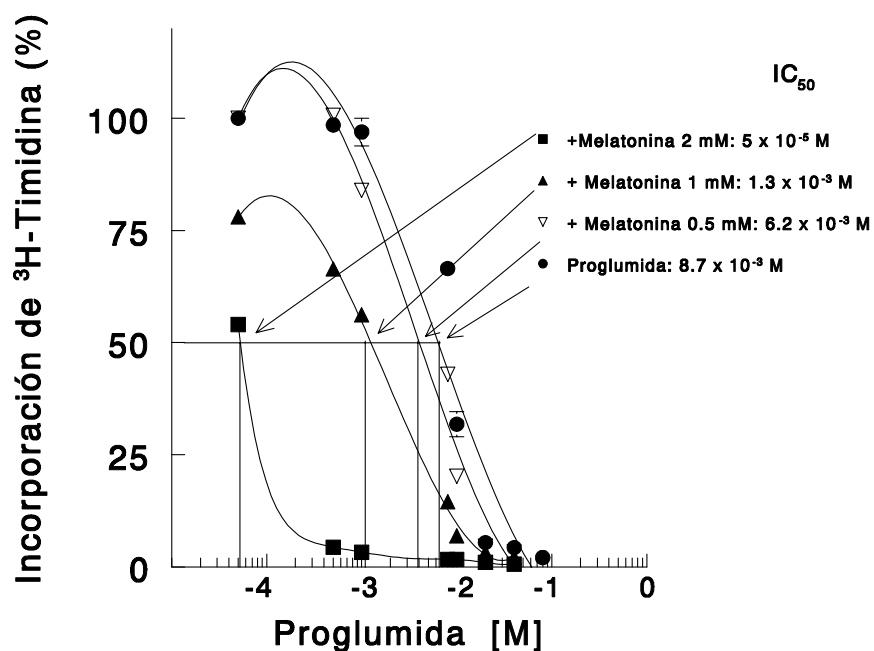


Figura 20: Efecto del tratamiento de HT-29 conjuntamente con melatonina a concentraciones fijas ($2 \times 10^{-3} M$, $1 \times 10^{-3} M$, $5 \times 10^{-4} M$ y $2.5 \times 10^{-4} M$) y proglumida a concentraciones variables (entre $5 \times 10^{-2} M$ y $4 \times 10^{-2} M$).

Se puede observar un desplazamiento a la izquierda de la curva de inhibición de proglumida por la acción de la melatonina, indicando una inhibición más potente de la proliferación celular con la combinación de estos dos productos. Así con una concentración fija de melatonina de $2 \times 10^{-3} M$, la IC_{50} para proglumida baja a $5 \times 10^{-5} M$. Cuando la concentración de melatonina es de $1 \times 10^{-3} M$, esta IC_{50} pasa a $1.3 \times 10^{-3} M$, que es de $6.2 \times 10^{-3} M$ en presencia de melatonina $5 \times 10^{-4} M$, que no difiere significativamente de su valor en ausencia de melatonina ($6.5 \times 10^{-3} M$).

3.3 Efectos de la co-incubación de lorglumida o devazepide (antagonistas del receptor CCK-A) y melatonina.

a) EFFECTO DE LA LORGLUMIDA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA MELATONINA.

Exponemos, en primer lugar, los resultados obtenidos tras la incubación de las células HT-29 con melatonina a dosis entre $6,25 \times 10^{-5}$ M y 4×10^{-3} M, en presencia de una concentración fija de lorglumida de 75×10^{-6} M.

En este caso, se observa una suma de los efectos de ambos compuestos, disminuyendo la IC_{50} para la melatonina, que desciende a $1,2 \times 10^{-4}$ M (figura 21).

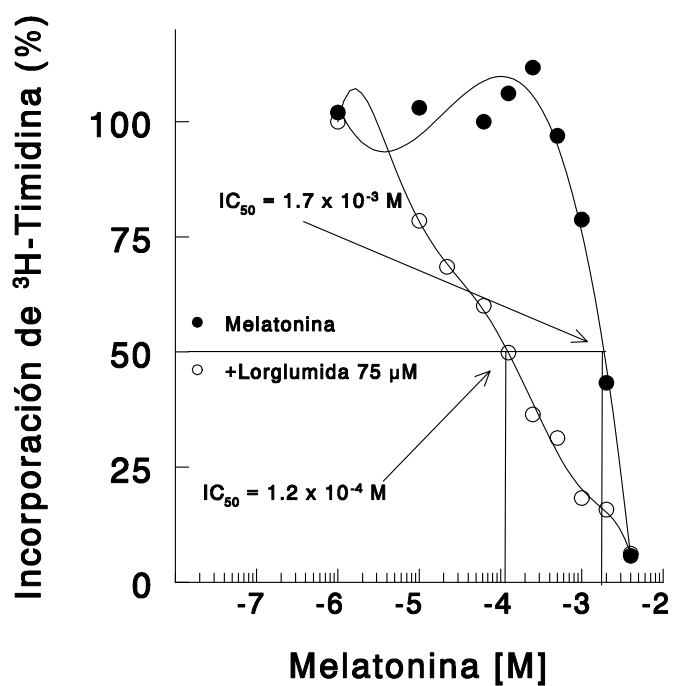


Figura 21: Curva de inhibición de melatonina en presencia de lorglumida 75

$\times 10^{-6} M (IC_{50})$.

b) EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA LORGUMIDA.

Al igual que en el caso de la proglumida, se hicieron una serie de experimentos en los cuales se estudió el efecto de dosis fijas de melatonina sobre la curva de inhibición de la lorglumida.

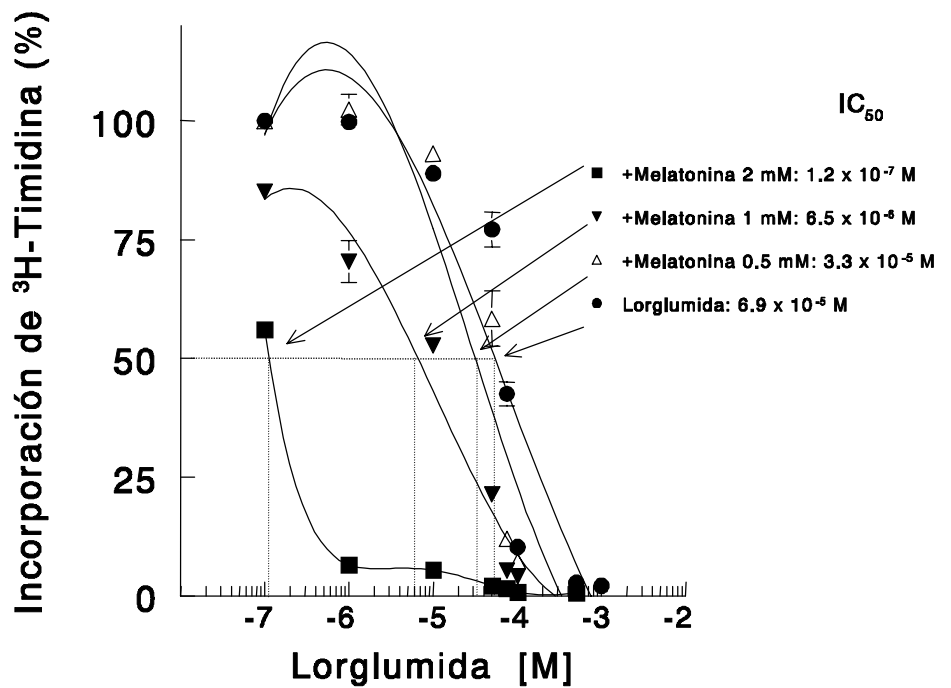


Figura 22: Curva de inhibición de lorglumida en presencia de diferentes concentraciones de melatonina.

La figura 22 muestra el resultado de tratar las células HT-29 con lorglumida a dosis entre 1×10^{-6} M y 5×10^{-4} M en presencia de concentraciones fijas de melatonina de 2×10^{-3} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M y $2,5 \times 10^{-4}$ M. Se produce un significativo desplazamiento a la izquierda de la curva de inhibición de la lorglumida, indicando un descenso de su IC_{50} . Así, a una concentración de melatonina de 2×10^{-3} M, la IC_{50} para la lorglumida desciende a $1,2 \times 10^{-7}$ M, mientras que a una concentración de melatonina de 1×10^{-3} M, le corresponde una IC_{50} de la lorglumida de $6,5 \times 10^{-6}$ M. En presencia de 5×10^{-4} M de melatonina, la IC_{50} de la lorglumida es $3,3 \times 10^{-5}$ M. Finalmente, con melatonina $2,5 \times 10^{-4}$ M, la IC_{50} de lorglumida no difiere significativamente de la de la lorglumida sola (69×10^{-6} M).

c) EFFECTO DEL DEVAZEPIDE SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DE LA MELATONINA.

El devazepide y la melatonina producen una inhibición del crecimiento celular basal de HT-29 de forma individual. Al incubar dichas células con melatonina a distintas dosis ($6,25 \times 10^{-5}$ M - 4×10^{-3} M), en presencia de una concentración fija de devazepide de 7×10^{-6} M (próxima a su IC_{50}), se observa una mayor inhibición del crecimiento celular por parte de la melatonina.

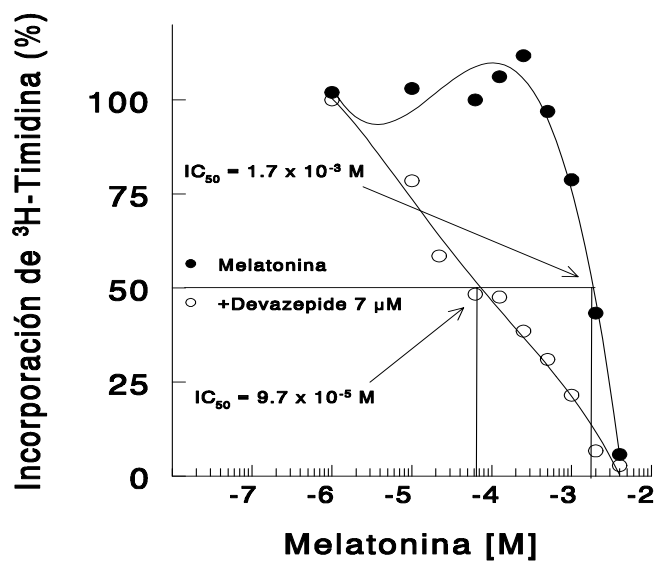


Figura 23: Curva de inhibición de melatonina en presencia de devazepide 7 $\times 10^{-6}$ M.

Así, en este caso, la IC₅₀ de la melatonina pasa a ser de 9.7×10^{-5} M.

d) EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA CURVA DE INHIBICIÓN DEL DEVAZEPIDE.

La figura 24 corresponde al tratamiento de la línea celular con devazepide a concentraciones variables entre 1×10^{-9} M y 2×10^{-5} M, en presencia de melatonina a concentraciones fijas de 2×10^{-3} M, 1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M y 2.5×10^{-4} M. Se puede observar que, al igual que en casos anteriores, la curva de inhibición del devazepide se desplaza a la izquierda con concentraciones crecientes de melatonina, indicando una disminución significativa de los valores de IC₅₀ para esta última. Así con una concentración fija de melatonina de 2×10^{-3} M, la IC₅₀ para devazepide es de 1.7×10^{-9} M. Cuando la concentración de

melatonina es de 1×10^{-3} M, esta IC_{50} pasa a un valor de 2.3×10^{-7} M. A una concentración de melatonina de 5×10^{-4} M, la IC_{50} para el devazepide es de 1.8×10^{-6} M, todavía significativamente diferente de la del devazepide sólo (5.1×10^{-6} M).

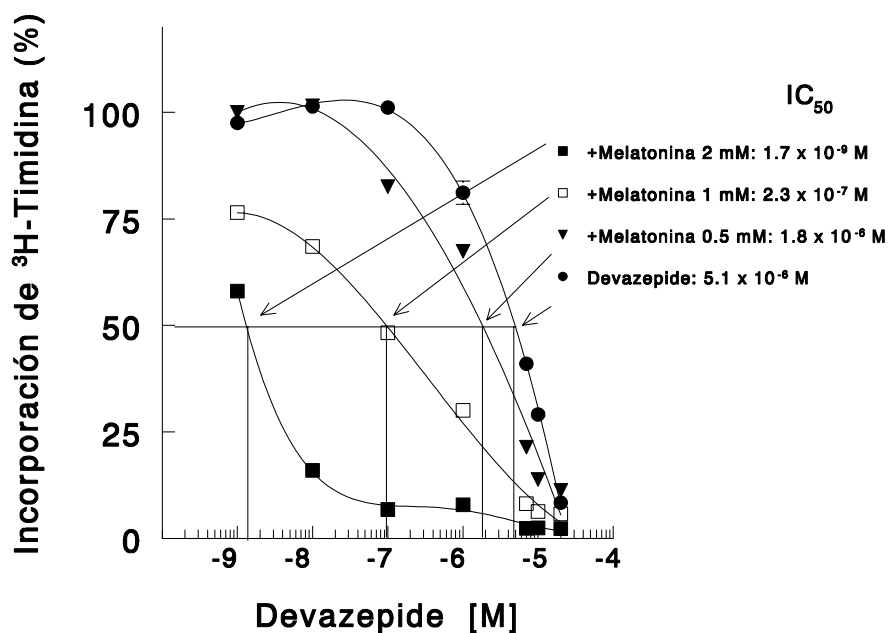


Figura 24: Curva de inhibición de devazepide en presencia de diferentes concentraciones de melatonina.

4. Resumen de los datos de IC_{50} obtenidos en los experimentos anteriores.

En las tablas siguientes se representan los valores de las medias \pm errores estándar de las IC_{50} obtenidas en todos los experimentos descritos anteriormente, así como el grado de significación estadística de acuerdo con las distintas dosis empleadas.

	Agonista		Antagonista		
	CCK-A	CCK-B	CCK-A/CCK-B	CCK-A	CCK-B
CCK-8	(*)	---	----	----	----
Gastrina-17	----	0	----	----	----
Proglumida	----	----	$6.5 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ M}$	----	----
Lorglumida	----	----	----	$6.9 \pm 0.1 \times 10^{-5} \text{ M}$	----
Devazepide	----	----	----	$5.1 \pm 0.2 \times 10^{-6} \text{ M}$	----
L365,260	----	----	----	----	0
PD135,158	----	----	----	----	0

(*): estimula la proliferación celular

Tabla XXIII: Valores de las IC_{50} (M) para cada uno de los distintos compuestos empleados en el tratamiento de las células HT-29

Tabla XXIV: Valores de las IC_{50} para la melatonina.	
Compuesto	IC_{50}
Melatonina	$1.7 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{ M}$
Melatonina + Gastrina 400 pM	$1.7 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{ M}$
Melatonina + Gastrina 4000 pM	$1.7 \pm 0.04 \times 10^{-3} \text{ M}$
Melatonina + Proglumida 10 mM	$4.3 \pm 0.06 \times 10^{-5} \text{ M}^{**}$
Melatonina + Lorglumida 75 μM	$1.2 \pm 0.02 \times 10^{-4} \text{ M}^{**}$
Melatonina + Devazepide 7 μM	$9.7 \pm 0.03 \times 10^{-5} \text{ M}^{**}$
**P < 0.0001 vs melatonina	

Tabla XXV: Valores de las IC₅₀ de las curvas de inhibición de los antagonistas CCK-A y/o CCK-B en presencia de melatonina

Compuesto	IC₅₀
Proglumida	$6.5 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ M}$
Proglumida + Melatonina 0.5 mM	$6.2 \pm 0.03 \times 10^{-3} \text{ M}$
Proglumida + Melatonina 1 mM	$1.3 \pm 0.02 \times 10^{-3} \text{ M}$
Proglumida + Melatonina 2 mM	$5 \pm 0.04 \times 10^{-5} \text{ M}^{**}$
Lorglumida	$6.9 \pm 0.07 \pm 0.1 \times 10^{-5} \text{ M}$
Lorglumida + Melatonina 0.5 mM	$3.3 \pm 0.05 \times 10^{-5} \text{ M}$
Lorglumida + Melatonina 1 mM	$6.5 \pm 0.03 \times 10^{-6} \text{ M}^{**}$
Lorglumida + Melatonina 2 mM	$1.2 \pm 0.06 \times 10^{-7} \text{ M}^{**}$
Devazepide	$5.1 \pm 0.08 \pm 0.2 \times 10^{-6} \text{ M}$
Devazepide + Melatonina 0.5 mM	$1.8 \pm 0.05 \times 10^{-6} \text{ M}^*$
Devazepide + Melatonina 1 mM	$2.3 \pm 0.05 \times 10^{-7} \text{ M}^{**}$
Devazepide + Melatonina 2 mM	$1.7 \pm 0.1 \times 10^{-9} \text{ M}^{**}$
* P< 0.001 vs devazepide; **P<0.0001 vs proglumida, lorglumida o devazepide	

Valores IC_{50} de los distintos productos combinados con melatonina en el tratamiento de HT-29. En la columna correspondiente a melatonina se refleja el valor al que desciende la IC_{50} para ésta al tratar la línea celular con la IC_{50} del producto combinado con ella. Por el contrario, en la casilla correspondiente a cada producto en concreto, se representa el valor al que desciende la IC_{50} del mismo al combinarlo con la IC_{50} de melatonina.

DETERMINACIÓN DE NITRITOS.

En este apartado, exponemos el efecto de la administración de distintas dosis de lorglumida y L364,718 sobre los niveles de nitritos en el sobrenadante del cultivo celular HT-29 tratado con estos productos.

1. Efecto de la lorglumida.

La lorglumida induce una disminución dosis-dependiente de los niveles de nitritos respecto del grupo control en las células HT-29.

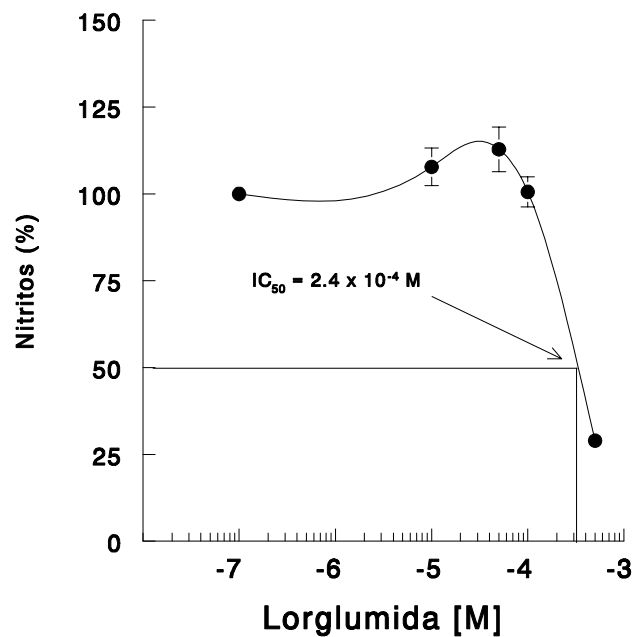


Figura 25: Efecto de la lorglumida sobre los niveles basales de nitritos en el sobrenadante de cultivos HT-29.

Se realizaron experimentos con concentraciones crecientes de lorglumida (entre 1×10^{-5} M y 5×10^{-4} M). La **figura 25** representa los cambios en el porcentaje de nitritos, apreciándose un descenso evidente en sus niveles a partir de una concentración 1×10^{-4} M.

2. Efecto del devazepide.

La incubación con devazepide produce una disminución dosis-dependiente de los niveles de nitritos en las células HT-29 respecto del grupo control. Se realizaron experimentos con concentraciones crecientes de devazepide (entre 1×10^{-7} M y 2×10^{-5} M).

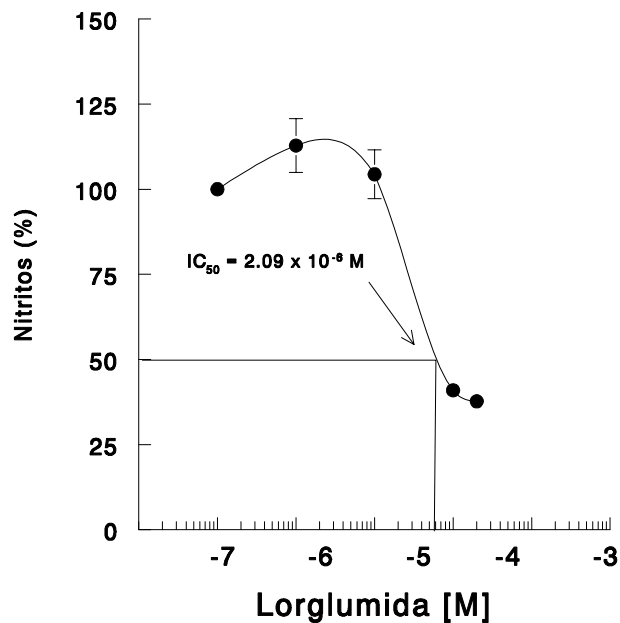


Figura 26: Efecto del devazepide sobre los niveles basales de nitritos en el sobrenadante de cultivos HT-29.

La **figura 26** representa el porcentaje de nitritos con cada concentración de devazepide respecto del grupo control. Se aprecia un descenso evidente en la concentración de nitritos a partir de una dosis de devazepide 1×10^{-6} M.

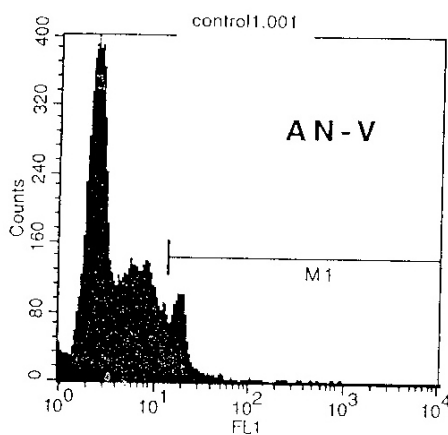
DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS Y NECROSIS.

Las modificaciones de viabilidad celular cuando incubamos las células HT-29 en presencia de los distintos compuestos estudiados se analizaron mediante un kit de detección de apoptosis, el Genzyme TACSTM Annexin V, que utiliza Anexina

V conjugada para citometría de flujo con el fin de identificar los cambios que se producen precozmente en la superficie celular durante los procesos de apoptosis. En cambio, las células necróticas captan yoduro de propidio (Material y Métodos).

1. Grupo control.

La **figura 27** muestra el porcentaje de células que presentan apoptosis (10'8 %) y necrosis (14'39 %) dentro del grupo control de células HT-29 incubadas únicamente con medio con suero fetal al 10 % en las primeras 24 horas y con medio con suero fetal al 2'5 % en las 18 horas restantes, según lo especificado en el apartado "Material y Métodos". Las células con apoptosis precoz son marcadas por su unión a la Anexina V, mientras que las que experimentan fenómenos de necrosis, que en este caso son el 14'39 %, incorporan yoduro de propidio.

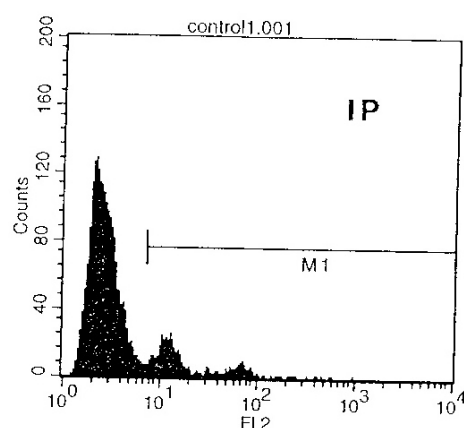


File: control1.001
Gated Events: 10000
X Parameter: FL1 (Log)

AN - V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	1080	10.80

% Total 10.80



File: control1.001
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	1439	14.39

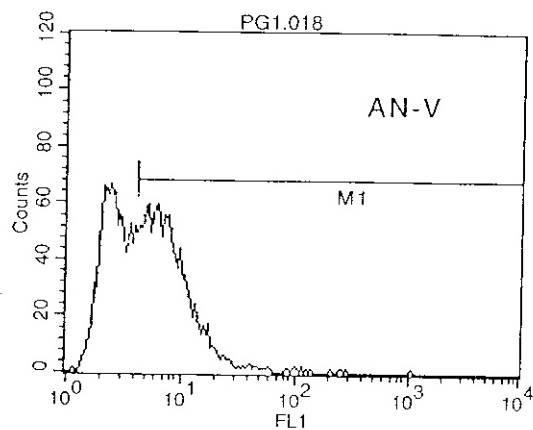
% Total 14.39

Figura 27: Porcentaje de células apoptóticas (10'8 %) y necróticas (14'39 %) determinadas en el grupo control de células HT-29.

2. Efecto de antagonistas CCK-A y CCK-B.

2.1 Proglumida.

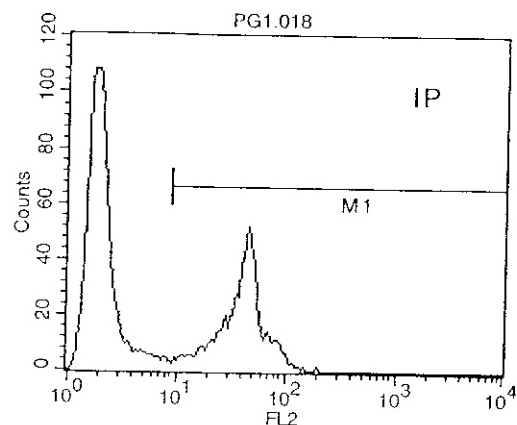
Hemos empleado tres dosis en torno a la IC₅₀ de proglumida obtenida en los experimentos de incorporación de [³H-Timidina], para comprobar el efecto de este antagonista CCK-A y CCK-B sobre la línea HT-29. Para una concentración de proglumida 1×10^{-3} M obtenemos un porcentaje de adhesión a Anexina V del 55'52 %, mientras que la incorporación de yoduro de propidio es de 37'81 %. Con proglumida 1×10^{-2} M el porcentaje de apoptosis obtenido es del 64'83 %, y el de necrosis de 30'65 %.



File: PG1.018
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

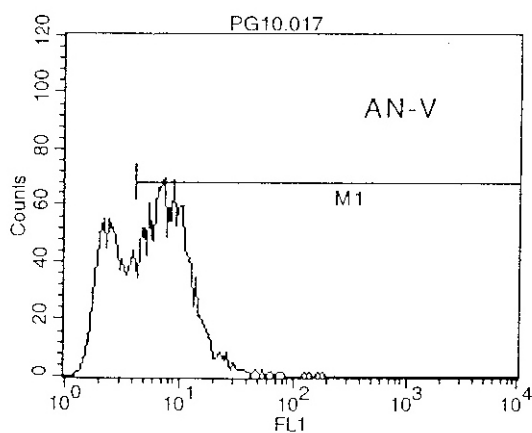
Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	5552	55.52	% Total 55.52



File: PG1.018
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

IP

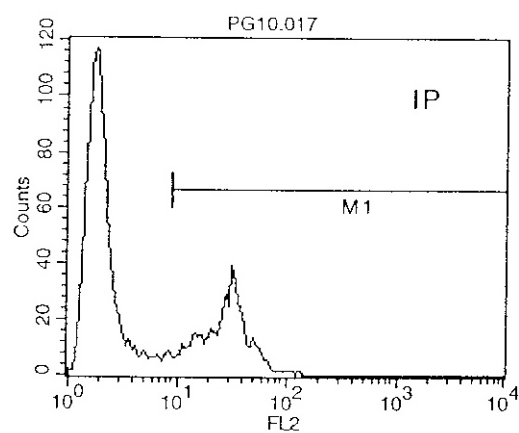
Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	3781	37.81	% Total 37.81



File: PG10.017
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	6483	64.83	% Total 64.83

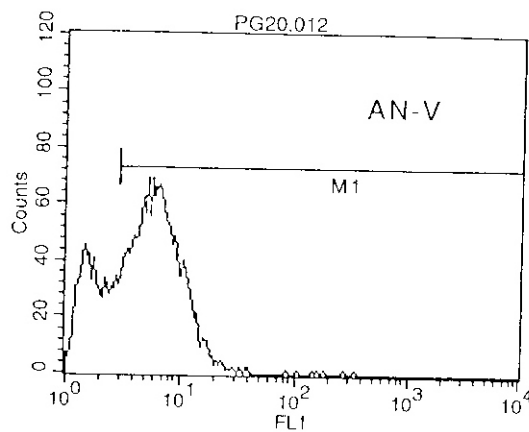


File: PG10.017
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	3065	30.65	% Total 30.65

Figura 28: Porcentaje de apoptosis y necrosis en células HT-29 tratadas con proglumida $1 \times 10^{-3} M$ y $1 \times 10^{-2} M$.

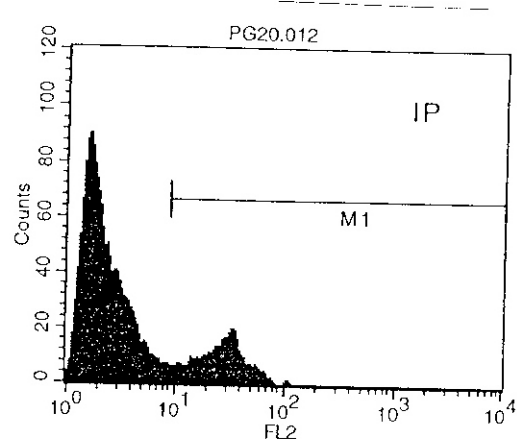


File: PG20.012
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	7208	72.08

% Total 72.08



File: PG20.012
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	2086	20.86

% Total 20.86

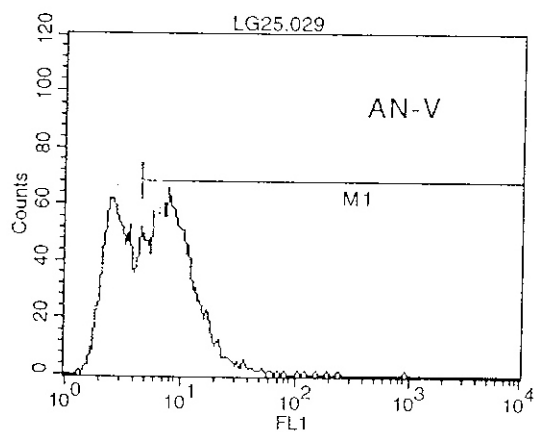
Figura 29: Porcentaje de apoptosis y necrosis en células HT-29 tratadas con proglumida 2×10^{-2} M.

La máxima concentración de proglumida empleada es 2×10^{-2} M, siendo el porcentaje de apoptosis resultante 72'08 %, y el de necrosis 20'86 %.

2.2 Lorglumida.

El tratamiento con lorglumida de HT-29 produce una inhibición del crecimiento celular basal a dosis crecientes como hemos observado anteriormente. Cuando analizamos el papel que desempeña respecto a estos procesos de muerte celular, encontramos que a concentraciones crecientes 25×10^{-6} M, 75×10^{-6} M y 15×10^{-5} M no hay grandes variaciones en el porcentaje de células apoptóticas detectadas, estando éste entre 60-73 %. También el porcentaje de células necróticas se encuentra en un rango entre 26-38 % para todas las concentraciones. Una concentración 25×10^{-6} M induce apoptosis en el 60'97 % y necrosis en un

32'79 %. Lorglumida a una concentración 75×10^{-6} M (próxima a la IC_{50}) induce un porcentaje de apoptosis en nuestra línea celular de 72'6 %, mientras que el de necrosis es de 26'07 %. Lorglumida 15×10^{-5} M induce la adhesión de Anexina V en un 69'12 %, y la incorporación de yoduro de propidio en un 37'8 %.

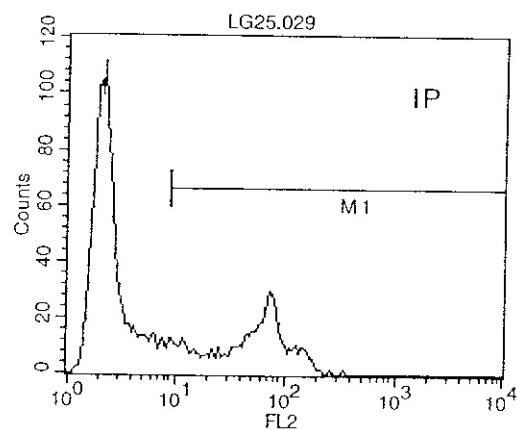


File: LG25.029
Gated Events: 10000
X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	6097	60.97

% Total 60.97



File: LG25.029
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2 (Log)

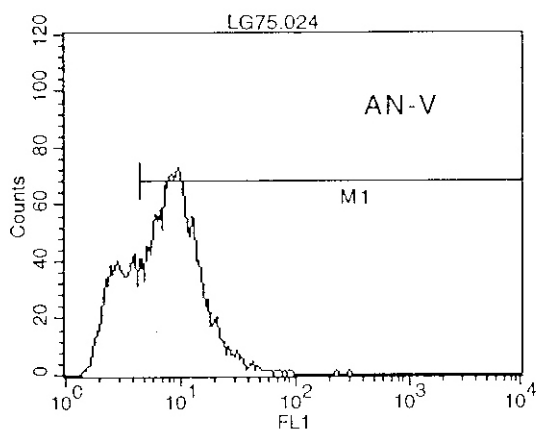
IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	3279	32.79

% Total 32.79

Figura 30: Porcentaje de apoptosis y necrosis en células HT-29 tratadas con lorglumida

$25 \times 10^{-6} M$.

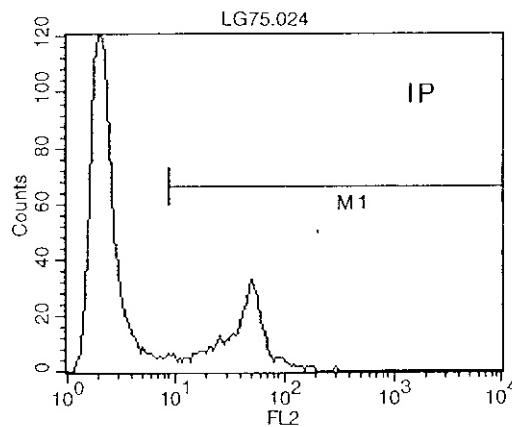


File: LG75.024
Gated Events: 10000
X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	7260	72.60

% Total 72.60

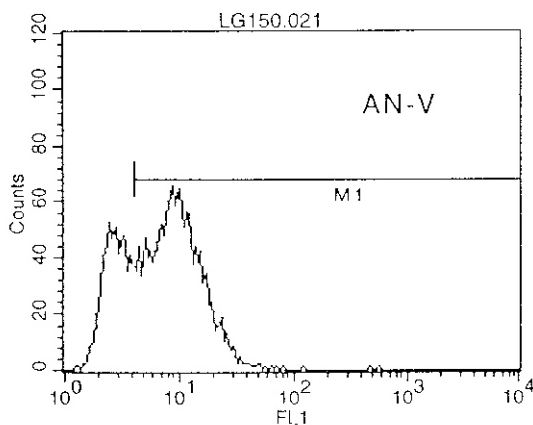


File: LG75.024
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	2607	26.07

% Total 26.07

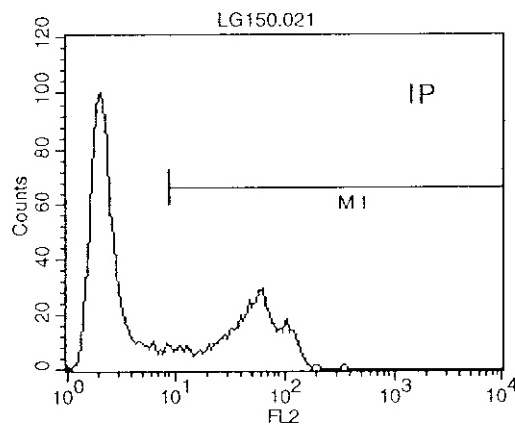


File: LG150.021
Gated Events: 10000
X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	6912	69.12

% Total 69.12



File: LG150.021
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	3780	37.80

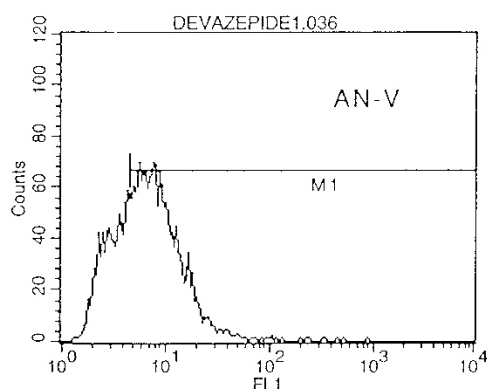
% Total 37.80

Figura 31: Porcentaje de apoptosis y necrosis en células HT-29 tratadas con lorglumida $75 \times 10^{-6} M$ y $15 \times 10^{-5} M$.

2.3 Devazepide ó L364,718.

Este antagonista del receptor CCK-A produce una inhibición del crecimiento basal de HT-29 a dosis crecientes, e induce apoptosis en un porcentaje que no varía significativamente para ninguna de las tres dosis empleadas, siendo éste del 64 – 70 %. El porcentaje de necrosis identificada tampoco experimenta variaciones, estando entre el 32 – 38 %.

Para una concentración de devazepide $1 \times 10^{-6} M$, se evidencia un porcentaje de unión a Anexina V de 69'16 % y a ioduro de propidio de 32'18 %. El tratamiento de esta línea celular con devazepide $7 \times 10^{-6} M$ (próxima a la IC_{50}), provoca un porcentaje de apoptosis de 64'35 % y de necrosis de 37'14 %. Tras el tratamiento durante 18 horas de HT-29 con devazepide $1 \times 10^{-5} M$, la unión a Anexina V se produce en un 65'04 y a ioduro de propidio en un 33'99 %.

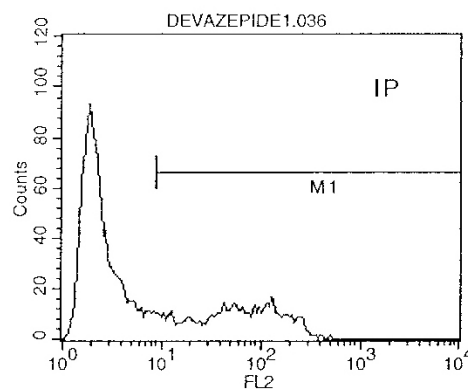


File: DEVAZEPIDE1.036
Gated Events: 10000
X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	6916	69.16

% Total 69.16



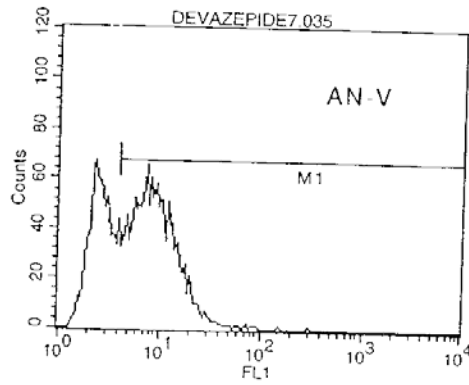
File: DEVAZEPIDE1.036
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	3218	32.18

% Total 32.18

Figura 32: Porcentaje de apoptosis y necrosis en células HT-29 tratadas con devazepide 1×10^{-6} M.

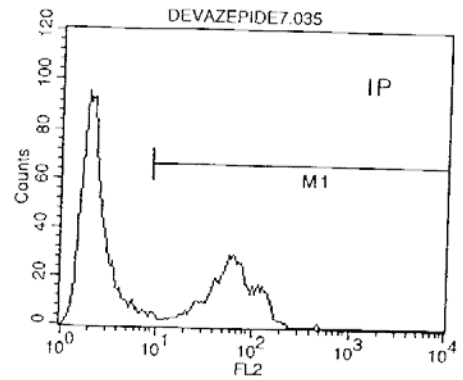


File: DEVAZEPIDE7.035
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	6435	64.35

% Total 64.35

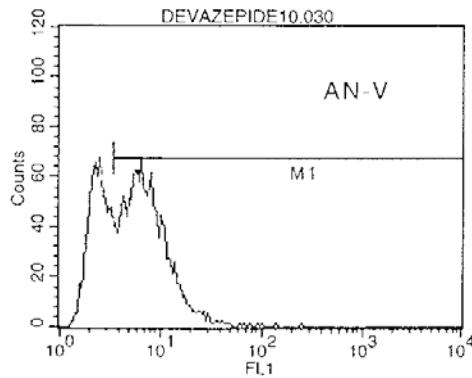


File: DEVAZEPIDE7.035
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	3714	37.14

% Total 37.14

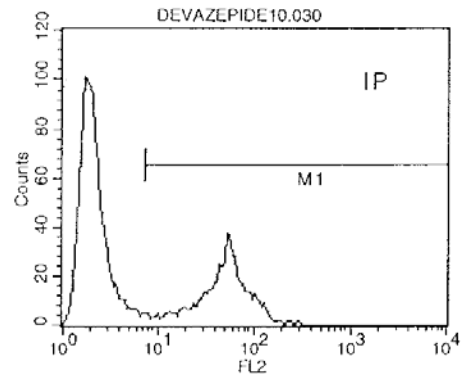


File: DEVAZEPIDE10.030
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	6504	65.04

% Total 65.04



File: DEVAZEPIDE10.030
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	3399	33.99

% Total 33.99

Figura 33: Porcentaje de apoptosis y necrosis en células HT-29 tratadas con devazepide $7 \times 10^{-6} M$ y $1 \times 10^{-5} M$.

3. Efecto de melatonina.

El tratamiento con melatonina de HT-29 a una concentración 5×10^{-4} M inhibe el crecimiento celular basal de las mismas aproximadamente un 20 % respecto del grupo control, pero no produce variaciones significativas en el porcentaje de apoptosis (16'7 %) y necrosis (14'31 %) respecto del grupo control. Con el tratamiento con melatonina a concentración 1×10^{-3} M, el porcentaje de adhesión a Anexina V pasa a ser de 24'43 %, mientras que la unión a yoduro de propidio se produce en un 67'82 %. Para una concentración de melatonina 2×10^{-3} M (próxima a IC_{50}), el porcentaje de incorporación de yoduro de propidio apenas varía respecto al caso anterior, siendo de 61'28 %; en cambio, el porcentaje de unión a Anexina V aumenta prácticamente al doble, siendo ahora de 40'04 %.

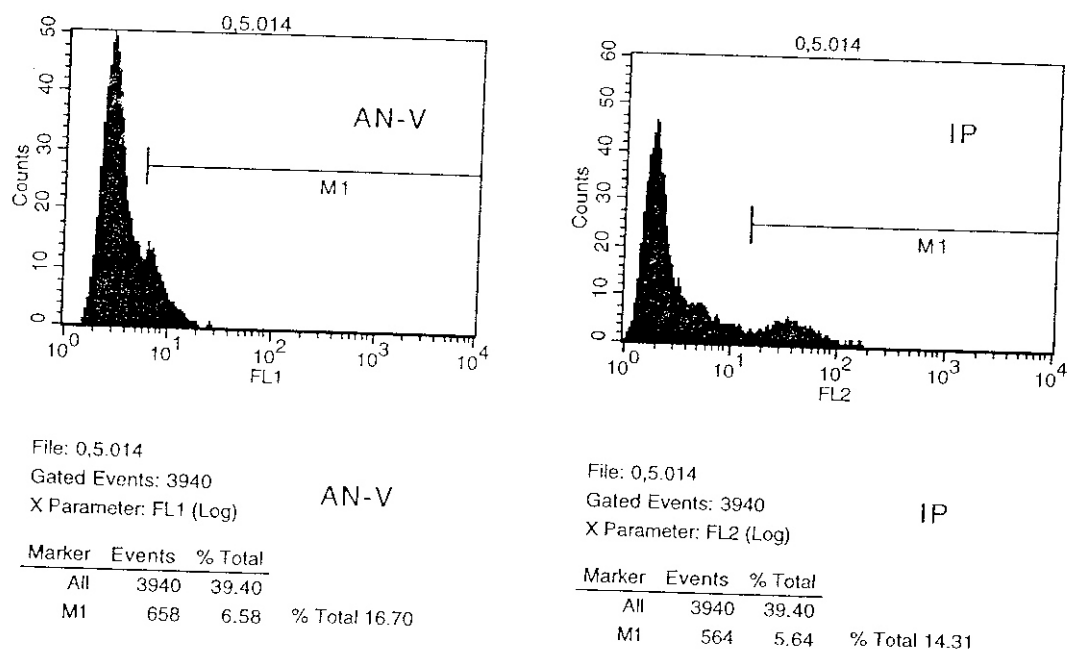
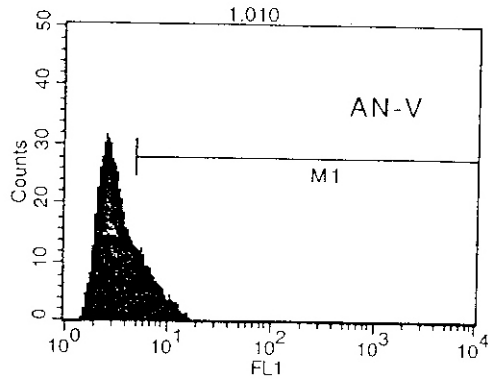
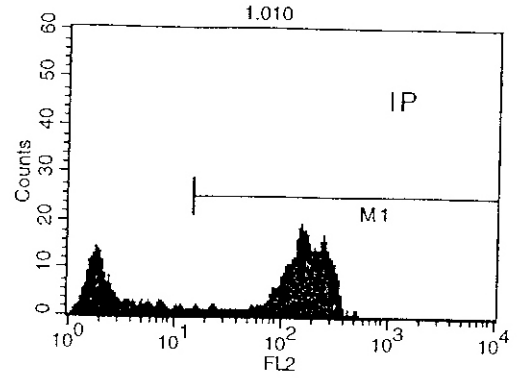


Figura 34: Porcentaje de apoptosis y necrosis en HT-29 tratadas con melatonina 5×10^{-4} M.



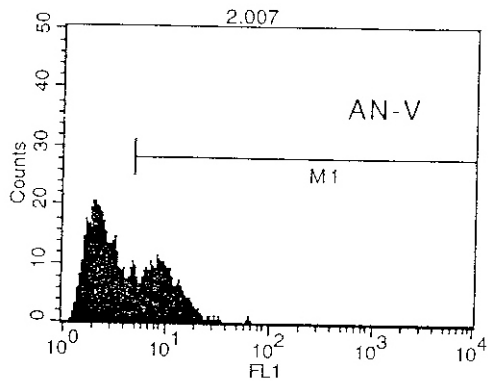
File: 1.010
Gated Events: 2934
X Parameter: FL1 (Log)

Marker	Events	% Total	
All	2934	29.34	
M1	717	7.17	% Total 24.43

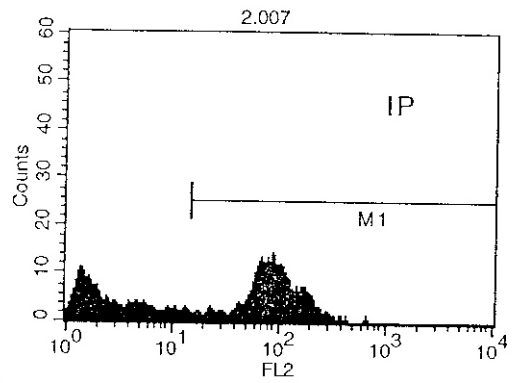


File: 1.010
Gated Events: 2934
X Parameter: FL2 (Log)

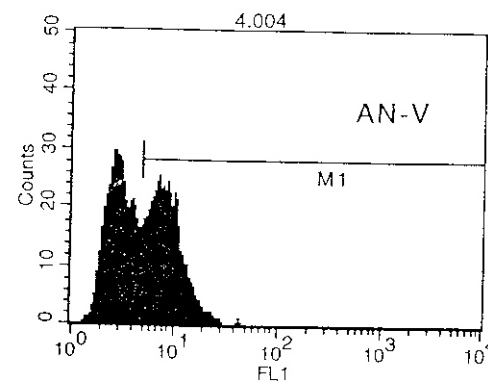
Marker	Events	% Total	
All	2934	29.34	
M1	1990	19.90	% Total 67.82



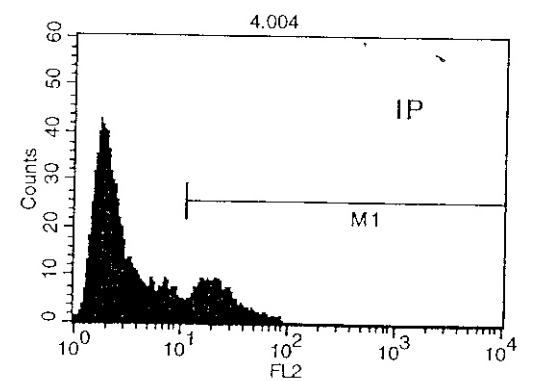
Marker	Events	% Total	
All	2547	25.47	
M1	1002	10.02	% Total 40.04



Marker	Events	% Total	
All	2547	25.47	
M1	1561	15.61	% Total 61.28



Marker	Events	% Total	
All	4368	43.68	
M1	2215	22.15	% Total 50.7



Marker	Events	% Total	
All	4368	43.68	
M1	908	9.08	% Total 20.78

Figura 35: Porcentaje de apoptosis y necrosis en HT-29 tratadas con melatonina $1 \times$

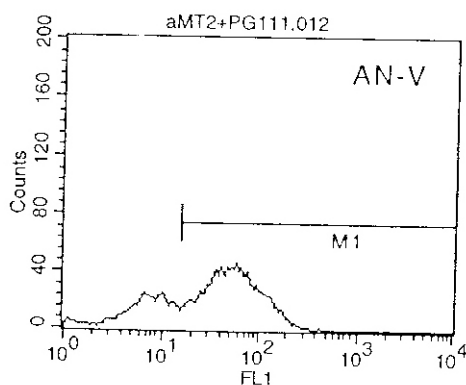
$10^{-3} M$, $2 \times 10^{-3} M$ y $4 \times 10^{-3} M$.

El tratamiento de la línea celular durante 18 horas con melatonina 4×10^{-3} M proporciona un porcentaje de células necróticas mucho menor (20'78 %), en cambio el porcentaje de células apoptóticas aumenta al 50'7 %.

4. Efecto de melatonina + antagonistas CCK-A y CCK-B.

4.1 Melatonina + proglumida.

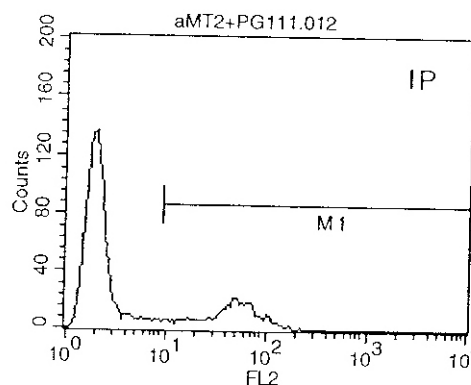
El efecto de proglumida y melatonina sobre el crecimiento celular basal de HT-29 era complementario en los estudios de incorporación de [3 H-timidina], sumándose las acciones inhibitorias de ambos. Cuando empleamos una concentración de melatonina 2×10^{-3} M junto con una de proglumida 1×10^{-3} M durante 18 horas, el porcentaje de células que se unen a Anexina V es de 70'77 %. En cambio, las células que incorporan yoduro de propidio son de 24'13 %.



Histogram Statistics

File: aMT2+PG111.012
 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: aMT2+PG111
 Acquisition Date: 20-May-99
 Total Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Total
All	1, 9910	10000	100.00
M1	16, 9910	7077	70.77



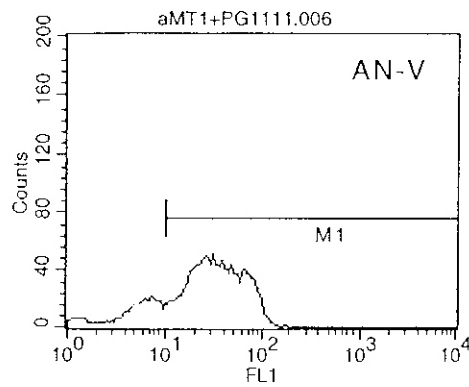
Histogram Statistics

File: aMT2+PG111.012
 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: aMT2+PG111
 Acquisition Date: 20-May-99
 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

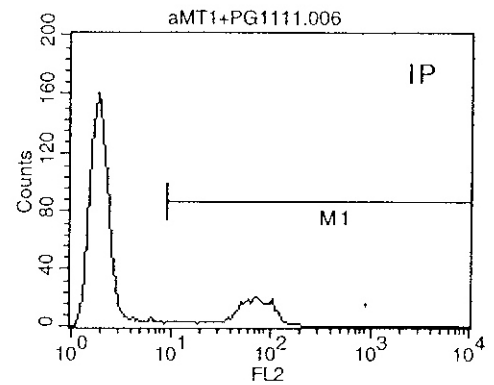
Marker	Left, Right	Events	% Total
All	1, 9910	10000	100.00
M1	9, 9910	2413	24.13

Figura 36: Porcentaje de apoptosis y necrosis en HT-29 tratadas con melatonina 2×10^{-3} M y proglumida 1×10^{-3} M conjuntamente.

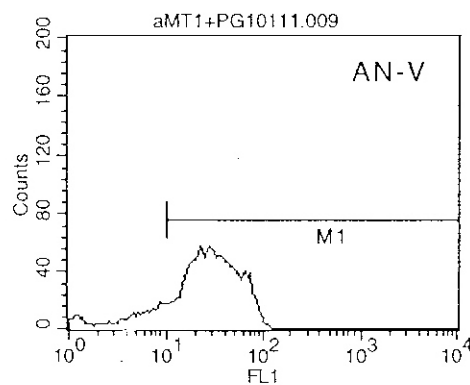
Si la concentración de melatonina es 1×10^{-3} M se administra junto con proglumida 1×10^{-3} M el porcentaje de apoptosis que determinamos es 79.9 %, y el de necrosis 19.44.



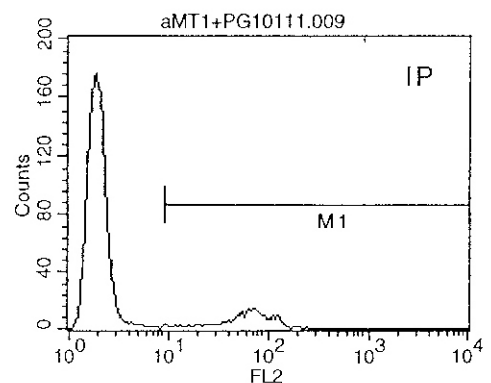
Marker	Left, Right	Events	% Total
All	1, 9910	10000	100.00
M1	10, 9910	7991	79.91



Marker	Left, Right	Events	% Total
All	1, 9910	10000	100.00
M1	9, 9910	1944	19.44



Marker	Left, Right	Events	% Total
All	1, 9910	10000	100.00
M1	10, 9910	8472	84.72



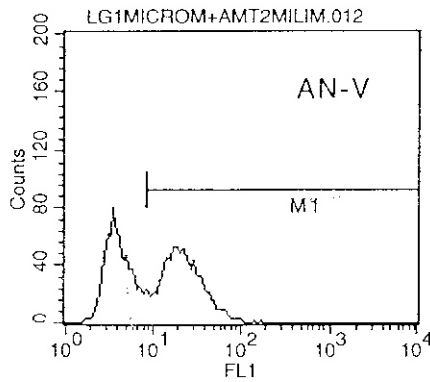
Marker	Left, Right	Events	% Total
All	1, 9910	10000	100.00
M1	9, 9910	1275	12.75

Figura 37: Porcentaje de apoptosis y necrosis en HT-29 tratadas con melatonina 1×10^{-3} M y proglumida 1×10^{-3} M conjuntamente; y melatonina 1×10^{-3} M y proglumida 1×10^{-2} M conjuntamente.

Respecto al efecto sobre la muerte celular de HT-29 tras el tratamiento con melatonina 1×10^{-3} M y proglumida 1×10^{-2} M, el porcentaje de células apoptóticas aumenta 84'72 %, mientras que el de células necróticas desciende a 12'75 %.

4.2 Melatonina + lorglumida.

El efecto de lorglumida y melatonina sobre el crecimiento celular basal de HT-29 era complementario en los estudios de incorporación de [3 H-timidina], sumándose las acciones inhibitorias de ambos. Cuando empleamos una concentración de melatonina 2×10^{-3} M junto con una de lorglumida 1×10^{-6} M durante 18 horas, el porcentaje de células que se unen a Anexina V es 53'33 %.

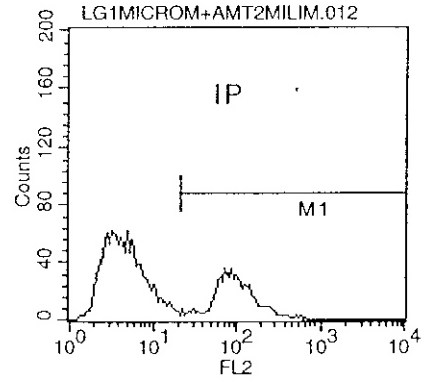


Acquisition Date: 17-Jun-98
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	5333	53.33

%Total 53,33



Acquisition Date: 17-Jun-98
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

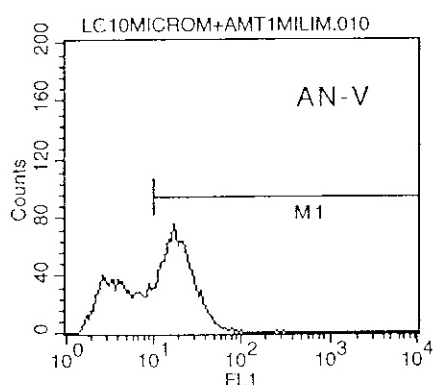
IP

Marker	Events	% Total
All	10000	100.00
M1	2986	29.86

%Total 29,86

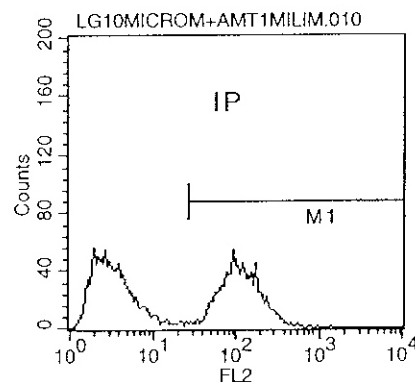
Figura 38: Porcentaje de necrosis y apoptosis en células HT-29 tratadas con melatonina 2×10^{-3} M conjuntamente con lorglumida 1×10^{-6} M.

En cambio, las células que incorporan yoduro de propidio son el 29'86 %. Si la concentración de melatonina es 1×10^{-3} M y se administra junto con lorglumida 1×10^{-5} M, el porcentaje de apoptosis que determinamos es 57'21 %, y el de necrosis 46'55 %.



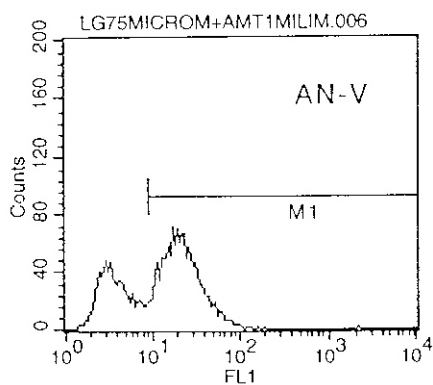
Acquisition Date: 17-Jun-98
Gated Events: 10000
X Parameter: FL1 (Log)

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	5721	57.21	%Total 57,21



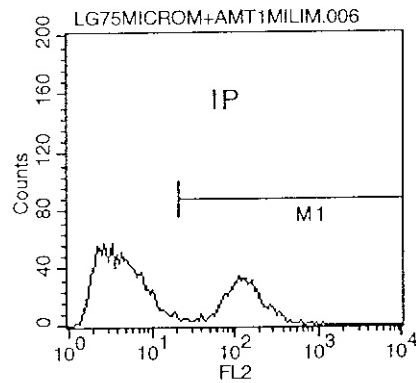
Acquisition Date: 17-Jun-98
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2 (Log)

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	4655	46.55	%Total 46,55



Acquisition Date: 17-Jun-98
Gated Events: 10000
X Parameter: FL1 (Log)

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	6536	65.36	%Total 65,36



Acquisition Date: 17-Jun-98
Gated Events: 10000
X Parameter: FL2 (Log)

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	3072	30.72	%Total 30,72

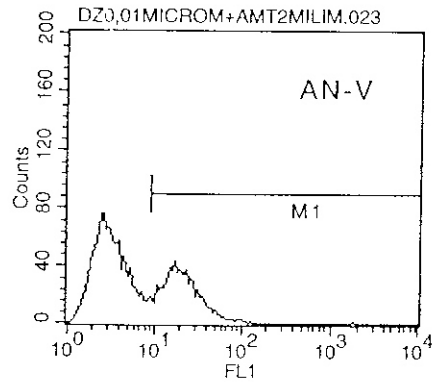
Figura 39: Porcentaje de necrosis y apoptosis en células HT-29 tratadas con melatonina

1 × 10⁻³ M conjuntamente con lorglumida 1 × 10⁻⁵ M; y melatonina 1 × 10⁻³ M conjuntamente con lorglumida 75 × 10⁻⁶ M

En cuanto al efecto sobre la muerte celular de HT-29 tras el tratamiento con melatonina 1 × 10⁻³ M y lorglumida 75 × 10⁻⁶ M, el porcentaje de células apoptóticas aumenta a 65'36 %, mientras que el de células necróticas es de 30'72%.

4.3 Melatonina + devazepide.

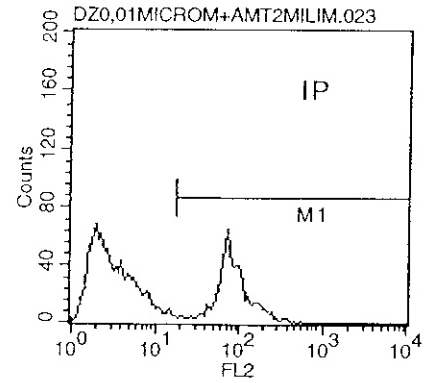
El efecto de devazepide y melatonina sobre el crecimiento celular basal de HT-29 era complementario, sumándose las acciones inhibitorias de ambos en los experimentos de proliferación celular. Cuando empleamos una concentración de melatonina 2 × 10⁻³ M junto con una de devazepide 1 × 10⁻⁷ M durante 18 horas, el porcentaje de células que se unen a Anexina V es 34'78%. En cambio, las células que incorporan yoduro de propidio son el 35'53 %. Si la concentración de melatonina es 1 × 10⁻³ M y se administra junto con devazepide 1 × 10⁻⁶ M, el porcentaje de apoptosis que determinamos es 45'87 %, y el de necrosis 38'65 %.



Acquisition Date: 17-Jun-98
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	3478	34.78	%Total 34,78



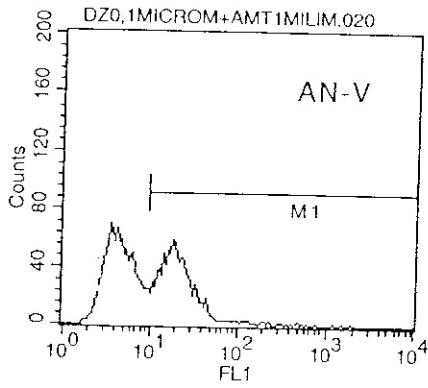
Acquisition Date: 17-Jun-98
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	3553	35.53	%Total 35,53

Figura 40: Porcentaje de apoptosis y necrosis en células HT-29 tratadas con melatonina 2×10^{-3} M junto con devazepide 1×10^{-7} M.

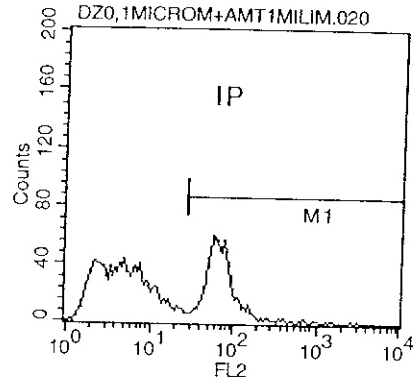
Tras el tratamiento con melatonina 1×10^{-3} M y devazepide 7×10^{-6} M, el porcentaje de células apoptóticas aumenta a 60'43 %, mientras que el de células necróticas es de 29'54%.



Acquisition Date: 17-Jun-98
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

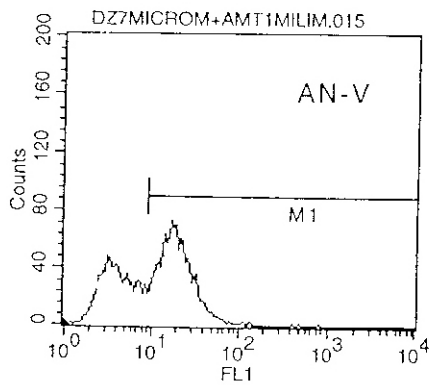
Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	4587	45.87	%Total 45,87



Acquisition Date: 17-Jun-98
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

IP

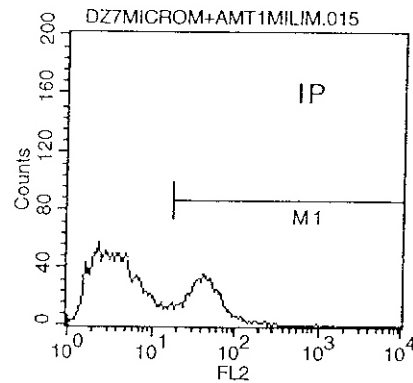
Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	3865	38.65	%Total 38,65



Acquisition Date: 17-Jun-98
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL1 (Log)

AN-V

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	6043	60.43	%Total 60,43



Acquisition Date: 17-Jun-98
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2 (Log)

IP

Marker	Events	% Total	
All	10000	100.00	
M1	2954	29.54	%Total 29,54

Figura 41: Porcentaje de apoptosis y necrosis en células HT-29 tratadas con melatonina 1×10^{-3} M junto con devazepide 1×10^{-6} M; y con melatonina 1×10^{-3} M junto con devazepide 7×10^{-6} M.

5. Resumen de los porcentajes de apoptosis y necrosis obtenidos en los experimentos anteriores.

Tabla XXVI: Porcentajes de apoptosis y necrosis presentes en las células HT-29 cultivadas en presencia de los compuestos indicados

Compuesto	Apoptosis (%)	Necrosis (%)
Control	10.80	14.39
Proglumida 1 mM	55.52	37.81
Proglumida 10 mM	64.83	30.65
Proglumida 20 mM	72.08	20.86
Lorglumida 25 μ M	60.97	32.79
Lorglumida 75 μ M	72.60	26.07
Lorglumida 150 μ M	69.12	37.80
Devazepide 1 μ M	69.16	32.18
Devazepide 7 μ M	64.35	37.14
Devazepide 10 μ M	65.04	33.99

Tabla XXVII: Porcentajes de apoptosis y necrosis presentes en las células HT-29 cultivadas en presencia de los compuestos indicados

Compuesto	Apoptosis (%)	Necrosis (%)
Control	10.80	14.39
Melatonina 0.5 mM	16.70	14.31
Melatonina 1 mM	24.43	67.82
Melatonina 2 mM	40.04	61.28
Melatonina 4 mM	50.70	20.78
Melatonina 1 mM + Proglumida 10 mM	84.72	12.75
Melatonina 1 mM + Proglumida 1mM	79.91	19.44
Melatonina 2 mM + Proglumida 1mM	70.77	24.13
Melatonina 1 mM + Lorglumida 10 µM	57.21	46.55
Melatonina 1 mM + Lorglumida 75 µM	65.36	30.72
Melatonina 2 mM + Lorglumida 1 µM	53.33	29.86
Melatonina 1 mM + Devazepide 0.1 µM	45.87	38.65
Melatonina 1 mM + Devazepide 7 µM	60.43	29.54
Melatonina 2 mM + Devazepide 0.1 µM	34.78	35.53

DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

En este trabajo, hemos utilizado células HT-29 de cáncer de colon humano que expresan receptores CCK-B (Lebovitz y cols., 1994). Sembrando 15.000 células por pocillo en una placa de 96, con una concentración en el medio de cultivo de 2'5% de suero fetal, se investigó el efecto de estos compuestos sobre la proliferación celular mediante la determinación de [³H] timidina. Se ha comprobado, que las células eran confluentes tras las primeras 24 horas del cultivo y que, en este caso, estaban sincronizadas fundamentalmente en fase G₁-G₀ antes de la adición del producto investigado. Para determinar las condiciones óptimas de cultivo, se realizaron experimentos preliminares variando el número de células sembradas por pocillo, la concentración de suero fetal en el medio de cultivo y los días de tratamiento con estos productos. En los estudios de citotoxicidad es suficiente, para ver el efecto de una droga, un periodo de incubación de 36-48 horas con la sustancia tras un periodo de 24 horas para que se dividan y alcancen la fase exponencial (Skenan, 1995). Estas condiciones fueron empleadas en los experimentos realizados, que se llevaron a cabo por triplicado al menos dos veces.

El tratamiento durante 48 horas de estos cultivos celulares en pases tempranos con gastrina-17 a concentraciones entre 4×10^{-9} M y 4×10^{-13} M, no ha supuesto ninguna alteración en la proliferación de los mismos respecto a los controles. Estas concentraciones de gastrina incluyen el rango fisiológico de las concentraciones de gastrina sérica en el hombre (Kusyk CJ y cols., 1986; Palmer Smith y cols., 1989; Mauss y cols., 1994). En cambio, tras la administración, en

las mismas condiciones, de CCK-8 a dosis entre 1×10^{-5} M y 5×10^{-7} M, sí se apreció un aumento significativo, aunque leve en la proliferación celular.

Además, hemos estudiado el efecto sobre la proliferación celular en la línea HT-29 de antagonistas no selectivos y selectivos de los receptores CCK-A y CCK-B, determinando la incorporación de timidina marcada con tritio radiactivo durante el proceso de síntesis del ADN. Hemos observado que estos antagonistas de los receptores CCK-A y CCK-B como proglumida y otros específicos del receptor CCK-A como lorglumida y L364,718, inhiben la proliferación de estas células.

Muchos estudios descritos en la literatura establecen que la gastrina estimula el crecimiento de algunas líneas celulares de cáncer de colon (Kusyk CJ y cols., 1986; Watson y cols., 1988; Smith y Solomon, 1988; Watson y cols., 1989; Guo y cols., 1990; Hossein y cols., 1990; Mauss y cols., 1994; Bold y cols., 1994). No obstante, todavía no se conocen con exactitud los sistemas a través de los cuales ejerce esta influencia sobre la proliferación celular. Este fenómeno puede indicar que algunas líneas celulares tengan sitios de unión específicos para gastrina, mientras otras no (Singh y cols., 1985; Mauss y cols., 1994). Así, Mauss y colaboradores (1994) encontraron que la gastrina-17 puede estimular el crecimiento en la línea celular HT-29, que presenta sitios específicos de unión para este compuesto, mientras que otras líneas celulares que no los poseen no se afectaban (T84, HCT116).

Guo y colaboradores (1990), señalan que algunas líneas celulares de cáncer colorrectal como MC-26 (ratón) ó L_oV_o (humana), pueden presentar receptores para gastrina en los primeros pases del cultivo. Sin embargo, a medida que los pases aumentan se pueden perder los receptores y disminuir o desaparecer el

efecto de la gastrina sobre los mismos. También apuntan la posibilidad de que las células de cáncer de colon con muchos pasajes produzcan sus propios factores autocrinos de crecimiento, de forma que muestran menor respuesta a la adición exógena de hormonas y factores de crecimiento. En cambio, al usar anticuerpos Ig G frente a gastrina no se inhibe el crecimiento de células MC-26, lo que sugiere que estas células no expresan un péptido similar a gastrina que pueda ser reconocido por estos anticuerpos. Así, aunque obtienen efectos significativos en el descenso del crecimiento celular con dosis altas de antagonistas de los receptores CCK-A y CCK-B como proglumida y benzotrip (antagonista CCK-B, derivado del triptofano), postulan que puede deberse a efectos no específicos de los mismos.

Bold y colaboradores (1994), encontraron que la gastrina-17 I estimulaba el crecimiento de células L₀V₀ de cáncer de colon humano, pero este efecto trófico no era abolido por antagonistas del receptor CCK-A ni del CCK-B. Asimismo, la gastrina estimulaba la producción de AMPc en esas células. Concluyeron que probablemente, la gastrina interactúa con un receptor distinto del CCK-A ó CCK-B, que es responsable de la regulación del crecimiento celular.

Ishizuka y colaboradores (1992) evidenciaron que la gastrina estimula el crecimiento de células de cáncer de estómago a través de un mecanismo que requiere el incremento de los niveles intracelulares de calcio. Sin embargo, las vías específicas de traducción de la señal por las que la gastrina regula el crecimiento de células de cáncer de colon puede cambiar y podría ser importante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en pacientes con cáncer de colon. Ishizuka y colaboradores (1994), observaron que la gastrina-17 estimulaba la producción de AMPc en células de cáncer de colon humanas como las L₀V₀,

COLO320 y HCT116 (presenta un efecto estimulador del crecimiento en las dos primeras e inhibidor en la última), mientras que estimulaba la hidrólisis de fosfatidil-inositol y la movilización del calcio intracelulares en células HT-29. Dedujeron que la gastrina-17 parece regular el crecimiento de células de cáncer de colon humano a través de receptores ligados a vías de traducción de la señal que son específicas para cada tipo celular.

Algunos investigadores han verificado un papel importante de algunos intermediarios del procesamiento de progastrina en el crecimiento del cáncer de colon (Ciccotosto y cols., 1995). Incluso algunos laboratorios han demostrado experimentalmente que la gastrina 17 glicino-terminal (G-Gly), tiene efectos biológicos y ejerce acciones mitógenas en células de cáncer de colon (Seva y cols., 1994; Singh y cols., 1994; Singh y cols., 1995), identificando incluso receptores en algunas líneas celulares de cáncer de colon que median el efecto estimulador del crecimiento de la G-Gly y que son distintos del receptor para la hormona madura (Singh y cols., 1995; Stepan y cols., 1996). Todo esto, junto al hecho de que la G-Gly se puede encontrar en altas concentraciones durante el desarrollo de tumores intestinales, permite sugerir un posible papel de estos péptidos intermedios en la diferenciación y el crecimiento intestinal.

Un estudio encuentra ciertos tipos de tumores humanos que expresan receptores CCK-B (carcinomas medulares de tiroides, cánceres de pulmón de células pequeñas, astrocitomas y cánceres de ovario) y, en menos ocasiones, receptores CCK-A (meningiomas, neuroblastomas y, sobre todo, tumores gastroenteropancreáticos); no encontraron estos receptores en los cánceres colorrectales investigados aunque se sabía que sintetizaban progastrina (Reubi y cols., 1997).

En algunas líneas celulares de cáncer de colon se ha demostrado únicamente la presencia de proteínas de unión de gastrina de aproximadamente 33-40 kDa (Chicione y cols., 1989), a pesar de la existencia de múltiples formas moleculares de estos receptores en tejidos diana normales. Estas células de mucosa colónica responden a los efectos de la gastrina sobre el crecimiento celular in vitro (Sirinek y cols., 1985). Narayan y colaboradores (1992) demostraron la existencia de un número significativo de lugares de alta afinidad ($K_d \leq 1nM$) para la gastrina/péptidos CCK en membranas de mucosa colónica de cerdo, la mayoría de los cuales están presentes en una banda de aproximadamente 45 kDa. Es posible que estas proteínas de unión estén presentes en células que controlan la respuesta al crecimiento, mientras otras formas de este receptor se expresen en otras poblaciones celulares de la mucosa colónica. También encontraron bastantes receptores de baja afinidad ($K_d \simeq 1-3 \mu M$) para la unión de gastrina, denominándose estos receptores respectivamente Tipo I y Tipo II. Ambos son aparentemente específicos para la unión de péptidos tipo gastrina/CCK, pudiendo así explicar los efectos biológicos de estas hormonas en células de la mucosa colónica.

Imdahl y colaboradores (1995), investigaron un posible efecto proliferativo autocrino de gastrina en carcinomas de colon, así como el receptor responsable de este hecho. Comprobaron la presencia de fragmentos de progastrina en carcinomas colorrectales, lo que se podría explicar por este efecto proliferativo autocrino de los mismos. Además, encontraron que la proteína de unión implicada en esta acción era más similar al receptor de baja afinidad gastrina/CCK-C que al gastrina/CCK-B. También Biagini y colaboradores (1997), estudiaron células de tejido colónico normal y tumoral así como muestras de metástasis hepáticas

encontrando que el ARNm de gastrina se expresaba en el 86'5% de los tumores investigados y que el receptor envuelto en esta hipotética acción proliferativa autocrina era probablemente el CCK-C, ya que su ARNm se expresaba tan frecuentemente como el de gastrina en estos tumores colónicos. Otros autores, han encontrado receptores para gastrina glicino-terminal que median este efecto trófico en líneas celulares de cáncer de colon humano (L_oV_o y HT-29), pudiendo ser los responsables del crecimiento en el cáncer de colon (Stepan y cols., 1999).

Los receptores CCK-A y CCK-B muestran una alta afinidad por el agonista endógeno colecistoquinina octapéptido COOH-terminal (CCK-8s), pero se pueden distinguir por la hormona peptídica endógena selectiva para el receptor CCK-B, gastrina-17. Además, el receptor CCK-A presenta una afinidad de 500 a 1000 veces mayor por los análogos sulfatados, sobre todo el octapéptido sulfatado de colecistoquinina (CCK-8s). En nuestro estudio, el tratamiento con CCK-8s ocasionó un incremento en la proliferación de HT-29 de aproximadamente un 40% para una concentración alta de este agonista (5×10^{-5} M), no afectándose el crecimiento celular con concentraciones inferiores a 1×10^{-6} M.

La proglumida, un derivado del ácido glutarámico (Rovati, 1976; Makovec y cols., 1985), es un antagonista de los efectos secretorios (Magous y Bali, 1983) y tróficos de la gastrina en células gastrointestinales normales (Johnson y Guthrie, 1984; Makovec y cols., 1985) y en carcinomas colorrectales (Beuchamp y cols., 1985; Smith y Solomon, 1988; Mauss y cols., 1994). Es un inhibidor competitivo específico tanto de gastrina (Magous y Bali, 1983) como de colecistoquinina (Williams y cols., 1983; Jensen y cols., 1985). Inhibe la acción de ambas aparentemente por inhibición de la unión de estas dos hormonas a sus respectivos receptores celulares de membrana (Magous y Bali, 1983; Williams y cols., 1983).

Estudios previos han demostrado que la proglumida puede inhibir el crecimiento basal de líneas celulares de carcinoma de colon (Smith y Solomon, 1988; Hossein y cols., 1990; Mauss y cols., 1994). En ratones xenotransplantados, este antagonista inhibe el crecimiento basal tumoral en ausencia de estimulación exógena (Johnson, 1977), aumentando además la supervivencia en ratones con cáncer de colon MC-26 (Beauchamp y cols., 1985). Sin embargo, para Smith y Solomon (1988) sólo inhibe el crecimiento tumoral estimulado por pentagastrina.

En nuestra línea celular, proglumida inhibe el crecimiento basal celular de forma significativa y dosis dependiente (Mauss y cols., 1994). Apreciamos una disminución en la proliferación de aproximadamente el 90% con una dosis de 2×10^{-2} M, y obtenemos una IC_{50} entre 6.5×10^{-3} M y 7×10^{-3} M. No se aprecian cambios en la curva de incorporación de timidina con concentraciones inferiores a 1×10^{-3} M. Se necesitan por tanto dosis altas de este compuesto para obtener esta respuesta. La acción de este antagonista, al menos a estas concentraciones correspondientes a la IC_{50} , no puede ser atribuido a un efecto tóxico celular irreversible, lo que se confirma mediante tinción con azul tripán.

La lorglumida es un derivado del ácido 5-(dipentilamino)-5-oxo-pentanoico que actúa como un potente antagonista no peptídico de la colecistoquinina (Makovek y cols., 1987; Scarpignato y cols., 1989). Es un antagonista competitivo, específico, reversible y potente para CCK-8 en varios modelos “in vitro” e “in vivo”. Su efecto sobre los receptores CCK-A es mucho mayor que el de proglumida (Makovec y cols., 1986). En algunos estudios se ha demostrado que bloquea el crecimiento estimulado por gastrina de células humanas pancreáticas ARJ42J (Seva y cols., 1990) y el crecimiento basal de células gástricas humanas MKN45G (Watson y cols., 1992). Esto indicaría que este

antagonista puede inhibir el crecimiento tumoral estimulado por gastrina de tumores gastrointestinales de una forma endocrina y otra paracrina, lo que sería clínicamente beneficioso para el tratamiento de tumores gastrointestinales que responden a gastrina. Además, por su relativa baja toxicidad y porque es activo también tras ser administrado oralmente, lorglumida es un buen candidato para su uso terapéutico en el hombre.

Sperti y colaboradores (1994) investigaron el efecto de la caeruleina (análogo de CCK) y de la lorglumida en la carcinogénesis pancreática inducida por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). La incidencia de cáncer pancreático se incrementaba significativamente cuando se administraba caeruleina tras el DMBA. En cambio, la lorglumida inhibía significativamente los efectos de la caeruleina y reducía el crecimiento tumoral cuando era inyectada tras la exposición al carcinógeno. En otros estudios, se ha evidenciado que la lorglumida inhibe el efecto estimulador de la CCK sobre tumores pancreáticos en ratas (Meijers y cols., 1992). Así mismo, disminuye el crecimiento de la línea G401 correspondiente a un tumor renal humano de Wilms, y presenta también un efecto inhibitorio similar en células de adenocarcinoma colónico humano HCT-116 (Blackmore y cols., 1994).

En nuestro ensayo, la lorglumida inhibe el crecimiento basal de células HT29 de forma significativa y dosis dependiente. Obtenemos una IC_{50} de 69×10^{-6} M - 75×10^{-6} M y una inhibición del crecimiento próxima al 100% con una concentración aproximadamente 1×10^{-4} M, son necesarias por tanto dosis mucho más bajas de este compuesto que de proglumida para obtener esta respuesta. La acción de este antagonista a estas concentraciones, tampoco puede ser atribuido a

un efecto tóxico celular irreversible, como se confirma mediante tinción con azul tripán.

Otra clase de potentes antagonistas de los receptores de colecistoquinina y gastrina han sido desarrollados a partir de un análogo benzodiazepínico aislado del *Aspergillus alliaceus*, la aspercilina (Chang y cols., 1985). En esta familia, L364,718 ha sido el más potente antagonista del receptor CCK³ pancreático encontrado hasta ahora, con la misma afinidad que el péptido sintético CCKg. Usado a concentraciones micromolares, puede inhibir la unión de gastrina y antagonizar eventos biológicos inducidos por péptidos gástricos como contracciones musculares gástricas suaves (Huang y cols., 1989). Es un extremadamente potente, competitivo y específico antagonista de los receptores CCK periféricos. Su potencia, actividad oral y larga duración de acción en estudios in vivo, favorecen su potencial aplicación desde el punto de vista terapéutico como antagonista de la colecistoquinina (Chang y Lotti, 1986). Seva y colaboradores (1990), estudiaron y confirmaron la implicación del receptor CCK-B en la respuesta proliferativa de células AR42J a la gastrina. Encontraron que mientras la lorglumida inhibía esta acción de la gastrina, el compuesto L364,718, a una concentración que ocupaba totalmente los receptores CCK-A, no afectaba a los CCK-B ni ejercía esta acción. Thumwood y colaboradores (1991), investigaron el efecto sobre la proliferación celular de varias líneas celulares del L364,718, evidenciando una inhibición de la misma en algunas líneas. Se ha observado que el devazepide inhibe el crecimiento del cáncer pancreático humano SW-1990 (Smith y cols., 1990). El tratamiento de nuestras células HT-29 con L364,718 provoca una inhibición significativa de la proliferación celular basal con

una dosis IC_{50} de entre $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ - $5,5 \times 10^{-6} \text{ M}$, es decir con una concentración más baja que los anteriores antagonistas investigados.

Otro compuesto de este tipo es el L365,260 que parece ser un potente antagonista del receptor CCK-B/gastrina. Exhibe una afinidad 1000 veces menor que su homólogo, L364,718, por los receptores CCK-A, por lo que ambas sustancias son la base experimental para la distinción entre los receptores CCK-A y CCK-B/gastrina (Lotti y Chang, 1989; Roche y cols., 1991 [II]). Algunos autores encuentran que L365,260 inhibe el crecimiento estimulado por gastrina de HT-29, aunque no influye en el crecimiento basal celular en ausencia de gastrina (Mauss y cols., 1994). En cambio, en nuestro experimento, el compuesto L365,260, empleado a las mismas concentraciones que el devazepide, no afecta el crecimiento basal de estas células, permaneciendo éste inalterado respecto del grupo control.

Por otra parte, hemos valorado el efecto de otro compuesto que también actúa como antagonista de los receptores CCK-B/gastrina, aunque posee cierto efecto agonista CCK-A que se traduce en una estimulación de la secreción pancreática al ser administrado vía oral, el dipeptidoide PD 135,158 ó CAM-1028. Con las concentraciones empleadas de esta sustancia, tampoco se ha producido ninguna alteración en la proliferación celular basal de HT-29, no variando la curva de incorporación de timidina respecto del grupo control.

Todos estos experimentos nos conducen a valorar la posible presencia de receptores de colecistoquinina en nuestra línea celular HT-29, que serían del tipo CCK-A y no del CCK-B, puesto que se produce una respuesta estimuladora del crecimiento basal de las mismas tras el tratamiento con CCK-8s, mientras que no se altera con gastrina-17. Este hecho se ve corroborado tras el empleo de

antagonistas comunes y selectivos de estos receptores. Apreciamos que proglumida (antagonista CCK-A y CCK-B) inhibe dicha proliferación basal, aunque de forma no muy potente. En cambio, los antagonistas más selectivos del receptor CCK-A, lorglumida y L364,718, ejercen este efecto de forma mucho más enérgica, no apreciándose ninguna respuesta tras el tratamiento con antagonistas selectivos CCK-B como L365,260 y PD 135-158. Además, la acción de estos antagonistas sobre el crecimiento basal, no estimulado por gastrina, nos llevan a pensar que la proliferación de estas células de cáncer de colon humano esté regulado por la secreción autocrina de un péptido similar a colecistoquinina. Por otra parte, parece que los receptores CCK-A presentan mayor afinidad por el octapéptido sulfatado de colecistoquinina (CCK-8s), y los receptores CCK-B/gastrina la muestran fundamentalmente por gastrina, el tetrapéptido CCK-4 y el octapéptido CCK-8 (Innis y Snyder, 1980; Moran y cols., 1986; Ballaz y cols., 1997). Sin embargo, en estudios en ratas y perros con agonistas de estos receptores, como gastrina y CCK-8, y antagonistas de los mismos como L364,718 y L365,260, se han evidenciado receptores tanto CCK-A como CCK-B con distintos tipos de afinidad para CCK-8: alta, baja y muy baja afinidad. Parece que esta cualidad es una propiedad intrínseca de la molécula del receptor CCK (Huang y cols., 1994), y podría explicar el hecho de que en nuestro estudio necesitemos usar concentraciones altas de CCK-8s para obtener una respuesta proliferativa.

En relación a los mecanismos de inhibición, hemos determinado también, la modificación en la producción de nitritos en células HT-29 tras el tratamiento de las mismas con los dos antagonistas específicos del receptor CCK-A (lorglumida y devazepide). Para determinar la concentración de nitritos en el medio tras 48

horas de cultivo con cada una de estas sustancias, hemos empleado el método estándar de Griess adaptado a una placa de 96 pocillos (Chang y cols., 1996), expresando finalmente los resultados en picomoles por millón de células. Para comprobar el efecto de lorglumida sobre los niveles basales de nitritos en el sobrenadante del cultivo, se realizaron experimentos con concentraciones crecientes de este compuesto entre 1×10^{-5} M y 5×10^{-4} M. Apreciamos un descenso significativo en la cantidad de nitritos respecto del grupo control a partir de una concentración de lorglumida 1×10^{-4} M, siendo la IC_{50} $2,4 \times 10^{-4}$ M (240 μ M). En cuanto al devazepide, lo empleamos a concentraciones entre 1×10^{-7} M y 2×10^{-5} M, y observamos que este descenso significativo de nitritos se muestra a partir de una dosis 1×10^{-6} M, con una IC_{50} $2,09 \times 10^{-6}$ M (2,09 μ M). Por tanto, lorglumida y devazepide producen una disminución en la producción de nitritos por parte de las células HT-29. En el aparato digestivo el óxido nítrico está muy extendido. Se relaciona con mecanismos de protección de la mucosa, circulatorios, inmunológicos, en la función hepática y en el peristaltismo, relajando la fibra muscular lisa (Vanderwinden, 1994). Parece que el óxido nítrico ejerce un papel pro y antitumoral, dependiendo de la concentración local de la molécula. Aumenta la expresión del gen supresor p53 y del gen regulador del ciclo celular p21/WAF₁/CIP₁ en células que poseen el gen p53 salvaje (HO y cols., 1996), lo que puede inducir apoptosis. Además la producción excesiva de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) o tipo 2 (NOS2) puede contribuir a la progresión del cáncer de colon y a la transición de adenoma a carcinoma (Ambs y cols., 1996). Recientemente se sugiere que la expresión excesiva del ARNm de la iNOS o NOS2 y la producción de óxido nítrico en tejido de cáncer de colon humano, pueden influir en la inmunosupresión relacionada con el tumor (Kojima

y cols., 1999). Además, la inhibición de la biosíntesis del óxido nítrico en células de cáncer de colon por el 5-fluoruracilo parece que puede ser la causa, al menos en parte, de la eficacia de este agente antitumoral. (Jin y cols., 1996). Todo esto indica que estos dos antagonistas de los receptores CCK-A puedan mediar parte de sus efectos antiproliferativos en las células HT-29 a través de su interacción con el sistema de la NOS.

Diferentes estudios han demostrado la acción oncostática de la melatonina “in vitro” e “in vivo” en diversos tumores (Hill y Blask, 1988; Karasek y cols., 1998; Cini y cols., 1998; Papazisis y cols., 1998; Baldwin y cols., 1999; Farriol y cols., 2000). Todavía no se conoce con exactitud cómo ejerce esta influencia sobre la proliferación celular. Los mecanismos propuestos para explicar estos efectos son la influencia sobre el sistema neuroendocrino (Gupta, 1988), regulación del sistema inmune (Maestroni y cols., 1987; Lisoni y cols., 1993; García-Mauriño y cols., 1997) y una actividad antitumoral directa (Hill y Blask, 1988). Muchos de los datos que sustentan este efecto oncostático directo de la melatonina han surgido a partir de estudios en cáncer de mama. En la línea celular de cáncer de mama MCF-7, parece que concentraciones fisiológicas de melatonina tienen efecto inhibitor del crecimiento (Hill y Blask, 1988; Cos y Sánchez-Barceló, 1994), además de que regula los receptores estrogénicos que expresan estas células (Danfort y cols., 1983). Por otra parte, la melatonina inhibe la proliferación de las células MCF-7 estimulada por estradiol (Blask y Hill, 1986; García Rato, 1998) y prolactina (Lemus-Wilson y cols., 1995) e inhibe la capacidad de diseminación de las células MCF-7 (Cos y cols., 1998). También se ha evidenciado un efecto inhibitor de la melatonina en células linfoides (Persengiev y Kyurkchiev, 1993), en células de melanoma humano (Ying y cols.,

1993), de cáncer de cérvix (Chen y cols., 1995; Papazisis y cols., 1998), de neuroblastoma (Cos y cols., 1996), de próstata (Gilad y cols., 1996), de hepatocarcinoma (Cini y cols., 1998), de coriocarcinoma (Shiu y cols., 1999), de cáncer de ovario (Petranka y cols., 1999) y de adenocarcinoma de colon (Papazisis y cols., 1998; Karasek y cols., 1998; Farriol y cols., 2000). La melatonina también inhibe el desarrollo y crecimiento de tumores intestinales inducidos por 1,2-dimetil-hidrazina (Anisimov y cols., 1997). Poon y colaboradores (1996), han identificado sitios de unión de alta afinidad para la 2 [125I] iodomelatonina en la mucosa/submucosa colónica de pacientes chinos con cáncer colorrectal.

En nuestro estudio, se confirma el efecto antiproliferativo de la melatonina “in vitro” en la línea celular HT 29 de adenocarcinoma de colon humano. Para determinar las condiciones óptimas de cultivo, se realizaron como en los casos anteriores, experimentos preliminares variando el número de células sembradas por pocillo, la concentración de suero fetal en el medio de cultivo y los días de tratamiento con la melatonina. En esta línea celular, sembrando 15.000 células por pocillo con una concentración en el medio de cultivo de 2'5% de suero fetal, se comprobó que tras 48 horas de incubación con melatonina se producía una disminución significativa de la proliferación celular con concentraciones 1×10^{-3} M (25'8% de inhibición), 2×10^{-3} M (56'4%) y 4×10^{-3} M (94'6%), siendo la IC_{50} $1'6 \times 10^{-3}$ - $1'8 \times 10^{-3}$ M ; con concentraciones inferiores a éstas, llegando hasta el rango nanomolar, no se halló ninguna modificación del crecimiento celular ni aumentando el periodo de incubación a cinco días. Una observación similar fue la obtenida por Chen y cols. (1995) en células ME-180 de carcinoma humano de cuello uterino. Más tarde han sido publicados hallazgos similares en líneas

celulares de cáncer de mama humano no hormonodependiente (T47D), de cáncer de ovario humano (OAW-42), cáncer de cuello uterino humano (HeLa) y HT-29 tras incubación de las células con concentraciones comprendidas entre 1 y 6 mM (Papazisis y cols., 1998). Farriol y colaboradores (2000), observaron un descenso moderado pero significativo en la síntesis de ADN en células CT-26 de carcinoma de colon de ratón, con concentraciones de 1 mM, 2mM y 3 mM. Otros trabajos publicados muestran el efecto oncostático de la melatonina con concentraciones más bajas (10^{-9} M, 10^{-10}) (Hill y Blask, 1988; Karasek y cols., 1998; Shiu y cols., 1999). Estas discrepancias pueden deberse a varios factores como la diferente estirpe celular, las condiciones del ensayo (nuestros experimentos, a diferencia de la mayoría de los señalados, fueron realizados en microplacas de 96 pocillos), la duración de la incubación y el hecho de agregar los productos a estudiar tras las primeras 24 horas, recambiando el medio (cuando las células se hallan en fase de crecimiento exponencial). Además, nosotros añadimos el isótopo radiactivo al cultivo al mismo tiempo que la sustancia a estudiar, con lo cual es posible apreciar las modificaciones en la proliferación desde el momento inicial (casi todos los autores lo añaden al final del periodo de incubación y tras 8-18 horas cuantifican su incorporación en el proceso de síntesis del ADN).

Por otra parte, hemos realizado distintos experimentos tratando la línea celular en las mismas condiciones con melatonina y gastrina, y melatonina y los antagonistas del receptor CCK que provocan una inhibición basal en la proliferación celular de HT-29, para comprobar si este efecto se complementaba. Hemos verificado que concentraciones fijas de gastrina empleadas con distintas concentraciones de melatonina no varían la IC_{50} esta última ni afectan el porcentaje de incorporación de timidina al ADN que se produce con cada dosis de

melatonina, por tanto la gastrina no altera el mecanismo de acción de melatonina sobre estas células.

La administración al cultivo HT-29 de dosis fijas de proglumida con melatonina a distintas concentraciones ocasiona una inhibición de la proliferación basal de estas células mucho más acusada que si se emplean por separado, uniéndose sus efectos y descendiendo la IC_{50} para melatonina a 43×10^{-6} M. Lo mismo ocurre al emplear concentraciones fijas de melatonina con distintas concentraciones de proglumida, de tal modo que la IC_{50} de ambas empleada conjuntamente produce una inhibición del crecimiento basal próxima al 100%. Esto indica que ambos productos actúan por distintos mecanismos, sumando su acción sobre estos cultivos.

Como hemos visto anteriormente, lorglumida es un antagonista CCK-A más selectivo y potente que proglumida. El tratamiento de nuestra línea celular de cáncer de colon con lorglumida 75×10^{-6} M y distintas concentraciones de melatonina conjuntamente, provoca un descenso del crecimiento celular basal mucho más intenso que usando ambas por separado, descendiendo la IC_{50} para melatonina a 12×10^{-5} M. Si empleamos lorglumida a concentraciones variables junto con melatonina a concentraciones fijas obtenemos el mismo resultado, apreciando que la IC_{50} de ambas empleada conjuntamente produce una inhibición de la proliferación celular basal próxima al 100%. Una vez más, comprobamos que los efectos de ambas sustancias son independientes y se suman al utilizarlas simultáneamente.

En cuanto al devazepide, es el antagonista CCK-A que ha llevado a cabo su acción de forma más potente en nuestros experimentos anteriores. Utilizado a una concentración fija junto con concentraciones variables de melatonina desciende el

porcentaje de incorporación de timidina al ADN de forma intensa, pasando a ser la IC_{50} para melatonina 97×10^{-6} M. Dosis variables de este compuesto benzodiazepínico con concentraciones fijas de melatonina provocan una inhibición del crecimiento celular basal el doble de intensa que con cada producto por separado, observando que la IC_{50} de ambas empleada conjuntamente produce una inhibición de la proliferación celular basal próxima al 100%. Todos estos resultados pueden apoyar la hipótesis de que los fármacos antagonistas de los receptores CCK-A actúen sobre la proliferación de las células HT-29 uniéndose a este receptor, y que la melatonina desempeñe su acción por mecanismos distintos que no afectan al comportamiento de esta proteína de unión, bien por un receptor de membrana o nuclear distinto, o ejerciendo un papel antioxidante menos específico.

Aunque la apoptosis se conoce desde hace relativamente poco tiempo, parece que constituye la forma más frecuente de muerte de células en los organismos vivos. La diferencia entre este proceso y la necrosis no es sólo bioquímica y morfológica, sino también conceptual. En la necrosis, la célula muere por el efecto nocivo directo de un agente externo químico (por ejemplo, anoxia, alteraciones del equilibrio hidroelectrolítico del medio, etc.) o físico (hipertermia intensa, etc.), que ocasiona una alteración en su homeostasis y la ruptura de la membrana celular. Por el contrario, en la apoptosis la célula muere a consecuencia de una orden que parte de sí misma; así, si en la necrosis podríamos decir que la célula muere "asesinada", en la apoptosis se "suicida". La necrosis es siempre un proceso imprevisto e indeseable para la célula y el sistema donde se halla y provoca una reacción inflamatoria. En cambio, cuando una célula muere por apoptosis lo hace porque, al menos en principio, este acto supondrá un beneficio para el correcto

desarrollo y funcionamiento del órgano y del sistema donde se encuentra. La apoptosis es, por ejemplo, responsable del “*turn-over*” (recambio) celular que experimentan células como los neutrófilos o las células embrionarias y de la eliminación de células potencialmente nocivas como las células T que reaccionan contra antígenos propios. Además de las importantes variaciones entre distintas estirpes celulares, el que una célula entre o no en apoptosis depende de numerosos factores, extracelulares e intracelulares, algunos de ellos con efecto estimulador y otros con efecto inhibitor sobre la apoptosis (Vivancos y cols., 1995).

El mantenimiento del número normal de un tipo celular requiere un balance entre el nivel de división y de muerte celular. El crecimiento incontrolado en las neoplasias puede explicarse, pues, por una excesiva proliferación, por una reducida muerte celular o por ambas.

Los principales hallazgos a este respecto son los que se han obtenido del estudio de algunos genes implicados en la apoptosis. De hecho, los genes que, de forma fisiológica, bloquean la apoptosis y, por tanto, favorecen la proliferación, como el *bcl-2*, entran en la categoría de protooncogenes, mientras que los que la estimulan, como el *p53*, se denominan antioncogenes. Cuando un protooncogen se expresa excesivamente o un antioncogen defectuosamente, en general a causa de mutaciones, se transforman en oncogenes.

Para Meterissian (1997), es especialmente importante el aspecto de la progresión tumoral de los adenocarcinomas gástricos y sobre todo colorrectales, y su relación con el número de apoptosis en las células tumorales, cuya determinación por métodos, ya al alcance de laboratorios clínicos, puede incluso servir para la clasificación y el seguimiento clínico postquirúrgico de estos tumores en un futuro inmediato. En este aspecto de la progresión tumoral es

también conveniente considerar que uno de los mecanismos implicados en la apoptosis de las células neoplásicas son las células citotóxicas del sistema inmunológico, como las células "natural-killer" (NK), las "killer" (K) o algunas de las células T citotóxicas. Pero quizá, por su aplicación clínica, resulta todavía más interesante el aspecto de que tanto la quimio como la radioterapia pueden tener su máxima eficacia antineoplásica en la capacidad que tengan de producir apoptosis en las células neoplásicas y no en el resto de las células del organismo; sin embargo, tanto las acciones de la quimioterapia como de la radioterapia son estimuladas o inhibidas por una serie de oncogenes presentes o ausentes en las células neoplásicas. Por otra parte, es muy interesante la posibilidad de que un pH ácido en el interior de la célula pueda desencadenar la apoptosis, lo que pondría de manifiesto la importancia de un mecanismo ácido-básico intracelular que generaría la energía necesaria para que se produjera el suicidio celular y justificaría que diversas sustancias (como levastatín, edelfosina, etc.) ejercieran su efecto antineoplásico a través de una inhibición del mecanismo de membrana antiportador $\text{Na}^{2+}/\text{H}^{+}$ que da lugar a la acidificación de la célula (Harguindey y cols., 1997). Así pues, estos aspectos de la apoptosis, en el campo de la oncología, ponen de manifiesto para el cirujano clínico la importancia de este mecanismo como un marcador pronóstico y, sobre todo, para prever las posibilidades de éxito de una determinada quimio o radioterapia en cada caso (Meterissian, 1997; Harguindey y cols., 1997). De acuerdo con Meterissian (1997), dentro de pocos años, cuando se quiera conocer la agresividad de un tumor, nos preguntaremos no sólo por el porcentaje de células que se hallan en fase S sino también el grado de apoptosis que presentan.

Se ha comprobado que algunas sustancias como el sulindac (antiinflamatorio no esteroideo parecido a aspirina) inhibe la progresión del ciclo celular e induce la muerte celular por apoptosis, mostrando un efecto antiproliferativo en células HT-29 de cáncer de colon humano. En nuestro estudio, hemos determinado el grado de apoptosis / necrosis que presentan las células HT-29 tras cultivarlas durante 18 horas en las condiciones ya expuestas con cada uno de los productos ensayados. Para ello, comprobamos su unión a Anexina V mediante citometría de flujo, lo que nos permite identificar los cambios que se producen precozmente en la superficie celular durante los procesos de apoptosis. En el grupo control, obtuvimos un porcentaje de células apoptóticas del 10'8%, frente a un 14'39% de células necróticas.

El mecanismo por el cual la melatonina inhibe el crecimiento tumoral aún no es conocido. Una posibilidad es que la hormona tiene actividad antimetabólica. Concentraciones fisiológicas y farmacológicas de melatonina inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama (particularmente MCF-7) (Hill y Blask, 1988) y líneas celulares de melanoma maligno (M-6) de forma dosis dependiente (Ying y cols., 1993). Este efecto puede ser el resultado de la regulación intranuclear disminuyendo la expresión de un gen o inhibiendo la liberación y actividad de factores estimuladores del crecimiento. La melatonina puede también modular la actividad de varios receptores de células tumorales. Por ejemplo, disminuye significativamente tanto la unión estrogénica como la expresión de receptores estrogénicos de forma dosis dependiente y tiempo dependiente en células de cáncer de mama MCF-7 (Molis y cols., 1994). También se ha apreciado que en esta línea celular de cáncer de mama, la melatonina aumenta el porcentaje de células apoptóticas, luego parece que activa los

mecanismos que inducen apoptosis (Eck y cols., 1998). Melen-Mucha y colaboradores (1998), examinaron el efecto de la melatonina sobre la apoptosis en el cáncer de colon 38 transplantable de murino, encontrando una disminución significativa de la proliferación celular y un aumento en el índice de apoptosis. Anisimov y colaboradores (2000), observaron que la exposición de ratas a 1,2-dimetilhidrazina provocaba cáncer de colon descendente en el 100 % de los casos, apareciendo éste tan sólo en un 65 % cuando se exponen conjuntamente a esta sustancia más melatonina. Esta actuación de la melatonina se correlacionaba con el efecto inhibitorio de ésta en el índice mitótico y con su acción estimuladora en el número relativo de células apoptóticas en tumores de colon.

En nuestra línea celular HT-29, el tratamiento con melatonina 5×10^{-4} M inhibe levemente la proliferación basal celular (aproximadamente un 10% respecto del grupo control), pero no produce variaciones significativas de apoptosis (16'7%) y necrosis (14'31%). En cambio al incrementar la concentración de melatonina (1×10^{-3} M y 2×10^{-3} M), aumenta considerablemente el porcentaje de células necróticas situándose entre el 60-70%; el porcentaje de células apoptóticas aumenta de forma dosis dependiente, siendo 24'43% y 40'04% respectivamente. Para melatonina 4×10^{-3} M, el porcentaje de necrosis es de 20'78% y el de apoptosis de 50'7%.

Hemos comprobado también el papel que ejercen los antagonistas del receptor CCK-A estudiados sobre los procesos de muerte celular en estas células. Tras el tratamiento con proglumida (dosis 1×10^{-3} M, 1×10^{-2} M y 2×10^{-2} M) el porcentaje de necrosis se sitúa entre el 38%-20% y el de apoptosis aumenta, siendo 55'52%, 30'65% y 72'08% respectivamente.

Con lorglumida (concentraciones 25×10^{-6} M, 75×10^{-6} M y 15×10^{-5} M) el porcentaje de células HT-29 necróticas se mantiene entre el 26% y el 38%, siendo el de apoptóticas del 60%-70%.

El tratamiento con devazepide a concentraciones 1×10^{-6} M, 7×10^{-6} M y 1×10^{-5} M, da lugar a un porcentaje de necrosis entre el 32% y 38%, mientras que el de apoptosis se mantiene entre el 64% -70%.

La combinación de melatonina con proglumida aumenta el grado de apoptosis situándolo entre el 70% y el 85% y reduce el de necrosis situándolo en torno al 12%-25%. En cambio el uso de melatonina con lorglumida no altera significativamente el índice de necrosis (29%-47%) ni el de apoptosis (53%-66%). El tratamiento con melatonina y devazepide tampoco cambia estos índices en gran medida, siendo el porcentaje de necrosis en torno a 29%-39% y el de apoptosis 34%-61%.

Los efectos proapoptóticos de la melatonina pueden deberse a una acción de la indolamina sobre la mitocondria. Actualmente, se reconoce que la mayoría de las señales para inducir apoptosis provienen de la mitocondria cuando ésta se encuentra sometida a estrés oxidativo. La melatonina actúa como regulador de la homeostasis mitocondrial (Martín y cols., 2000 [I]; Martín y cols., 2000 [II]), lo que sugiere la participación de esta organela en los efectos observados sobre la proliferación celular aquí descritos.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1.- Tras el tratamiento de la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano con gastrina-17, no se aprecia ninguna alteración en la proliferación celular. Sin embargo, el cultivo de las mismas células con CCK-8 ocasiona un incremento significativo de la proliferación celular. El mecanismo de este efecto trófico puede deberse, por tanto, a que estas células expresan receptores de tipo CCK-A principalmente.

2.- El estudio del efecto de los antagonistas de los receptores CCK-A y CCK-B sobre las células HT-29, nos indica que se produce una inhibición significativa del crecimiento celular con antagonistas específicos del receptor CCK-A (devazepide y lorglumida) y con antagonistas CCK-A/CCK-B (proglumida), pero no con los antagonistas CCK-B (L365,260 y PD138,156), lo que confirma que el mecanismo de acción antiproliferativo depende del receptor CCK-A.

3.- Los antagonistas específicos del receptor CCK-A, lorglumida y devazepide, disminuyen la producción de nitritos por células HT-29, lo que sugiere la participación del óxido nítrico en la proliferación celular.

4.- El efecto oncostático de la melatonina en otros tipos de cáncer también ha sido demostrado en nuestros resultados, encontrando una inhibición de la proliferación celular. Cuando se incuban las células HT-29 conjuntamente con melatonina y antagonistas de los receptores CCK-A y CCK-A/CCK-B, se observa una importante potenciación del efecto antiproliferativo de cada compuesto por separado.

5.- Los antagonistas específicos del receptor CCK-A y CCK-A/CCK-B inhiben la proliferación celular induciendo apoptosis y, en menor grado, necrosis de las células HT-29. La melatonina aumenta también ambos procesos de muerte celular (apoptosis y necrosis), y el tratamiento conjunto de melatonina y los antagonistas de los receptores CCK-A (lorglumida y devazepide) y CCK-A/CCK-B (proglumida) aumenta el porcentaje de apoptosis.

6.- En definitiva, la inhibición de la proliferación celular se debe a una estimulación de la apoptosis y, en menor grado, de la necrosis celular.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pharmacol*, 1993; 82 (2): 253-256.

Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res*, 1994; 16 (2): 100-112.

Aharoni D, Dantes A, Oren M, Amsterdam A. cAMP-mediated signals as determinans for apoptosis in primary granulosa cells. *Exp Cell Res*, 1995; 218 (81): 271-282.

Amb S, Merriam WG, Bennet WP, Felley-Bosco E, Ogunfusika MO, Oser SM, Klein S, Shields PG, Billiar Harris CC. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res*, 1998; 58: 334-341.

Anderson JC, Barton MA, Gregory RA. Synthesis of gastrin. *Nature*, 1964; 204: 933-934.

Anisimov VN, Popovich IG, Shtylik AV, Zabezhinski MA, Ben-Huh H, Gurevich P, Berman V, Tendler Y, Zusman I. Melatonin and colon carcinogenesis. III. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis in colon mucosa and

colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 2000; 52 (1): 71-76.

Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski M. Melatonin and colon carcinogenesis. I. Inhibitory effects of melatonin on development of intestinal tumors induced by 1,2-dimethyl-hidrazine in rats. *Carcinogenesis*, 1997; 18: 1549- 1553.

Azuma T, Taggart T, Walsh JH. Effects of bombesin on the release of glycine - extended progastrin (gastrin G) in rat antral tissue culture. *Gastroenterology*, 1987; 93: 322-329.

Baldwin GS, Chandler R, Scanlon DB, Weinstock J. Identification of gastrin binding protein in porcine gastric mucosal membranes by covalent cross-linking with iodinated gastrin 2,17. *J Biol Chem*, 1986; 261: 12252-12257.

Baldwin P J, Bierman W, Jayadev J, Barrett JC, Murphy E. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res*, 1999; 26: 129-136.

Ballaz S, Barber A, Fortuño A, Del Río J, Martín-Martínez M, Gómez-Monterrey I, Herranz R, González-Muñiz R, García-López MT. Pharmacological evaluation of IQM-95,333, a highly selective CCK-A receptor antagonist with anxiolytic-like activity in animal models. *Br J Pharmacol*, 1997; 121: 759-767.

Bartsch C, Bartsch H, Fuchs U, Lippert TH, Bellman O, Gupta D. Stage dependent depression of melatonin in patients with primary breast cancer: correlation with prolactin, thyroid stimulating hormone, and steroid receptors.

Cancer, 1989; 64: 426-433.

Bartsch C, Bartsch H, Schmidt A, Ilg S, Bichler KH, Fluchter SH. Melatonin and 6-sulfatoxymelatonin circadian rhythms in serum and urine of primary prostate cancer patients: evidence for reduced pineal activity and relevance of urinary determinations. Clin Chim Acta, 1992; 209: 153-167.

Beauchamp RD, Townsend CM, Singh P, Glass EJ, Thompson JC. Proglumide a gastrin receptor antagonist inhibits growth of colon cancer and enhances survival in mice. Ann Surg, 1985; 202 (3): 303-309.

Becker-André M, André E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. Biochem Biophys Res Commun, 1993; 194 (3): 1371-1379.

Begos DG, Modlin IM. Gastrin and colon cancer. Clarifying the controversy [editorial]. J Clin Gastroenterol, 1994; 18 (3): 189-193.

Behr TM, Jenner N, Béhé M, Angerstein C, Gratz S, Raue F, Becker W. Radiolebel peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. J Nucl Med, 1999; 40: 1029-1044.

Belaiche J, Delwaide J, Louis E, Gast P. Enterochromaffine-like cells and their receptors: physiological role and physiopathological significance. Acta Gastroentero Belg, 1993; 56 (3-4): 235-244.

Berglindh T, Sachs G, Takeguchi T. Ca²⁺ -dependent secretagogue stimulation in isolated rabbits gastric glands. *Am J Physiol*, 1980; 239: 90-94.

Bertrand P, Böhme GA, Durieux C, Guyon C, Capet M, Jeantaud B, Boudeau P, Ducos B, Pendley CE, Martin GE, Floch A, Doble A. Pharmacological properties of ureido-acetamides new potent and selective non-peptide CCK-B/gastrin receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, 1994; 262: 233-245.

Biagini P, Monges G, Vuaroqueaux V, Parriaux D, Cantaloube JF, De Micco P. Human receptors gastrin/cholecystokinin: type B and type C expression in colonic tumors and celular lines. *Life Sci*, 1997; 61 (10): 1009-1018.

Biasco G, Brandi G, Renga M, Paganelli GM, Tomassetti P, Calabrese C. Is there a relationship between hypergastrinemia and colorrectal cancer risk? Rectal cell proliferation in Zollinger-Ellison syndrome. *AJC*, 1995; 90: 1365-1366.

Blackmore M, Doherty E, Manning JE, Hirst BH. Autocrine growth stimulation of human renal Wilms' tumour G401 cells by a gastrin-like peptide. *Int J Cancer*, 1994; 57 (3): 385-391.

Blask DE, Hill SM. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm*, 1986; 21: 433-449.

Blevins GT, Van de Westerlo EMA, Yule DI, Williams JA. Characterzation of cholecystokininA receptor agonist activity by a family of cholecystokininB

receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994; 269 (3): 911-916.

Boland CR. Gastrin and colorrectal neoplasia – chicken or egg, or both? [Editorial]
J Clin Gastroenterol, 1991; 13: 497-499.

Bold RJ, Ishinzuka J, Townsend CM. Progress toward hormonal therapy of
gastrointestinal cancer. *Ann Surg*, 1996; 223: 4-11.

Bold RJ, Ishizuka J, Courtney M, Townsend CM, Thompson JC. Gastrin stimulates
growth of human colon cancer cells via a receptor other than CCK-A or CCK-B.
Biochem Biophys Res Commun, 1994; 202 (3): 1222-1226.

Boldó Roda E, Botet X, Garriga J, Rius Cornadó X. Factores de riesgo del cáncer
colorrectal en España. *Cir Esp*, 1999; 65: 392-396.

Brinton LA, Gridley G, Hrubec Z, Hooper R, Fraumeni JF. Cancer risk following
pernicious anemia. *Br J Cancer*, 1989; 59: 810-813.

Brzezinski A. Melatonin in humans. *New Eng J Med*, 1997; 336: 186-195.

Buttayan R, Olsson CA, Pintar J, Chang C, Bandyk MG. Induction of the TRPM-2
gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol*, 1989; 9 (8): 3473-
3481.

Cabero JL, Li ZQ, Mardh S. Gastrin potentiates histamine-stimulated

aminopyrine accumulation in isolated rat parietal cells. *Am J Physiol*, 1991; 261(4 PT1): G621-G627.

Cáceres-Cortés J. Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem*, 1994; 269: 12084.

Campos RV, Buchan AMJ, Meloche RM, Pederson RA, Kwok YN, Coy DH. Gastrin secretion from human antral cells in culture. *Gastroenterology*, 1990; 99: 36-44.

Carlberg C, Hooft R, Hüijsduijnen R, Staple JK, DeLamater JF, Becker-André M. RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol*, 1994; 8 (6): 757-770.

Carlberg C, Wiesenberg I, Schröder M. Nuclear signaling of melatonin. *Front Horm Res*, 1997; 23: 25-35.

Caygill CP, Hill MJ, Hall CN, Kirkham JS, Northfield TC. Increased risk of cancer at multiple sites after gastric surgery for peptic ulcer. *Gut*, 1987; 28: 924-928.

Chang C, Lotti VJ. Biochemical and pharmacological characterization of an extremely potent and selective nonpeptide cholecystokinin antagonist. *Proc Natl Acad Sci*, 1986; 83: 4923-4926.

Chang HR, Bland KI. 1998. Tumores del colon. En: Zinner MJ, Schwartz SI, Ellis H. Maingot. Operaciones Abdominales. Buenos Aires; Editorial Médica Panamericana S.A., 1193-1218.

Chang MJ, Modzelewski RA, Russell DM, Johnson CS. Interleukin 1 α and γ -Interferon induction of nitric oxide production from murine tumor-derived endothelial cells. *Cancer Res*, 1996; 56: 886-891.

Chang RSL, Lotti VJ, Monaghan RL, Birnbaum J, Stapley EO, Goetz MA, Albers-Schonberg G, Patchett AA, Liesch J, Hensens OD, Springer JP. A potent non peptidic cholecystokinin antagonist selective for peripheral tissues isolated from *Aspergillus alliaceus*. *Science*, 1985; 230: 177-179.

Chang RSL, Lotti VJ. Biochemical and pharmacological characterization of an extremely potent and selective nonpeptide cholecystokinin antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 4923-4926.

Charnley RM, Thomas WM, Stanley J, Morris DL. Serum gastrin concentrations in colorectal cancer patients. *Ann R Coll Surg Engl*, 1992; 74: 138-141.

Chen D, Monstein HJ, Nylander AG, Zhao CM, Sundler F, Hakanson R. Acute responses of rats stomach enterochromaffin-like cells to gastrin: secretory activation and adaptation. *Gastroenterology*, 1994; 107: 18-27.

Chen D, Leal BZ, Reiter RJ, Abe M, Sewerynek E, Melchiorri D, Meltz ML, Poeggeler B. Melatonin's inhibitory effect on growth of ME-180 human cervical cancer cells is not related to intracellular glutathione levels. *Cancer Lett*, 1995; 91: 153-159.

Chevner JH, Sutliff VE, Grybowski DM, Jensen RT, Gardner JD. Functionally distinct receptors for cholecystokinin and gastrin on dispersed chief cells from guinea pig stomach. *Am j Physiol*, 1988; 254: G151-G155.

Chew CS, Nakamura K, Ljungstrom. Calcium signaling mechanism in the gastric parietal cell. *Yale J Biol Med*, 1992; 65 (6): 561-576.

Chicione L, Narayan S, Townsend CM Jr, Singh P. The presence of a 33-40 kDa gastrin binding protein on human and mouse colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 164: 512-519.

Chuang CN, Chen MC, Soll AH. Gastrin-histamine interactions: Direct and paracrine elements. *Scand J Gastroenterol*, 1991; 26: 95-103.

Ciccotosto GD, McLeish A, Hardy KJ, Shulkes A. Expression, processing and secretion of gastrin in patients with colorectal carcinoma. *Gastroenterology*, 1995; 19: 1142-1153.

Cini G, Coronello M, Mini E, Neri B. Melatonin's growth-inhibitory effect on hepatoma AH 130 in the rat. *Cancer Lett*, 1998; 125: 51-59.

Cohen JJ [I]. Overview: mechanisms of apoptosis. *Immunol Today*, 1993; 14: 126-130.

Cohen JJ [II]. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest*, 1993; 103 (2 SUPPL): 995-1015.

Cohen JJ, Duke RC. Glucorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol*, 1984; 132 (1): 38-42.

Cohen JJ. Glucocorticoid-induced apoptosis in the thymus. *Semin Immunol*, 1992; 4 (6): 363-369.

Conroy T, Guillemin F, Stines J, Denis B. Diagnostic et évaluation de l'extension des cancers colo-rectaux. *La Revue du Praticien*, 1994; 44: 2706-2713.

Creutzfeldt W, Lamberts R. Is hypergastrinaemia dangerous to man? *Scan J Gastroenterol*, 1991; 26 (Suppl): 179-191.

Coon SL, Roseboom PH, Baler R. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science*, 1995; 270: 1681-1683.

Cos S, Fernandez R, Guezmes A, Sanchez-Barcelo EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res*, 1998; 58: 4383-4390.

Cos S, Sanchez-Barcelo EJ. Differences between pulsatile or continuous exposure to melatonin on MCF-7 human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett*, 1994; 85: 105-109.

Cos S, Verduga R, Fernandez-Viadero C, Megias M, Crespo D. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. *Neurosci. Lett*, 1996; 216: 113-116.

Danforth DN Jr., Tamarkin L, Lippman ME. Melatonin increases estrogen receptor binding activity of human breast cancer cells. *Nature*, 1983; 305: 323-325.

Del Valle J, Chiba T, Park J, Yamada T. Distinct receptors for cholecystokinin and gastrin in canine fundic D-cells. *Am J Physiol*, 1993; 264: G811-G815.

Dickinson CJ, Takeuchi T, Guo Y-J, Stadler BT, Yamada T. Expression and processing of prohormones in nonendocrine cells. *Am J Physiol*, 1993; 264: G553-G560.

Dickinson CJ. Relationship of gastrin processing to colon cancer. *Gastroenterology*, 1995; 109 (4): 1384-1387.

Dy DY, Whitehead RH, Morris DL. SMS 201.995 inhibits in vitro and in vivo growth of human colon cancer. *Cancer Res*, 1992; 52: 917-923.

Eck KM, Yuan L, Duffy L, Ram PT, Ayyetey S, Chen I, Cohn CS, Reed JC, Hill SM. A sequential treatment regimen with melatonin and all-trans retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells. *Br J Cancer*, 1998; 77 (12): 2129-2137.

Elsborg L, Mosbech J. Pernicious anemia as a risk factor in gastric cancer. *Acta Med Scan*, 1979; 206: 315-318.

Evans BE, Rittle KE, Bock MG, DiPardo RM, Freidinger RM, Whitter WL, Gould NP, Lundell GF, Hommick CF, Veber DF, Anderson PS, Chang RSL, Lotti VJ, Cerino DJ, Chen TB, Kling PJ, Kunkuel KA, Springer JP, Hirshfield J. Design of nonpeptidal ligands for a peptide receptor: Cholecystokinin antagonists. *J Med Chem*, 1987; 30: 1221239.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 1992; 148 (7): 2207-2216.

Farriol M, Venereo Y, Orta X, Castellanos JM, Segovia-Silvestre T. In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J Appl. Toxicol*, 2000; 20: 21-24.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61: 759-767.

Finke J, Fritzen R, Ternes P. Expression of bcl-2 in Burkitt's lymphoma cell lines: induction by latent Epstein-Barr virus genes. *Blood*, 1992; 80 (2): 459-469.

Fough J, Trempe C. New human tumor cell line. 1975. En: Fough, J; Trempe, C. Human tumor cell lines in vitro. New York. Plenum, 115-141.

Furuya, Y; Berges, R; Ludmo, P; Isaacs, JT. 1994. The molecular basis of apoptosis in disease. En: Tomei, J; Cope, D. Apoptosis II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 231.

García-Mauriño S, González-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El- Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN- γ production by human circulating CD4+ cells. *J Immunol*, 1997; 159 (2): 574-581.

García Rato MA. Efectos antiestrogénicos de la melatonina en células de cáncer de mama. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo, 1998.

Gardner JD. Receptor for gastrointestinal hormones. *Gastroenterology*, 1979; 76 (1): 202-214.

Geoghegan J, Pappas TN. Clinical uses of gut peptides. *Ann Surg*, 1997; 225 (2): 145-154.

Gerber J, Payne NA. The role of gastric secretagogues in regulating gastric histamine release in vivo. *Gastroenterology*, 1992; 102: 403-408.

Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C, Potvin C, Gravel D, Bernard D, Boyle P. Nutritional factors and colon carcinoma. *Cancer*, 1997; 80: 858-864.

Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, Otulakowski G. Isoform-specific aminoterminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev*, 1994; 8 (5): 538-553.

Gilad E, Laudon M, Matzkin H, Pick E, Sofer M, Braf Z, Zisapel N. Functional melatonin receptors in human prostate epithelial cells. *Endocrinology*, 1996; 137 (4): 1412-1417.

Glücksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev*, 1951: 26: 59.

Goëtz MA, Lopez M, Monaghan RL, Chang RSL, Lotti VJ, Chen TB. Aspercilin, a novel non-peptidal cholecystokinin antagonist from *Aspergillus alliaceus*, fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot*, 1985; 41: 875-877.

Gonzalez R, Sanchez A, Ferguson JA. Melatonin therapy of advanced human malignant melanoma. *Melanom Res*, 1991; 4: 237-243.

González-Haba MG, García-Mauriño S, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. High-affinity of melatonin by human circulating T lymphocytes CD4. *FASEB J*, 1995; 9: 1331-1335.

Gores GL, Larusso NF, Miller LJ. Hepatic processing of cholecystokinin peptides. I. Estructural specificity and mechanism of hepatic extraccion. *Am J Physiol*, 1986; 250: G344-G349.

Goto Y, Katt EW, García R. Gastrin mediation of food-stimulated gastric acid secretion in the rat: inhibition by monoclonal antibody to gastrin. *Can J Physiol Pharmacol*, 1986; 64: 112.

Götz ME, König G, Riederer P, Youdum MB. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol Ther*, 1994; 61: 37.

Graffner H, Singh G, Chaudry J, Milsom JW. Omeprazole-induced hypergastrinemia does not influence growth of colon carcinoma. *Dig Dis Sci*, 1992; 37: 485-489.

Gregory RA, Hardy PM, Johns DS. The antral hormone gastrin. *Nature*, 1964; 204: 931-933.

Guo YS, Baijal M, Jin G-F, Thompson JC, Townsend CM, Singh P. Growth-promoting effects of gastrin on mouse colon cancer cells in vitro: absence of autocrine effects. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, 26: 871-877.

Gupta, D. Neuroendocrine signals in cancer. En: D. Gupta, A. Atanasio, R.J. Reiter (eds.) The Pineal Gland and Cancer. Brain Research Promotions, Tübingen, West-Germany 1988: pp 9-28.

Hahne WF, Jensen RT, Lemp GF, Gardner JD. Proglumide and benzotrip: members of different class of cholecystokinin receptor antagonist. Proc Natl Acad Sci Usa, 1981; 78: 6304-6308.

Hakanson R, Tielemans Y, Chen D, Andersson K, Mattsson H, Sundler F. Time-dependent changes in enterochromaffin-like cells kinetic in stomach of hypergastrinemic rats. Gastroenterology, 1993; 105: 15-21.

Hakanson R, Tielemans Y, Chen D, Andersson K, Ryberg B, Mattsson H, Sundler F. The biology and pathobiology of ECL cells. Yale J Biol Med, 1992; 65 (6): 761-764.

Harguindey S, Pedraz JL, García Cañero R, Pérez de Diego J, Katin M. Edelfosina, apoptosis y antiportador $\text{Na}^{2+}/\text{H}^{+}$: mecanismos de inducción e implicaciones [carta]. Oncología, 1997; 20: 75-77.

Harper AA, Raper HS. Pancreozymin, a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine. J Physiol, 1943; 102: 115.

Harrison JD, Jones JA, Morris DL. The effects of the gastrin receptor antagonist proglumide on survival gastric carcinoma. Cancer, 1990; 66: 1449-1452.

Helander HF, Keeling DJ. Cell biology of gastric acid secretion. *Baillière's Clin Gastroenterol*, 1993; 7 (1): 1-21.

Heldsinger AA, Vinik AI. Action of gastrin in guinea pig oxintic cells. Studies using quantitative cytochemistry. *J Clin Invest*, 1984; 74: 124-132.

Hersey SJ, Sachs G. Gastric acid secretion. *Physiol Rev*, 1995; 75 (1): 155-189.

Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 1992; 11 (2): 121-139.

Hill SM, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. *Cancer Res*, 1988; 48: 6121-6126.

Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR γ : the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 205: 1976-1983.

Ho Ys, Wang YJ, Lin JK. Induction of p53 and p21/WAF1/CIF1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells. *Mol Carcinol*, 1996; 16: 20-31.

Hockenbery DM. Defining apoptosis. *Am J Pathol*, 1995; 146 (1): 16-19.

Hockenbery DM, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990; 348: 334-336.

Hockenbery DM, Oltval ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993; 75 (2): 241-251.

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88 (16): 6961-6965.

Höker M, Hughes J, Folsch UR, Schmidt WE. PD 135-158 a CCK-B/gastrin receptor antagonist stimulates rats pancreatic enzyme secretion as a CCK-A receptor agonist. *Eur J Pharmacol*, 1993; 242 (1): 105-108.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancer. *Science*, 1991; 253: 49.

Holm L, Jagare A. Role of prostaglandins in regulation of gastric mucosal blood flow and acid secretion. *Am J Physiol*, 1992; 263: G446-G451.

Holst JJ, Fahrenkrug J, Stadil F, Rehfeld JF. Gastrointestinal endocrinology. *Scand J Gastroenterol*, 1996; 31 Suppl 216: 27-38.

Hoosein NM, Kiener PA, Curry RC, Brattain MG. Evidence for autocrine growth stimulation of cultured colon tumor cells by a gastrin/cholecystokinin-like peptide. *Exp Cell Res*, 1990; 186: 15-21.

Huang SC, Fortune KP, Wank SA, Kopin AS, Gardner JD. Multiple affinity states of different cholecystokinin receptors. *J Biol Chem*, 1994; 269 (42): 26121-26126.

Huang SC, Zhang L, Chiang HCV, Wank SA, Maton PN, Gardner JD, Jensen RT. Benzodiazepine analogues L365,260 and l364,718 as gastrin and pancreatic CCK receptor antagonists. *Am J Physiol*, 1989; 257: G169-G174.

Hutchinson JB, Dimalina R, Dockray GJ. Neuropeptides in the gut: Quantification and characterization of cholecystokinin octapeptide-bombesine and vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivities in the myenteric plexus of guinea pig intestine. *Peptides*, 1981; 2: 23-30.

Ichikawa T, Ishihara K, Saigenji K, Hotta K. Stimulation of mucus glycoprotein biosynthesis in rat gastric mucosa by gastrin. *Biochem Pharmacol*, 1993; 46 (9): 1551-1557.

Imdahl A, Eggstein S, Crone C, Farthmann EH. Growth of colorectal carcinoma cells: regulation in vivo by gastrin-receptor antagonist proglumide. *J Cancer Res Clin Oncol*; 1989; 115: 388-392.

Imdahl A, Mantamadiotis T, Eggstein S, Farthmann EH, Baldwin GS. Expression of gastrin, gastrin/CCK-B and gastrin/CCK-C receptors in human colorectal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1995; 121 (11): 661-666.

Innis RB, Snyder SH. Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77: 6917-6921.

Ishida Y, Furukawa Y, Decaprio JA, Saito M, Griffin JD. Treatment of myeloid leukemic cells with the phosphatase inhibitor okadaic acid induces cell cycle arrest at either G1/S or G2/M depending on dose. *J Cell Physiol*, 1992; 150 (3): 484-492.

Ishizuka J, Martinez J, Townsend CM Jr, Thompson JC. The effect of gastrin on growth of human stomach cancer cells. *Ann Surg*, 1992; 215: 528-535.

Ishizuka J, Townsend CM Jr, Bold RJ, Martinez J, Rodriguez M, Thompson JC. Effects of gastrin on 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, intracellular calcium and phosphatidylinositol hydrolysis in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 1994; 54: 2129-2135.

Ito M, Matsui T, Taniguchi T, Murayama T. Functional characterization of a human brain cholecystokinin-B receptor: a trophic effect of cholecystokinin and gastrin. *Gastroenterology*, 1994; 104: 831 A.

Ivy AC, Oldberg E. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am J Physiol*, 1928; 86: 599.

Jacobs LR. Fiber and colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 1988; 17: 747.

Jacobson MD, Burnett JF, King MD, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial AND. *Nature*, 1993; 361: 365-369.

Jansen JBMJ, De Jong AJL, Singer MV, Niebel W, Rovatti LC, Lamers CBHW. Role of cholecystokinin in bombesin - and meal - stimulated pancreatic polypeptide secretion in dogs. *Dig Dis Sci*, 1990; 35 (9): 1073-1077.

Jensen RT, Murphy RB, Trampota M, Scheneider LH, Jones SW, Howard JM, Gardner JD. Proglumide analogues: potent cholecystokinin receptor antagonists. *Am J Physiol*, 1985; 249: G214-G220.

Ji L, Zhang G, Uematsu S, Akahori Y Hirabaashi Y. Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide. *FEBS Lett*, 1995; 358 (2): 211-214.

Jiang S, Chow SC, McCabe MJ, Orrenius S. Lack of Ca²⁺ involvement in thymocyte apoptosis induced by chelation of intracellular Zn²⁺. *Lab Invest*, 1995; 73: 111.

Jin Y, Heck DE, DeGeorge G, Tian Y, Laskin JD. 5-Fluoruracil supresses nitric oxide biosynthesis in colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 1996; 56: 1978-1982.

Johnsen AH, Rehfeld JF. Cionin, a disulfotyrosyl hybrid of cholecystokinin and gastrin from the neural ganglion of the protochordate *Ciona intestinalis*. *J Biol Chem*, 1990; 265 (6): 3054-3058.

Johnson LR, Guthrie PD. Proglumide inhibition of trophic action of pentagastrin. *Am J Physiol*, 1984; 246: G62-G66.

Johnson LR. Gastric secretion. 1991. En: Johnson LR. *Gastrointestinal Physiology*. St Louis (Missouri). Mosby (4^o edición), 66-84.

Johnson LR. Effrect of exogenous gut hormone on gastrointestinal mucosal growth. *Scand J Gastroent Suppl*, 1982; 17 (74): 89-92.

Johnson LR. New aspects of the trophic action of gastrointestinal hormones. *Gastroenterology*, 1977; 70: 278-288.

Jorpes JE. Memorial lecture. The isolation and chemistry of secretin and cholecystokinin. *Gastroenterology*, 1968; 55: 157.

Karasek M., Winczyk K., Kunert-Radek J., Wiesenberg I., Pawlinowski M. Antiproliferative Effects of Melatonin and CGP 52608 on the Murine Colon 38 Adenocarcinoma In Vitro and In Vivo. *Neuroendocrinol. Lett*, 1998; 19: 71-78.

Karlin DA, McBath M, Jones RD, Elwin KE, Romsdahl MM. Hypergastrinemia and colorrectal carcinogenesis in the rat. *Cancer Lett*, 1985; 29: 73-78.

Kerr JFR, Harmon B, Searle J. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpoletail durin spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J Cell Sci*, 1974; 14:571.

Kerr JFR, Searle J. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch*, 1973; 13: 87.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26: 239.

Kikendall JW, Glass AR, Sobin LH, Bowen PE. Serum gastrin is not hihger in subjects with colonic neoplasia. *Am J Gastroenterol*, 1992; 87: 1394-1397.

Kochman ML, Del Valle J, Dickinson CJ, Boland CR. Post-translational processing of gastrin in neoplastic human colonic tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; 189: 1165-1169.

Kodner, I.J.; Fry, R.D.; Fleshman, J.W.; Birnbaum, E.H. 1995. Colon, recto y ano. En: Schwartz, S.I.; Shires, G.T.; Spencer, F.C. *Principios de Cirugía*. México D.F.; Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V, 1229-1345.

Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, Uchiyama A, Matsunari Y, Mibu R, Tanaka M. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol*, 1999; 70: 222-229.

Kolber MA, Broschat K, Landa-González B. Cytochalasin B induces cellular DNA fragmentation. *FASEB J*, 1990; 4 (12): 3021-3027.

Konturek JW, Stoll R, Konturek SJ, Domschke W. Cholecystokinin in the control acid secretion in man. *Gut*, 1993; 34: 321-328.

Konturek JW, Thor P, Maczka M, Stoll R, Domschke W. Role of cholecystokinin in the control of gastric emptying and secretory response to fatty meal in normal subjects and duodenal ulcer patients. *Scand J Gastroenterol*, 1994; 29: 583-590.

Kopin AS, Lee TL, McBride EW, Miller LJ, Lu M, Lin HY, Kolakowsky LF Jr, Beinborn M. Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 3605-3609.

Korsmeyer SJ. bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 1992; 80 (4): 879-886.

Kusyk CJ, McNeil NO, Johnson LR. Stimulation of growth of a colon cancer cell line by gastrin. *Am J Physiol*, 1986; 251: G597-G601.

Kyprianou N, English HF, Isaacs JT. Activation of Ca²⁺- Mg²⁺ dependent

endonuclease as an early event in castration-induced prostatic cell death. *Prostate*, 1988; 13 (2): 103-117.

Lamberts R, Creutzfeldt W, Struber HG, Brunner G, Solcia E. Long-term omeprazole therapy in peptic ulcer disease: gastrin endocrine cells growth and gastritis. *Gastroenterology*, 1993; 104 (5): 1356-1370.

Lamers CB, Walsh JH, Jansen JB, Harrison AR, Ippoliti AF, Van Tongeren JH. Evidence that gastrin-34 is preferentially released from the human duodenum. *Gastroenterology*, 1982; 83: 233-239.

Landa García JI. Cáncer colorrectal y gastrina. Una interesante relación por investigar. *Cir Esp*, 1996; 60: 79-80.

Lane DP. p53 the guardian of the genome. *Nature*, 1992; 358: 15.

Lebovitz PL, Finley GG, Melhem M, Dagnal E, Meisler A. Receptors of gastrin in colorectal cancer cell lines. *Gastroenterology*, 1994; 106: A408.

Lee YM, Beinborn M, Mc Bride EW, Lu M, Kolakowsky LF Jr, Kopin AS. The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor. Cloning and characterization. *J Biol Chem*, 1993; 268: 8164-8169.

Lemus-Wilson A., Kelly P.A., Blask D.E. Melatonin blocks the stimulatory effects of prolactin on human breast cancer cell growth in culture. *Br J Cancer*, 1995; 72: 1435-1440.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, 1958; 80: 2587.

Levin B, Murphy GP. Revision in American Cancer Society recommendations for the early detection of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*, 1992; 42 (5): 296-299.

Levine AJ, Mommand J, Finlay CA. The p53 tumor supressor gene. *Nature*, 1991; 351: 453-456.

Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, Tancini G, Conti A, Maestroni GM. A randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in patients with brain metastasis due to solid neoplasms. *Cancer*, 1994; 73: 699-701.

Lissoni P, Barni S, Meregalli S. Modulation of cancer endocrine therapy by melatonin: a phase II study of tamoxifen alone. *Br J Cancer*, 1995; 71: 854-856.

Lissoni P., Barni S., Tancini G., Rovelli F., Ardizzoia a., Conti A., Maestroni G.J.M. A study of the mechanism involved in the immunostimulatory action of the pineal hormone in cancer patients. *Oncology*, 1993; 50: 399-402.

Lissoni P, Meregalli S, Nosetto L. Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology*, 1996; 53: 43-46.

Liu Y, Bhalla K, Hill C, Priest D. Evidence for involvement of tyrosine phosphorylation in taxol-induced apoptosis in a human ovarian tumor cell line. *Biochem Pharmacol*, 1994; 48 (6): 1265-1272.

Loewe CJ, Grider JR, Gardiner J, Vlahcevic ZR. Selective inhibition of pentagastrin and cholecystokinin stimulated exocrine secretion by proglumide. *Gastroenterology*, 1985; 89: 746-751.

Lotti VJ, Chang RSL. A new potent and selective nonpeptide gastrin and brain cholecystokinin receptor (CCK-B) ligand: L365,260. *Eur J Pharmacol*, 1989; 162: 278-280.

Lotti VJ, Chang RSL. A new potent and selective nonpeptide gastrin antagonist and brain cholecystikinin receptor (CCK-B). *Eur J Pharmacol*, 1989; 162: 273-280.

Lundegardh G, Adami HO, Helmick C, Zack M. The risk of large bowel cancer after partial gastrectomy for benign ulcer disease. *Ann Surg*, 1990; 212: 714-719.

Lundell L, Lindstedt G, Olbe L. Origin of gastrin liberated by gastrin releasing peptide in the man. *Gut*, 1987; 28: 1128-1133.

Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol*, 1987; 68: 384-391.

Maestroni GJM, Conti A, Lissoni P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res*, 1994; 54: 4740-4743.

Maestroni GJM, Covacci V, Conti A. A hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res*, 1994; 54: 2429-2432.

Maestroni GJM. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*, 1993; 14: 1-10.

Magous R, Bali JP. Evidence that proglumide and benzotript antagonize secretagogue stimulation of isolated gastric parietal cells. *Regul Pept*, 1983; 7: 223-241.

Makovec F, Bani M, Cereda R, Chisté R, Pacini MA, Revel L, Rovati LA, Rovati LC. Pharmacological properties of lorglumide as a member of a new class of cholecystokinin antagonists. *Arzneim-Forsch*, 1987; 37: 1265-1268.

Makovec F, Bani M, Chisté R, Revel L, Rovati LC, Setnikar L. Different peripheral and central antagonistic activity of new glutararomic acid derivates on satiety induced by cholecystokinin in rats. *Regul Pept*, 1986; 16: 281-290.

Makovec F, Chisté R, Bani M, Pacini MA, Setnikar I, Rovati LA. New glutaromic acid derivates with potent competitive and specific cholecystokinin-antagonistic activity. *Arzneim Forsch*, 1985; 35: 1048-1051.

Mantamadiotis T, Baldwin GS. The seventh transmembrane domain of gastrin CCK/gastrin receptors contributes to non-peptide antagonist binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 201 (3): 1382-1389.

Mantyh CR, Pappas TN, Vigna SR. Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B/ gastrin receptors in the canine upper gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 1994; 107: 1019-1030.

Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D [I]. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J*, 2000; 14: 1677-1679.

Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D [II]. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res*, 2000; 28: 242-248.

Martín SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci*, 1994; 19: 26-30.

Marvik R, Johnsen JF, Rehfeld JF, Sandvik A, Waldum HL. Effect of cionin on histamine and acid secretion by perfused rat stomach. *Scand J Gastroenterol*, 1994; 29: 591-594.

Marx J. New colon cancer gene discovered. *Science*, 1993; 260:751.

Masclee AAM, Jansen JBMJ, Driessen WMM, Geusken LM, Lamers CBHW. Effect of truncal vagotomy on cholecystokinin release gallbladder contraction and gallbladder sensitivity to cholecystokinin in humans. *Gastroenterology*, 1990; 98: 1338-1344.

Matsumoto M, Park J, Yamada T. Gastrin receptor characterization: affinity cross-linking of the gastrin receptor on canine parietal cell. *Am J Physiol*, 1987; 252: G143-147.

Mauss S, Niederau C, Hengels KJ. Effects of gastrin, proglumide, loxiglumide and L-365,260 on growth of human colon carcinoma cells. *Anticancer Res*, 1994; 14: 215-220.

Mecklin JP, Jarvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer*, 1991; 68 (5): 1109-1112.

Meers P, Mealy T. Calcium-dependent Annexin V binding to phospholipids: stoichiometry, specificity, and the role of negative charge. *Biochemistry*, 1993; 32 (43): 11711-11721.

Melen-Mucha G, Winczyk K, Pawlikowski M. Somatostatin analogue octeotride and melatonin inhibit bromodeoxyuridine incorporation into cell nuclei and enhance apoptosis in the transplantable murine colon 38 cancer. *Anticancer Res*, 1998 (5 A): 3615-3619.

Menéndez-Peláez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow-Walden L, Pablos MI, Tan DX. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem*, 1993; 53 (4): 373-382.

Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res*, 1993; 15 (2): 59-69.

Messmer UK, Lapetina EG, Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW-264.7 macrophages is antagonized by protein-kinase-C and protein-kinase-A activating compounds. *Mol Pharm*, 1995; 47 (4): 757-765.

Meterissian SH. Apoptosis. Its role in the progression of and chemotherapy for carcinoma. *J Am Coll Surg*, 1997; 184: 658-666.

Meyer G, Beinborn M, Sewing KF. Characterization of CCK-A receptor mediated

pepsinogen secretion in porcine chief cells. *Pharmacology*, 1996; 53: 48-59.

Meijers M, Appel MJ, van Garderen-Hoetmer A, Lamers CB, Rovati LC, Jansen JB, Woutersen RA. Effects of cholecystokinin and bombesin on development of azaserine-induced pancreatic tumours in rats: modulation by the cholecystokinin receptors antagonist lorglumide. *Carcinogenesis*, 1992; 13 (9): 1525-1528.

Missbach M, Jagher B, Sigg I, Nayeri S, Carlberg C, Weisenberg I. Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor α with potent antiarthritic activity. *J Biol Chem*, 1996; 271 (23):13515-13522.

Miyake A, Mochizuki S, Kawashima H. Characterization of cloned human cholecystokinin receptors as a gastrin receptor. *Biochem Pharmacol*, 1994; 47 (8): 1339-1343.

Miyasaka K, Guan D, Liddle RA, Green GM. Feed-back regulation by trypsin: evidence intraluminal CCK-releasing peptide. *Am J Physiol*, 1989; 257: G175-G181.

Modlin IM, Nangia AK. The pathobiology of the human enterochromaffin-like cell. *Yale J Biol Med*, 1992; 65 (6): 775-792.

Modlin IM, Tang LH. A new look at an old hormone: gastrin. *Trends Endocrinol Metab*, 1993; 4: 51-57.

Molis TM, Spriggs LL, Hill SM. Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 1994; 8: 1681-1690.

Moran TH, Robinson PH, Godrich MS, McHugh PR. Two brain cholecystokinin receptors: implications for the behavioral actions. *Brain Res*, 1986; 362: 175-179.

Mulholland MW, Debas HT. Physiology and pathophysiology of gastrin: a review. *Surgery*, 1988; 102: 135-147.

Murphy MG, Sytnik B, Kovacs TOG, Mertz H, Ewanik D, Shingo S, Lin JH, Gertz BJ, Walsh JH. The gastrin receptor antagonist L365,260 inhibits stimulated acid secretion in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 1993; 54: 533-539.

Narayan S, Chicione L, Singh P. Characterization of gastrin binding proteins on colonic mucosal membranes of guinea pigs. *Mol Cell Biochem*, 1992; 112: 163-171.

Nemeth J, Taylor B, Powels S, Varro A, Dockray GJ. Identification of progastrin derived peptides in colorectal carcinoma extracts. *Gut*, 1993; 34: 90-95.

Nishida A, Miyata K, Tsutsumi R, Yuki H, Azukawa S, Kobayashi A, Kamato T, Ito H, Yamano M, Katuyama Y, Satoh M, Ohta M, Honda K. [I]. Pharmacological profile of (R)-1-[23-Dihydro-1-(2'-methyl-phenacyl)-2-oxo-5-phenyl-1H-14-benzodiazepin-3-yl]-3-(3-methylphenyl)urea (YM022) a new potent and selective

gastrin/cholecystokinin-B receptor antagonist in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994; 269 (2): 725-731.

Nishida A, Takinami Y, Yuki H, Kobayashi A, Azukawa S, Kamato T, Ito H, Yamano M, Nagakura Y, Miyata K [II]. YM022 {(R)-1-[23-Dihydro-1-(2'-methyl-phenacyl)-2-oxo-5-phenyl-1H-14-benzodiazepin-3-yl]-3-(3-methylphenyl)urea} a potent and selective gastrin/cholecystokinin-B receptor antagonist prevents gastric and duodenal lesions in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994; 270 (3): 1256-1261.

Orrenius S, Nicotera P. The calcium ion and cell death. *J Neural Transm*, 1994; 43: 1-11.

Owens GP, Cohen JJ. Identification of genes involved in programmed cell death. *Canc Metastasis Rev*, 1992; 11(2): 149-156.

Papazisis K.T., Kouretas D., Geromichalos G.D., Sivridis E., Tsekrelis O.K., Dinitriadis K.A., Kirtsaris A.H. Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines. *J Pineal Res*, 1998; 25: 211-218.

Patterns of cancer in five continents. 1990. Lyon: World Health Organization.

Pendley CE, Fitzpatrick LR, Ewing RW, Molino BF, Martin GE. The gastrin/cholecystokinin-B receptor antagonist L-365,260 reduces basal acid secretion and prevents gastrointestinal damage induced by aspirin, ethanol and

cysteamine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993; 265 (3): 1348-1354.

Penman ID, El-Omar E, Ardill JES, McGregor JR, Galloway DJ, O'Dwyer PJ.

Plasma gastrin concentrations with colorectal neoplasia and unaltered following tumor resection. *Gastroenterology*, 1994; 106: 1263-1270.

Persengiev S.P., Kyurkchiev S. Selective effect of melatonin on the proliferation of lymphoid cells. *Int J Biochem*, 1993; 25: 441-444.

Petranka J., Baldwin W., Bierman J., Jayadev S., Barret J.C., Murphy E. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. *J Pineal Res*, 1999; 26: 129-136.

Pierce GB, Lewellyn AL, Parchment RE. Mechanism of programmed cell death in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86 (10): 3654-3658.

Pinson DM, Havu N, Szetern MI, Mattsson H, Looney GA, Kimler BF, Hurwitz A. Drug-induced hypergastrinemia: Absence of trophic effects on colonic carcinoma in rats. *Gastroenterology*, 1995; 108: 1068-1074.

Pisegna JR, De Weert A, Huppi K, Wank SA. Molecular cloning of the human brain and gastric cholecystokinin receptor: structure functional expression and chromosomal localization. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; 189: 296-303.

Poon AM, Mak AS, Luk HT. Melatonin and 2 [¹²⁵I] iodomelatonin binding sites in the human colon. *Endocr Res*, 1996; 22 (1): 77-94.

Prinz C, Kajimura M, Scott DR, Mercier F, Helander HF, Sachs G. Histamine secretion from rat enterochromaffinlike cells. *Gastroenterology*, 1993; 105: 449-461.

Ramani N, Praissman M. Molecular identification and characterization of the gastrin receptor in guinea pig gastric glands. *Endocrinology* 1989, 124: 1881-1887.

Rasmussen K, Czachura JF, Stockton ME, Howbert JJ. Electrophysiological effects of diphenylpyrazolidinone cholecystokinin-B and cholecystokinin-A antagonist on midbrain dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993; 264: 480-485.

Rehfeld JF, Hansen HF, Marley PD, Stengard-Petersen K. *Ann N Y Acad Sci*, 1985; 448: 11-23.

Rehfeld JF, Johnsen AH. Identification of gastrin component I as gastrin-71. The largest possible bioactive progastrin product. *Eur J Biochem*, 1994; 223 (3): 765-773.

Reina AJ, López-Cantarero M, Gallardo A, Fuentes O, Gaitán D, García A, González C, Acuña-Castroviejo D. Time-dependent changes of serum gastrin and gastrin receptors in the rat oxyntic mucosa after proximal gastric vagotomy. *J Surg Res*, 1997; 67: 186-192.

Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int*, 1995; 27: 453-460.

Renga M, Brandi G, Paganelli GM, Calabrese C, Papas S, Tosti A, Tomassetti P, Miglioli M, Biasco G. Rectal cell proliferation and colon cancer risk in patients with hypergastrinaemia. *Gut*, 1997; 41:330-332.

Reubi JC, Schaer JC, Waser B. Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res*, 1997; 57: 1377-1386.

Richardson CT, Bailey BA, Walsh JH, Fordtran JS. The effect of an H₂-receptor antagonist on food-stimulated acid secretion, serum gastrin and gastric emptying in patients with duodenal ulcers. *J Clin Invest*, 1975; 55: 536-542.

Ritcher HM. Physiologic consequences of vagotomy and gastric resection. *Gastroenterol Clin North Am*, 1994; 23: 193-213.

Roche S, Bali JP, Galleyrand JC, Magous R. Characterization of gastrin-type receptor on rabbit gastric parietal cells using L365,260 and L364,718. *Am J Physiol*, 1991; 260: G182-G188.

Roche S, Gusdinar T, Bali JP, Magous R. "Gastrin" and "CCK" receptors on histamine and somatostatin -containing cells from rabbit fundic mucosa- II. *Biochem Pharmacol*, 1991; 42 (4): 771-776.

Rovati AL Inhibition of gastric secretion by anti-gastrinic and H2 blocking agents. Scand J Gastroenterol, 1976; 11: 113-118.

Rovati AL. Nuovi aspetti della fisiopatologia gastroduodenale, gastrina ed antigastrinici. Minerva médica, 1969; 60: 999-1010.

Sakaguchi T, Sandoh N, Aono T. Enhanced gastric acid secretion induced by gastrin can be suppressed by glucose injected into portal vein in rats. Biochem Pharmacol, 1994; 48 (1): 205-206.

Sandler RS. Datos epidemiológicos de cáncer colorrectal y factores de riesgo para el mismo. Gastroenterol Clin North Am, 1996; 4: 731-748.

Sandvik AK, Dimaline R, Marvik R, Brenna E, Waldum HL. Gastrin regulates histidine decarboxylase activity and mRNA abundance in rat oxyntic mucosa. Am J Physiol, 1994; 267: G254-G258.

Sandvik AK, Waldum HL CCK-B (gastrin) receptor regulates gastric histamine release and acid secretion. Am J Physiol, 1991; 260: G925-G928.

Saunders JW. Death in embryonic systems. Science, 1966; 154: 604.

Scarpignato C, Varga G, Dobronyi I, Papp M. Effect of a new potent CCK antagonist, lorglumide, on carulein and bombesin-induced pancreatic secretion and growth in the rat. Br J Pharmacol, 1989; 96 (3): 661-669.

Schmassmann A, Garner A, Flogerzi B, Hasan MY, Sanner M, Varga L, Halter F. Cholecystokinin type B receptor antagonist PD-136,450 is a partial secretory agonist in the stomach and full agonist in the pancreas of the rat. *Gut*, 1994; 35 (2): 270-274.

Schmidt WE, Creutzfeldt W, Höker M, Hustede R, Choudhury AR, Schleser A, Rovati LC, Fölssch UR. Cholecystokinin receptor antagonist loxiglumide modulates plasma levels of gastro-entero-pancreatic hormones in man. *Eur J Clin Invest*, 1991; 21: 501-511.

Seitz JF, Giovanni M, Gouvernet J, Gauthier AP. Elevated serum gastrin levels in patients with colorectal neoplasia. *J Clin Gastroenterol*, 1991; 13: 541-545.

Sethi T, Herget T, WU SV, Walsh JH, Rozengurt E. CCKA and CCKB receptors expressed in small cell lung cancer lines and mediates Ca²⁺ mobilization and clonal growth. *Cancer Res*, 1993; 53 (21): 5208-5213.

Seva C, Dickinson CJ, Yamada T. Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin. *Science*, 1994; 265: 410-412.

Seva C, Scemama JL, Bastié MJ, Pradayrol L, Vaysse N. Lorglumide and loxiglumide inhibit gastrin-stimulated DNA synthesis in a rat tumoral acinar pancreatic cell line (AR42J). *Cancer Res*, 1990; 50: 5829-5833.

Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest*, 1995; 96 (1): 491-503.

Shiu SYW, Li L, Xu JN, Pang CS, Wong JTY, Pang SF. Melatonin-induced inhibition of proliferation and G₁/S cell cycle transition delay of human choriocarcinoma Jar cells: Possible involvement of MT₂ (MEL_{1B}) receptor. *J Pineal Res*, 1999; 27:183-192.

Shulkes A, Baldwin GS. Biology of gut cholecystokinin and gastrin receptors. *Clin Exp Pharmacol Physio*, 1997; 24 (3-4): 209-216.

Shulkes A, Read M. Regulation of somatostatin secretion by gastrin and acid dependent mechanism. *Endocrinology*, 1991; 129: 2329-2334.

Simon B, Eissele M, Czornik M, Swarovsky B, Arnold R. Effects of gastrin receptor blockade on gastrin histidine decarboxylase gene expression in rats during achlorhydria. *Scand J Gastroenterol*, 1995; 30: 503-510.

Singh P, Kumar S, Townsend CM Jr, Thompson JC [I]. Structural requirements for the binding of gastrin to mouse colon cancer cells. *Surg Forum*, 1987; 38: 171-173.

Singh P, Le S, Beauchamp RD, Townsend CM Jr, Thompson JC [II]. Inhibition of pentagastrin-stimulated up-regulations of gastrin receptors on growth of mouse

colon tumor (MC-26), in vivo by proglumide, a gastrin receptor antagonist. *Cancer Res*, 1987; 47: 5000-5004.

Singh P, Owlia A, Espeijo R, Dai B. Novel gastrin receptors mediate mitogenic effects of gastrin and processing intermediates of gastrin on Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 1995, 270. 8429-8438.

Singh P, Rae-Venter B, Townsend CM, Khalil T, Thompson JC. Gastrin receptors in normal and malignant gastrointestinal mucosa: age-associated changes. *Am J Physiol*, 1985; 249: 6761-6769.

Singh P, Xu Z, Dai B, Rajaraman S, Rubin N, Dhruva B. Incomplete processing of progastrin expressed by human colon cancer cells: role of noncarboxyamidated gastrins. *Am J Physiol*, 1994; 266: G459-G468.

Sirinek KR, Levine BA, Moyer M. Pentagastrin stimulates in vitro growth of normal and malignant human colon epithelial cells. *Am J Surg*, 1985, 149: 35-39.

Skehan P. 1995 Assays of cell growth and cytotoxicity. In: *Cell growth and apoptosis: A practical approach*. C.G. Stuzinski, ed, Oxford Press, New York, pp 169-191.

Smith JP, Kramer ST, Bagheris S. Effects of high-fast diet and L364,718 on growth of human pancreas cancer. *Dig Dis Sci*, 1990; 35 (6): 726-732.

Smith JP, Kramer ST, Solomon TE. CCK stimulates growth of six human

pancreatic cancer cell lines in serum free medium. *Regul Pept*, 1991; 32: 341-349.

Smith JP, Liu G, Soundararajan V, Mc Laughlin PJ, Zagon IS [II]. Identification and characterization of CCK-B/gastrin receptors in human pancreatic cell lines. *Am J Physiol*, 1994; 266: R377-R383.

Smith JP, Verderame MF, Mclaughlin PJ, Zagon IS. Characterization of the CCK-C (Cancer) receptor in human pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 1998; 116 (4): G5047.

Smith JP, Wood JG, Solomon TE [I]. Elevated gastrin levels in patients with colon cancer or adenomatous polyps. *Dig Dis Sci*, 1989; 34: 171-174.

Smith PJ, Solomon TE. Effects of gastrin, proglumide and somatostatin on growth of human colon cancer. *Gastroenterology*, 1988, 95: 1541-1548.

Sobhani I, Lehy T, Laurent-Puig P. Chronic endogenous hypergastrinemia in humans: evidence for a mitogenic effect on the colonic mucosa. *Gastroenterology*, 1993; 105: 22-30.

Soll AH, Amirian DA, Thomas LP, Reedy TJ, Elashoff JD. Gastrin receptors on isolated canine parietal cells. *J Clin Invest*, 1984; 73: 1434-1447.

Soll AH, Grossman MI. The interactions of stimulants on the function of isolated canine parietal cells. *Philos Trans R Soc Lond [Biol]*, 1981; 296: 5-15.

Soll AH. The action of secretagogues on oxygen uptake by isolated mammalian parietal cells. *J Clin Invest*, 1978; 61: 370-380.

Song I, Brown DR, Wiltshire RN, Trent JM, Yamada T. The human gastrin receptor gene (hGRg): Molecular structure and localization to human chromosomen 11p 15.4. *Gastroenterology*, 1994; 104: A856.

Sperti C, Militello C, Rovati L, Behboo R, Khajeturian E, Perasole A, Alaggio R, Pedrazzoli S. Effect of cholecystokinin analogue caerulein and cholecystokinin antagonist lorglumide on pancreatic carcinogenesis in the rat. *J Surg Oncol*, 1994; 57 (1): 11-16.

Steinmetz ML, Kushi LH, Bostick RM, et al. Vegetables, fruit and colon cancer in the Iowa Women's Health Study. *AM J Epidemiol*, 1994; 139: 1.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 1995; 267: 1445-1449.

Stepan VM, Sawada M, Todisco A, Dickinson CJ. Glycine-extended gastrin exerts growth-promoting effects on human colon cancer cells. *Mol Med*, 1999; 5 (3): 147-159.

Stepan VM, Sawada M, Yamada T, Dickinson CJ. Glycine-extended gastrin exerts growth-promotting effects on colon cancer cell lines. *Gastroenterology*, 1996; 110: A1122.

Stern DH, Walsh JH. Gastrin release in postoperative ulcer patients: evidence for release of duodenal gastrin. *Gastroenterology*, 1973; 64: 363-369.

Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of Annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. *Arch Biochem Biophys*, 1992; 298 (1): 187-191.

Talley NJ, Chute CG, Larson DE, Epstein R, Lydick EG, Melton LJ. Risk for colorectal adenocarcinoma in pernicious anemia: a population-based cohort study. *Ann Intern Med*, 1989; 111: 738-742.

Talley NJ. Chronic (nonerosive) gastritis: pathogenesis and management. *Dig Dis*, 1989; 7: 61-75.

Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Hippman M, Chabner B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12 demethylbenzanthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res*, 1981, 41: 4432-4436.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester IC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*, 1993; 1: 57-60.

Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett*, 1993; 70: 65-71.

Tari A, Yamamoto G, Yonei Y, Sumii M, Sumil K, Haruma K, Kajiyama G, Wu V, Sachs G, Walsh JH. Effect of histamine on rat gastric H (+)-K (+)-ATPase alpha-subunit expression. *Am J Physiol*, 1994; 266. G444-G450.

Tariq A, Parmar NS, Ageel AM. Gastric and duodenal antiulcer and cytoprotective effects of proglumide in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987; 241: 602-607.

Tatsuta M, Yamamura H, Ichii M, Taniguchi H. Effect of prolonged administration of gastrin on experimental carcinogenesis in rat colon induced by intrarectal instillation of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res*, 1983; 43: 2258-2260.

Tatsuta M, Yamamura H, Lishi H, Noguchi S, Ichii M, Taniguchi H. Gastrin has no promoting effect on chemically induced colonic tumors in Wistar rats. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1985; 21: 741-744

Tew KD, Houghton PJ, Houghton JA. 1993. Preclinical and clinical modulation of anticancer drugs. Hollinger PJ (editor).

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267: 1456-1462.

Tielemans Y, Hakanson R, Willems G. Hyperplastic manifestations of the

enterochromaffin-like cells in the stomach of rats with congenital moderate hypergastrinemia. *Scand J Gastroenterol*, 1994; 29: 219-225.

Upp JR, Singh P, Townsend CM, Thompson JC. The clinical significance of gastrin receptors in human colon cancer. *Cancer Res*, 1989; 49: 488-492.

Vanderwinden JM. Role of nitric oxide in gastrointestinal function and disease. *Acta Gastroenterol Belg*, 1994; 57 (3-4): 224-229.

Van Solinge WW, Nielse FC, Friis-Hansen L, Falkmer UG, Rehfeld JF. Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas. *Gastroenterology*, 1993; 104: 1099-1107.

Varro A, Dockray GJ. Post-translational processing of pro-gastrin: inhibition of cleavage phosphorylation and sulphation by brefeldin A. *Biochem J*, 1993; 295: 813-819.

Varro A, Voronina S, Dockray GJ. Pathways of processing of gastrin precursors in rat antral mucosa. *J Clin Invest*, 1995; 95: 1642-1649.

Verity MA. Oxidative damage and repair in the developing nervous system. *Neurotoxicology*, 1994; 15 (1): 81-91.

Vivancos J, Viñas O, Font J. La apoptosis. *Medicina Integral*, 1995; 25 (8): 357-366.

Waldum HL, Sandvik AK, Brenna E, Petersen H. Gastrin-histamine sequence in the regulation of gastric acid secretion. *Gut*, 1991; 32: 698-701.

Waldum HL. *Gastroenterology*, 1989; 96: 1393-1404.

Walsh JH, Lamers CBHW, Valenzuela JE. Cholecystokinin-octapeptidelike immunoreactivity in human plasma. *Gastroenterology*, 1982; 82: 538-544.

Walsh JH. Physiology and pathophysiology of gastrin. *Mt Sinai J Med*, 1992; 59: 117-123.

Walsh JH. Role of gastrin as trophic hormone. *Digestion*, 1990; 47: 11-16.

Wank SA, Pisegna JR, De Weert A. Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc Nat Acad Sci*, 1992; 89: 8691-8695.

Wank SA, Pisegna JR, De Weerth A. Cholecystokinin receptor family. Molecular cloning structure and functional expression in rat guinea pig and human. *Ann N Y Acad Sci*, 1994; 713: 49-66.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan C, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 1992; 356: 314-317.

Watson SA, Durrant LG, Crosbie JD, Morris DL. The in vitro growth response of primary human colon cancer and gastric cancer cells to gastrin. *Int J Cancer*, 1989; 43: 692-696.

Watson SA, Durrant LG, Morris DL. Gastrin: growth enhancing effects on human gastric and colonic tumour cells. *Br J Cancer*, 1989; 59: 554-558.

Watson SA, Durrant LG, Morris DL. Growth-promoting action of gastrin on human colonic and gastric tumour cells cultured in vitro. *Br Surg*, 1988; 75: 342-345.

Watson SA, Morris DL, Durrant LG, Robertson JF, Hardcastle JD. Inhibition of gastrin-stimulated growth of gastrointestinal tumour cells by octeotride and the gastrin/cholecystikinin receptor antagonists, proglumide and lorglumide. *Eur J Cancer*, 1992; 28: 1462-1467.

Weinstock J, Baldwin CS. Binding of gastrin 17 to human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 1988; 48: 932-937.

Wertz IE, Hanley MR. Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trend Biochem Sci*, 1996; 21(10): 359-364.

Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schröder M, Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR α by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nuclei Acid Res*, 1995; 23

(3): 327-333.

Wilkes JM, Scott DR, Hersey SJ. Second messengers in the gastric gland: a focus de calcium. *Scand J Gastroenterol*, 1991; Suppl 180: 70-84.

Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, 1993; 74 (5): 777-779.

Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J Pathol*, 1991; 173: 1.

Williams JA, Bailey A, Steigerwalt RW. Effects of proglumide on pancreatic acinar cell function. *Digestion*, 1983, 27: 227-233.

Williamson R. Properties of rapidly labelled AND fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embrionic mouse liver cells. *J Mol Biol*, 1970; 51: 157.

Willians JA, Blevins GT. Cholecystokinin and the regulation of pancreatic acinar cell function. *Physiol Rev*, 1993; 73: 701-723.

Wingo P, Tong T, Bolden S. Cancer stadistics 1995. *Cancer*, 1995; 5: 8.

Winsett OE, Townsend CM, Glass EJ, Thompson JC. Gastrin stimulated growth of colon cancer. *Surgery*, 1986; 99: 302-307.

Wolfe MM, Tseng CC. The gastrin (or is it CCK-B) receptor on parietal cell is cloned. *Gastroenterology*, 1993; 104 (6): 1876-1878.

Wolfe MM. Gastrin is a potent stimulant of the parietal cell –maybe-. *Gastroenterology*, 1992; 102 (1): 365-367.

Wong K, Beardshall K, Waters CM, Calam J, Poston GJ. Postprandial hypergastrinemia in patients with colorectal cancer. *Gut*, 1991; 32:1352-1354.

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 1980; 68:-306.

Wyllie AH, Kerr JFR, Macaskill IAM, Currie AR. Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. *J Pathol*, 1973; 111: 85.

Ying S.W., Niles L.P., Crocker C. Human malignant melanoma cells express high-affinity receptors for melatonin: Antiproliferative effects of melatonin and 6-chloromelatonin. *Eur J Pharmacol*, 1993; 246: 89-96.

Yu DH, Huang SC, Wank SA, Mantey S, Gardner JC, Jensen RT. Pancreatic receptors for cholecystokinin: evidence for three receptor classes. *Am J Physiol*, 1990; 258: G86-G95.

Yu MJ, McCowan JR, Mason NR, Deeter JB, Mendelsohn LG. Synthesis and X-ray crystallographic analysis of quinazolinone cholecystokinin: gastrin receptor ligands. *J Med Chem*, 1992; 35: 2534-2542.

Yu MJ, Thrasher KJ, McCowan JR, Mason NR, Mendelsohn LG. Quinazolinone cholecystokinin-B receptor ligands. *J Med Chem*, 1991; 34: 1505-1508.

Zimojic DB, Popescu NC, Matsui T, Chihara K. Localization of human cholecystokinin-B/gastrin receptor gene (CCKBR) to chromosome 11p 15.5 15.4 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1994; 65: 184-185.